



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

Facultad de Ciencias Experimentales

Departamento de Biología y Geología

Área de Genética

Mecanismos genéticos y
moleculares que conectan la
determinación del meristemo floral
y el desarrollo del fruto de tomate



Tesis Doctoral
Laura Castañeda Cruz
Almería, octubre 2021



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES
Departamento de Biología y Geología

**Mecanismos genéticos y moleculares que conectan
la determinación del meristemo floral y el
desarrollo del fruto de tomate**

Laura Castañeda Cruz
Almería, octubre 2021

TESIS DOCTORAL

Mecanismos genéticos y moleculares que conectan la determinación del meristemo floral y el desarrollo del fruto de tomate

Genetic and molecular mechanisms linking floral meristem determination and fruit development in tomato

Trabajo realizado en el Área de Genética y en el Área de Fisiología Vegetal, Departamento de Biología y Geología, Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Almería, por LAURA CASTAÑEDA CRUZ, Ingeniera Química por la Universidad de Almería. Dicho trabajo se ha llevado a cabo en el ámbito del Programa de Doctorado “Biotecnología y Bioprocesos Industriales Aplicados a la Agroalimentación y Medioambiente”, para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Almería.

Fdo. Laura Castañeda Cruz
Almería, 1 de octubre de 2021

El Dr. Rafael Lozano Ruíz, Catedrático de Genética de la Universidad de Almería y la Dra. María Estela Giménez Caminero, Profesora Ayudante Doctor de la Universidad Politécnica de Madrid,

HACEN CONSTAR

Que el presente trabajo ha sido realizado bajo nuestra dirección y recoge fielmente la labor realizada por Laura Castañeda Cruz, Ingeniera Química, para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Almería. Las investigaciones reflejadas en esta memoria se han llevado a cabo en las Áreas de Genética y Fisiología Vegetal, Departamento de Biología y Geología, Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Almería.

Y para que así conste, expiden y firman el presente en Almería, a 1 de octubre de 2021.

Fdo. Rafael Lozano Ruíz

Fdo. M^a. Estela Giménez Caminero

PUBLICACIONES

Los resultados y conclusiones descritas en la presente Memoria han sido objeto de las siguientes publicaciones en revistas científicas incluidas en el *Journal of Citation Reports* (JCR):

- Giménez, E., Castañeda, L., Pineda, B., Pan, I.L., Moreno, V., Angosto, T. & Lozano, R. (2016). TOMATO *AGAMOUS1* and *ARLEQUIN/TOMATO AGAMOUS-LIKE1* MADS-box genes have redundant and divergent functions required for tomato reproductive development. *Plant Molecular Biology*, 91(4-5), 513-531.
- Pérez-Martín, F., Yuste-Lisbona, F.J., Pineda, B., Angarita-Díaz, M.P., García-Sogo, B., Antón, T., Sánchez, S., Giménez, E., Atarés, A., Fernández-Lozano, A., Ortiz-Atienza, A., García-Alcázar, M., Castañeda, L., Fonseca, R., Capel, C., Goergen, G., Sánchez, J., Quispe, J.L., Capel, J., Angosto, T., Moreno, V. & Lozano, R. (2017). A collection of enhancer trap insertional mutants for functional genomics in tomato. *Plant Biotechnology Journal*, 15(11), 1439-1452.
- Castañeda, L., Giménez, E., Pineda P., García-Sogo, B., Ortiz-Atienza, A., Micol-Ponce, R., Angosto, T. Capel, J., Moreno, V., Yuste-Lisbona, F.J. & Lozano, R. (2021). Tomato *CRABS CLAW* paralogues act with chromatin remodelling factors to trigger floral determinacy. *Nature Plants* (en evaluación).

FINANCIACIÓN

Este trabajo ha sido financiado por los siguientes proyectos de investigación:

- Identificación, etiquetado y análisis funcional de genes implicados en el cuajado del fruto de tomate y en la tolerancia a la salinidad en especies silvestres relacionadas (AGL2012-40150-C03-02), financiado por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad.
- *Breeding for Resilient, Efficient and Sustainable Organic Vegetable production* (BRESOV), financiado por el Programa de Investigación e Innovación de la Unión Europea Horizonte 2020 (No. 774244).

Asimismo, las actividades de I+D descritas en la presente Memoria han recibido el apoyo de los fondos UE-FEDER y del Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (CeIA3).

AGRADECIMIENTOS

Al acercarse el momento de la defensa de mi tesis doctoral me gustaría dedicar unas palabras de agradecimiento a todos los que habéis hecho posible que hoy este escribiendo estas líneas.

A mis directores, Rafael Lozano y Estela Giménez, por haberme guiado en este camino con vuestra dedicación y entrega. A Rafa, por abrirme las puertas del grupo de investigación y brindarme la oportunidad de desarrollar esta tesis. Gracias también por tu paciencia y los ánimos en los momentos más duros, por enseñarme a ser inconformista y a buscar siempre la excelencia. A Estela, por creer en mí y sacar mi mejor versión, no solo en la ciencia, sino en la vida. Gracias por haberme enseñado con tanta generosidad a trabajar en el laboratorio, por las horas de invernadero y las de reflexión. En definitiva, gracias amiga por entrar en mi vida para quedarte.

A Juan Capel, gracias por descubrirme el laboratorio de genética y animarme a empezar esta carrera apasionante. A Trinidad Angosto, por convertir lo difícil en fácil solucionando mil y un contratiempos siempre con una sonrisa. Gracias a los dos por estar siempre dispuestos a ayudar con vuestra experiencia y conocimiento.

A Fernando Yuste, por haber sido guía, compañero y amigo. Es mucho lo que tengo que agradecerte, pero sobre todo gracias por estar siempre al pie del cañón, por tu infinita paciencia y hacerme ver el vaso medio lleno.

A todos mis compañeros del laboratorio, por haber hecho de él el mejor lugar para aprender y trabajar cada día. A María Salinas, Bea, Rocío Torreblanca, Blanca y Jorge, con los que compartí parte de esta travesía y de los que guardo un bonito recuerdo. A Carmen Capel y Rocío Fonseca, gracias por vuestra buena disposición ayudar siempre que os he necesitado. A Fernando Pérez, por acogerme y enseñarme tanto en los primeros meses. Gracias por dejarme en herencia el mutante que tantas satisfacciones me ha dado y tantas horas de sueño me ha robado. Quiero agradecer también a las nuevas y no tan nuevas incorporaciones al laboratorio: Abraham, Juan

Diego, Kiko, Cristina, Ricardo, Jose, Victoria y Teresa por traer aires nuevos, sabiduría a raudales, memes, risas, comida real y otras fantasías. Gracias por aguantar mi bipolaridad de los últimos meses.

No puedo dejar de agradecer a los que empezasteis siendo compañeros y os habéis convertido irremediabilmente en parte de mi vida. A Manolo, por tu alegría y tu risa contagiosa, los conciertos, la agenda cultural y todos esos ratos en nuestro laboratorio de clausura. A Maca, porque no hay nadie como tú para convertir en carcajadas los peores dramas. A Rosa, por aportar otro punto de vista y ser un apoyo constante desde la distancia. A Sandra, mi “compañera de piso”, por estar siempre dispuesta a todo, por los desahogos y los buenos ratos que hemos compartido. A Ana y Toñi porque sin dudarlo sois lo mejor que me ha pasado en estos años, conoceros ha sido un regalo. Sin vosotras seguramente este día no habría llegado. Gracias y mil veces gracias.

A mis amigos, por aguantar chapas interminables quedada tras quedada y adaptar sus horarios a mis “horas extra”. En especial a Maru, Gloria, Mabi, Taty y Carre por estar incondicionalmente desde que puedo recordar.

A Jose, gracias por tu comprensión, generosidad y apoyo en los momentos más difíciles. Por enseñarme que las ganas pueden más que la distancia. Gracias por traerme paz.

A mi familia, abuelos, tíos y primos por estar siempre y creer en mí. A Isabel y Antonio, por tantas noches de sushi y ciencia. A Sergia y José Diego, por su cariño, comprensión y ser el pegamento que nos mantiene unidos. A Beatriz, por sujetarme y no dejar que me pierda. A Celia y Sofía por su alegría y las noches de pijamas. A mi hermano Carlos, por los juegos, los debates, las risas y por poner cordura a mis desvaríos de hippie. A mis padres, por habernos dado todas las oportunidades y haberme empujado a perseguir mis sueños. Papá, gracias por insistir y no dejarme tirar la toalla. Mamá, eres una heroína de carne y hueso, mi gran apoyo y mi ejemplo a seguir. Ni en mil vidas podré devolverte todo lo que haces por mí. Y por último, a quien más ilusión le haría este día, a mi abuelo José.

A todos, muchas gracias.

A MI FAMILIA



Resumen

Resumen

La formación de flores, como estructuras altamente especializadas que albergan los órganos reproductivos de las plantas, constituye uno de los mayores hitos biológicos y evolutivos de las angiospermas. A pesar de la gran variedad de tamaños, formas y colores que pueden presentar, las flores se desarrollan siguiendo un patrón predeterminado, en el que se distinguen cuatro verticilos de órganos florales, donde los sépalos, pétalos, estambres y carpelos se originan de manera secuencial a partir de dominios celulares específicos que integran el meristemo floral. Una vez las células meristemáticas de cada verticilo han adquirido la identidad de los distintos órganos florales, el meristemo floral debe reprogramarse para terminar su desarrollo, concluyendo así la proliferación y diferenciación de las células meristemáticas. Este proceso de determinación floral obedece a una regulación genética precisa y debe estar coordinado con el programa de diferenciación de los distintos órganos florales, y más concretamente con el desarrollo de carpelos. De esta forma, la determinación floral ocurre en un momento específico del desarrollo, una vez se ha formado un número preciso de carpelos, específico para cada especie. Este proceso se encuentra estrechamente ligado al número de lóculos que formarán el fruto, lo que supone un rasgo de especial importancia agronómica toda vez que define caracteres como la forma y el tamaño del fruto, así como otros de calidad interna de este (textura, jugosidad, contenido en sólidos solubles, acidez, etc.). En una planta modelo como tomate (*Solanum lycopersicum* L.), el conocimiento detallado de los genes y mecanismos moleculares implicados en el proceso de determinación floral no solo constituye un objetivo fundamental para la biología del desarrollo, sino que tiene una evidente repercusión para la mejora genética y la producción hortícola.

A fin de profundizar en el mecanismo genético y molecular que regula la determinación de la actividad del meristemo floral, en la presente Tesis Doctoral se han llevado a cabo el análisis genético y la caracterización molecular y funcional de un nuevo mutante recesivo de tomate denominado *fruit iterative growth* (*fig*). Las plantas homocigotas para el alelo *fig* presentan un fenotipo de penetrancia incompleta y expresividad variable que, en su versión más severa, se caracteriza por el desarrollo de un elevado número de sépalos, pétalos, estambres y, muy especialmente,

de carpelos, lo que conduce a la formación de frutos indeterminados, con el consiguiente crecimiento de frutos secundarios que emergen desde el interior del fruto principal, dando lugar al conocido aspecto de “fruto de fruto”.

Mediante técnicas de análisis genético y mapeo por secuenciación masiva (*mapping by sequencing*) se ha aislado y caracterizado el gen *Solanum lycopersicum* *CRABS CLAWa* (*SICRCa*), que codifica un factor de transcripción de la familia YABBY. Si bien este gen no ha sido estudiado en tomate, su homólogo en *Arabidopsis thaliana*, *CRABS CLAW* (*CRC*), representa un factor crucial en la regulación del desarrollo de carpelos, la determinación del meristemo floral y la formación de los nectarios.

El análisis funcional y molecular del gen *SICRCa*, y de su parálogo, *SICRCb*, indica que la actividad de ambos se rige por un mecanismo de compensación activa que regula la determinación del meristemo floral. Así mismo, hemos podido demostrar que *SICRCa* y *SICRCb* funcionan de manera parcialmente redundante para garantizar el correcto desarrollo de la flor y el fruto. Igualmente importante, este estudio aporta además evidencias de que las proteínas parálogas SICRC forman parte de un complejo remodelador de la cromatina junto con SIIMA, SIKNU, SITPL1 y SIHADA1 que regula la expresión de *SIWUS*, a fin de promover la determinación floral y asegurar la correcta formación del gineceo.

Por su parte, un estudio de complementación del mutante *crc-1* de *Arabidopsis* mediante la expresión de los parálogos *SICRC* de tomate bajo el control del promotor del *locus CRC* de *Arabidopsis*, ha permitido concluir que los *loci SICRCa* y *SICRCb* cumplen una función homóloga a la de *CRC* en lo relativo al desarrollo de los carpelos y la determinación del meristemo floral, no así en la formación de los nectarios, órganos de los que carecen las especies del género *Solanum*.



Summary

Summary

The formation of flowers, as highly specialized structures that house the reproductive organs, constitutes one of the major biological and evolutionary milestones of angiosperms. Despite the great variety of sizes, shapes and colours that they can present, flowers are developed following a predetermined pattern, in which four floral organ whorls, i.e. sepals, petals, stamens and carpels are sequentially differentiated from specific cellular domains of the floral meristem. Once the meristematic cells of each whorl have acquired the appropriate identity of the different floral organs, the floral meristem must be reprogrammed to complete its development, thus concluding proliferation and differentiation of the meristematic cells. This process of floral determination obeys a precise genetic regulation and must be coordinated with the differentiation program of the floral organs, and more specifically with the development of carpels. In this way, the floral determination should occur at a specific moment of development, once a precise number of carpel primordia have been initiated. This process is closely linked to the number of locules that will form the fruit, which is a trait of special agronomic importance since it defines characters such as the shape and size of the tomato fruits, as well as other internal quality of the fruit (texture, juiciness, soluble solids content, acidity, etc.). In a model plant such as tomato (*Solanum lycopersicum* L.), further knowledge of the genetic factors and the molecular mechanism involved in floral determinacy not only is a fundamental objective for developmental biology, but also has an evident repercussion for plant breeding and horticultural production. Mapping-by-sequencing strategies have allowed us to isolate and characterize *Solanum lycopersicum* *CRABS CLAWa* (*SICRCa*) gene, which encodes a YABBY transcription factor. Although this gene has not been characterized in tomato so far, its homologous in *Arabidopsis thaliana*, *CRABS CLAW* (*CRC*), has been described as a key factor for carpel formation, floral meristem determinacy and nectary formation.

Functional and molecular analyses of the *SICRCa* gene and its paralogue *SICRCb*, indicate that both YABBY members have developed an active compensation mechanism to regulate floral meristem determination and that they operate in a partially redundant manner for safeguarding the proper formation of flowers and fruits. Furthermore, this study provides

evidence for the putative role of SICRC paralogues in tomato as members of a chromatin remodelling complex together with SIIMA, SIKNU, SITPL1 and SIHADA1 to regulate *SIWUS* expression in order to promote floral determination and asses the correct gynoecium formation.

Likewise, a complementation study of the Arabidopsis *crc-1* mutant by the expression of the *CRC* paralogues in tomato under the control of the *CRC* promoter led to the conclusion that the *SICRCa* and *SICRCb* loci have a homologous function to the Arabidopsis *CRC* gene regarding to carpel formation and fusion, and floral meristem determinacy.



Índice

Resumen	XVII
Summary	XXI
Introducción	1
1. El tomate	1
1.1. Origen y distribución geográfica	1
1.2. Taxonomía	2
1.3. Descripción botánica	3
1.4. Importancia económica y nutricional	5
1.5. El tomate como especie modelo	7
2. El meristemo apical del tallo	9
2.1. Estructura y organización del SAM	10
2.2. Control genético de la función meristemática: la ruta CLAVATA-WUSCHEL	12
2.3. Otros genes implicados en la actividad del SAM	14
2.4. Regulación hormonal del SAM: papel de las citoquininas	16
3. La transición floral	18
3.1. Inducción de la floración e identidad del meristemo floral	18
3.2. Identidad de los órganos florales	24
3.3. Regulación hormonal durante el desarrollo floral	30
4. La determinación del meristemo floral	33
4.1. La ruta AGAMOUS-WUSCHEL: funciones directas e indirectas de AGAMOUS en la represión de <i>WUSCHEL</i>	33
4.1.1. Represión directa de <i>WUSCHEL</i> : la función de las proteínas PcG	36
4.1.2. Represión indirecta de <i>WUSCHEL</i> : AGAMOUS activa la función de <i>KNUCKLES</i>	37
4.2. Papel de <i>CRABS CLAW</i> en la determinación floral y la regulación de la homeostasis de auxinas	41
4.3. Conservación y divergencia funcional de <i>CRABS CLAW</i> en angiospermas	45

Índice

4.4. Otros genes implicados en la determinación floral	50
5. El desarrollo del fruto de tomate	54
Objetivos	59
Materiales y métodos	63
1. Material vegetal y condiciones de cultivo	63
2. Caracterización fenotípica de flores y frutos de tomate	64
3. Análisis de Southern blot	65
4. Mapeo mediante secuenciación (<i>mapping by sequencing</i>)	65
5. Genotipado del gen <i>SICRCa</i> mediante PCR	67
6. Generación de líneas transgénicas de tomate	68
7. Extracción de ARN y análisis de expresión mediante RT-qPCR	69
8. Secuenciación de ARN (RNA-Seq)	70
9. Análisis de expresión mediante hibridaciones <i>in situ</i>	71
10. Complementación molecular del mutante <i>crc-1</i> de <i>Arabidopsis</i>	72
11. Localización subcelular y ensayos de complementación de fluorescencia bimolecular	73
12. Ensayos de coimmunoprecipitación	75
13. Alineamiento de secuencias y análisis de microsintenia	76
Resultados	79
1. Caracterización fenotípica y análisis genético del mutante <i>fruit iterative growth (fig)</i>	79
2. Aislamiento y caracterización molecular de la mutación <i>fig</i>	86
3. Análisis funcional del gen <i>SICRCa</i>	91
4. Análisis funcional del gen <i>SICRCb</i> y caracterización de la interacción entre los parálogos <i>SICRC</i>	99
5. Análisis funcional de los parálogos <i>SICRC</i> en la determinación del meristemo floral	105
6. Interacción de los parálogos <i>SICRC</i> con los genes <i>TAG1</i> y <i>TAGL1/ALQ</i>	111

7.	Complementación molecular del mutante <i>crc-1</i> de Arabidopsis	114
	Discusión	119
1.	Los genes parálogos <i>SICRC</i> de tomate son necesarios para el desarrollo del carpelo	119
2.	Los parálogos <i>SICRC</i> de tomate regulan la determinación del meristemo floral mediante la inhibición de <i>SIWUS</i>	124
3.	Redundancia funcional y compensación entre los parálogos <i>SICRC</i>	128
4.	Conservación y divergencia funcional de los parálogos <i>SICRC</i>	130
5.	Los genes <i>SICRC</i> podrían coordinar el desarrollo de carpelos y la determinación del meristemo floral de tomate.	133
	Conclusiones	141
	Bibliografía	147
	Anexos	195

Apéndice de figuras tablas y anexos

Figura 1. Desarrollo vegetativo y órganos reproductivos de la planta de tomate.

Figura 2. Evolución de la producción de tomate en fresco y la superficie cosechada en el mundo durante el periodo 1990-2019.

Figura 3. Estructura y organización del SAM de Arabidopsis.

Figura 4. Representación esquemática de la ruta meristemática CLV-WUS.

Figura 5. Control de la actividad meristemática en el SAM mediada por citoquininas en la especie modelo *A. thaliana*.

Figura 6. Representación esquemática de la transición floral y sus distintas etapas

Figura 7. Representación esquemática de las rutas reguladoras de la floración propuestas en la especie *A. thaliana*.

Figura 8. Transición floral en tomate.

Figura 9. Modelos génicos propuestos para regular la identidad floral.

Figura 10. Representación esquemática de las funciones directas e indirectas de AGAMOUS en la represión de *WUSCHEL* en el meristemo floral.

Figura 11. Fenotipo de fruto de los mutantes de clase C en tomate.

Figura 12. Ruta indirecta de represión AG-KNU-WUS en *A. thaliana*.

Figura 13. Represión de *SIWUS* en tomate.

Figura 14. Representación esquemática de la activación transcripcional del gen *YUC4*.

Figura 15. Representación esquemática de la ruta reguladora de la determinación del meristemo floral mediada por AGAMOUS en Arabidopsis.

Figura 16. Esquema de las principales funciones adquiridas por la subfamilia de genes *CRC* durante la diversificación de las angiospermas.

Figura 17. Fenotipos de indeterminación de flor y fruto en tomate.

Figura 18. Frutos de tomate con anomalías en el cierre pistilar.

Apéndice de tablas figuras y anexos

Figura 19. Caracterización fenotípica del mutante *fig*.

Figura 20. Variabilidad morfológica del fruto observada en plantas de fenotipo severo del mutante *fig*.

Figura 21. Diferenciación de los primordios de carpelos en los estadios 5 y 8 del desarrollo floral de plantas mutantes *fig*.

Figura 22. Formación del gineceo en los estadios 5, 9 y antesis (AD) del desarrollo floral de mutantes *fig*.

Figura 23. Caracterización molecular de la correlación fenotipo mutante *fig*– inserción de T-DNA en plantas de fenotipo mutante T₀, T₁ y T₂.

Figura 24. Mapeo mediante secuenciación masiva de la mutación *fig*.

Figura 25. Caracterización molecular del gen *S1CRCa*.

Figura 26. Caracterización fenotípica y expresión del gen *S1CRCa* en líneas T₀ RNAi *S1CRCa*.

Figura 27. Caracterización fenotípica y molecular de líneas T₀ CR-*slcrca*.

Figura 28. Análisis espacio-temporal del patrón de expresión de *S1CRCa*.

Figura 29. Árbol jerárquico de los términos ontológicos GO (del inglés, *Gene Ontology*) correspondiente a los genes diferencialmente expresados en botones florales *fig* respecto a los WT.

Figura 30. Análisis de microsintenia entre bloques genómicos que albergan a los genes *CRC* en *Arabidopsis* y tomate.

Figura 31. Análisis espacio-temporal del patrón de expresión de *S1CRCb*.

Figura 32. Caracterización de líneas T₀ CR-*slcrcb*.

Figura 33. Análisis de expresión de los parálogos *S1CRC* en mutantes nulos (líneas CRISPR) CR-*slcrca* y CR-*slcrcb*.

Figura 34. Caracterización fenotípica de flores y frutos desarrollados por líneas dobles mutantes CR-*slcrca:slcrcb*.

Figura 35. Morfología de las células epidérmicas de los órganos del tercer y cuarto verticilo de flores WT y dobles mutantes CR-*slcrca:slcrcb*.

Apéndice de figuras tablas y anexos

Figura 36. Expresión espacio-temporal de *SIWUS* en flores mutantes (CR-*slcrca*, CR-*slcrCb* y CR-*slcrca:slcrCb*) y WT.

Figura 37. Localización subcelular de las proteínas SICRCa y SICRCb.

Figura 38. Estudio *in vivo* de las interacciones proteína-proteína de los parálogos SICRC mediante complementación de fluorescencia bimolecular (BiFC).

Figura 39. Estudio *in vivo* de las interacciones proteína-proteína de los parálogos SICRC mediante coimmunoprecipitación (CoIP).

Figura 40. Características fenotípicas de los mutantes simples *tag1* y RNAi *TAGL1*, y del doble mutante *tag1:RNAi TAGL1*.

Figura 41. Análisis de expresión de los parálogos *SICRC* de tomate en botones florales (estadios de desarrollo 0 a 12) de los mutantes simples *tag1* y RNAi *TAGL1*, y del doble mutante *tag1:RNAi TAGL1*.

Figura 42. Complementación del mutante *crc-1* de *Arabidopsis* mediante transformación genética con los parálogos *SICRC* de tomate.

Figura 43. Transformación genética de plantas WT de *Arabidopsis* (*Ler*) con los parálogos *SICRC* de tomate.

Figura 44. Modelo que integra a las proteínas SICRCa y SICRCb en el complejo proteico implicado en la represión de *SIWUS*.

Tabla 1. Producción de tomate, superficie cultivada y rendimiento en los principales países productores de tomate del mundo en 2019.

Tabla 2. Secuencias de los cebadores utilizados para el genotipado de *SICRCa* y las construcciones RNAi y CRISPR / Cas9.

Tabla 3. Cebadores utilizados para los análisis de expresión.

Tabla 4. Cebadores utilizados para el ensayo de complementación del mutante *crc-1* de *A. thaliana*.

Tabla 5. Cebadores utilizados para clonar la secuencia codificante de los genes estudiados en los ensayos de localización subcelular e interacciones proteína-proteína en el vector pENTR/D-TOPO.

Apéndice de tablas figuras y anexos

Tabla 6. Número de órganos desarrollados por flores mutantes *fig* con fenotipo *WT-like*, débil y severo, en relación con las flores wild-type (WT).

Tabla 7. Parámetros que caracterizan a los frutos mutantes *fig* maduros de fenotipo *WT-like*, débil y severo, en relación con los producidos por plantas wild-type (WT).

Tabla 8. Regiones LTR del genoma de tomate homólogas a la secuencia de 367 pb inserta en el cuarto intrón del gen *Solyc01g010240*.

Anexo I. Lista de genes diferencialmente expresados en botones florales *fig* respecto a los WT ($P < 0,05$).

Anexo II. Análisis funcional de enriquecimiento de los términos *Gene Ontology* (GO) en botones florales *fig* respecto al WT.



Introducción

Introducción

1. El tomate

1.1. Origen y distribución geográfica

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es un cultivo originario de la región andina que abarca desde el sur de Colombia hasta el norte de Chile, y desde la costa del Pacífico, incluidas las islas Galápagos, a las estribaciones orientales de los Andes. Actualmente, la especie *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* se considera el ancestro más probable del actual tomate cultivado de frutos grandes y habría sido domesticado a partir de la especie silvestre *Solanum pimpinellifolium* (Ranc *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2014).

Mientras que la especie *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* crece en los ambientes húmedos de Ecuador y Perú y en el borde oriental de la cuenca del Amazonas, *S. pimpinellifolium* ocupa las costas y valles peruanos más secos y la costa ecuatoriana más húmeda. Así, a pesar de que no existe una barrera reproductiva entre *S. pimpinellifolium* y *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*, la cordillera de los Andes supone una barrera física y ecológica para la reproducción cruzada entre estas especies. Este hecho condujo a la formulación de varias hipótesis acerca del lugar y la fecha en las que se habría producido el proceso de domesticación (Rick & Butler, 1956). Actualmente, gracias a los datos moleculares y morfológicos presentados por Blanca y colaboradores en 2012, la hipótesis más aceptada propone que este proceso se produjo en dos etapas. La primera de ellas consistiría en una selección de *S. pimpinellifolium* o *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* primitiva por parte de los primeros agricultores que habría resultado en el *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* ecuatoriano y del norte de Perú. La segunda etapa probablemente habría ocurrido en Mesoamérica y consistiría en una selección adicional de estos *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* predomesticados que habría dado lugar a las variedades tradicionales de fruto grande (Blanca *et al.*, 2012, 2015).

Ya en el siglo XVI los españoles introdujeron el cultivo del tomate en el sur de Europa, donde su uso se limitó al ornamental debido a que durante más de un siglo fue considerado una especie venenosa por su proximidad

taxonómica con otras solanáceas venenosas como la mandrágora (*Mandragora autumnalis* L.) o la belladona (*Atropa belladonna* L.) (Rick, 1978). No fue hasta mediados del siglo XVIII cuando el tomate pasó a formar parte de la alimentación europea y se inició su distribución por Oriente Medio, África, Filipinas, Asia, Estados Unidos y Canadá, siendo actualmente uno de los principales cultivos hortícolas del mundo (Nuez, 1995).

La migración del cultivo de tomate desde Mesoamérica a Europa, y más aún desde Perú y Ecuador a Mesoamérica, supuso un cuello de botella genético como consecuencia de una selección principalmente orientada a la mejora del fruto (Miller & Tanksley, 1990; Williams & St. Clair, 1993; Park *et al.*, 2012; Blanca *et al.*, 2012). Durante los últimos 100 años, los esfuerzos realizados para la mejora del cultivo se han centrado en incrementar la resistencia a determinadas enfermedades y plagas, la adaptación a diversas áreas de producción y la productividad. Además, se ha perseguido conseguir la uniformidad del fruto y otros atributos relacionados con la demanda del mercado como la palatabilidad o la conservación en fresco que han contribuido a una mayor erosión de la variabilidad genética entre los cultivares actuales (Foolad, 2007; Koenig *et al.*, 2013).

1.2. Taxonomía

La clasificación taxonómica del tomate ha experimentado algunas variaciones desde que el naturalista sueco Carl Nilsson Linnæus lo denominara originalmente como *Solanum lycopersicum* en 1753 en su obra *Species Plantarum*. Pocos años después, en 1768, Miller, atendiendo a la morfología de las hojas y el tipo de dehiscencia de las anteras del tomate, lo reclasificó como *Lycopersicon esculentum* Mill. No obstante, en 2001, a partir de numerosos estudios moleculares y morfológicos, el tomate fue nuevamente incluido en el género *Solanum*, aceptando por tanto, la denominación botánica propuesta por Linnæus (Olmstead *et al.*, 1999; Peralta & Spooner, 2001). En la actualidad, la clasificación taxonómica del tomate según la base de datos de referencia ITIS (*Integrated Taxonomic Information System*) es la siguiente:

Reino:	Plantae
Subreino:	Viridiplantae
Infrarreino:	Streptophyta
Superdivisión:	Embryophyta
División:	Tracheophyta
Subdivisión:	Spermatophytina
Clase:	Magnoliopsida
Superorden:	Asteranae
Orden:	Solanales
Familia:	Solanaceae
Género:	<i>Solanum</i> L.
Especie:	<i>Solanum lycopersicum</i> L.

1.3. Descripción botánica

La planta de tomate es una especie dicotiledónea perenne, que se cultiva como anual. Puede desarrollarse de forma erecta o rastrera según sea su hábito de crecimiento determinado o indeterminado, respectivamente. Su sistema radicular está compuesto por una raíz principal corta y débil, abundantes raíces secundarias y raíces adventicias. El tomate sigue un hábito de crecimiento simpodial (Figura 1A). Después de la producción de entre 6 y 12 hojas, que puede variar según el genotipo, el meristemo apical se determina y adquiere identidad reproductiva. De esta forma, se desencadena la transición floral y el desarrollo de la primera inflorescencia. Tras esta transición floral el crecimiento de la planta continua a partir del meristemo axilar de la última hoja desarrollada que pasa a denominarse meristemo simpodial (MS). A continuación, se forma un nuevo segmento simpodial que desarrolla 2 o 3 hojas antes de determinarse y producir una nueva inflorescencia. Este patrón de crecimiento supone la formación de sucesivos segmentos simpodiales con un nuevo evento de transición implícito con cada uno de ellos (Lozano *et al.*, 2009).

El tallo principal de la planta constituye el eje central de entre 2 y 4 cm de diámetro a partir del cual se desarrollan las hojas, los tallos secundarios

(también de ramificación simpodial) en la axila de las hojas y las inflorescencias. Las hojas se disponen de forma alterna y están formadas por entre 7 y 9 folíolos primarios lobulados y de borde dentado. Las inflorescencias de tipo racemoso (dicasio) pueden ser simples o ramificadas, y están compuestas por un número variable de entre 5 y 15 flores (Figura 1B).

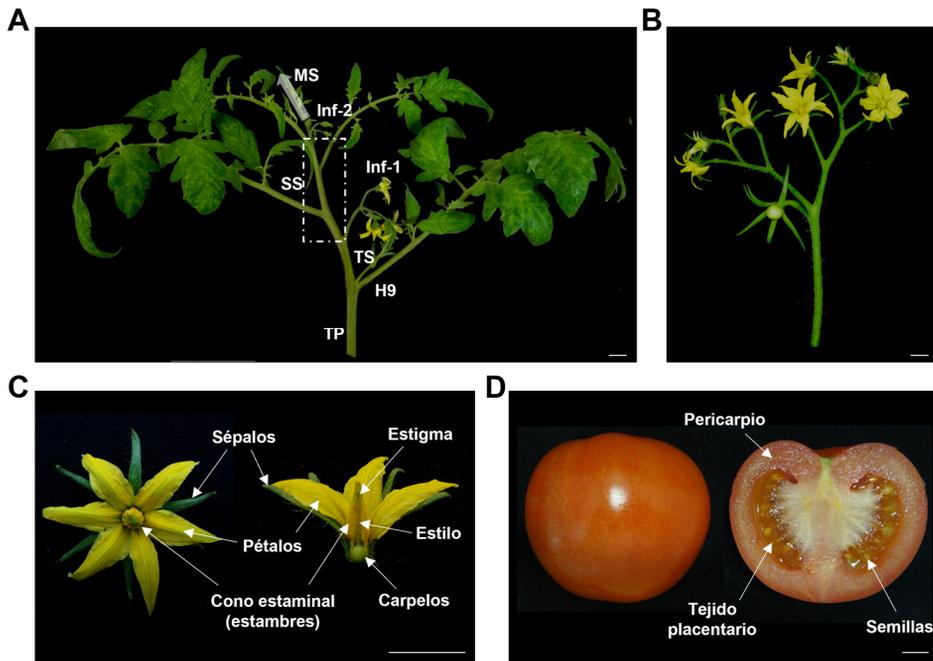


Figura 1. Desarrollo vegetativo y órganos reproductivos de la planta de tomate. (A) Detalle del crecimiento simpodial de tomate. TP: tallo principal, TS: tallo secundario, H9: novena hoja verdadera, Inf-1: primera inflorescencia, Inf-2: segunda inflorescencia, SS: segmento simpodial, MS: meristemo simpodial. **(B)** Inflorescencia de tomate en racimo. **(C)** Flor de tomate y sus distintos órganos. **(D)** Fruto maduro bilocular de tomate. Escala = 1 cm.

La flor de tomate es hermafrodita, actinomorfa e hipógina. La disposición de los órganos florales está organizada en cuatro verticilos concéntricos (Figura 1C). El primer verticilo floral lo integran 5 o más sépalos, dependiendo de la variedad, mientras que el segundo está formado por el mismo número de pétalos amarillos dispuestos en posiciones alternas a los sépalos. Los estambres, fusionados lateralmente, forman el cono estaminal en el tercer verticilo. Cada estambre a su vez está formado por dos anteras que se extienden a lo largo del estambre y un filamento central que sirve

como soporte y aporta el sustento nutricional necesario para la formación del polen. El cono estaminal envuelve al cuarto verticilo en el que se encuentra el gineceo formado por el ovario que contiene los óvulos en su interior. El ovario puede estar formado por dos o más carpelos que se fusionan dando lugar al estilo y el estigma. El estilo y estigma normalmente quedan dentro del cono estaminal, favoreciendo de esta manera la autofecundación que generalmente coincide con el momento de anthesis. Por este motivo, el tomate es considerada una especie autógama (Picken, 1984; Ho & Hewitt, 1986). Tras la fecundación se produce el desarrollo del ovario que se convertirá en un fruto carnoso tipo baya bi o plurilocular, generalmente de color rojo (Figura 1D). El fruto está constituido principalmente por el pericarpio, el tejido placentario y las semillas, y su tamaño varía en función del cultivar y las condiciones ambientales de desarrollo (Chamarro, 1995).

1.4. Importancia económica y nutricional

Las solanáceas, con más de 2700 especies, son la tercera familia del reino vegetal en importancia económica debido a que especies como la berenjena, el pimiento o el tomate se cultivan de manera intensiva a nivel global. El tomate es el cultivo hortícola de mayor importancia económica en el mundo. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), en el año 2019 se cultivaron en el mundo 180 millones de toneladas de tomate en una superficie de 5 millones de hectáreas (FAOSTAT, <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>).

El consumo de tomate está en continuo ascenso en todo el mundo, y con él, su cultivo. Por ello, desde la última década del siglo XX, la producción de tomate se ha incrementado notablemente debido, no tanto al aumento de la superficie cultivada, como al desarrollo de variedades híbridas y la incorporación de altas tecnologías de cultivo que han permitido maximizar los recursos naturales para incrementar la productividad del cultivo (Figura 2).

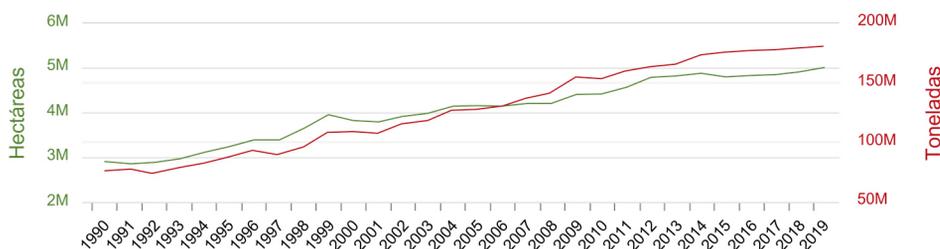


Figura 2. Evolución de la producción de tomate en fresco y la superficie cosechada en el mundo durante el periodo 1990-2019. Fuente: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>

En el año 2019, España, con una producción de 5.000.560 toneladas, fue el segundo productor de tomate de la Unión Europea (UE), y el octavo a nivel mundial. Cabe destacar, que la producción intensiva bajo cubierta desarrollada por la UE ha supuesto un incremento significativo en el rendimiento en relación con la media mundial (Tabla 1).

El tomate es un producto muy versátil en cuanto a su comercialización, ya que podemos encontrarlo en fresco o procesado en forma de zumo, pasta de tomate, o en salsas como el ketchup o la barbacoa. La clave del éxito de este cultivo reside en gran medida en la enorme cantidad y diversidad de variedades cultivadas que difieren en forma, tamaño, color, dureza, textura, sabor y aroma, y que permite la adaptación de la especie a diferentes gustos y usos.

Otra característica destacable del tomate es su valor nutricional. El tomate constituye una importante fuente de micronutrientes como el potasio o el ácido fólico, y antioxidantes como los flavonoides, la vitamina C y los β -carotenos. No obstante, los principales beneficios del consumo de tomate se han atribuido principalmente a su alto contenido en licopeno, un carotenoide que otorga el color rojo a los frutos maduros de tomate. Como antioxidante, el licopeno se caracteriza por frenar o ralentizar las reacciones de oxidación que se producen en las células de nuestro organismo y originan los radicales libres que están directamente relacionados con el envejecimiento celular, enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer. Por ende, diversos estudios señalan que el consumo de tomate confiere un beneficio preventivo ante este tipo de enfermedades (Rao &

Agarwal, 2000; Rao, 2002; Canene-Adams *et al.*, 2005; Basu & Imrhan, 2007; Jatoi *et al.*, 2007).

Tabla 2. Producción de tomate, superficie cultivada y rendimiento en los principales países productores de tomate del mundo en 2019.

Países	Producción (Tm)	Superficie (ha)	Rendimiento (Tm/ha)
China (Continental)	62.764.671	1.082.453	58,0
India	19.007.000	781.000	24,3
Estados Unidos de América	12.841.990	110.760	115,9
Turquía	10.858.990	181.488	59,83
Egipto	6.751.856	173.276	39,0
Italia	5.252.690	91.410	57,5
Irán	5.248.904	121.203	43,3
España	5.000.560	56.940	87,8
México	4.271.914	87.917	48,6
Brasil	3.917.967	54.537	71,8
Resto	44.849.787	2.289.561	
Total Mundo	180.766.329	5.030.545	35,9

Fuente: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>

1.5. El tomate como especie modelo

Arabidopsis thaliana es la especie modelo por excelencia del reino vegetal. A pesar de que la utilización de esta especie modelo ha sido clave en el aislamiento y la identificación de numerosos genes reguladores de distintos procesos de desarrollo vegetativo y reproductivo, se hace necesario el empleo de otra especie como modelo para abordar el estudio de las bases genéticas y moleculares del desarrollo y la maduración de frutos carnosos. El tomate constituye un buen candidato a este respecto debido a sus características biológicas entre las que destaca su sistema de reproducción autógeno, su ciclo de vida corto (entre 6 y 8 semanas), su capacidad de

adaptación a múltiples condiciones ambientales y su aptitud para la transformación genética (Foolad, 2007; Lozano *et al.*, 2009). Además, se dispone de una gran cantidad de recursos fitogenéticos depositados en el *Tomato Genomics Research Centre*, TGRC (<https://tgrc.ucdavis.edu/>), que posee la mayor colección de accesiones de tomate silvestre del mundo, así como una gran cantidad de mutantes monogénicos y líneas de introgresión que constituyen un extraordinario material de partida para la identificación de nuevos genes y funciones génicas relacionadas con caracteres de interés agronómico. Asimismo, existe una gran variedad de colecciones de mutantes generadas mediante la utilización de agentes físicos, como son los neutrones rápidos (Verkerk, 1971; Emmanuel & Levy, 2002) y la radiación gamma (Matsukura *et al.*, 2007), agentes químicos entre los que destaca el etil metano sulfonato (EMS), por su uso sencillo y la producción de una elevada tasa de mutagénesis (Van Harten, 1998; Menda *et al.*, 2004; Watanabe *et al.*, 2007; Sikora *et al.*, 2011), y agentes biológicos como los transposones y las inserciones de ADN exógeno, fundamentalmente T-DNA (Mathews *et al.*, 2003; Martí *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 2011; Carter *et al.*, 2013; Pérez-Martín *et al.*, 2017).

Otras características del tomate que han contribuido a la relevancia científica de la que actualmente goza esta especie, son su naturaleza diploide ($2n = 24$) y el tamaño relativamente pequeño de su genoma (950 Mb), que se distribuye en 12 cromosomas (Michaelson *et al.*, 1991). La eucromatina representa el 25 % del total del genoma y en ella se concentran aproximadamente el 90 % de los genes descritos (Wang *et al.*, 2006; Sato & Tabata 2016). En 2012, un consorcio internacional formado por más de 300 investigadores pertenecientes a institutos públicos de investigación de 10 países (The Tomato Genome Consortium, 2012), publicó la secuencia genómica del cultivar de tomate Heinz 1706 y la de la especie silvestre *S. pimpinellifolium*. Esta publicación supuso un antes y un después en la investigación de la genética del desarrollo y la mejora genómica del tomate favoreciendo la aparición de herramientas sumamente eficaces con las que afrontar el desarrollo de nuevas variedades de tomate más competitivas.

La secuencia completa del genoma de tomate, junto a otros recursos disponibles como mapas físicos y genéticos saturados pueden ser

consultados en numerosas de bases de datos públicas como el DNA-Banco de datos de Japón (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>), *Tomato Functional Genomics Database* (<http://ted.bti.cornell.edu/>), o MIBASE (<http://www.pgb.kazusa.or.jp/mibase/>). Entre ellas cabe destacar la base de datos *SOL Genomics Network* (<https://solgenomics.net/>), que está dedicada exclusivamente a genomas de solanáceas y pone, al servicio del usuario, multitud de recursos bioinformáticos para facilitar la labor investigadora como las secuencias de genes y sus funciones estimadas, la alineación de secuencias, colecciones de ESTs y marcadores moleculares (AFLP, CAPS, dCAPS, SNP, SSR).

Asimismo, a partir de la secuencia del genoma de tomate se han predicho 34.727 genes codificantes, de los cuales 31.741 presentan una alta similitud con genes de *Arabidopsis* y de ellos 30.855 han sido verificados por datos de secuenciación de ARN (RNA-Seq) (The Tomato Genome Consortium, 2012). Sin embargo, solo el 78 % de genes identificados tienen asignada una función génica en base a la homología que muestran sus secuencias respecto a otros genes de función conocida. El restante 22 % aparece anotado como “*unknown protein*”, por lo que el estudio funcional de los genes predichos en el genoma de tomate constituye un objetivo esencial en esta especie.

2. El meristemo apical del tallo

Las plantas son organismos pluricelulares que inician su crecimiento a partir de una única célula, el cigoto. Después de múltiples divisiones, el cigoto comienza a diferenciarse para formar el embrión, proceso que depende del establecimiento de la polaridad apical-basal. Esta polarización responde a la posición que ocupan dos estructuras de células indiferenciadas en el embrión, a saber, el meristemo apical del tallo (SAM; del inglés *Shoot Apical Meristem*) y el meristemo apical de la raíz (RAM; del inglés *Root Apical Meristem*). Las células que constituyen los meristemos se dividen de manera continua y organizada atendiendo a un equilibrio dinámico entre el mantenimiento de la actividad meristemática y la formación de nuevos

órganos y tejidos, que se mantendrá durante todo el desarrollo de la planta. Así, a partir del SAM se origina la parte aérea de la planta, mientras que el RAM permitirá a la formación de las raíces (Evans & Barton, 1997; Aichinger *et al.*, 2012).

2.1. Estructura y organización del SAM

La organización de los meristemas es muy similar en todos los vegetales superiores, con al menos tres dominios que se diferencian tanto a nivel funcional como histológico (Figura 3). La zona central (CZ) alberga un conjunto de células madre con una tasa de división lenta que sirve de protección frente a posibles mutaciones, ya que a partir de ellas se originarán tanto los tejidos somáticos como las líneas germinales. La división de las células madre dará lugar a células hijas que se desplazan hacia la zona periférica (PZ) e interna (RZ) del meristemo. En la PZ, que rodea a la zona central, las células se dividen más rápido y se diferencian para formar los primordios de las hojas y los meristemas reproductivos, mientras que las células de la RZ se diferencian para formar los primordios de los tejidos internos del tallo. Estos dominios funcionales quedan definidos por señales específicas procedentes del centro organizador (CO), un pequeño grupo de células situadas en la base de la zona central que promueven la inducción y el mantenimiento del número apropiado de células madre en cada uno de ellos (Figura 3A). Habida cuenta de que el destino de cada célula del SAM está determinado principalmente por la información que proporciona su posición, son necesarios mecanismos de señalización continua entre las células vecinas de las distintas zonas (Perales & Reddy, 2012).

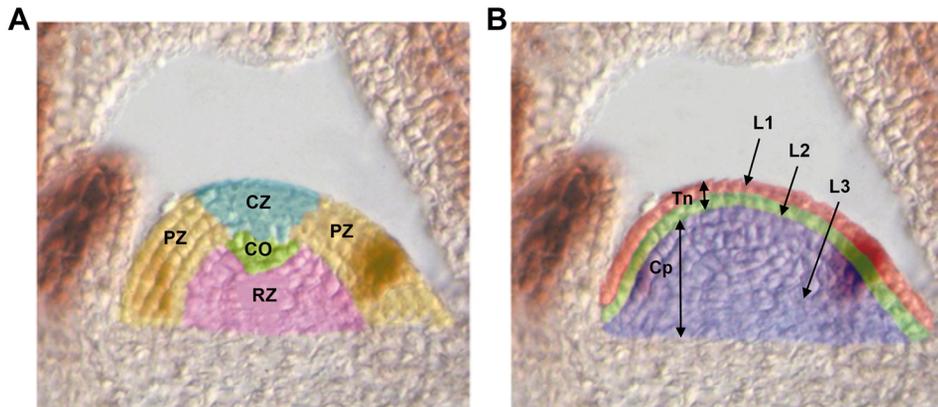


Figura 3. Estructura y organización del SAM de Arabidopsis. (A) Organización funcional del SAM. CZ: zona central, PZ: zona periférica, RZ: zona interna, CO: centro organizador. **(B)** Organización anatómica del SAM que incluye las tres capas L1, L2 y L3. Tn: túnica, Cp: corpus. Adaptado de Bowman & Eshed. (2000).

En la mayoría de las dicotiledóneas, la anatomía tisular del SAM incluye a su vez tres capas celulares (L1-L3), que participan tanto en el mantenimiento del SAM como en la formación de los órganos (Figura 3B). Las capas más externas, L1, epidérmica y L2, subdérmica, constituyen la túnica y están formadas por una única célula de espesor, respectivamente. La capa L3, o corpus, se encuentra bajo la túnica y consta de un conjunto de células que se dividen en todos los planos a diferencia de las capas L1 y L2 en las que las células se dividen únicamente en el plano anticlinal. Las células de la capa L1 dan lugar a la epidermis de los brotes, las hojas y las flores, mientras que la capa L2 proporciona el tejido mesodérmico y las células germinales. La capa L3 proporciona los tejidos vasculares y la médula (Satina *et al.*, 1940; Fletcher & Meyerowitz, 2000).

2.2. Control genético de la función meristemática: la ruta CLAVATA-WUSCHEL

El SAM permanece activo durante toda la vida de la planta y mantiene su estructura organizativa gracias al equilibrio que se establece entre la proliferación de células madre y la pérdida continua de células hijas que se diferencian para formar nuevos órganos. El mecanismo molecular que regula este equilibrio se centra en la retroalimentación negativa existente entre el factor de transcripción WUSCHEL (WUS), necesario para mantener la actividad indiferenciada de las células meristemáticas y el péptido señal CLAVATA3 (CLV3), promotor de la diferenciación celular (Figura 4; Brand *et al.*, 2000; Schoof *et al.*, 2000). El gen *WUS* codifica un factor de transcripción que contiene un homeodominio de la familia WUSCHEL-LIKE HOMEODOMAIN (WOX) y se expresa en el centro organizador del SAM, donde inhibe la transcripción de diversos *loci* que regulan positivamente la diferenciación celular (Mayer *et al.*, 1998; Yadav *et al.*, 2013). A su vez, WUS es capaz de moverse entre las células de la CZ donde mantiene el carácter indiferenciado de las células madre e induce la expresión del gen *CLV3* mediante activación directa del promotor de este último (Yadav *et al.*, 2011; Daum *et al.*, 2014; Perales *et al.*, 2016). El péptido señal CLV3 es secretado entonces por la CZ del SAM y percibido por receptores quinasa (RLKs), cuya señalización da lugar a la inhibición de la actividad de *WUS* (Schoof *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2015).

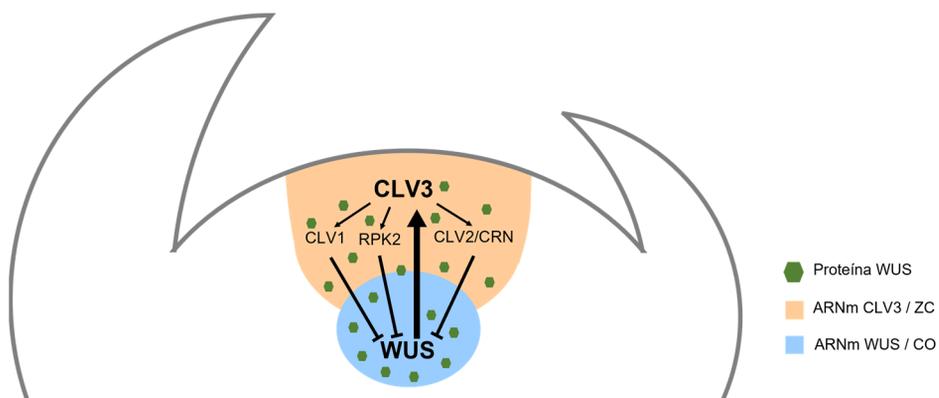


Figura 4. Representación esquemática de la ruta meristemática CLV-WUS. ZC: zona central, CO: centro organizador. Adaptado de Yadav *et al.* (2011).

El gen *CLV3* codifica un péptido de la familia CLAVATA3/ESR-RELATED (CLE) capaz de unirse a las proteínas receptoras CLV. *CLV1* codifica un receptor RLK que contiene dominio extracelular rico en regiones repetidas de leucina (LRR) y un dominio intracelular de quinasas. La proteína *CLV2* es similar a *CLV1*, aunque no posee el dominio receptor de quinasas (Jeong *et al.*, 1999; Carles & Fletcher, 2003; Fiers *et al.*, 2007). Así, mientras *CLV1* forma homodímeros, *CLV2* forma heterodímeros con CORYNE (CRN; syn. SUPPRESSOR OF *LLP1 2* (SOL2)), que actúa como correceptor para la transducción de la señal *CLV3* (Mitchum *et al.*, 2008; Miwa *et al.*, 2008). Entre los múltiples RLKs que participan en la transducción de la señal de *CLV3*, los complejos homodímeros *CLV1* y RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE 2 (RPK2) y el heterodímero *CLV2*-CRN, parecen tener funciones relevantes, dado que los mutantes *clv1*, *rpk2*, *clv2* y *crn* desarrollan fenotipos extremos que afectan al tamaño del meristemo y el desarrollo de brotes vegetativos (Müller *et al.*, 2008; Bleckmann *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2010; Kinoshita *et al.*, 2010; Somssich *et al.*, 2016). De este modo, la cascada de señalización intracelular que se inicia en *CLV3*, restringe la señal de *WUS* en el CO evitando la excesiva proliferación de células madre. Por tanto, la vía *CLV*-*WUS* funciona como un bucle dinámico que permite que el dominio de las células madre y el CO subyacente ajusten continuamente su tamaño entre sí para mantener la homeostasis en el SAM (Schoof *et al.*, 2000).

Por otro lado, en los flancos de los meristemas encontramos tres receptores asociados a quinasas (BARELY ANY MERISTEM 1-3 (BAM1, BAM2 y BAM3)) parálogos a *CLV1*, que forman heterómeros con este y actúan de forma redundante para promover el mantenimiento de las células madre en estas regiones mediante un mecanismo de amortiguación génica (DeYoung *et al.*, 2006). De hecho, en el mutante *clv1* se observa un aumento de los niveles de expresión de los genes *BAM* que compensan la pérdida de función de *CLV1* y disminuyen la severidad del fenotipo mutante (Nimchuk *et al.*, 2015). Estos mecanismos de compensación proporcionan una gran plasticidad al desarrollo del SAM haciendo que se mantenga la homeostasis de células madre en el meristemo a pesar de la pérdida de función de alguno de los genes implicados en la ruta *CLV*-*WUS*, lo cual es indispensable para el crecimiento y desarrollo de la planta (Diss *et al.*, 2014).

La base genética y molecular del mecanismo subyacente a la ruta CLV-WUS ha sido desentrañada a partir del análisis de mutantes y estudios de genética reversa, principalmente en *Arabidopsis*. El mutante *wus* presenta un SAM defectuoso, incapaz de mantener su tamaño y la función meristemática, y muestra un desarrollo aberrante de la planta a partir de meristemas axilares. Por el contrario, las mutaciones en los genes *CLV* causan un agrandamiento del meristemo que conduce al desarrollo de tallos engrosados, inflorescencias ramificadas y flores y frutos con un mayor número de órganos (Brand *et al.*, 2000; Schoof *et al.*, 2000). Diversos estudios realizados a partir de mutantes que mostraban estos fenotipos en distintas especies como arroz, maíz y tomate, han demostrado que la ruta CLV-WUS se encuentra muy conservada en dicotiledóneas y monocotiledóneas (Nagasawa *et al.*, 1996; Suzaki *et al.*, 2004, 2006, 2008, 2009; Bommert *et al.*, 2005; Hirano, 2008; Pautler *et al.*, 2013; Ohmori *et al.*, 2013). Concretamente, en tomate, se generaron líneas *knock-out* mediante la técnica de edición génica CRISPR/Cas9 de los genes *FASCIATED AND BRANCHED*, *SLCLV2* y *SLCLV3*, homólogos a *CLV1*, *CLV2* y *CLV3* de *Arabidopsis*, respectivamente. El fenotipo de estas tres líneas mutantes confirma la conservación de la ruta CLV-WUS en esta especie modelo ya que exhiben un incremento del tamaño del SAM asociado al desarrollo de inflorescencias ramificadas cuyas flores presentan órganos supernumerarios (Xu *et al.*, 2015).

2.3. Otros genes implicados en la actividad del SAM

A pesar de que la ruta CLV-WUS juega un papel central en el mantenimiento de la estructura y organización del SAM, se han descrito otros factores decisivos en su formación y equilibrio dinámico. Tal es el caso de los factores de transcripción de la familia KNOTTED-like HOMEODOMAIN (KNOX). KNOTTED1 (KN1) fue el primer factor de transcripción con homeodominio aislado en plantas, concretamente en maíz, y su identificación se produjo a partir de un mutante de ganancia de función de maíz en el que se observa el crecimiento de tejido ectópico e indiferenciado en hojas (Freeling & Hake,

1985; Vollbrecht *et al.*, 1991). *KN1* juega un papel esencial en la regulación de la determinación del destino celular en el SAM. En *Arabidopsis*, en cambio, el gen *SHOOTMERISTEMLESS (STM)*, ortólogo de *KN1*, se identificó a partir del mutante de pérdida de función *stm* que se muestra incapaz de establecer y mantener el SAM. De este modo, una vez que el mutante *stm* forma los cotiledones no se desarrollan órganos laterales, como sucede en una planta silvestre (Barton & Poethig, 1993; Long *et al.*, 1996). El gen *STM* es, por tanto, requerido para mantener la indeterminación celular y evitar la diferenciación de las células en el meristemo, donde actúa de forma independiente de *CLV3* y *WUS* (Clark *et al.*, 1996; Gallois *et al.*, 2002; Lenhard *et al.*, 2002). Además, aunque la actividad de *STM* no es necesaria para la inducción de *CLV3*, si lo es para mantener, junto con la actividad de *WUS*, un nivel suficiente de expresión de *CLV3* en la zona central del meristemo (Carles & Fletcher, 2003).

Otros tres genes KNOX de clase I, *KNAT1/BREVIPEDICELLUS (KNAT1/BP)*, *KNAT2* y *KNAT6* se expresan, al igual que *STM*, en la CZ del meristemo y actúan de forma parcialmente redundante con él para reprimir la expresión de los *loci ASYMMETRIC LEAVES 1 y 2 (AS1 y AS2)*, que están implicados en la formación de los órganos laterales (Byrne *et al.*, 2000, 2002; Semiarti *et al.*, 2001). A su vez, *AS1* y *AS2* regulan negativamente la expresión de los genes KNOX en la zona periférica del SAM, promoviendo la diferenciación de los primordios que darán lugar a la formación de nuevos órganos en esta posición (Ori *et al.*, 2000).

Varios miembros de la familia YABBY (YAB) se encuentran implicados en la represión de los genes KNOX, entre ellos: *FILAMENTOUS FLOWER (FIL)* y *YAB3*. Estos genes regulan negativamente a los genes meristemáticos durante el desarrollo de los órganos laterales y promueven la diferenciación de las células axiales en los mismos. Así, los dobles mutantes *yab3:fil* desarrollan meristemos vegetativos y de inflorescencia en lugares inapropiados como son los márgenes de cotiledones, las rosetas y las hojas caulinares, resultantes de la expresión ectópica de los genes *STM*, *KNAT1/BP* y *KNAT2*. Asimismo, la inhibición de los genes YABBY compensa parcialmente la falta de actividad meristemática en los mutantes *stm* (Siegfried *et al.*, 1999; Kumaran *et al.*, 2002).

2.4. Regulación hormonal del SAM: papel de las citoquininas

Las citoquininas juegan un papel destacado en la regulación del SAM, ya que son hormonas esenciales para la división celular de los tejidos meristemáticos y, por tanto, para el mantenimiento de las células madre (Kende & Zeevaart, 1997). De hecho, se conoce que en *Arabidopsis*, altos niveles de citoquininas inducen la expresión ectópica de *WUS* y promueven la indiferenciación de las células vecinas (Müller & Sheen, 2007; Barton, 2010; Zürcher & Müller, 2016).

La actividad de las citoquininas se ve influenciada por su propia biosíntesis, transporte y señalización, tal y como se esquematiza en la Figura 5 (Sakakibara, 2005; Werner *et al.*, 2006). La biosíntesis de citoquininas en *Arabidopsis* está regulada, entre otras, por las proteínas de la familia adenosina fosfato-isopenteniltransferasa (IPT) (Takei *et al.*, 2001; Sakakibara, 2006). Esta familia está formada por 11 miembros entre los que destaca la proteína IPT7, cuya transcripción es inducida en el SAM por STM (Yanai *et al.*, 2005). Asimismo, el gen *LONELY GUY4 (LOG4)* se expresa en la capa celular L1 del SAM y contribuye a la producción de citoquininas (Kurakawa *et al.*, 2007; Kuroha *et al.*, 2009; Gruel *et al.*, 2016). Además, las citoquininas, dependiendo de factores ambientales como la luz o el nitrato disponible en el medio, pueden modular la expresión de *WUS* (Lau & Deng, 2010; Pfeiffer *et al.*, 2016; Landrein *et al.*, 2018).

La señalización de citoquininas está mediada por tres receptores ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE (AHK), a saber, AHK2, AHK3 y AHK4, quienes a su vez activan los reguladores de respuesta ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORS (ARRs; Lee *et al.*, 2019a). Hasta la fecha, se han identificado 22 genes ARR que se dividen en los tipos A y B (Brandstatter & Kieber, 1998; Imamura *et al.*, 1999). Los ARR de tipo B son activadores transcripcionales que promueven la respuesta a citoquininas, mientras que la mayoría de los ARR de tipo A son represores (To *et al.*, 2004; Mason *et al.*, 2005). Así, los ARR-B, como ARR1, ARR10 y ARR12, activan la expresión del gen *WUS* uniéndose directamente a su promotor (Meng *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017b; Zubo *et al.*, 2017; Xie *et al.*, 2018). A su vez, *WUS*

reprime la expresión de los genes *ARR-A*, *ARR5*, *ARR6*, *ARR7* y *ARR15* (Leibfried *et al.*, 2005).

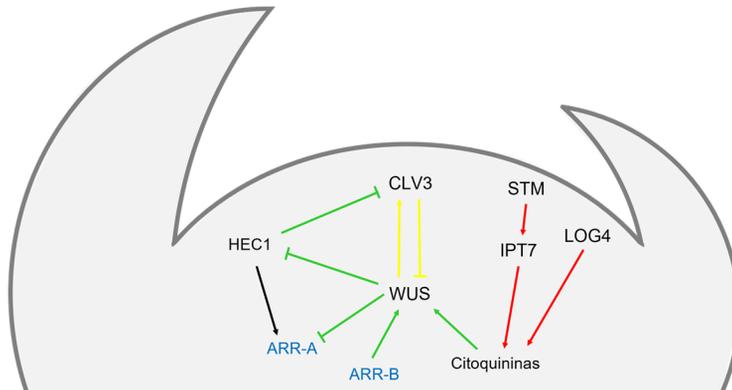


Figura 5. Control de la actividad meristemática en el SAM mediada por citoquininas en la especie modelo *A. thaliana*. Representación esquemática de la biosíntesis (líneas rojas), señalización (color azul) y relación (líneas verdes) de las citoquininas con la ruta meristemática CLV-WUS (líneas amarillas) para controlar la actividad meristemática en el SAM. Adaptado de Lee *et al.* (2019a).

La relación entre la ruta CLV-WUS y las citoquininas está regulada por factores de transcripción específicos como HECATE1 (*HEC1*), con el que forma un bucle de retroalimentación (Lee *et al.*, 2019a). La actividad del gen *HEC1* está directamente reprimida por altas concentraciones de la proteína WUS, por lo que su expresión se extiende por todo el SAM a excepción del centro organizador. A su vez, *HEC1* reprime la expresión de *CLV3* y activa la expresión de los genes *ARR* de tipo A *ARR7* y *ARR15*. Así, los genes *ARR7* y *ARR15* son objetivos directos de *HEC1* y WUS, que los regulan de manera opuesta (Figura 5).

La combinación de los múltiples sistemas de retroalimentación que actúan en paralelo para controlar la actividad meristemática constituye pues, un mecanismo eficaz y fiable para determinar de forma irreversible el destino de las células del SAM.

3. La transición floral

El cambio fisiológico que experimentan las plantas al pasar de una fase de crecimiento vegetativo a otra de desarrollo reproductivo se conoce como transición floral. Este mecanismo sincroniza la información temporal y espacial obtenida por medio de señales endógenas y exógenas de la planta para desarrollar flores en la posición y el momento adecuados, y así garantizar el éxito reproductivo de la misma. A tal efecto, las células del SAM modifican su programa genético de desarrollo para propiciar el cambio de identidad hacia células de un nuevo tipo meristemático, el meristemo de inflorescencia (MI), a partir del cual se desarrollarán los meristemos florales (MF) y finalmente las flores (Figura 6; Poethig, 1990). A pesar de que estos procesos ocurren secuencialmente, existe una interacción funcional entre ellos que confiere robustez y flexibilidad a la transición floral en su conjunto.



Figura 6. Representación esquemática de la transición floral y sus distintas etapas.

3.1. Inducción de la floración e identidad del meristemo floral

La transición floral se produce como resultado de la integración de las distintas respuestas de la planta a una compleja red de señales endógenas y exógenas. A partir del análisis de la variación natural y la caracterización de mutantes de *A. thaliana* afectados en la transición de la fase vegetativa a reproductiva, se han identificado seis rutas principales que participan en este proceso.

Entre las rutas que responden a factores ambientales se encuentran la vernalización, la temperatura ambiente y el fotoperiodo, que se refieren a la aceleración que experimenta la floración cuando la planta se expone a

largos periodos de frio y la regulación de la floración en respuesta a la cantidad de horas de luz que recibe la planta al día. Además, se han encontrado indicios de que la calidad de la luz, así como los nutrientes disponibles en el medio pueden influir en este proceso. Así, la planta coordina el inicio de la floración para que coincida con la época más favorable del año. Por otro lado, las rutas endógenas funcionan independientemente de las señales ambientales para controlar la floración, y están relacionadas con el estado de desarrollo de la planta. Estos factores endógenos aseguran que la floración no se produzca de forma prematura, cuando las plantas son demasiado jóvenes y no se han acumulado suficientes recursos para la floración. Entre ellas encontramos la ruta autónoma, la ruta de las giberelinas y la ruta dependiente de la edad (Srikanth & Schmid, 2011; Andrés & Coupland, 2012; Khan *et al.*, 2014).

Éste entramado de rutas de inducción convergen en la regulación un número discreto de genes conocidos como genes integradores florales que regulan a su vez a los llamados genes de identidad del meristemo floral (FMI; del inglés *Floral Meristem Identity*), siendo así responsables de que la transición de la fase vegetativa a la reproductiva se produzca en el momento preciso cuando las condiciones para florecer son las adecuadas (Figura 7; Fornara *et al.*, 2010).

Los genes homólogos *FLOWERING LOCUS T (FT)* y *TWIN SISTER OF FT (TSF)*, son dos de los integradores florales principales en *A. thaliana*. Ambos genes codifican proteínas móviles que actúan como señales de larga distancia entre las hojas y el SAM y funcionan como activadoras de la transición floral. En estudios previos se ha observado que mientras que la mutación del gen *FT* da lugar a fenotipos severos de floración tardía en condiciones de día largo, la mutación *tsf* tan solo provoca un ligero retraso en el tiempo de floración en presencia de la forma activa de su homólogo. Sin embargo, los dobles mutantes *ft:tsf* presentan un fenotipo aditivo que indica que los genes *FT* y *TSF* actúan de forma redundante promoviendo la inducción floral. Asimismo, ambos genes son regulados de forma similar por el fotoperiodo, la ruta de las giberelinas, la ruta autónoma y la vernalización mediante el control de la expresión del gen represor de la floración *FLOWERING LOCUS C (FLC)* (Yamaguchi *et al.*, 2005; Khan *et al.*, 2014). En

condiciones de día largo, la expresión de *FT* y *TSF* es inducida a través de la acción del gen circadiano *CONSTANT* (*CO*). La transcripción y traducción de *FT* y *TSF* tiene lugar en las hojas y, a continuación, sendas proteínas se desplazan a través del floema hasta el SAM donde interaccionan con la proteína bZIP FLOWERING LOCUS D (*FD*). Los heterodímeros *FT*/*FD* y *TSF*/*FD* intervienen paralelamente en la activación transcripcional de algunos de los genes fundamentales para promover la floración, como son *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1* (*SOC1*), *APETALA1* (*AP1*) y *FRUITFULL* (*FUL*; Andrés & Coupland, 2012).

El gen *SOC1* codifica un factor de transcripción MADS-box y, al igual que *FT* y *TSF*, es reprimido por *FLC* y activado en condiciones de día largo, a través de la acción de *CO* y la presencia de giberelinas (Srikanth & Schmid, 2011). En el SAM, *SOC1* interacciona físicamente con la proteína MADS-box, *AGAMOUS-LIKE 24* (*AGL24*), que es regulada a su vez por la ruta relacionada con el fotoperíodo, la vernalización y la ruta autónoma. *SOC1* y *AGL24* promueven la floración a través de un bucle de activación transcripcional en el que cada uno es capaz de activar la expresión del otro, y conjuntamente activan la expresión del gen *LEAFY* (*LFY*) (Lee *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008).

La expresión de *LFY*, además de ser inducida por *SOC1* y *AGL24*, es activada por la ruta autónoma, la ruta dependiente de la edad y la ruta de las giberelinas. Al caracterizar los mutantes de pérdida de función *lfy*, se observó un retraso en el tiempo de floración, así como el reemplazo de sus flores por estructuras con características propias de brotes inflorescentes. Este fenotipo indica que el gen *LFY* actúa como conector entre la ruta de inducción de floral y los genes FMI (Schultz & Haughn, 1991; Weigel *et al.*, 1992; Nilsson *et al.*, 1998; Srikanth & Schmid, 2011).

Junto a *LFY*, el gen MADS-box *AP1* y su parólogo *CAULIFLOWER* (*CAL*), actúan de forma coordinada para determinar la identidad de meristemos florales, a partir de meristemos laterales que se inician en los flacos de la inflorescencia. Con tal propósito, el gen *LFY* induce la expresión de *AP1* y *CAL* en el meristemo floral y éstos a su vez regulan positivamente la expresión de *LFY* (Bowman *et al.*, 1993; Kempin *et al.*, 1995; Mandel & Yanofsky, 1995; Parcy *et al.*, 1998; Liljegren *et al.*, 1999; Wagner *et al.*,

1999). Otro factor clave en las primeras etapas de este proceso es el gen MADS-box *FUL*, de secuencia nucleotídica muy similar a las de *AP1* y *CAL*, y que actúa de manera redundante con ellos para inducir la formación de las flores a través de la regulación positiva de *LFY* (Ferrándiz *et al.*, 2000).

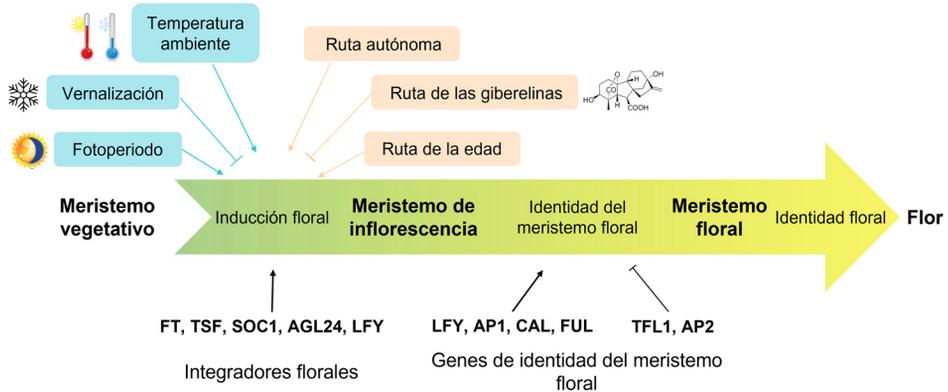


Figura 7. Representación esquemática de las rutas reguladoras de la floración propuestas en la especie *A. thaliana*.

La especificación de la identidad floral del meristemo está regulada negativamente por *TERMINAL FLOWER1* (*TFL1*), que contribuye a este proceso de forma antagónica a los genes FMI mencionados hasta el momento. Así, mientras *LFY*, *AP1*, *CAL* y *FUL* determinan la identidad de meristemo floral, *TFL1* promueve la identidad de inflorescencia. Por ende, un requisito fundamental para que el meristemo de inflorescencia adquiera la identidad de meristemo floral, es garantizar que la expresión de *TFL1* no se produzca en brotes florales. Asimismo, el factor de transcripción *AP2* reprime la floración al unirse directamente al gen *SOC1* para reprimir su transcripción (Yant *et al.*, 2010).

La transición floral en *Arabidopsis* y tomate sigue procesos diferentes debido a características singulares del desarrollo de ambas especies y, en particular, a las que ha propiciado el proceso de domesticación en esta última. Así, el tomate, al contrario que *Arabidopsis*, sigue un patrón de crecimiento simpodial, por lo que la transición floral no constituye un evento único, sino que se produce secuencialmente tras la producción de cada simpodio (Lozano *et al.*, 2009).

Además, el mecanismo que regula el proceso de la transición floral es diferente en tomate al tratarse de una especie de día neutro y, por tanto, independiente del fotoperiodo. Una mutación en el gen que codifica un fitocromo tipo A, homólogo al gen *EID1* de *Arabidopsis*, es responsable de la ralentización del ciclo circadiano en las especies cultivadas de tomate. Este alelo mutante no está presente en las accesiones de especies silvestres de *Solanum* emparentadas con el tomate cultivado, lo que sugiere que los ritmos circadianos lentos han supuesto una ventaja evolutiva para el cultivo del tomate durante su domesticación (Müller *et al.*, 2016). Por tanto, la expresión del gen *SINGLE FLOWER TRUSS (SFT)*, homólogo a *FT* de *A. thaliana*, no está regulada por el fotoperiodo, aunque su sobreexpresión induce la floración temprana, y su pérdida de función la retrasa. Experimentos de *graftin* en los que se usó como patrón donador una planta *35S:SFT* y como esqueje receptor una planta mutante *sft*, pusieron de manifiesto la producción de una señal sistémica por parte del gen *SFT* capaz de complementar los defectos del mutante *sft* (Molinero-Rosales *et al.*, 2004; Lifschitz & Eshed, 2006; Lifschitz *et al.*, 2006).

El *locus SFT* junto con *FALSIFLORA (FA)*, el homólogo del gen *LFY* en tomate, promueven la transición floral en esta especie, tal y como se deduce del notable retraso en el tiempo de floración que experimentan los dobles mutantes *sft:fa* (Figura 8; Molinero-Rosales *et al.*, 1999, 2004; Thouet *et al.*, 2012). De forma similar a la doble función que desempeña el *locus LFY* en *Arabidopsis*, *FA* promueve, además de la floración, la determinación de la identidad del MF en tomate. Así, los mutantes *fa* presentan un retraso en la floración y desarrollan inflorescencias vegetativas en las que se puede observar cómo las flores han sido reemplazadas por brotes simpodiales debido a la incapacidad de los meristemas vegetativos para adquirir identidad floral (Allen & Sussex, 1996; Molinero-Rosales *et al.*, 1999). Un segundo gen involucrado en la determinación de la identidad del meristemo floral en tomate es *ANANTHA (AN)*, el ortólogo del gen *UNUSUAL FLORAL ORGANS* de *Arabidopsis*. *AN* codifica un gen F-box cuya mutación causa el desarrollo de inflorescencias muy ramificadas compuestas por masas indeterminadas de MI incapaces de formar flores. La mutación *fa* es epistática sobre *an* y la expresión de *AN* es indetectable en mutantes *fa*, lo

(Molinero-Rosales *et al.*, 2004; Quinet *et al.*, 2006). Del mismo modo, los mutantes de pérdida de función de los genes MADS-box *JOINTLESS (J)* y *MACROCALIX (MC)*, desarrollan fenotipos similares en cuanto a la reversión del meristemo de inflorescencia a un meristemo vegetativo. Estos fenotipos indican que los genes *SFT*, *J* y *MC* actúan como promotores de la identidad del MI en los meristemos que surgen después de la transición floral del meristemo apical impidiendo la reversión hacia el programa de crecimiento vegetativo (Vrebalov *et al.*, 2002; Quinet *et al.*, 2006; Szymkowiak & Irish, 2006; Yuste-Lisbona *et al.*, 2016).

3.2. Identidad de los órganos florales

Una vez que el meristemo apical ha adquirido identidad de MF, han de diferenciarse distintas regiones meristemáticas conocidas como primordios, responsables de formar los diferentes órganos florales en la mayoría de las dicotiledóneas estudiadas, incluida tomate. Los primordios se inician secuencialmente alrededor de los flancos de los meristemos florales y se organizan en torno a cuatro anillos concéntricos, los denominados verticilos florales, en los que se desarrollarán, desde el más externo al más interno, los sépalos, pétalos, estambres y carpelos.

La identidad de cada órgano floral viene especificada por un pequeño grupo de genes identificados a partir del análisis de mutantes, cuyas flores exhibían transformaciones homeóticas que afectaban a la identidad de al menos un tipo de órgano floral (Krizek & Fletcher, 2005; Causier *et al.*, 2010; Bowman *et al.*, 2012). La caracterización de estos mutantes llevó a la conclusión de que los genes que regulan la identidad de los órganos florales actúan de manera coordinada para controlar el desarrollo de los mismos y proporcionó la base para establecer el modelo clásico ABC (Figura 9A; Bowman *et al.*, 1989, 1991, 1993; Schwarz-Sommer *et al.*, 1990; Coen & Meyerowitz, 1991; Weigel & Meyerowitz, 1994). De acuerdo con este modelo, las diferentes combinaciones de las funciones A, B y C especifican la identidad de cada órgano en el verticilo floral adecuado. De este modo, los genes de función A establecen la identidad de los sépalos en el primer

verticilo, los de función A y B regulan la identidad de los pétalos en el segundo verticilo, las funciones B y C son requeridas para el desarrollo de los estambres en el tercer verticilo y la expresión de los genes de función C es la encargada de especificar la identidad de los carpelos en el cuarto y más interno de los verticilos de la flor. Por otro lado, los genes de función A y C actúan de manera antagónica, evitando que sus actividades se extiendan al dominio del otro. En *Arabidopsis*, los genes de función A son *AP1* y *AP2*, los de función B *APETALA3 (AP3)* y *PISTILLATA (PI)*; y la función C está regulada por el gen *AGAMAOUS (AG)*.

A lo largo de los años este modelo ha sido refinado y ampliado con la función D, proporcionada por los genes *SHATTERPROOF (SHP1 y SHP2)* y *SEEDSTICK (STK)*, responsable de la identidad de los óvulos (Pinyopich *et al.*, 2003), y la función E que engloba a los genes *SEPALLATA (SEP1, SEP2, SEP3, SEP4)* y actúa de forma redundante con las restantes funciones génicas (Figura 9B; Pelaz *et al.*, 2000; Theissen *et al.*, 2016).

Todos los genes de identidad floral, a excepción de *AP2*, que forma parte de la familia génica AP2/ERF, son miembros de la familia de factores de transcripción MADS-box. Según el modelo del cuarteto floral (FQM) descrito en 2001, distintas combinaciones de estas proteínas MADS-box forman complejos cuaternarios que controlan el programa de desarrollo y especifican la identidad de los distintos órganos florales. Así, la identidad de cada órgano floral está especificada por un heterotetrámero diferente (Theissen & Saedler, 2001).

A pesar de que el modelo ABCDE ha sido confirmado ampliamente a nivel molecular en *Arabidopsis*, quedan aún numerosas cuestiones por resolver acerca de los genes implicados en la determinación de la identidad de los órganos florales y las interacciones entre ellos. Una de las incógnitas que se plantean es la aparente falta de genes de función A en muchas especies angiospermas. Este hecho llevó a reformular el modelo clásico como el modelo (A)BCD, en el que (A) engloba las funciones A y E (Figura 9C; Litt & Kramer, 2010). Esta modificación se basa en la idea de que las funciones A y E, en lugar de especificar la identidad de los órganos florales, serían las encargadas de especificar la identidad de los meristemos florales y regular

los distintos patrones de desarrollo floral asegurando la expresión de los genes de función B, C y D en los dominios adecuados.

Según esta modificación del modelo, los sépalos serían el estado predeterminado para los órganos florales y, por lo tanto, el hecho de que los sépalos estén ausentes en las flores mutantes *ap1* y *ap2* podría ser una consecuencia indirecta de un fallo en la especificación del meristemo floral (Wellmer *et al.*, 2014). Este modelo se apoya en numerosos estudios que han demostrado que, como vimos en el apartado anterior, los genes de función A de Arabidopsis, *AP1* y *AP2*, están implicados en la identidad del meristemo floral (Okamura *et al.*, 1997; Ferrándiz *et al.*, 2000). Además, el gen *AP2* juega un papel importante en el control espacial de los dominios de expresión de otros genes implicados en la identidad floral. *AP2* actúa reclutando al correpresor transcripcional *TOPELESS (TPL)* y a la histona desacetilasa *HDA19* para formar el complejo proteico *AP2-TPL-HDA19*, que reprime directamente la expresión de *AG* en los dos verticilos más externos, tal y como postula el modelo ABC original, pero también suprime la expresión de los genes de función B *AP3* y *PI* (Krogan *et al.*, 2012). El gen *AP2*, por lo tanto, no participaría en la inducción del desarrollo de los pétalos, para la cual la función B es esencial como predice el modelo ABC original, sino que estaría involucrado en el establecimiento de los distintos dominios de expresión de los MF.

Recientemente, el modelo (A)BCD se ha reformulado como (A)B(C) en el que la función (C) engloba a las funciones C y D (Figura 9D). Esta modificación se basa en la noción de que los genes de función C y D están estrechamente relacionados y probablemente derivan de genes que combinaban ambas funciones (Theissen *et al.*, 2016). De acuerdo con esta idea, se ha encontrado que los genes de función C y D en petunia tienen actividades que se superponen en gran medida (Heijmans *et al.*, 2012), mientras que en *A. thaliana* estas actividades genéticas son funcionalmente más diversas (Pinyopich *et al.*, 2003).

De esta forma, el desarrollo floral ha recorrido un círculo casi completo desde ABC hasta (A)B(C) en el transcurso de los últimos 30 años (Thomson & Wellmer, 2019).

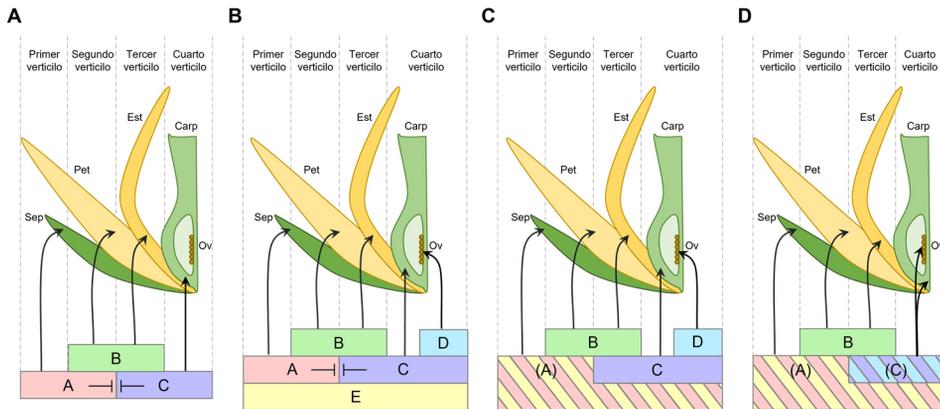


Figura 9. Modelos genéticos propuestos para regular la identidad floral. (A) Modelo clásico "ABC". (B) Modelo extendido "ABCDE". (C) Modelo reformulado "(A)BCD". (D) Modelo reformulado "(A)B(C)". Sep: sépalos, Pet: pétalos, Est: estambres, Carp: carpelos, Ov: óvulos, A: genes de función A, B: genes de función B, C: genes de función C, D: genes de función D, E: genes de función E, (A): genes de clase A y E, (C): genes de clase C y D. Las flechas indican los órganos o verticilos florales en los que tienen actividad los genes de las funciones indicadas en cada caso. Adaptado de Thomson & Wellmer. (2019).

Por otro lado, para que se desarrolle un número adecuado de órganos florales en la posición correcta y en cada verticilo, existen distintos mecanismos encargados de delimitar los dominios de expresión de los genes de identidad floral en los distintos verticilos. Entre los genes que llevan a cabo esta función encontramos algunos que generalmente están involucrados en el establecimiento de límites entre órganos adyacentes durante todo el desarrollo de la planta, como los genes *COC-SHAPEDCOTYLEDON* (*CUC*) (Aida *et al.*, 1997; Vroemen *et al.*, 2003), y otros cuya expresión es específica de flor. Tal es el caso del *locus SUPERMAN* (*SUP*), cuya función implica el mantenimiento del límite de la expresión de los genes de función B entre los verticilos 3 y 4. Es por ello que los mutantes *sup* presentan flores con una expresión de *AP3* que se expande hacia la región central de la flor y producen estambres ectópicos a expensas de los carpelos (Bowman *et al.*, 1992; Sakai *et al.*, 1995). El mecanismo mediante el cual *SUP* ejerce su función no se conoce con exactitud, aunque parece estar relacionado con el control por parte de este gen de las vías de respuesta a fitohormonas (Nibau *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2018). El establecimiento de este límite está regulado además por el microRNA-172

(miR172), que reprime a su vez la expresión de *AP2* (Aukerman & Sakai, 2003; Chen, 2004).

Del mismo modo, el factor de transcripción RABBIT EARS (RBE), involucrado en la formación de los pétalos, establece el límite entre el segundo y tercer verticilo al reprimir la expresión de *AG* (Takeda *et al.*, 2004; Krizek *et al.*, 2006; Huang & Irish, 2015). Para ello, *RBE* regula la expresión del miR164 encargado de modular la expresión de los genes *CUC* en la flor (Baker *et al.*, 2005; Sieber *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2012).

En tomate, el gen de función *A MC*, ortólogo de *AP1* de Arabidopsis, participa en el mantenimiento de la identidad del meristemo de inflorescencia, así como en la especificación de la identidad de los sépalos (Vrebalov *et al.*, 2002; Yuste-Lisbona *et al.*, 2016). Junto a *MC*, se han identificado cinco genes homólogos del gen *AP2* de Arabidopsis a los que se ha denominado *SIAP2a*, *SIAP2b*, *SIAP2c*, *SIAP2d* y *SIAP2e*, siendo el primero de ellos el más homólogo al gen de Arabidopsis. Las líneas RNAi *SIAP2* mostraron defectos en la maduración de los frutos, pero no en el desarrollo de las flores. No obstante, al analizar líneas mutantes en las que se había silenciado las secuencias correspondientes a los dominios AP2 conservados, se pudieron observar defectos en las flores correspondientes al tamaño y morfología de los sépalos que mostraron características distintivas similares a las de una hoja además de defectos en la maduración de los frutos. Estos resultados parecen indicar que existe una redundancia funcional de los genes *SIAP2* (Chung *et al.*, 2010; Karlova *et al.*, 2011).

En cuanto a la función B, en tomate encontramos copias duplicadas de los genes de Arabidopsis *AP3* y *PI*. Así dos parálogos de *AP3*, *TOMATO AP3* (*TAP3*; syn. *STAMENLESS* (*SL*)) y *TOMATO MADS BOX 6* (*TM6*); y dos homólogos de *PI*, *Solanum lycopersicum GLOBOSA* (*SIGLO*; syn. *SIGLO1*, *LePI*, *TPIB*) y *TOMATO PISTILLATA* (*TPI*; syn. *SIGLO2*), especifican la identidad de los pétalos y los estambres (Pnueli *et al.*, 1991; Kramer *et al.*, 1998; Busi *et al.*, 2003; De Martino *et al.*, 2006; Hileman *et al.*, 2006; Geuten & Irish, 2010; Quinet *et al.*, 2014).

Mediante la caracterización de los mutantes de pérdida de función *tap3* y *tm6* se determinó la divergencia funcional de los genes *TAP3* y *TM6*.

Mientras el gen *TAP3* está involucrado en el desarrollo, tanto de pétalos como de estambres, el *locus TM6* actúa promoviendo principalmente la identidad de los últimos (De Martino *et al.*, 2006). Por otro lado, los mutantes *slglo1* y *slglo2* desarrollaron flores con estambres semi carpelares y pétalos de fenotipo silvestre. Sin embargo, los dobles mutantes *slglo1:slglo2* presentan un fenotipo similar al de *tap3* en el que se observan conversiones homeóticas de pétalos en estambres y de estambres en carpelos, que se fusionan con los carpelos que componen el cuarto verticilo (Geuten & Irish, 2010). Estos fenotipos indican que *GLO1* y *GLO2* actúan de manera redundante promoviendo la identidad de pétalos y estambres.

La función C está regulada por los miembros de la subfamilia AG: *TOMATO AGAMOUS1 (TAG1)* y *TOMATO AGAMOUS-LIKE1 (TAGL1; syn. ARLEQUIN (ALQ))*, homólogos a los genes *AG* y *SHP1/2* de *Arabidopsis*, respectivamente. Los mutantes *tag1* se caracterizan por presentar conversiones homeóticas de estambres y carpelos, así como por un cuarto verticilo indeterminado (Pnueli *et al.*, 1994b; Pan *et al.*, 2010). Por su parte, los mutantes de pérdida de función del gen *TAGL1/ALQ* se ven afectados en aspectos relacionados con la maduración del fruto, mientras que las líneas de sobreexpresión *35S:TAGL1* desarrollan sépalos carnosos con características propias de carpelos que maduran de forma similar al fruto y pétalos con características de estambres (Vrebalov *et al.*, 2009; Giménez *et al.*, 2010, 2015). Al evaluar las líneas de silenciamiento doble RNAi:*TAG1-TAGL1*, se observaron anomalías celulares en estambres y carpelos que producían pequeños frutos con algunas características sepaloideas (Giménez *et al.*, 2016). Estos resultados parecen indicar que, a pesar de la diversificación de funciones de los genes *TAG1* y *TAGL1/ALQ*, ambos actúan de forma redundante para especificar la identidad de estambres y carpelos en tomate.

La función D depende de la actuación de los genes *TOMATO AGAMOUS-LIKE11*, y *SIMBP3*, dos homólogos del gen *STK* de *Arabidopsis* cuyas mutaciones ocasionan defectos en el desarrollo de óvulos y semillas (Busi *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2019). Por último, se han identificado dos genes de función E en tomate, *TOMATO MADS BOX 5 (TM5)* homólogo a *SEP3* de *Arabidopsis* e involucrado en establecer el número de verticilos y órganos

florales, así como en la identidad de los mismos (Pnueli *et al.*, 1994a), y *TOMATO MADS BOX 29* (*TM29*; syn. *TAGL2*), homólogo a los genes de *Arabidopsis* *SEP1* y *SEP2*, que interviene en desarrollo de los órganos florales, la formación del fruto y el mantenimiento de la identidad del meristemo floral (Ampomah-Dwamena *et al.*, 2002).

3.3. Regulación hormonal durante el desarrollo floral

Las hormonas vegetales regulan el crecimiento de las plantas mediante diversos mecanismos y tienen una función decisiva en el establecimiento de distintos programas de desarrollo (Alabadí *et al.*, 2009). Así, la distribución heterogénea de auxinas está relacionada con el inicio de todos los meristemos axilares, entre ellos el MF (Benková *et al.*, 2003). En el meristemo floral, existe una gradación en la concentración de auxinas que permite su acumulación en aquellos dominios celulares donde se inician los primordios florales (Oka *et al.*, 1999; Reinhardt *et al.*, 2003; Heisler *et al.*, 2005). La formación de estos picos o máximos de concentración está regulada, tanto por la biosíntesis, como por el transporte polar de esta fitohormona.

Los mutantes de pérdida de función de los genes de la familia YUCCA (*YUC*) y de los loci *NAKED PINS IN YUC MUTANTS* y *AGC KINASE*, relacionados con la biosíntesis de auxinas, muestran fenotipos similares entre sí, que destacan por la incapacidad de formar meristemos florales en las etapas tempranas del desarrollo reproductivo (Cheng *et al.*, 2006, 2008). Junto a ellos, las proteínas PIN-FORMED (*PIN*) desempeñan un papel fundamental en el transporte polar de auxinas, como se deduce del fenotipo de los mutantes de pérdida de función del gen *PIN1* que no desarrollan flores aunque pueden ser rescatados mediante la aplicación exógena de esta fitohormona (Gälweiler *et al.*, 1998; Křeček *et al.*, 2009).

Los máximos de auxinas en las capas celulares L1 y L2 del meristemo de inflorescencia conducen a la activación del gen de respuesta a auxina *MONOPTEROS* (*MP*; syn. *ARF5*) (Bhatia *et al.*, 2016; Bhatia & Heisler, 2018).

Estudios previos han demostrado que *MP* recluta a los remodeladores de la cromatina ATPasa SWI/SNF SPLAYED (*SYD*) y BRAHMA (*BRM*), que se unen a los promotores de sus genes diana para aumentar la accesibilidad de la cromatina (Wu *et al.*, 2015). Entre los genes diana de *SYD* y *BRM* se encuentran los factores de transcripción *AINTEGUMENTA* (*ANT*) y *AINTEGUMENTA-LIKE6* (*AIL6*), que promueven el crecimiento floral (Krizek, 2009; Yamaguchi *et al.*, 2013). Además, *MP* activa la expresión del locus *ARABIDOPSIS HISTIDINE PHOSPHOTRANSFER PROTEIN6* (*AHP6*), que codifica un regulador negativo de la vía de señalización de citoquininas. *AHP6* suprime la actividad de las células meristemáticas en el tejido que rodea a los primordios florales y, por lo tanto, ayuda a establecer la filotaxis (Mähönen *et al.*, 2006; Besnard *et al.*, 2014).

El control de la síntesis y el transporte de auxinas en el meristemo floral también han sido relacionados con la actividad de los factores de transcripción *DORNROSCHEN*, *DORNROSCHEN-LIKE* y *PUCHI*, que controlan la identidad de dicho meristemo y la iniciación de los órganos florales de manera parcialmente redundante junto con las proteínas *BLADE-ON-PETIOLE1* y *2*, que forman parte del complejo ubiquitina ligasa E3 (Chandler & Werr, 2017; Zhang *et al.*, 2017a). Estas proteínas, promueven la expresión de *LFY* junto con *MP*, *ANT*, *AIL6*, *FT* y las distintas rutas de inducción que mencionamos en el apartado 3.1 de esta sección (Abe *et al.*, 2005; Wigge *et al.*, 2005; Yamaguchi *et al.*, 2013, 2016).

Por su parte, el gen *LFY*, junto con *MP*, inhibe la expresión del regulador negativo de la respuesta a citoquininas *ARR7* que desencadena un aumento local de citoquininas y conduce al establecimiento de un meristemo floral completamente funcional (Zhao *et al.*, 2010; Chahtane *et al.*, 2013; Denay *et al.*, 2017). *LFY* está involucrado además, en el control de la respuesta a auxinas y reduce los niveles de giberelinas en el meristemo floral a través de la regulación positiva de la enzima del citocromo P450 de catabolismo de giberelinas *EUI-LIKE P450 A1*. Esta disminución de giberelinas conlleva una acumulación de las proteínas *DELLA*, sensibles a giberelinas, que más tarde actúan junto con los factores de transcripción *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN LIKE* (*SPL*) para activar la expresión del gen *AP1*. (Yamaguchi *et al.*, 2009, 2014).

Las fitohormonas no sólo juegan un papel importante en el establecimiento del meristemo floral, sino que intervienen durante todo el desarrollo de la flor. Estudios recientes han revelado que los genes de identidad de los órganos florales de *A. thaliana* regulan directamente la expresión de factores involucrados en procesos como la biosíntesis y la señalización hormonal (Thomson & Wellmer, 2019). Así, *AP1* impide la producción de brotes axilares en el primer verticilo de la flor mediante la represión del gen de biosíntesis de citoquininas *LOG4* y la inducción de la enzima CYTOKININ OXIDASE/DEHYDROGENASE3. La reducción de los niveles de citoquininas evita que la axila del sépalo adquiera competencia meristemática, propiciando el mantenimiento de la identidad de este órgano floral (Han *et al.*, 2014).

Durante las primeras etapas de la formación de meristemo floral, el gen *AG* controla la actividad meristemática contribuyendo a mantener una homeostasis hormonal adecuada. Para ello, *AG* modula la expresión de *AUXIN RESPONSE FACTOR3 (ARF3; syn. ETTIN (ETT))*, involucrado en la respuesta a auxinas y en la homeostasis de citoquininas. Para ello, *ARF3/ETT* reprime directamente la expresión de los genes de biosíntesis de citoquininas *IPT3*, *IPT5* e *IPT7*, y a través de ellos regula la expresión de genes relacionados con el ciclo celular (Zhang *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2019a). *AG* además, promueve la expresión de *SUP*, que reprime a su vez a los genes de síntesis de auxinas *YUC1* y *YUC4*, desencadenando una disminución local de los niveles de esta fitohormona (Lee *et al.*, 2019a). Asimismo, *AG* controla el crecimiento de los estambres de forma dependiente del ácido jasmónico mediante la regulación de la expresión del gen *DEFECTIVE IN ANTHER DEHISCENCE1* (Thomson & Wellmer, 2019).

La formación de los pétalos, las anteras, el polen y el pistilo también está regulada por distintas fitohormonas. En el primer caso, las auxinas, las giberelinas y el ácido jasmónico regulan la expresión del factor de transcripción *BIGPETAL*. La formación de las anteras está influenciada por etileno y la formación del polen por citoquininas y brasinosteroides (Chandler, 2011). Por último, la iniciación de los carpelos, el crecimiento del gineceo y la formación del estilo y el estigma están regulados positivamente por la acción de las auxinas (Marsch-Martínez & De Folter, 2016).

4. La determinación del meristemo floral

Una vez se han desarrollado los carpelos en el verticilo más interno de la flor, cesa la proliferación de células meristemáticas y el MF, por tanto, se determina. Este proceso está estrechamente ligado al número de carpelos, y por consiguiente, de lóculos que formarán el fruto. Así, la precisión temporal con que este proceso tiene lugar resulta fundamental para el correcto desarrollo reproductivo de la planta (Sablowski, 2007; Sun *et al.*, 2009; Sun & Ito, 2015).

Estudios en *Arabidopsis* han demostrado que *WUS* desempeña una función clave en el mantenimiento de las células meristemáticas del SAM y el MF (Mayer *et al.*, 1998). De hecho, los mutantes *wus* muestran una determinación prematura tanto del meristemo apical como del floral, lo que da lugar a flores con un único estambre central y sin carpelos (Laux *et al.*, 1996). Durante los primeros estadios del desarrollo floral (estadios 1 y 2), el número de células meristemáticas se mantiene constante gracias al mecanismo de retroalimentación negativo CLV-WUS, que ocurre de manera similar al descrito en el SAM (Smyth *et al.*, 1990; Schoof *et al.*, 2000). A continuación, se activa la vía regulatoria AG-WUS que desencadena, mediante múltiples mecanismos genéticos, la terminación de la actividad de las células meristemáticas una vez se ha determinado la identidad de un número concreto de carpelos. (Lenhard *et al.*, 2001; Lohmann *et al.*, 2001; Sun & Ito, 2015).

4.1. La ruta AGAMOUS-WUSCHEL: funciones directas e indirectas de AGAMOUS en la represión de WUSCHEL

Al contrario que los mutantes *wus*, los mutantes *ag* presentan flores indeterminadas en las que el cuarto verticilo floral ha sido reemplazado por el desarrollo de otra flor, dando lugar a un fenotipo reiterativo de flor dentro de flor (Bowman *et al.*, 1989, 1991; Yanofsky *et al.*, 1990). Así pues, *AG* desempeña una doble función especificando, por un lado, la identidad de estambres y carpelos en el tercer y cuarto verticilo, respectivamente, como

gen de función C y, por otro, promoviendo la determinación del meristemo floral en el verticilo más interno, mediante la represión de *WUS* (Sieburth *et al.*, 1995; Sun & Ito, 2015).

En el estadio 3 del desarrollo de botón floral de *Arabidopsis*, *WUS* y *LFY* actúan conjuntamente para inducir la expresión de *AG*. A su vez, la activación del gen *AG*, cuyo dominio de expresión incluye al del gen *WUS*, se correlaciona con el comienzo de la disminución de la expresión de este último, aunque no es hasta el estadio 6 cuando cesa completamente su actividad (Drews *et al.*, 1991; Mayer *et al.*, 1998; Lenhard *et al.*, 2001; Lohmann *et al.*, 2001; Hong *et al.*, 2003). Entre los estadios 3 y 6 del desarrollo floral, *AG* actúa reprimiendo la expresión de *WUS* mediante múltiples mecanismos que se engloban en la ruta conocida como AG-*WUS*. *AG* aborda la inhibición de *WUS* de forma directa mediante su unión a las regiones reguladoras del gen *WUS* y el reclutamiento de las proteínas del grupo Polycomb (PcG), e indirecta a través de la activación de los genes *KNUCKLES (KNU)* y *CRABS CLAW (CRC)* (Figura 10; Sun *et al.*, 2009, 2014, 2019; Liu *et al.*, 2011; Yamaguchi *et al.*, 2017, 2018).

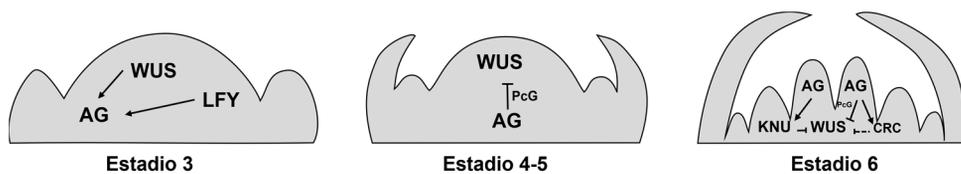


Figura 10. Representación esquemática de las funciones directas e indirectas de *AGAMOUS* en la represión de *WUSCHEL* en el meristemo floral. Adaptado de Liu *et al.* (2011).

En tomate, se han evaluado distintos mutantes de pérdida de función del gen *TAG1* que mostraron fenotipos diferentes relativos a la determinación floral. Así, en 1994 Pnueli y colaboradores caracterizaron plantas transgénicas que expresaban el ARN de *TAG1* en antisentido. Estos mutantes forman pseudocarpelos que desarrollan, a su vez, MF adicionales en la posición que normalmente ocuparía la placenta durante el desarrollo del fruto, razón por la que estos meristemas florales ectópicos forman nuevas flores que únicamente desarrollan sépalos y pétalos (Figura 11A; Pnueli *et al.*, 1994b). En 2010, Pan y colaboradores describieron un mutante del gen *TAG1* procedente de líneas de silenciamiento RNAi que mostraron

un fenotipo de indeterminación conocido como “fruto dentro de fruto” (Figura 11B; Pan *et al.*, 2010). Por último, otra línea RNAi:TAG1, descrita por Giménez y colaboradores en 2016, presenta frutos de pequeño tamaño y sin placenta en los que no se observa indeterminación (Figura 11C; Giménez *et al.*, 2016). Estas diferencias se han atribuido a la posibilidad de que la expresión de otros genes con una secuencia similar a la TAG1, como por ejemplo TAGL1/ALQ, haya podido verse afectada en el caso de las líneas antisentido y a los diferentes fondos genéticos de cada mutante (Giménez *et al.*, 2016).

Además, en tomate existe un segundo gen de función C, TAGL1/ALQ. Trabajos recientes caracterizaron el doble mutante RNAi:TAG1-TAGL1 al objeto de comprobar el efecto causado al abolir completamente la función C de la flor de tomate (Figura 11D). Este doble mutante no mostró indeterminación, tal y como cabía esperar debido al fenotipo observado en el mutante simple RNAi:TAG1, probablemente porque un nivel basal de transcritos TAG1 sea suficiente para la determinación de los carpelos (Giménez *et al.*, 2016). Así pues, hasta el momento no se ha descrito ningún mutante *knock-out* de función C que permita profundizar en el papel de que ejerce TAG1 en la determinación floral y en su interacción con el otro gen de clase C, TAGL1/ALQ.

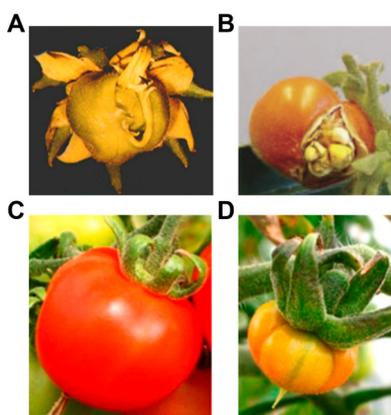


Figura 11. Fenotipo de fruto de los mutantes de clase C en tomate. (A) Fruto de plantas TAG1 Antisense RNA (Pnueli *et al.*, 1994b). **(B)** Fruto de plantas RNAi TAG1 (Pan *et al.*, 2010). **(C)** Fruto de plantas RNAi TAG1 (Giménez *et al.*, 2016). **(D)** Fruto de plantas RNAi TAG1:TAGL1 (Giménez *et al.*, 2016).

4.1.1. Represión directa de *WUSCHEL*: la función de las proteínas PcG

Las proteínas PcG fueron identificadas por primera vez en *Drosophila melanogaster* como represoras de genes homeóticos (Lewis, 1978; Jürgens, 1985). Estas se asocian en subcomplejos funcionalmente distintos (Müller & Verrijzer, 2009): el subcomplejo Polycomb2 Repressive Complex2 (PRC2), que trimetila la histona H3 Lys-27 (H3K27) en genes diana específicos, el PRC1, que reconoce dicha metilación e induce la compactación de la cromatina para la represión transcripcional de los genes diana, y el complejo Pho-Represivo, que es responsable del reclutamiento de proteínas PcG mediante genes que contienen elementos de respuesta Polycomb. En *Arabidopsis*, los genes *CURLY LEAF (CLF)*, *FERTILIZATION-INDEPENDENT ENDOSPERM (FIE)* y *EMBRYONIC FLOWER 2* son miembros de PRC2 (Ohad *et al.*, 1999; Yoshida *et al.*, 2001; Pien & Grossniklaus, 2007; Köhler & Villar, 2008; Schatlowksi *et al.*, 2008; Hennig & Derkacheva, 2009; Zheng & Chen, 2011), mientras que el gen *TERMINAL FLOWER2 / LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN1 (TFL2/LHP1)* forma parte de PRC1 (Turck *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007). Sin embargo, no se han identificado ningún homólogo del Complejo Pho-Represivo en plantas.

Durante las primeras etapas de la determinación del meristemo floral, AG se une directamente a distintas dianas específicas del *locus WUS* para reprimir su expresión. Esta unión directa favorece la activación de *CLF* y *TFL2/LHP1*, que a su vez promueven la compactación de la cromatina a través de la hipermetilación de las histonas para garantizar una represión estable de *WUS* (Liu *et al.*, 2011). No obstante, este mecanismo es insuficiente para que se produzca la determinación del MF. Como mencionamos anteriormente, la inhibición completa de la expresión de *WUS* en el estadio 6 de desarrollo del botón floral, requiere además la activación por parte AG de los genes *KNU* y *CRC*, tal y como se describe en los siguientes apartados.

4.1.2. Represión indirecta de *WUSCHEL*: *AGAMOUS* activa la función de *KNUCKLES*

El gen *KNU* codifica un factor de transcripción de la familia de proteínas zinc-finger C2H2 que contiene un dominio de represión transcripcional EAR (*Ethylene responsive element binding factor Associated amphiphilic Repression domain*; Payne *et al.*, 2004). El mutante *knu* presenta un fenotipo indeterminado de flor dentro de fruto en el que pueden observarse estambres y carpelos ectópicos que se desarrollan a partir del tejido placentario del fruto debido a una expresión prolongada de *WUS*. La caracterización de los dobles mutantes *ag:knu* y *knu:wus* indicó que los genes *AG*, *KNU*, y *WUS* forman parte de la misma ruta genética que controla la actividad del meristemo floral, y que *KNU* actúa como un puente entre *AG* y *WUS* en la regulación transcripcional de la determinación del meristemo floral (Payne *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2009).

En los estadios previos a la activación de *KNU*, su secuencia promotora y codificante se encuentran cubiertas por marcas epigenéticas H3K27me3, represoras de la transcripción, que son establecidas y mantenidas por las proteínas PcG (Figura 12A). En el estadio 3, *AG* se une al promotor de *KNU* de forma competitiva con las proteínas PcG, ya que su sitio de unión colocaliza con un elemento de respuesta a Polycomb (PRE). Así, *AG* desplaza a las proteínas PcG, y a continuación, entre los estadios 3 y 5, se produce una pérdida gradual de las marcas H3K27me3. En consecuencia, el promotor del gen *KNU* resulta accesible para la maquinaria que lleva a cabo su transcripción en el estadio 6 (Sun *et al.*, 2009, 2014). De esta forma, la expresión de *KNU* comienza en el estadio 6 en el centro del meristemo floral, coincidiendo en espacio y tiempo con la represión completa de la actividad de *WUS*. La represión de *WUS* mediada por la acción de *KNU* tiene lugar a través de varios mecanismos que constan de múltiples pasos.

En el meristemo floral, el factor remodelador de la cromatina SYD se une directamente al promotor de *WUS* para mantener su actividad transcripcional durante estadios previos a la activación de *KNU*, ya que contribuye a una mayor accesibilidad del ADN, y a la deposición una marca epigenética que se asocia a la transcripción activa de la cromatina mediante

la trimetilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me3) (Cairns, 2005; Kwon *et al.*, 2005; Sawarkar & Paro, 2010; Wu *et al.*, 2012). La evaluación del estado de la cromatina del *locus WUS* durante el desarrollo floral mostró que, entre los estadios 0 y 5 existe una elevada concentración de esta marca epigenética y altos niveles de acetilación de la histona H3 relacionada, de igual modo, con la inducción de la transcripción (Figura 12B). Sin embargo, en el estadio 6, coincidiendo con el inicio de la expresión de *KNU*, se encontró una disminución, tanto de las marcas H3K4me3, como de la acetilación de H3 en el *locus WUS*. Esto sucede debido a que en este estadio, *KNU* se une a una región situada en el promotor de *WUS* que solapa parcialmente con el sitio de unión de *SYD*, provocando su desalojo. Así, tras la unión de *KNU* al promotor de *WUS*, se observa una pronunciada pérdida de accesibilidad al *locus WUS*. Además, para que la represión de la actividad de *WUS* sea estable a partir del estadio 6, *KNU* recluta a *PRC2* e interacciona físicamente su componente *FIE* para inducir el silenciamiento de *WUS* vía H3K27me3 (Sun *et al.*, 2019).

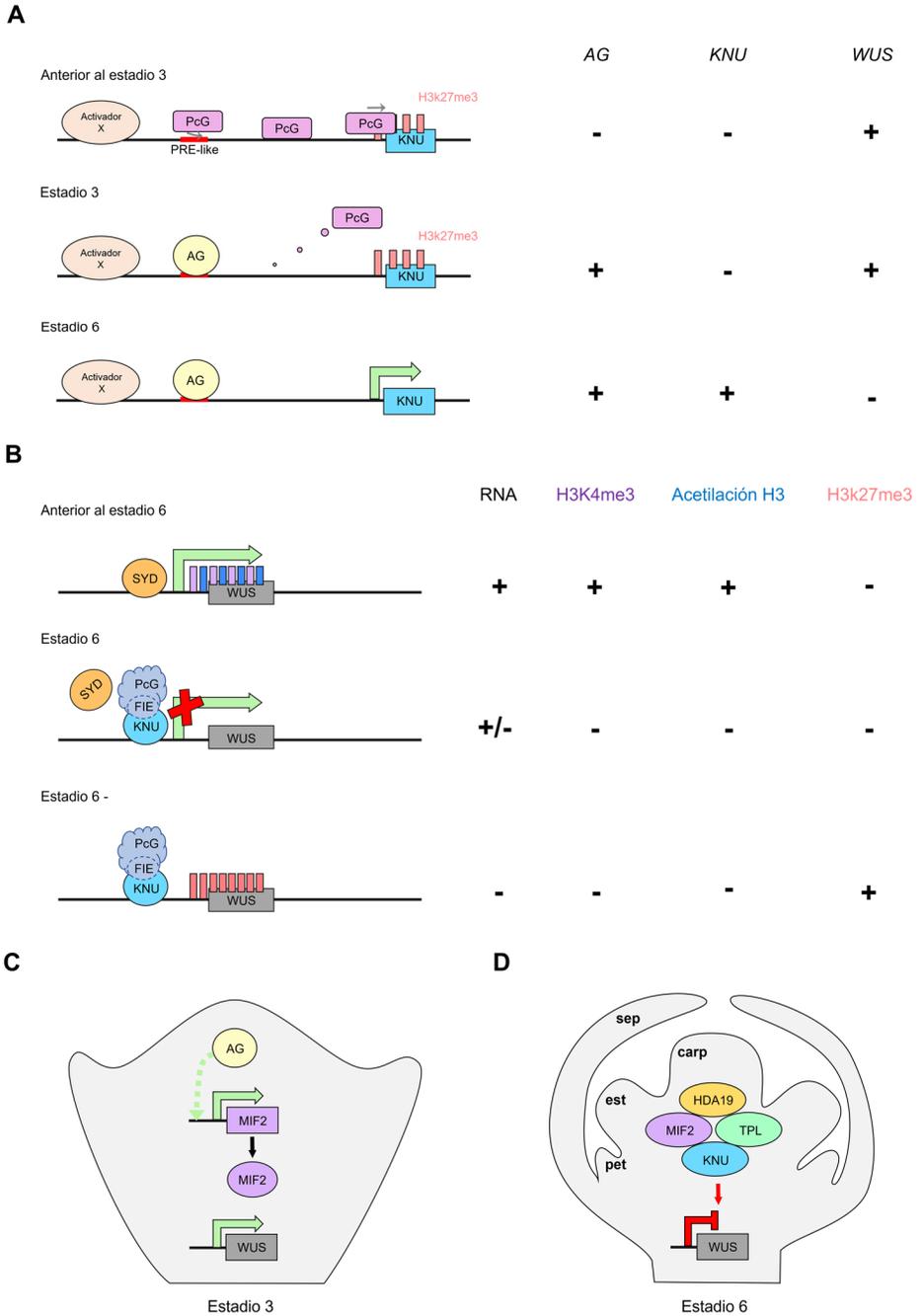


Figura 12. Ruta indirecta de represión AG-KNU-WUS en *A. thaliana*. (A) Representación esquemática de la regulación transcripcional de *KNU* dependiente de AG en estadios de desarrollo floral previos al 6. Adaptado de Sun *et al.* (2014). (B) Represión de *WUS* mediada por KNU-PRC2 antes y durante el estadio de desarrollo floral 6. Adaptado de Sun *et al.* (2019).

Figura 12. Continuación. (C) Activación transcripcional de *MIF2* dependiente de AG en el estadio de desarrollo floral 3. Adaptado de Bollier *et al.* (2018). **(D)** Formación del complejo remodelador de la cromatina encargado de silenciar la expresión del gen *WUS* mediante la desacetilación de las histonas en el estadio de desarrollo floral 6. sep: sépalo, pet: pétalo, est: estambre, carp: carpelo. Adaptado de Bollier *et al.* (2018).

Además, *KNU* contribuye por otra vía a la represión de *WUS* en el meristemo floral formando parte de un complejo remodelador de la cromatina, encargado de la desacetilación de las histonas. AG, además de inducir la actividad de *KNU*, regula positivamente la expresión del gen *Arabidopsis thaliana* *MINI ZINC FINGER2* (*AtMIF2*; Figura 12C), relacionado principalmente con el desarrollo temprano del carpelo y los óvulos (Sicard *et al.*, 2008; Bollier *et al.*, 2018). Debido las características específicas de las proteínas MIF, *AtMIF2* actúa como un adaptador proteico entre los represores transcripcionales *KNU*, *TPL* y la histona desacetilasa *HDA19* para reprimir la actividad del meristemo floral (Hu *et al.*, 2008). Una vez se ha formado este complejo proteico, *AtMIF2* se une a las regiones reguladoras del gen *WUS* para reprimir epigenéticamente su expresión (Figura 12D; Bollier *et al.*, 2018).

A pesar de su interés agronómico, el mecanismo que controla la determinación del MF en tomate aún presenta grandes incógnitas. No obstante, la regulación de la inhibición de *WUS* a través de la ruta AG-*KNU*-*WUS* mediante la formación del complejo remodelador de la cromatina propuesto en *Arabidopsis*, se encuentra muy conservado en tomate (Bollier *et al.*, 2018). Así, *TAG1* regula positivamente la expresión de los genes *INHIBITOR OF MERISTEM ACTIVITY (IMA)* y *SIKNU*, ortólogos de *AtMIF2* y *KNU* de *Arabidopsis* (Figura 13A), que interactúan para reprimir la expresión de *SIWUS*. *IMA* actúa como adaptador proteico y recluta a *SIKNU* para formar un complejo represor de la transcripción, junto con las proteínas *SITPL1* y *SIHDA1*, ortólogas de *TPL* y *HDA19* de *Arabidopsis*, respectivamente (Figura 13B; Hao *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2015). Al igual que sucede en *Arabidopsis*, este complejo contribuye a inhibir la expresión de *SIWUS* durante la determinación del MF en tomate mediante la desacetilación de las histonas.

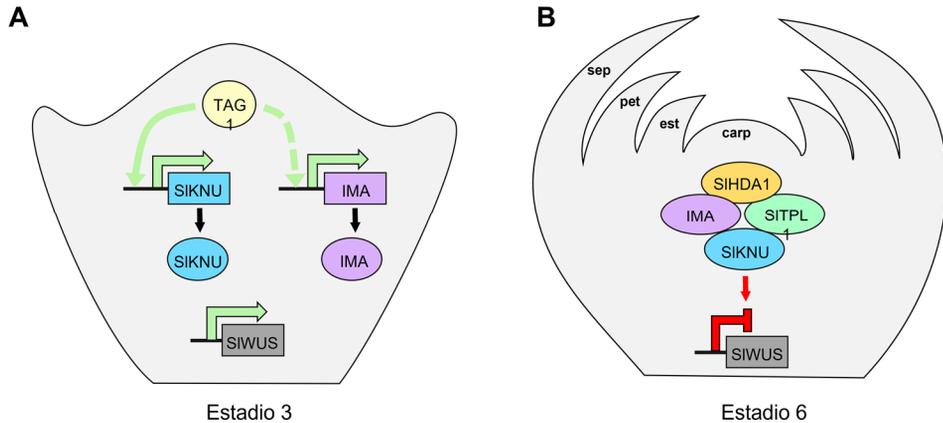


Figura13. Represión de *SIWUS* en tomate. (A) Activación transcripcional directa (flecha continua) de *SIKNU* e indirecta (flecha discontinua) de *IMA* dependiente de TAG1 en el estadio 3. **(B)** Formación del complejo remodelador de la cromatina formado por *SIKNU*, *IMA*, *SLTPL1* y *SIHDA1* encargado de silenciar la expresión de *WUS* mediante la desacetilación de las histonas en el estadio 6. sep: sépalo, pet: pétalo, est: estambre, carp: carpelo. Adaptado de Bollier *et al.* (2018).

4.2. Papel de *CRABS CLAW* en la determinación floral y la regulación de la homeostasis de auxinas

El gen *CRC* codifica un factor de transcripción YABBY que contiene sendos dominios *zinc finger* y HLH (dominio YABBY). Su expresión en *Arabidopsis* comienza durante los estadios 5-6 del desarrollo del botón floral, coincidiendo con el inicio de la formación de los primordios carpelares en esta especie. *CRC* participa en la especificación de los nectarios y el desarrollo de caracteres específicos del pistilo como la diferenciación del estigma y el estilo, la fusión de los carpelos y la determinación del MF. Así, los mutantes *crc* muestran un fenotipo débil de indeterminación del carpelo, si bien desarrollan un excesivo número de los mismos mal fusionados, y carece de nectarios (Bowman & Smyth, 1999; Alvarez & Smyth, 1999, 2002). Esta pérdida de determinación está causada, al menos parcialmente, por una reducción de la expresión de *AG*, lo que prueba su función como regulador transcripcional de *CRC* (Prunet *et al.*, 2008). Se ha comprobado que *AG* induce directamente la expresión de *CRC* uniéndose a

su promotor para regular la organogénesis y la determinación del carpelo mediante el establecimiento de un pico máximo de auxinas a nivel local, en el dominio meristemático donde se comienzan a diferenciar los carpelos (Gómez-Mena *et al.*, 2005; Ó'Maoiléidigh *et al.*, 2013; Yamaguchi *et al.*, 2017, 2018; Lee *et al.*, 2019b). De esta forma, *CRC* no solo controla específicamente el programa de desarrollo del carpelo, sino que también comparte función con *AG* en la terminación del meristemo floral, confirmando la estrecha coordinación entre estos dos procesos.

Múltiples estudios han descrito una ruta de determinación del meristemo floral aguas abajo de *AG* coordinada por *CRC* e independiente de *KNU* (Yamaguchi *et al.*, 2017, 2018). Pese a que como hemos mencionado anteriormente los mutantes *crc* presentan un leve fenotipo de indeterminación, los dobles mutantes *crc:knu* muestran un fenotipo aditivo con una fuerte indeterminación floral debido a la expresión ectópica y prolongada de *WUS*. De este modo, dos genes diana de *AG* como son *CRC* y *KNU*, regulan sinérgicamente la expresión de *WUS* en el meristemo floral (Breuil-Broyer *et al.*, 2016; Yamaguchi *et al.*, 2017).

La regulación de la homeostasis de auxinas en el dominio medio del gineceo resulta determinante para el desarrollo de las células meristemáticas en el MF. De hecho, se ha observado cómo cambios en la homeostasis de auxinas en esta región origina defectos en la determinación del meristemo floral y finalmente del fruto (Larsson *et al.*, 2014; Yamaguchi *et al.*, 2017). Sin embargo, los genes implicados en la homeostasis de auxinas a menudo se expresan en toda la planta, por lo que deben ajustarse de manera específica a cada tejido y etapa del desarrollo. Estudios recientes han identificado un vínculo molecular entre los factores de transcripción específicos que desempeñan su función en el gineceo, *AG* y *CRC*, y algunos de los genes que controlan la generación de un pico máximo de auxinas, *TORNADO2 (TRN2)* y *YUC4* (Chávez Montes *et al.*, 2015; Yamaguchi *et al.*, 2017, 2018).

El gen *CRC* controla la homeostasis de auxinas en la región central del gineceo a través de la inhibición de *TRN2*, que codifica una proteína de membrana de la familia tetraspanina implicada en la distribución asimétrica de auxinas a través del transporte polar, y la inducción de forma sinérgica

con AG del gen de síntesis de auxinas *YUC4* (Cnops *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2015; Yamaguchi *et al.*, 2017, 2018).

YUC4 es un gen diana común a AG y CRC que promueve la transición de células meristemáticas a células diferenciadas en el gineceo a partir de la producción de auxinas. Sin embargo, en la región genómica próxima al sitio de iniciación de la transcripción (TSS; del inglés *Transcriptional Start Site*) de *YUC4* podemos encontrar varios nucleosomas que imposibilitan este proceso. Así, para activar la transcripción del gen *YUC4* se hace necesaria la intervención de algún remodelador de la cromatina que promueva su apertura para hacer más accesible la región promotora de dicho gen (Figura 14). Con tal fin, AG interacciona físicamente con los factores ISWI CHR11 y CHR17 para formar el complejo AG-CH11-CH17 (Smaczniak *et al.*, 2012). A continuación, AG-CH11-CH17 se une directamente al promotor de *YUC4* y desliza los nucleosomas de manera que la accesibilidad a su TSS aumenta antes de la determinación del meristemo floral (Yen *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2014; Yamaguchi *et al.*, 2018). Es entonces, durante el estadio 6 del desarrollo floral, cuando CRC se une al promotor de *YUC4* para activar sinérgicamente su expresión. De este modo, la regulación *YUC4* mediante la acción conjunta de AG y CRC, resulta indispensable para activar la expresión del primero, únicamente en el momento y lugar correctos (Yamaguchi *et al.*, 2018).

Además, de forma paralela, durante el estadio 6 de desarrollo, CRC se une directamente al promotor de *TRN2* para reprimir su expresión, generándose así un nivel de auxinas adecuado para reducir la actividad del meristemo floral (Yamaguchi *et al.*, 2017). Por ende, los genes diana de CRC relacionados con auxinas, *YUC4* y *TRN2*, actúan en rutas paralelas para inducir la determinación del meristemo floral a través de la regulación de *WUS*.

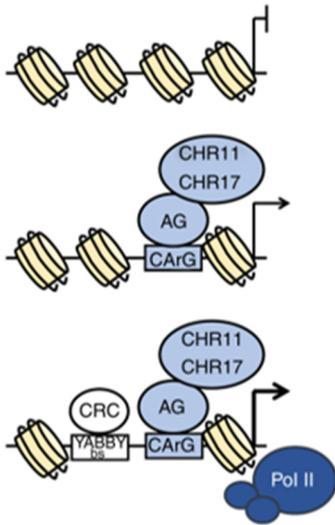


Figura 14 Representación esquemática de la activación transcripcional del gen *YUC4*. En la región promotora del gen *YUC4* existe una alta concentración de nucleosomas que imposibilitan su transcripción. El complejo remodelador de la cromatina AG-CHR11-CHR17 se une al promotor de *YUC4* con el fin de deslizar los nucleosomas y hacer accesible esta región. A continuación, CRC se une al promotor de *YUC4*, y junto con AG, inducen su expresión. Adaptado de Yamaguchi *et al.* (2018).

Sin embargo, quedan múltiples interrogantes por dilucidar en lo referente a la ruta que actúa aguas abajo de *TRN2* o el modo en que las auxinas regulan la expresión de *WUS*. Uno de los genes que posiblemente estén involucrados en esta ruta es el factor de transcripción *ARF3/ETT*, ya que este gen induce la determinación del meristemo floral a través de la represión de la expresión de *WUS* (Liu *et al.*, 2014). Otro aspecto a destacar de la implicación de este factor de transcripción en la determinación del meristemo floral es su papel en la homeostasis de citoquininas. *ARF3/ETT* reprime la expresión de los genes de las familias génicas IPT y LOG, involucradas en la biosíntesis de citoquininas, e inactiva la actividad del gen receptor de citoquininas *AHK4*. De este modo, se produce una disminución de citoquininas que afecta a la división celular del MF (Nemhauser *et al.*, 2000; Tiwari *et al.*, 2003; Tantikanjana & Nasrallah, 2012; Liu *et al.*, 2014; Simonini *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2019a).

En resumen, la acción de los factores de transcripción AG, KNU y CRC, junto con la actuación sinérgica de los niveles adecuados de auxinas y citoquininas, conducen a la determinación del meristemo floral y la formación del gineceo en *Arabidopsis* (Figura 15).

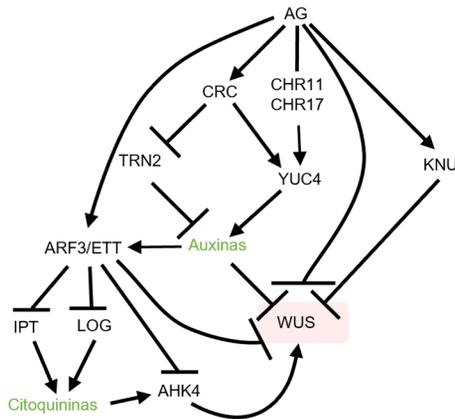


Figura 15. Representación esquemática de la ruta reguladora de la determinación del meristemo floral mediada por AGAMOUS en Arabidopsis. Adaptado de Yamaguchi *et al.* (2018) y Lee *et al.* (2019a).

4.3. Conservación y divergencia funcional de *CRABS CLAW* en angiospermas

Durante la evolución, fenómenos sucesivos de duplicación génica han dado lugar a muchos de los miembros de familias génicas que actualmente desempeñan funciones importantes durante el desarrollo vegetal. Resulta habitual que los miembros de una misma familia tengan funciones relacionadas o participen en procesos biológicos afines. Recientemente, se ha descrito la presencia de un precursor de gen *YABBY* en algas del género *Micromonas*, y de homólogos *YABBY* en especies del briófito *Anthoceros spp.* y en especies de helechos los licófitos como *Huperzia selago* y *Huperzia serrata*, lo que sugiere que las proteínas *YABBY* estaban ya presentes en el genoma del ancestro común de plantas terrestres (Worden *et al.*, 2009; Evkaikina *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2020; Romanova *et al.*, 2021). Romanova y colaboradores proponen que a partir de un *YABBY* ancestral, las plantas habrían podido regular el desarrollo de hojas y esporangios, y que la posterior duplicación y divergencia funcional habría conducido hasta los genes *YABBY*, responsables de caracteres vegetativos y reproductivos en las plantas más evolucionadas (Romanova *et al.*, 2021). En las angiospermas, la familia *YABBY* consta de cinco subfamilias representadas en Arabidopsis por seis genes, a saber, *CRC*, *YAB1/YAB3 (FIL)*, *YAB2*, *YAB4 (INO)* y *YAB5*, y por nueve en tomate nombrados, según la

relación con sus ortólogos de *Arabidopsis*, como *Solanum lycopersicum* *CRABS CLAWa* (*SICRCa*), *SICRCb*, *SIYABBY1*, *SIYABBY1b*, *SIYABBY2a*, *SIYABBY2b*, *SIINO*, *SIYABBY5a* y *SIYABBY5b* (Bowman, 2000; Yamada *et al.*, 2011). De acuerdo con los patrones de expresión los miembros de la familia *YABBY* analizados en angiospermas, estos se clasifican en vegetativos y reproductivos (Bartholomes *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2013). Así, *FIL*, *YAB3*, *YAB2* y *YAB5* se expresan preferentemente en cotiledones, hojas y en los órganos florales que evolucionaron a través de modificación de las hojas: sépalos, pétalos, estambres y carpelos, pero nunca en los óvulos, razón por la que se incluyen en la categoría de *YABBY* vegetativos. Por su parte, el grupo de genes *YABBY* reproductivos incluye a las subfamilias *CRC* e *INO*, que se expresan exclusivamente durante el desarrollo de carpelos y óvulos, respectivamente (Siegfried *et al.*, 1999; Villanueva *et al.*, 1999; Du *et al.*, 2020).

A finales del siglo pasado, se describió el gen *CRC* de *Arabidopsis* y su participación en la formación de los nectarios y de caracteres que definen el pistilo de las angiospermas, tales como la diferenciación del estilo y el estigma, la fusión de los márgenes de los carpelos, la especificación de la polaridad adaxial/abaxial del gineceo y la determinación del meristemo floral (Alvarez & Smyth, 1999). La importancia de estas funciones en el desarrollo del carpelo sugiere que los genes *CRC* y su neofuncionalización habrían sido esenciales en el origen evolutivo del carpelo. Por este motivo, en las últimas dos décadas se han realizado numerosas investigaciones basadas en estudios funcionales y análisis de expresión de los genes ortólogos a *CRC* (Yamaguchi *et al.*, 2004; Fourquin *et al.*, 2005, 2007, 2014; Lee *et al.*, 2005b, 2005a; Ishikawa *et al.*, 2009; Orashakova *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009; Nakayama *et al.*, 2010; Yamada *et al.*, 2011; Bartholomes *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2013; Morel *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2018; Strable & Vollbrecht, 2019; Zhao *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2021; Gong *et al.*, 2021). Los resultados de estos estudios proponen que un gen ancestral *CRC-like*, involucrado en la determinación del meristemo floral, la especificación de la polaridad adaxial/abaxial del gineceo y la formación del estilo y el estigma, habría adquirido nuevas funciones durante la diversificación de las especies

en algunos linajes específicos, tal y como se esquematiza en la Figura 16 (Orashakova *et al.*, 2009; Yamada *et al.*, 2011).

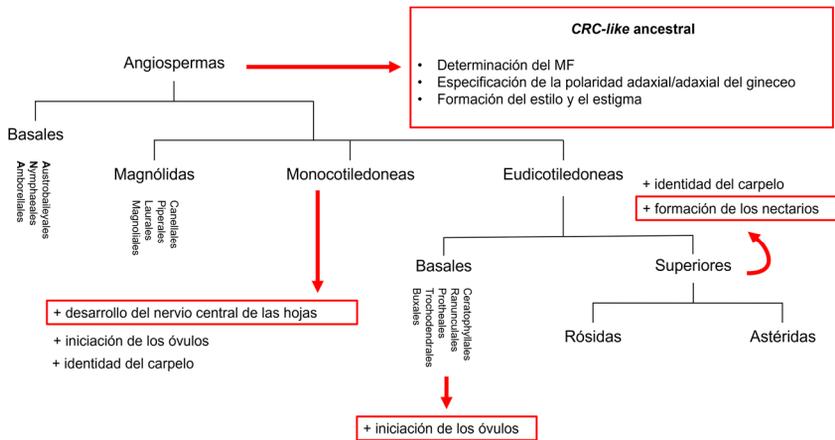


Figura 16. Esquema de las principales funciones adquiridas por la subfamilia de genes *CRC* durante la diversificación de las angiospermas. En el esquema se muestra un resumen de las principales funciones adquiridas por el clado *CRC* y los grandes grupos de angiospermas según el sistema de clasificación APG IV (Angiosperm Phylogeny Group, 2016).

Una de las funciones adquirida por los genes de la subfamilia *CRC* es el desarrollo de los nectarios, un órgano especializado en secretar néctar y maximizar el éxito de la polinización. Aunque la disposición de los principales órganos florales se encuentra muy conservada en la flor, los nectarios pueden encontrarse asociados a cualquiera de ellos, e incluso a órganos vegetativos (Brown, 1938; Bernardello, 2007). El desarrollo de nectarios está muy extendido entre angiospermas basales, monocotiledóneas y eudicotiledóneas pero, sin embargo, solo las plantas eudicotiledóneas superiores han reclutado genes de la subfamilia *CRC* para su formación, probablemente debido a la relación de los nectarios con los órganos reproductivos de la flor en estas especies (Lee *et al.*, 2005b; Bernardello, 2007; Fourquin *et al.*, 2014; Morel *et al.*, 2018).

En la monocotiledónea *Phalaenopsis equestris* y la eudicotiledónea basal *Eschscholzia californica*, los genes *PeDL1/2* y *EcCRC* participan en la determinación del meristemo floral, la polaridad del carpelo y la iniciación de los óvulos, siendo esta última una nueva función adquirida en estas especies (Orashakova *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2021). Sin embargo, en una

monocotiledónea como el arroz, el gen *DROOPING LEAF (DL)*, ortólogo del gen *CRC* de *Arabidopsis*, ha adquirido una nueva función relativa a la diferenciación del nervio central de la hoja. Así, los mutantes *dl* muestran estabilidad mecánica muy reducida de la hoja que resulta en el fenotipo denominado “hoja caída” (del inglés *drooping leaf*). Esta función es compartida por otros ortólogos de *CRC* en monocotiledóneas como *Zea mays*, *Asparagus asparadoides*, *Lilium longiflorum* o *Triticum aestivium*. Además, los genes *DL* de arroz y *PFCRC* de la solanácea *Physalis floridana* establecen la identidad del carpelo (Yamaguchi *et al.*, 2004; Ishikawa *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009; Nakayama *et al.*, 2010; Strable *et al.*, 2017; Strable & Vollbrecht, 2019; Gong *et al.*, 2021)

En dicotiledóneas como *Pisum sativum* y *Medicago truncatula*, los genes *PsCRC* y *MtCRC* parecen haberse especializado en el desarrollo vascular del carpelo y las hojas (Fourquin *et al.*, 2014). Este hallazgo pone en entredicho la premisa de que la especialización de los genes del clado *CRC* en el desarrollo del nervio central de las hojas se produjera tras la diversificación de las monocotiledonas, ya que esta función es compartida por ambas leguminosas, por la eudicotiledonea basal *Aquilegia formosa*, pero también por monocotiledóneas como arroz, trigo, maíz y sorgo (ver referencias en Fourquin *et al.*, 2014). Además, *PsCRC* y *MtCRC* se expresan en estambres, al igual que los genes *CcCRC* y *AmbCRC* de las angiospermas basales *Cabomba caroliniana* y *Amborella trichopoda*, respectivamente. En cambio, no se han detectado niveles de transcritos *CRC* en otras especies de eudicotiledóneas, lo que parece indicar que la expresión de los genes *CRC* en estambres de angiospermas basales y leguminosas no tiene un origen común, sino que es el resultado de procesos de especialización independientes (Fourquin *et al.*, 2005, 2014; Yamada *et al.*, 2011).

Por otro lado, la expresión de los genes de la subfamilia *CRC* en los dominios abaxiales del carpelo se considera ancestral; de hecho, así se ha descrito en varias especies de eudicotiledoneas superiores como *Petunia hybrida* y *P. floridana*, en la monocotiledónea *A. asparagoides* y en las angiospermas basales *A. trichopoda* y *C. caroliniana* (Fourquin *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2005b; Nakayama *et al.*, 2010; Yamada *et al.*, 2011; Morel *et al.*, 2018; Gong *et al.*, 2021). Sin embargo, la expresión de los ortólogos *CRC* en leguminosas

y gramíneas no es específica de la región abaxial del carpelo, sino que se extiende a todo el primordio carpelar. Dada la distancia evolutiva entre leguminosas y gramíneas, es probable que la pérdida de esta función se haya producido independientemente en ambos clados (Yamaguchi *et al.*, 2004; Ishikawa *et al.*, 2009).

Simultáneamente a estos análisis funcionales, distintas investigaciones realizadas en monocotiledóneas (*A. asparagoides* y *Oryza sativa*) (Yamaguchi *et al.*, 2004; Nakayama *et al.*, 2010), eudicotiledóneas basales (*A. trichopoda*, *C. caroliniana*, *E. californica*, *A. formosa* y *Epimedium sagittatum*; Lee *et al.*, 2005b; Fourquin *et al.*, 2005; Orashakova *et al.*, 2009; Yamada *et al.*, 2011; Bartholomes *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2013) y eudicotiledóneas superiores (*A. thaliana*, *Gossypium hirsutum*, *M. truncatula*, *P. sativum* y *Capparis flexuosa*; Alvarez & Smyth, 1999; Bowman & Smyth, 1999; Lee *et al.*, 2005a, 2005b; Fourquin *et al.*, 2007, 2014) han revelado la presencia de una sola copia de *CRC* en el genoma de todos estos linajes. Sin embargo, una duplicación ancestral dio origen a los parálogos *CRCa-CRCb* en solanáceas (Phukela *et al.*, 2020): *SICRCa* y *SICRCb* en *S. lycopersicum* (Huang *et al.*, 2013; Ezura *et al.*, 2017), *CRC1* y *CRC2* en *Nicotiana tabacum* (Lee *et al.*, 2005b), *PhCRC1* y *PhCRC2* en *P. hybrida* (Morel *et al.*, 2018), *NbCRC1* y *NbCRC2* en *N. benthamiana* (Lee *et al.*, 2005b) y *CaCRC1* y *CaCRC2* en *Capsicum annum* (Deng *et al.*, 2020). De estas parejas de parálogos, hasta la fecha se han realizado estudios funcionales de los genes *PhCRC1* y *PhCRC2* de *P. hybrida*, que actúan de forma redundante en el desarrollo de los nectarios, la polaridad del carpelo y la determinación del meristemo floral, así como de *PFRC*, la única copia funcional de *P. floridana*, que interviene en la determinación del meristemo floral, la formación de los carpelos y además confiere identidad a pétalos, estambres y carpelos a través de la interacción con los genes MADS-box de clase B (Morel *et al.*, 2018; Gong *et al.*, 2021).

4.4. Otros genes implicados en la determinación floral

Además de la regulación de la determinación del meristemo floral mediada por la ruta AG-WUS, se han identificado otros factores implicados en este proceso que actúan aguas arriba o en vías paralelas a AG.

Un ejemplo de estos factores son los genes *ULTRAPETALA1* (*ULT1*), *REBELOTE* (*RBL*) y *SQUINT* (*SQN*) que inducen la expresión de AG y regulan de forma redundante el dominio de expresión de WUS en el meristemo floral. A partir del análisis de los mutantes *ult1*, *rbl* y *sqn* se pudo deducir que la mutación de estos genes de forma individual tiene un efecto menor en la determinación del carpelo. No obstante, cuando estos mutantes se combinan entre sí o con mutaciones en los genes AG, *SUP* o *CRC*, se desencadena una fuerte indeterminación del MF que desarrolla reiteradamente verticilos florales (Prunet *et al.*, 2008). De forma similar, el mutante de pérdida de función del locus *JAIBA* (*JAB*), *jab*, muestra defectos en el desarrollo de los órganos reproductivos de la flor, pero combinado con la mutación *crc-1*, los mutantes dobles *jab crc-1* muestran alteraciones severas en la determinación del meristemo floral (Zúñiga-Mayo *et al.*, 2012).

El locus *SUP*, además de establecer los márgenes entre los verticilos 3 y 4 para evitar la expresión de los genes de función B en este último, está involucrado en la determinación del meristemo floral, pero de forma paralela a AG. El análisis de los mutantes *sup:knu* indica que *SUP* y *KNU* actúan de forma independiente pero coordinada para iniciar y mantener la determinación del MF (Bowman *et al.*, 2012; Breuil-Broyer *et al.*, 2016). Junto a ellos, el factor de transcripción bZIP *PERIANTHIA*, también afecta a la actividad del meristemo floral a través de la inducción de AG durante las primeras etapas del desarrollo floral (Running & Meyerowitz, 1996; Chuang *et al.*, 1999; Das *et al.*, 2009; Maier *et al.*, 2009).

Además, se han descrito distintos microRNAs que juegan un papel importante en la determinación del MF a través de la regulación de genes clave en este proceso. Un ejemplo lo encontramos en el miR172 que promueve la determinación floral, reduciendo la expresión de *AP2*, que a su vez reprime la actividad del gen AG (Chen, 2004). Recientes estudios han propuesto que los niveles de expresión de WUS dependen en parte de la

actividad de *AP2*. Dado que el *locus FUL* y el miR172 son reguladores negativos de *AP2*, la inducción de *FUL* y miR172 produce una disminución de la actividad *AP2* y, por lo tanto, de la expresión de *WUS* (Balanzà *et al.*, 2018).

El miR165/166, por su parte, modula el equilibrio de la expresión de los genes de clase III HD-ZIP *PHABULOSA (PHB)* y *PHAVOLUTA (PHV)* PHB/PHV, esencial para una determinación floral adecuada. De hecho, tanto la reducción de la expresión de PHB/PHV por la sobreexpresión de miR165/166, como el desajuste de la expresión que experimentan alelos de *PHB* y *PHV* resistentes a la regulación por el miR165/166, conducen a una actividad prolongada del MF y, por tanto, a la producción de un número indeterminado de órganos florales (Prigge *et al.*, 2005; Ji *et al.*, 2011).

Además, el gen *ARGONAUTE10 (AGO10)* y su homólogo *ARGONAUTE1 (AGO1)* son necesarios para la determinación del meristemo floral en el momento preciso, a través de la interacción con los miR172 y miR165/166. Para ello, por un lado, las proteínas AGO10 y AGO1 se asocian con el miR172 para mediar en la represión de *AP2* y por otro ejercen efectos opuestos sobre el miR165/166. Así, mientras AGO1 media en las funciones de miR165/166, AGO10 reprime su expresión (Ji *et al.*, 2011).

En tomate, se han descrito múltiples mutantes que presentan fenotipos de flor o fruto indeterminados. Uno de los casos más llamativos es el de los mutantes de pérdida de función del gen de función E, *TM29*. Estos mutantes desarrollan flores con defectos en los cuatro verticilos, permaneciendo el más interno de ellos indeterminado. Los carpelos mutantes desarrollan frutos en los que se observa el crecimiento ectópico de brotes secundarios capaces de romper el pericarpio y emerger al exterior. Estos brotes producen estructuras similares a hojas y flores que reproducen el mismo fenotipo que las flores primarias, volviendo a desarrollar brotes ectópicos de forma reiterada (Figura 17A; Ampomah-Dwamena *et al.*, 2002). *TM5*, el otro gen de función E descrito en tomate, también se relaciona con la regulación de la determinación del MF, ya que entre sus funciones está establecer el número adecuado de verticilos y órganos florales (Figura 17B; Pnueli *et al.*, 1994a).

Además, algunos factores de transcripción que controlan el desarrollo temprano de los órganos laterales también parecen tener un papel fundamental en el desarrollo de la flor y el fruto del tomate. Normalmente, el factor de transcripción NO APICAL MERISTEM/CUP-SHAPED COTYLEDON (NAM/ CUC) *GOBLET* (*GOB*) se expresa en áreas específicas que señalan y preceden el inicio de los foliolos. Sin embargo, la expresión ectópica de *GOB* conduce a la formación de un elevado número de órganos en todos los verticilos florales y el desarrollo de frutos con carpelos adicionales que emergen desde interior del gineceo (Figura 17C; Berger *et al.*, 2009). Así mismo, la sobreexpresión del gen de la familia KNOX, *TOMATO KNOTTED2* (*LeT6/TKn2*) prolonga la fase de proliferación del SAM en relación con el inicio de la organogénesis dando como resultado el desarrollo de meristemos de mayor tamaño que producen un mayor número de órganos laterales. Por tanto, estas plantas presentan meristemos florales de gran tamaño que desarrollan un elevado número órganos y rara vez fructifican (Figura 17D; Janssen *et al.*, 1998).

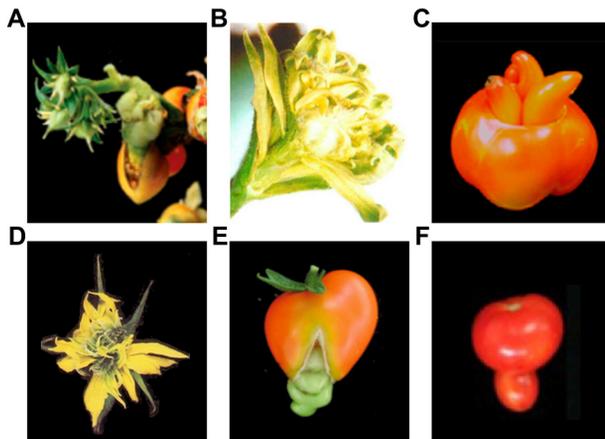


Figura 17. Fenotipos de indeterminación de flor y fruto en tomate. (A) Flor y fruto de plantas ARN *TM29* antisentido. Adaptado de Ampomah-Dwamena *et al.* (2002). (B) Flor de plantas ARN *TM5* antisentido. Adaptado de Pnueli *et al.* (1994a). (C) Fruto del alelo de ganancia de función del gen *GOB*, *Gob-4d*. Adaptado de Berger *et al.* (2009). (D) Flor portadora de la construcción *35S:LeT6*. Adaptado de Janssen *et al.* (1998). (E) Fruto mutante de las líneas de sobreexpresión *OE-156*. Adaptado de Ferreira e Silva *et al.* (2014). (F) Fruto mutante de pérdida de función *procera*. Adaptado de Carrera *et al.* (2012).

Al igual que en *Arabidopsis*, junto con los factores de transcripción, los miRNAs juegan un papel importante en la determinación del meristemo floral. Entre ellos, el miR156 regula la expresión de los miembros de la familia SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN LIKE (SPL o SBP box) (Schwab *et al.*, 2005; Salinas *et al.*, 2012). En tomate se han descrito 15 miembros de esta familia conocidos como *Solanum lycopersicum* SBP box (SlySBP). Así, la sobreexpresión del *AtMIR156b* en plantas de tomate, *OE-156*, conduce a una reducción de la expresión de la mayor parte de los genes SlySBP y a la aparición de fenotipos mutantes consistentes en alteraciones morfológicas de flores y frutos acompañadas de la indeterminación de los mismos. Las flores desarrollan estructuras meristemáticas en lugar de ovarios y óvulos que desencadenan la producción de estructuras vegetativas ectópicas y carpelos adicionales en el interior del carpelo principal (Figura 17E). Además, en las plantas *OE-156* se observa una sobreexpresión de los factores de transcripción *LeT6/TKn2* y *GOB* que indica que los genes *SlySBP* diana de miR156, *LeT6/TKn2* y *GOB*, podrían formar parte de una misma ruta para regular la determinación del MF. Por el contrario, la expresión de *TAG1* y *TM29* no se ve afectada en el mutante *OE-156* por lo que los genes *SlySBP* diana de miR156 actuarían en una ruta reguladora independiente de *TAG1* y *TM29* (Ferreira e Silva *et al.*, 2014).

Por otro lado, se ha observado que altas concentraciones de giberelinas están relacionadas con la determinación del MF. Por ende, el mutante de tomate *procera* (*pro*), que contiene un SNP en la secuencia codificante del gen represor de la señalización de giberelinas *SIDELLA*, desarrolla un fenotipo pleiotrópico en el que se ven afectados diversos caracteres vegetativos, así como el número de órganos que se desarrollan en cada uno de los verticilos florales. Además, aproximadamente un tercio de los frutos *pro* desarrollan estructuras carpelares adicionales en el interior del carpelo principal (Figura 17F; Carrera *et al.*, 2012).

5. El desarrollo del fruto de tomate

Una vez cesa la actividad del meristemo floral y se completa la formación del gineceo tiene lugar la fertilización de los óvulos. Tras ella, los carpelos se desarrollan para formar el fruto, un órgano complejo especializado en la maduración y la dispersión de las semillas que garantiza la supervivencia de la especie (Lozano *et al.*, 2009).

Como describimos en el apartado anterior, el proceso de determinación del meristemo floral está estrechamente relacionado con el número de carpelos que desarrolla la flor y, por consiguiente, con el número de lóculos que formarán el fruto. Por tanto, este proceso es decisivo en cuanto al tamaño final del fruto y su apariencia exterior, dos parámetros que condicionan en gran medida su valor comercial. El tamaño de fruto viene dado principalmente por el número de lóculos que lo conforman (Tanksley, 2004). En este sentido se han identificado las mutaciones *fasciated (fas)*, *locule number (lc)* y *excessive number of floral organs (eno)*. Estas mutaciones causan un desajuste en la expresión del gen *WUS*, que resulta en la producción de un elevado número de carpelos y finalmente la producción de frutos multiloculados de gran tamaño (Muños *et al.*, 2011; Van der Knaap *et al.*, 2014; Fernández-Lozano *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2015; Yuste-Lisbona *et al.*, 2020). La mutación *fas* está causada por una inversión de 294-kb en el promotor del gen ortólogo a *CLV3* de Arabidopsis, *SlCLV3*, mientras que *lc* está asociada a dos SNPs en un elemento regulador 15 pb aguas abajo del gen ortólogo de *WUS* de Arabidopsis, *SlWUS*. La mutación *eno*, por su parte, se relaciona con un SNP en el codón de iniciación de la traducción del gen *ENO* que codifica un factor de transcripción de tipo AP2/ERF.

No obstante, en ocasiones pueden aparecer rasgos fenotípicos asociados a la determinación del meristemo floral no deseables en cuanto a la calidad externa del fruto en la medida en que afectan negativamente a su valor comercial. Algunos de estos rasgos consisten en anomalías en el cierre pistilar, como las que encontramos en los frutos que desarrollan las líneas de silenciamiento RNAi *SlKNU* (Figura 18A) y RNAi *SlIMA* (Figura 18B) descritas por Bollier *et al.* (2018), los dobles y triples mutantes *eno:lc* (Figura 18C), *eno:fas* (Figura 18D) y *eno:fas:lc* (Figura 18E) descritas por Yuste-Lisbona *et*

al. (2020), o la producción de estructuras secundarias de flor o fruto que emergen desde el interior del fruto principal. Como ejemplo de estos últimos, encontramos los frutos que desarrollan los mutantes *tag1* (Figura 11 A,B; Pnueli *et al.*, 1994b; Pan *et al.*, 2010), las líneas ARN antisentido del gen *TM29* (Figura 17A; Ampomah-Dwamena *et al.*, 2002), las plantas mutantes *Gob-4d* (Figura 17C; Berger *et al.*, 2009), las líneas de sobreexpresión *OE-156* (Figura 17E; Ferreira e Silva *et al.*, 2014) o el mutante *procera* (Figura 17F; Carrera *et al.*, 2012).



Figura 18. Frutos de tomate con anomalías en el cierre pistilar. (A-E) Cierre pistilar de frutos (A) RNAi *SIKNU*, (B) RNAi *SIIMA*, (C) *eno:lc*, (D) *eno:fas* y (E) *eno:lc:fas*. Adaptado de Bollier *et al.* (2018) y Fernández-Lozano, (2019).

En conclusión, la correcta coordinación de los mecanismos que regulan la determinación floral es esencial para garantizar la calidad externa del fruto que será determinante en su comercialización.



Objetivos

Objetivos

Además de constituir el cultivo hortícola de mayor relevancia económica, el tomate (*Solanum lycopersicum* L.) se ha convertido en los últimos años en una especie modelo para el estudio del desarrollo reproductivo en plantas, y en particular de aquellas que producen frutos carnosos. Pese a ello, nuestro conocimiento en torno a la base genética de los mecanismos que regulan el desarrollo floral y de fruto sigue siendo escaso. La identificación y el análisis de mutantes ha sido un factor determinante en la aparición de nuevos cultivares, pero también ha permitido la disección genética de procesos tan complejos como los que controlan la identidad de los órganos florales o la determinación del carpelo (Coen & Meyerowitz, 1991; Pelaz *et al.*, 2000; Malcomber & Kellogg, 2005; Fourquin *et al.*, 2014). El grupo de Genética y Fisiología del Desarrollo Vegetal (AGR176) de la Universidad de Almería dispone de una amplia colección de mutantes de tomate obtenidos mediante sendos programas de mutagénesis insercional (T-DNA) y química (EMS), a partir de los cuales se han identificado nuevos genes reguladores del desarrollo como *TAGL1* (Giménez *et al.*, 2010), *HYDRA* (Rojas-Gracia *et al.*, 2016), *DXS1* (García-Alcázar *et al.*, 2017), *SIMED18* (Pérez-Martín *et al.*, 2018), *ENO* (Yuste-Lisbona *et al.*, 2020) o *HAIRPLUS* (Fonseca *et al.*, enviado a Molecular Plant). En esta Tesis Doctoral nos centramos en el aislamiento y el estudio de la función de nuevos genes implicados en la regulación de la determinación del meristemo floral (MF) y su influencia en los patrones de desarrollo del fruto de tomate. Para ello, realizamos el escrutinio de dicha colección de mutantes y seleccionamos la línea *989et73*, a la que denominamos *fruit iterative growth (fig)*, en alusión a su fenotipo característico de “fruto dentro fruto” que muestra este mutante. A partir del análisis genético y la caracterización molecular y funcional de *fig* pretendemos, como objetivo general, profundizar en el conocimiento de los mecanismos genéticos y moleculares que regulan el cese de la actividad meristemática del meristemo floral y la formación del fruto de tomate. Con tal fin, planteamos los siguientes objetivos específicos:

PRIMERO.– Caracterizar los efectos fenotípicos de la mutación *fig* en el desarrollo reproductivo de tomate y llevar a cabo el análisis genético para establecer el modo de herencia del correspondiente alelo mutante.

SEGUNDO.– Aislar el gen afectado por la mutación *fig* y demostrar la causalidad de la misma.

TERCERO.– Determinar las consecuencias transcripcionales de la mutación *fig* durante el desarrollo floral y caracterizar los patrones de expresión del gen *SICRCa* y de su parálogo *SICRCb*.

CUARTO.– Estudiar las funciones de los parálogos *CRC* de tomate y avanzar en el estudio del mecanismo genético y molecular en el que regula la determinación del meristemo floral de tomate.

QUINTO.– Analizar el proceso de diversificación funcional de los parálogos *SICRCa* y *SICRCb* respecto a su ortólogo *CRC* de *Arabidopsis thaliana*, *CRC*, y a otros homólogos de angiospermas.



Materiales y Métodos

Materiales y métodos

1. Material vegetal y condiciones de cultivo

El mutante *fruit iterative growth* (*fig*) procede de la colección de mutantes de inserción de T-DNA generada en el cultivar de fondo genético P73 (Pérez-Martín *et al.*, 2017). Esta colección se generó por transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, usando el vector binario pD991 (Campisi *et al.*, 1999). Las plantas de tomate se cultivaron en condiciones de invernadero bajo luz solar natural (fotoperiodo de 13 a 14 h). Las temperaturas oscilaron entre 26-34 °C y 20-25 °C durante los períodos diurnos y nocturnos, respectivamente. Se utilizaron prácticas de manejo estándar, incluida la adición regular de fertilizantes.

Las plantas mutantes y transgénicas de *A. thaliana* utilizadas en este estudio se encuentran en el fondo genético Landsberg *erecta* (*Ler*) (amablemente proporcionado por la Dra. María Rosa Ponce de la Universidad Miguel Hernández, Elche, España). Las semillas de los mutantes *crabs claw-1* (*crc-1*; CS3814; NASC ID: N3814) (Alvarez & Smyth, 1999) se obtuvieron inicialmente del Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC) en Nottingham, Reino Unido, y se propagaron en nuestro laboratorio para su posterior análisis. Las semillas se esterilizaron superficialmente durante 8 minutos en hipoclorito de sodio al 40 % (v/v) y Tritón X-100 al 1 % (v/v) con agitación periódica, se enjuagaron al menos cuatro veces con agua destilada estéril y se sembraron en placas de Petri que contenían medio de germinación MS (Murashige & Skoog, 1962). Cuando fue necesario, se añadió kanamicina al medio de germinación MS hasta una concentración final de 50 µg/ml. Después del tratamiento en frío a 4 °C durante 24 horas en oscuridad, las placas se incubaron durante 15 días en una cámara de crecimiento a 22 °C con un ciclo de 16 horas de luz/8 horas de oscuridad. Posteriormente, las plantas se cultivaron en macetas a 20 °C y 60-70 % de humedad relativa bajo iluminación constante.

2. Caracterización fenotípica de flores y frutos de tomate

El número de órganos (sépalos, pétalos, estambres y carpelos) desarrollados por flores en estadio de antesis se evaluó en plantas silvestres (WT; del inglés *wild type*) y *fig*. Los fenotipos mutantes se clasificaron en tres categorías, a saber, *WT-like*, débil y severo, en función del grado de indeterminación floral observado. Asimismo, se determinó el peso promedio en gramos (g), el ancho y el largo en milímetros (mm), y el número de lóculos en los frutos producidos por plantas WT y *fig*. Se evaluaron un mínimo de 60 flores y frutos de plantas WT y del mutante *fig* en cada una de las categorías fenotípicas establecidas: expresividad nula (fenotipo *WT-like*), intermedia (fenotipo débil) y alta (fenotipo severo). Para determinar si existen diferencias significativas entre el valor medio de las clases fenotípicas establecidas para cada uno de los caracteres evaluados se utilizó la prueba de la mínima diferencia significativa (LSD; del inglés *Least Significant Difference*) con un nivel de significación del 95 % ($P < 0,05$).

Para los estudios de microscopía óptica, se recolectaron botones florales en diferentes estadios de desarrollo. Las muestras se fijaron en FAE (formaldehído al 10 %, ácido acético al 5 % y etanol absoluto al 50 %), se deshidrataron en series de etanol, se embebieron en parafina y se cortaron con un micrótopo Leica RM2035. Las secciones histológicas de 8 μm se tiñeron utilizando una solución de azul de toluidina al 1 % (m/v) y se observaron con un microscopio Leica DM6 B.

El análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM) se realizó siguiendo el protocolo descrito en Lozano *et al.* (1998). Las muestras de botones florales se diseccionaron manualmente, se fijaron en FAEG (formaldehído al 10 %, ácido acético al 5 %, etanol absoluto al 50 % y glutaraldehído al 0,72 %) y se deshidrataron en series de etanol. Posteriormente, los tejidos se secaron utilizando un secador de punto crítico Bal-Tec CPD030 y se recubrieron con oro en un dispensador de partículas Bal-Tec SCD005. Finalmente, las muestras se visualizaron utilizando un microscopio electrónico de barrido Hitachi S-3500N a 10 kV.

3. Análisis de Southern blot

La presencia o ausencia de inserciones de T-DNA existentes en plantas T_0 y T_1 del mutante *fig* se determinó mediante hibridaciones tipo Southern blot siguiendo el protocolo descrito en Pérez-Martín *et al.* (2017). Brevemente, se digirieron 10 μ g de ADN genómico de las muestras de interés utilizando las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*. El ADN digerido se sometió a electroforesis y una posterior transferencia a membranas de nailon Hybond N⁺ (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EEUU). La hibridación se realizó con una sonda quimérica marcada con [α -32P] dCTP que fusiona la secuencia codificante completa del *locus NPTII* y 811 pb de la secuencia codificante del gen endógeno de tomate *FALSIFLORA* (*FA*). Para la exposición de las membranas de nailon se utilizaron películas de revelado Hyperfilms (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EEUU).

4. Mapeo mediante secuenciación (*mapping by sequencing*)

La estrategia de mapeo por secuenciación se realizó siguiendo lo descrito en Yuste-Lisbona *et al.* (2021). Para llevar a cabo esta estrategia, se generó una población de mapeo F_2 a partir de la autofecundación de una planta F_1 resultante del cruzamiento de una planta mutante *fig*, acigota para la inserción de T-DNA, con una planta de la accesión LA1589 de tomate silvestre *S. pimpinellifolium*. Después de caracterizar fenotípicamente la población generada, se formaron dos *pools* usando cantidades equimolares de ADN de 25 plantas mutantes y 50 plantas de fenotipo WT seleccionadas al azar. El ADN genómico de cada una de estas plantas fue extraído utilizando DNAzol[®] Reagent kit (Invitrogen Life Technologies, San Diego, CA, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación del ADN se realizó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EEUU). La secuenciación de estos *pools* se llevó a cabo en el Genome Center del Instituto Max Planck for Plant Breeding Research (Colonia, Alemania). Las bibliotecas se generaron de acuerdo con el protocolo Illumina TruSeq DNA y se secuenciaron con extremos pareados

(*paired-ends*) de 100 pb de longitud en una plataforma Illumina HiSeq2000 (Illumina Inc., CA, EEUU). Las lecturas se alinearon con la secuencia de referencia del genoma del tomate versión 4.0 (ITAG4.0) utilizando Bowtie2 versión 2-2.0.0-b5 con parámetros predeterminados (Langmead & Salzberg, 2012). Las lecturas duplicadas se eliminaron utilizando la función *MarkDuplicates* de la herramienta Picard (<http://broadinstitute.github.io/picard/>). La asignación de variantes se llevó a cabo utilizando la función *HaplotypeCaller* de GATK (DePristo *et al.*, 2011). A continuación, se utilizó BCFtools del paquete SAMtools (Li *et al.*, 2009) para filtrar mutaciones puntuales bialélicas con una cobertura mínima de 10 lecturas en cada muestra. Posteriormente, se calculó la frecuencia alélica (el número de lecturas para alelos diferentes a la referencia entre el número de lecturas totales) de cada una de las variantes bialélicas seleccionadas. Por último, para identificar la región cromosómica donde se encuentra la mutación causante del fenotipo *fig*, se representaron las frecuencias alélicas promedio a lo largo de cada cromosoma utilizando un script personalizado en el entorno R para computación estadística (R Development Core Team, 2020) que usa una ventana deslizante y un tamaño de paso de 1000 y 100 variantes, respectivamente. Una vez se determinó la región genómica candidata a albergar la mutación *fig*, las variantes alélicas identificadas en ella se filtraron en función de los siguientes criterios: i) variantes que eran heterocigotas (0/1) y homocigóticas (1/1) para el alelo alternativo en los pools WT y mutante, respectivamente; y ii) variantes únicas que no habían sido anotadas previamente en los genomas de tomate secuenciados (Aflitos *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2014).

5. Genotipado del gen *SICRCa* mediante PCR

El ADN genómico procedente de hojas jóvenes de una familia segregante para la mutación *fig* fue extraído utilizando DNAzol® Reagent kit (Invitrogen Life Technologies, San Diego, CA, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación del ADN se llevó a cabo utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EEUU). El locus *SICRCa* se genotipó usando los cebadores SICRCa-Fg y SICRCa-Rg que amplifican un fragmento de 332 pb en plantas homocigotas WT, un fragmento de 699 pb en plantas homocigotas para la mutación *fig* y ambos fragmentos en plantas heterocigotas. Las secuencias de los cebadores utilizados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Secuencias de los cebadores utilizados para el genotipado de *SICRCa* y las construcciones RNAi y CRISPR/Cas9.

Gen	Nombre	Secuencia 5' - 3'	Ensayo
<i>SICRCa</i>	SICRCa-Fg	TGAACCATCATCTCCAAGG	Genotipado
	SICRCa-Rg	TTTCTTGAAAACTAAAGTGGCAAT	
<i>SICRCa</i>	SICRCa-Fi	TCTAGACTCGAGACACTCTTCAAAGTCCAAAAA	RNAi
	SICRCa-Ri	ATCGATGGTACCATGGTGTTAATTTTATGATCAGCAG	
<i>SICRCa</i>	SICRCa-CR-F	ATTGTATCCAACAACCTCTTGCA	CRISPR/ Cas9 sgRNA
	SICRCa-CR-R	AAACTGCAAGAAGTTGTTGGATA	
<i>SICRCb</i>	SICRCb-CR-F	ATTGTATCCATTAGCCTCTTGTA	CRISPR/ Cas9 sgRNA
	SICRCb-CR-R	AAACTACAAGAGGCTAATGGATA	
<i>SICRCa</i>	SICRCa-CR-Fg	TTTCTCTGTTCTTCACTTTT	CRISPR/ Cas9
	SICRCa-CR-Rg	TTATGCTTTTTGGGGCAAAG	
<i>SICRCb</i>	SICRCb-CR-Fg	CAACACGTGCACTTCATTAGC	CRISPR/ Cas9
	SICRCb-CR-Rg	GTAGGCAGATGGAAGCCTGT	

6. Generación de líneas transgénicas de tomate

Para generar la construcción de ARN de interferencia (RNAi) del gen *SICRCa*, se amplificó un fragmento de 119 pb de la secuencia codificante del gen *Solyc01g0104120* usando los cebadores SICRCa-Fi y SICRCa-Ri (Tabla 2). El producto de PCR resultante se clonó en orientación sentido y antisentido, separados por una secuencia intrónica, en el vector pKannibal (Wesley *et al.*, 2001). El vector pKannibal modificado se digirió con la enzima de restricción *NotI* y el fragmento resultante se clonó en el vector binario pART27 (Gleave, 1992), de acuerdo con el protocolo descrito por Pérez-Martín *et al.* (2017). Las líneas CRISPR/Cas9 de los genes *SICRCa* y *SICRCb* se obtuvieron mediante el sistema GoldenBraid descrito por Vazquez-Vilar *et al.* (2016). La herramienta web Breaking-Cas (Oliveros *et al.*, 2016) fue utilizada para obtener una secuencia de RNA guía (sgRNA) que reconozca de forma específica una región codificante de cada gen *SICRC*, *SICRCa* (GTATCCAACAACCTTCTTTGCA) y *SICRCb* (GTATCCATTAGCCTCTTGTA). Las secuencias de los cebadores usados en la generación de construcciones de RNAi y CRISPR/Cas9 se muestran en la Tabla 2. Los experimentos de transformación genética se llevaron a cabo como se describe en Ellul *et al.* (2003) utilizando la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens*. Los niveles de ploidía de las plantas transgénicas de primera generación (T_0) se evaluaron siguiendo el protocolo descrito previamente por Atarés *et al.* (2011).

En lo que respecta a las líneas CRISPR/Cas9, cada planta transgénica T_0 fue genotipada con cebadores que amplifican una secuencia que incluye la región de reconocimiento de la diana de cada sgRNA. De este modo, se utilizaron las parejas de cebadores SICRCa-CR-Fg/Rg y SICRCb-CR-Fg/Rg (Tabla 2) para amplificar las regiones de interés de los genes *SICRCa* y *SICRCb*, respectivamente. Los productos de PCR se clonaron en el vector pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI, EEUU), y al menos 10 clones por cada producto de PCR se secuenciaron por el método de Sanger. Así, se determinó la naturaleza molecular de las ediciones introducidas en la secuencia genómica de cada gen. Únicamente se seleccionaron para su posterior análisis fenotípico aquellas plantas T_0 que portaban mutaciones *knock-out* bialélicas (dos alelos mutantes en un mismo *locus*) o en

homocigosis. Las plantas dobles mutantes *CR-slcrcb:slcrcb* se generaron realizando cruces estándar entre líneas T₀ CRISPR/Cas9 portadoras de alelos *knock-out* para cada gen de interés, *SICRCa* y *SICRCb*. Posteriormente, las plantas dobles mutantes *CR-slcrcb:slcrcb* fueron identificadas en la progenie T₁ mediante el genotipado de los *loci* de estudio.

7. Extracción de ARN y análisis de expresión mediante RT-qPCR

El ARN total se extrajo utilizando el reactivo TRIzol[®] Reagent (Invitrogen Life Technologies, San Diego, CA, EEUU) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. La cantidad de ARN se estimó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EEUU) y la calidad se verificó mediante electroforesis en gel. El ADN contaminante se eliminó utilizando el kit DNA-freeTM (Ambion, Austin, TX, EEUU). Se utilizó 1 µg de ARN para la síntesis de ADN complementario (cDNA) usando la transcriptasa inversa ML-MLV (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) con una mezcla de cebadores hexámeros aleatorios y oligo(dT)₁₈. El análisis RT-qPCR se llevó a cabo utilizando el kit SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU) en un termociclador 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU). Se analizaron tres réplicas biológicas y dos técnicas de cada réplica biológica. Se utilizó como referencia endógena el gen de expresión constitutiva *Ubiquitin3* (*Solyc01g056940*). La cuantificación de la expresión génica se realizó utilizando el método de cálculo $\Delta\Delta Ct$ (Winer *et al.*, 1999). Las secuencias de las parejas de cebadores utilizadas en este estudio para cada gen analizado se muestran en la Tabla 3.

8. Secuenciación de ARN (RNA-Seq)

Se secuenciaron tres réplicas biológicas por genotipo en cada experimento. En el caso de los genotipos P73 y *fig* cada muestra estaba compuesta por al menos 30 botones florales en estadios de desarrollo de 0 a 6. Para los genotipos *tag1*, RNAi *TAGL1*, *tag1:RNAi TAGL1* y P73, cada replica estaba formada por un mínimo de 30 botones florales en estadios de desarrollo de 0 a 12. El ARN total se aisló usando el reactivo TRIzol® Reagent (Invitrogen Life Technologies, San Diego, CA, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN contaminante se eliminó utilizando el kit DNA-free™ (Ambion, Austin, TX, EEUU). La secuenciación de estas muestras se llevó a cabo en el Genome Center del Instituto Max Planck for Plant Breeding Research (Colonia, Alemania). Las bibliotecas se prepararon de acuerdo con el protocolo de ARN TruSeq de Illumina y se secuenciaron con extremos pareados (*paired-ends*) de 150 pb de longitud en la plataforma Illumina HiSeq2000 (Illumina, Inc., San Diego, CA, EEUU). Las lecturas se alinearon con la secuencia de referencia del genoma del tomate versión 4.0 (ITAG4.0) usando Tophat v2.0.6 (Kim *et al.*, 2013) con los siguientes parámetros: --max-insertion-length 12 --max-deletion-length 12 -g 1 --read-gap-length 12 --read-edit-dist 20 - --read-mismatches 12 --no-coverage-search --read-realign-edit-dist 0 --segment-mismatches 3 --splice-mismatches 1. La cuantificación del número de lecturas por transcrito se realizó utilizando los paquetes GenomicFeatures y GenomicAlignments de Bioconductor (Lawrence *et al.*, 2013). El análisis de expresión diferencial se llevó a cabo con el paquete DESeq2 (Love *et al.*, 2014), utilizando la corrección de prueba múltiple Benjamini-Hochberg (Benjamini & Hochberg, 1995) para reducir el número de falsos positivos (FDR; del inglés *false discovery rate*). Los genes con un *p-valor* ajustado por FDR menor de 0,05 se consideraron como diferencialmente expresados. El análisis de enriquecimiento de términos de Gene Ontology (GO) de los genes diferencialmente expresados se realizó con el software agriGO v2.0 (Tian *et al.*, 2017) utilizando un *p-valor* ajustado por FDR menor de 0,05 con la prueba estadística de Fisher y el ajuste de múltiples pruebas de Bonferroni.

9. Análisis de expresión mediante hibridaciones *in situ*

La preparación de los tejidos, los cortes de las secciones histológicas y la detección de los transcritos en los experimentos de hibridación *in situ* se llevaron a cabo como se describe en Lozano *et al.* (1998). Brevemente, las sondas *SICRCa* (*Solyc01g0104120*), *SICRCb* (*Solyc05g012050*) y *SIWUS* (*Solyc11g071380*) se sintetizaron usando cDNA como molde y utilizando los cebadores *SICRCa-Fz/SICRCa-Rz*, *SICRCb-Fz/SICRCb-Rz* y *SICRCWUS-Fz/SICRCWUS-Rz*, respectivamente, cuyas secuencias se indican en la Tabla 3. Los productos de PCR resultantes se clonaron en el vector pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI, EEUU). Después de la linealización del plásmido, se utilizaron el kit comercial DIG RNA labelling mix (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, EEUU) y las polimerasas T7 o SP6 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, EEUU), dependiendo de la orientación del inserto, para la transcripción *in vitro* de las sondas en orientación antisentido. Como control negativo, se sintetizaron sondas de ARN en sentido y se hibridaron con secciones de botones florales de tomate.

Tabla 3. Cebadores utilizados para los análisis de expresión

Gen	Nombre	Secuencia (5' - 3')	Ensayo
<i>SICRCa</i>	<i>SICRCa-Fq</i>	AGTGAAATGTGGGCATTGTG	RT-qPCR
	<i>SICRCa-Rq</i>	TGTCCCTTCTTGAAATTGTTGA	
<i>SICRCb</i>	<i>SICRCb-Fq</i>	TCATCTACCTCATCAACTGGT	RT-qPCR
	<i>SICRCb-Rq</i>	GATTGTAGGCAGATGGAAGC	
<i>Ubiquitin3</i>	<i>Ubiquitin-Fq</i>	CCAAGATCCAGGACAAGGAA	RT-qPCR
	<i>Ubiquitin-Rq</i>	AAATCAAACGCTGCTGGTCT	
<i>SICRCa</i>	<i>SICRCa-Fz</i>	TGTCTTCTCATCTCCTAATTCC	<i>In situ</i>
	<i>SICRCa-Rz</i>	CCAAATTTTGCTTCACTCCTC	
<i>SICRCb</i>	<i>SICRCb-Fz</i>	ATGGATTATGTTCAATCTTCTGAGC	<i>In situ</i>
	<i>SICRCb-Rz</i>	CTAAACATTGTTGGTATTTCCAGAAT	
<i>SIWUS</i>	<i>SIWUS-Fz</i>	CGCCTTGCCACTGATAATAA	<i>In situ</i>
	<i>SIWUS-Rz</i>	GAAAAGGGTAAGTTGCTGGAGA	

10. Complementación molecular del mutante *crc-1* de *Arabidopsis*

El mutante *crc-1* de *Arabidopsis* se complementó con dos construcciones diferentes, cada una con un fragmento de 3864 pb aguas arriba desde el codón de iniciación del gen *CRC* de *Arabidopsis* que representa su región promotora (pCRC), fusionada a las secuencias codificantes de los genes de tomate *SICRCa* (*pCRC::SICRCa*) o *SICRCb* (*pCRC::SICRCb*). Las secuencias de los cebadores utilizados para amplificar el pCRC de *Arabidopsis* y las regiones codificantes de los genes de tomate se muestran en la Tabla 4. Los productos de PCR se purificaron para su posterior clonación en el vector pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI, EEUU). El pCRC y la región codificante de cada gen se unieron mediante una doble digestión con *XhoI* y una enzima de restricción específica que corta dentro del *poliI* del vector pGEM-T Easy (*AatII* o *SacI* dependiendo de la orientación del inserto en el vector) y la posterior ligación de los fragmentos digeridos obtenidos con la T4 DNA ligasa para reconstruir el plásmido. Las secuencias completas del pCRC fusionada con la secuencia codificante del gen correspondiente se obtuvieron amplificando con los cebadores pCRC-Fac/SICRCa-Rac o pCRC-Fac/SICRCb-Rac (Tabla 4). Los fragmentos amplificados se clonaron en el vector de entrada pENTR/D-TOPO (Invitrogen Life Technologies, San Diego, CA, EEUU) y, finalmente, se recombinaron en el vector binario de destino Gateway pGWB401 (Nakagawa *et al.*, 2007). Todos los plásmidos finales se verificaron mediante secuenciación Sanger y, a continuación, se transformaron en la cepa C58C1 de *Agrobacterium tumefaciens*. Plantas WT del ecotipo *Ler* y mutantes *crc-1* se transformaron mediante el método de inmersión floral descrito por Clough & Bent. (1998). Se seleccionaron plantas transgénicas T₁ en placas suplementadas con 50 µg/ml de kanamicina como se describió previamente en Harrison *et al.* (2006). La caracterización fenotípica de al menos 30 flores y silicuas de plantas *Ler*, *crc-1*, y de las líneas T₁ procedentes de la transformación de *Ler* y *crc-1* con las construcciones *pCRC::SICRCa* y *pCRC::SICRCb* se llevó a cabo utilizando un microscopio digital Leica DMS1000.

Tabla 4. Cebadores utilizados para el ensayo de complementación del mutante *crc-1* de *A. thaliana*.

Gen	Nombre	Secuencia (5' - 3')	Ensayo
<i>SICRCa</i>	SICRCa-Fac	CTCGAGATGTCTTCCTCATCTCC	<i>pCRC::SICRCa</i>
	SICRCa-Rac	TCAGCCAAGGTCCCATTT	
<i>SICRCb</i>	SICRCb-Fac	CTCGAGATGGATTATGTTCAATCTT	<i>pCRC::SICRCb</i>
	SICRCb-Rac	CTAACATTGTTGGTATTTCCAGAAT	
<i>CRC</i>	pCRC-Fac	CACCATCGGTATTAACAACATTTG	<i>pCRC::SICRCa</i>
	pCRC-Rac	CTCGAGGGTCTTTAGCGAATG	<i>pCRC::SICRCb</i>
<i>CRC</i>	pCRC-Seq-1R	CATGGTTTCGGTGTTCAAAA	Chequeo por secuenciación
	pCRC-Seq-2F	ATGTTGTACCACTAAAACACCATAAT	
	pCRC-Seq-2R	CAACAATAACAAAGTCTCTGATCG	
	pCRC-Seq-3F	TTGAGGATAATTTCTCATTGTCCA	
	pCRC-Seq-3R	GCACTACAAATTTTCTGTTTGAGG	
	pCRC-Seq-4F	AACTCAGAATCCAGCAGTATAGAGAA	
	pCRC-Seq-4R	GACCCTAAATGTCACTCCTCGT	
	pCRC-Seq-5F	TCATATTTATACGAAGACATGGTTGAA	

11. Localización subcelular y ensayos de complementación de fluorescencia bimolecular

La localización subcelular de las proteínas codificadas por los genes *SICRCa* y *SICRCb* se evaluó fusionando dichas proteínas con la proteína verde fluorescente (GFP; del inglés *green fluorescence protein*). Así, las secuencias completas de las proteínas SICRCa y SICRCb se clonaron en el vector de entrada pENTR/D-TOPO (Invitrogen Life Technologies, San Diego, CA, EEUU) y se recombinaron en el vector binario de destino Gateway pGWB6 (Nakagawa *et al.*, 2007) para fusionar GFP en el extremo N-terminal de las proteínas de interés.

Para visualizar *in vivo* en células vegetales la interacción de las proteínas SICRCa y SICRCb con las proteínas que forman parte del complejo proteico que regula la expresión de *SIWUS* se realizaron ensayos de

complementación de fluorescencia bimolecular (BiFC). Para ello, se clonaron las secuencias completas de las proteínas SICRCa, SICRCb, SIKNU, SIIMA, SIHDA1 y SITPL1 en el vector de entrada pENTR/D-TOPO (Invitrogen Life Technologies, San Diego, CA, EEUU) y se recombinaron en los vectores binarios de destino Gateway que contienen los fragmentos N- o C-terminales de la proteína amarilla fluorescente (YFP; del inglés *yellow fluorescence protein*; vectores pYFN43 y pYFC43, respectivamente). Las construcciones se transformaron en la cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens* y se infiltraron en hojas de *Nicotiana benthamiana* de plantas de 2-3 semanas de edad. Las plantas se mantuvieron en condiciones de día largo (16 horas de luz/8 horas de oscuridad) a 22 °C. Las muestras se observaron 3 días después de la infiltración utilizando un microscopio confocal Nikon ECLIPSE Ti equipado con la unidad de escaneo láser Nikon C2 Si. Las secuencias de los cebadores utilizados en los experimentos de localización subcelular y los ensayos BiFC se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Cebadores utilizados para clonar la secuencia codificante de los genes estudiados en los ensayos de localización subcelular e interacciones proteína-proteína en el vector pENTR/D-TOPO.

Gen	Nombre	Secuencia (5' - 3')	Ensayo
<i>SICRCa</i>	SIICRCa-Ft	CACCATGTCTTCCTCATCTCTCT	Clonación en pENTR/D-TOPO
	SIICRCa-Rt	TCAGCCAAGGTCCCATTT	
<i>SICRCb</i>	SICRCb-Ft	CACCATGGATTATGTTCAATCTTCT	Clonación en pENTR/D-TOPO
	SICRCb-Rt	CTAAACATTGTTGGTATTTCCAGAAT	
<i>SIKNU</i>	SIKNU-Ft	CACCATGGCGGACCACAC	Clonación en pENTR/D-TOPO
	SIKNU-Rt	CTACAAACGAAGGGTAAGGTCGAGAT	
<i>SIIMA</i>	SIIMA-Ft	CACCATGAAAAAAGTTTTGAGG	Clonación en pENTR/D-TOPO
	SIIMA-Rt	TCATTTAGTAGTAGAAGAAGCGGAAG	
<i>SIHDA1</i>	SIHDA19-Ft	CACCATGGATGTTGGAGGA	Clonación en pENTR/D-TOPO
	SIHDA19-Rt	TTAGGAGATAATATCAGTTGGTTGATC	
<i>SITPL1</i>	SITPL1-Ft	CACCATGTCTTCTTTAGCAGAGA	Clonación en pENTR/D-TOPO
	SITPL1-Rt	TCATCTTTGAACTTGGTCAGCA	

12. Ensayos de coimmunoprecipitación

Para los ensayos de coimmunoprecipitación (CoIP), los vectores de entrada pENTR/D-TOPO que contenían las secuencias completas en marco de lectura abierto de las proteínas fusionadas de interés se recombinaron en los vectores binarios de destino Gateway pGWB6 y pGWB15 (Nakagawa *et al.*, 2007), que contienen las etiquetas GFP o HA, respectivamente. Las construcciones se transformaron en la cepa GV3101 de *A. tumefaciens*. Posteriormente, se cotransfectaron transitoriamente hojas de *N. benthamiana* de plantas de 2-3 semanas de edad con cultivos de la cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens* que expresan las proteínas SICRCa o SICRCb fusionadas con GFP (SICRCa^{GFP} o SICRCb^{GFP}) y los diferentes miembros del complejo proteico que regula la expresión de *SIWUS* etiquetados con hemaglutinina (HA) (SIKUN^{HA}, SIIMA^{HA}, SIHDA1^{HA} o SITPL1^{HA}). Además, la construcción SICRCb^{GFP} se cotransfectó con el vector que expresa la proteína SICRCa marcada con HA (SICRCa^{HA}). Las plantas se mantuvieron en condiciones de día largo (16 h de luz/8 h de oscuridad) a 22 °C. La posterior extracción de proteínas se realizó a partir de hojas recolectadas 3 días después de la infiltración. El material vegetal se trituró en nitrógeno líquido y se homogeneizó en un tampón de extracción de proteínas (Tris-HCl 25 mM, pH 7,4, NaCl 75 mM, Nonidet P-40 al 0,5 %, desoxicolato de sodio al 0,05 %, β-mercaptoetanol 10 mM, 1 mM Cóctel inhibidor de proteasa libre de PMSF y cComplete-EDTA (Roche Applied Science, Indianápolis, IN, EE. UU)). Los extractos de proteínas se centrifugaron dos veces a 14.000 g durante 10 min a 4 °C. Después de la lisis celular, las proteínas etiquetadas con GFP se capturaron magnéticamente utilizando el kit de aislamiento μMACS (Miltenyi Biotec S.L., Bergisch Gladbach, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras resultantes se analizaron por SDS-PAGE y Western blot usando anticuerpos anti-GFP-HPR (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) y anti-HA-peroxidasa (Roche Applied Science, Basilea, Suiza) para determinar si las proteínas de interés están formando complejos proteicos.

13. Alineamiento de secuencias y análisis de microsintenia

Las secuencias de aminoácidos de las proteínas CRC (NP_177078) de *Arabidopsis* y SICRCa (XP_004228849) y SICRCb (XP_004239032) de tomate, obtenidas de la base de datos de GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), se alinearon por pares utilizando la herramienta BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). El estudio de microsintenia para evaluar el grado de conservación de las regiones genómicas que albergan el gen *CRC* de *Arabidopsis* y los genes *SICRCa* o *SICRCb* de tomate se llevó a cabo con la herramienta GEvo disponible en el servidor CoGe (<https://genomevolution.org/coge/GEvo.pl>). De este modo, se realizaron alineamientos genómicos por pares entre la región genómica que comprende 10.000 nucleótidos a la izquierda y a la derecha del gen *CRC* de *Arabidopsis* en el cromosoma 1 (posiciones: 25.997.465-26.019.059; TAIR v10.02), y la región genómica que contiene 30000 nucleótidos a la izquierda y derecha de los genes de tomate *SICRCa* o *SICRCb* en los cromosomas 1 (posiciones: 5.022.049-5.084.644; ITAG4.0) y 5 (posiciones: 5.323.844-5.385.856; ITAG4.0), respectivamente.



Resultados

Resultados

En la presente memoria se describen los resultados obtenidos de la caracterización fenotípica y el análisis genético del mutante *fruit iterative growth (fig)*, que nos han permitido identificar dos genes parálogos de tomate, denominados *Solanum lycopersicum CRABS CLAWa* y *Solanum lycopersicum CRABS CLAWb*, homólogos a *CRABS CLAW* de *Arabidopsis*, como factores esenciales que regulan el desarrollo del gineceo y la determinación del meristemo floral.

1. Caracterización fenotípica y análisis genético del mutante *fruit iterative growth (fig)*

El mutante inicialmente denominado *989et73* se identificó a partir de una familia T₁ proveniente de un programa de mutagénesis insercional en tomate, en el que participaron el Grupo de Cultivos *in vitro* del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP-UPV, Valencia), el Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC, Murcia) y el Grupo de Genética y Fisiología del Desarrollo Vegetal de la Universidad de Almería (Almería). En dicho programa se usó el vector binario pD991 (Campisi *et al.*, 1999) para la generación de más de 7800 líneas transgénicas de tomate que se evaluaron en condiciones *in vitro* y en invernadero para detectar mutantes afectados en el desarrollo vegetativo y reproductivo (Pérez-Martín *et al.*, 2017). La denominación *989et73* del mutante se debe a: i) el hecho de ser parte de la progenie de la línea T₀ de código 989, ii) en el programa de mutagénesis se utilizó una construcción génica de tipo *enhancer trap (et)*, y iii) el fondo genético en el que se llevó a cabo tal programa fue el cultivar P73 de tomate (73).

El crecimiento vegetativo de las plantas T₁ portadoras de la mutación *989et73* fue similar al de las plantas silvestres. Por el contrario, se detectó un aumento en el número de órganos florales de las plantas *989et73*, siendo dicho incremento más notable en el caso de los carpelos (Figura 19A-C; Tabla 6; Tabla 7). Los estambres mutantes, en los casos más extremos, perdían la fusión lateral debido al sobrecrecimiento del ovario motivado a

su vez por el excesivo número de carpelos. En consecuencia, los frutos formados a partir de flores mutantes se caracterizaban por presentar estructuras carpelares adicionales que crecían de manera reiterada e indeterminada desde el interior del fruto principal (Figura 19A-C; Tabla 6; Tabla 7). La singularidad de este fenotipo nos llevó a renombrar el mutante *989et73* como *fruit iterative growth (fig)*.

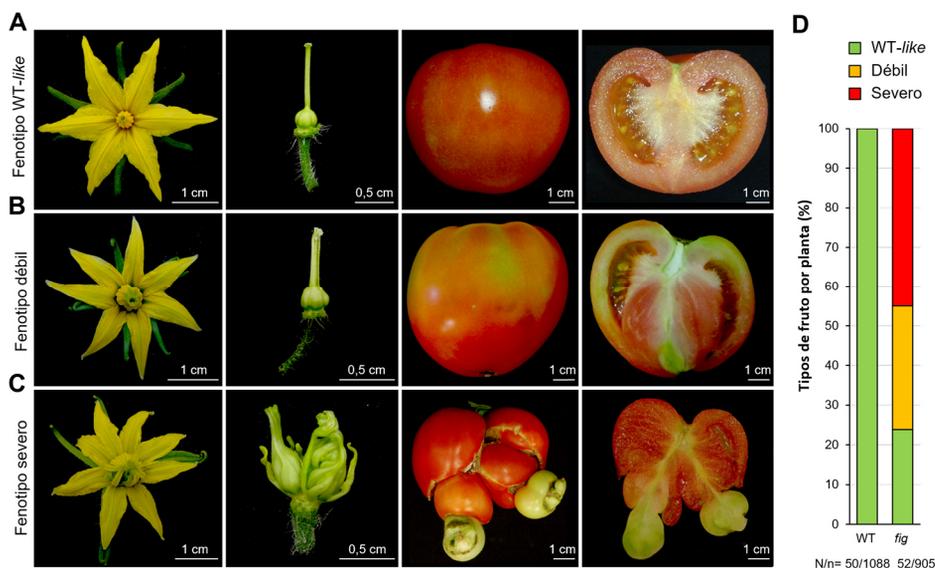


Figura 19. Caracterización fenotípica del mutante *fig*. (A-C) De izquierda a derecha se muestran flores, pistilos, frutos cerrados y secciones longitudinales de fruto, todos ellos desarrollados por plantas homocigóticas mutantes *fig*, pero con distinto grado de penetrancia y expresividad. (A) expresividad nula (fenotipo WT-like, idéntico al WT), (B) expresividad intermedia (fenotipo débil) y (C) expresividad alta (fenotipo severo). (D) Porcentaje de los distintos tipos de fruto (WT-like, débil o severo) producido por plantas WT y mutantes *fig*. N: número total de plantas evaluadas, n: número de frutos caracterizados.

La segregación observada en la población T₁ (39 WT: 15 *fig*) se ajustó a una herencia monogénica recesiva de la mutación *fig* ($\chi^2 = 0,22$; $P = 0,64$). No obstante, el fenotipo mutante presentó penetrancia incompleta y expresividad variable en la medida en que fue posible observar variación fenotípica entre plantas homocigóticas mutantes, e incluso en frutos de una misma planta o inflorescencia. De hecho, en una planta mutante *fig* es posible observar un rango de fenotipos en flores y frutos que varía desde un fenotipo indistinguible del silvestre, al que denominamos WT-like, hasta

fenotipos que presentan defectos significativos en el desarrollo y que dividimos en dos categorías, débil y severo, según el grado de tales anomalías (Figura 19A-C; Figura 20; Tabla 6; Tabla 7).



Figura 20. Variabilidad morfológica del fruto observada en plantas de fenotipo severo del mutante *fig*. Escala = 1 cm.

Tabla 6. Número de órganos desarrollados por flores mutantes *fig* con fenotipo *WT-like*, débil y severo, en relación con las flores wild-type (WT).

Fenotipo de flor (N)	Número de órganos florales			
	Sépalos	Pétalos	Estambres	Carpelos
Wild-type (WT) (N = 71)	5,9 ± 0,6 (a)	5,9 ± 0,6 (a)	6,1 ± 0,7 (a)	3,5 ± 0,7 (a)
<i>fig</i> WT-like (N = 66)	5,8 ± 0,6 (a)	5,9 ± 0,7 (a)	6,0 ± 0,7 (a)	3,4 ± 0,7 (a)
<i>fig</i> débil (N = 75)	6,1 ± 0,5 (b)	6,2 ± 0,4 (b)	6,3 ± 0,6 (a)	4,6 ± 1,1 (b)
<i>fig</i> severo (N = 67)	6,3 ± 0,9 (c)	6,6 ± 0,9 (c)	6,9 ± 1,3 (b)	11,5 ± 7,1 (c)

Se evaluaron flores en antesis de plantas WT y *fig* con tres niveles de expresividad, a saber, *WT-like*, débil y severo. N: número de flores caracterizadas en cada caso. Los datos se representan como la media ± la desviación estándar. Las diferencias significativas se calcularon mediante comparaciones por pares de las medias utilizando la prueba de la mínima diferencia significativa (LSD; del inglés *Least Significant Difference*). Solo los valores acompañados por letras distintas se consideran estadísticamente diferentes ($P < 0,05$).

Tabla 7. Parámetros que caracterizan a los frutos mutantes *fig* maduros de fenotipo *WT-like*, débil y severo, en relación con los producidos por plantas wild-type (WT).

Fenotipo de fruto (N)	Peso (g)	Diámetro (mm)		Número de lóculos
		Ecuatorial	Longitudinal	
Wild-type (WT) (N = 84)	126,5 ± 40,9 (a)	63,7 ± 8,1 (a)	52,7 ± 6,5 (a)	3,7 ± 0,8 (a)
<i>fig</i> WT-like (N = 62)	130,4 ± 47,1 (a)	63,8 ± 8,9 (a)	51,7 ± 7,3 (a)	4,0 ± 1,0 (a)
<i>fig</i> débil (N = 60)	124,7 ± 53,8 (a)	62,8 ± 8,7 (a)	54,4 ± 10,2 (a)	7,2 ± 1,2 (b)
<i>fig</i> severo (N = 116)	116,4 ± 48,3 (a)	62,5 ± 10,3 (a)	51,8 ± 10,5 (a)	17,3 ± 6,0 (c)

Se evaluaron frutos maduros producidos por plantas WT y *fig* con tres niveles de expresividad, a saber, *WT-like*, débil y severo. N: número de frutos caracterizados en cada caso. Los datos se representan como la media ± la desviación estándar. Las diferencias significativas se calcularon mediante comparaciones por pares de las medias utilizando la prueba de la mínima diferencia significativa (LSD; del inglés *Least Significant Difference*). Solo los valores acompañados por letras distintas se consideran estadísticamente diferentes ($P < 0,05$).

Para completar el análisis fenotípico del mutante *fig* se llevó a cabo un estudio mediante microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido (SEM) de botones florales en distintas etapas de desarrollo. Las imágenes derivadas de este estudio revelaron que las primeras alteraciones en la diferenciación de los primordios florales son visibles en fases relativamente tempranas del desarrollo, concretamente en el estadio floral 5, según una estimación realizada a partir del tamaño del botón floral (Brukhin *et al.*, 2003). En este estadio de desarrollo, al igual que ocurre en los botones florales WT, los carpelos emergen y aparecen las cavidades ováricas. No obstante, estas últimas muestran estructuras carpelares anómalas en flores de fenotipo *fig*, tanto débil como severo (Figura 21; Figura 22). Posteriormente, en estadios 8 y 9 del desarrollo floral, el gineceo de flores mutantes *fig* muestra un incremento del número de carpelos, que además se fusionan de manera incompleta (Figura 21B, C; Figura 22B, C). Asimismo, las secciones histológicas de flores en anthesis muestran el desarrollo de estilos más cortos y gruesos compuestos por numerosos carpelos que crecen unos dentro de otros. Estas diferencias fueron más acusadas en flores de fenotipo *fig* severo, las cuales producen ovarios de tamaño tres veces mayor que el de flores silvestres (Figura 19A, C; Figura 22A, C). Cabe señalar, que la variación fenotípica que exhiben las flores de mutantes *fig*, y que afecta principalmente al número de carpelos que se inician en el verticilo más interno (verticilo 4), se corresponde con un nivel similar de variación en el fenotipo del fruto. Así, a partir de flores mutantes *fig* se desarrollan frutos de fenotipo WT-like, idéntico al WT (Figura 19A); débil, caracterizado por producir estructuras secundarias de fruto que solo son visibles en el interior del fruto (Figura 19B); y frutos de fenotipo severo en los que las estructuras secundarias rompen el pericarpio y son visibles desde el exterior (Figura 19C; Figura 20). El porcentaje de frutos de fenotipo WT-like, débil y severo producidos por planta mutante *fig* fue 22,9, 14,4 y 61,7 %, respectivamente (Figura 19D). A pesar de estas anomalías, los frutos mutantes *fig* desarrollaron semillas viables aunque su número disminuía al aumentar la severidad del fenotipo.

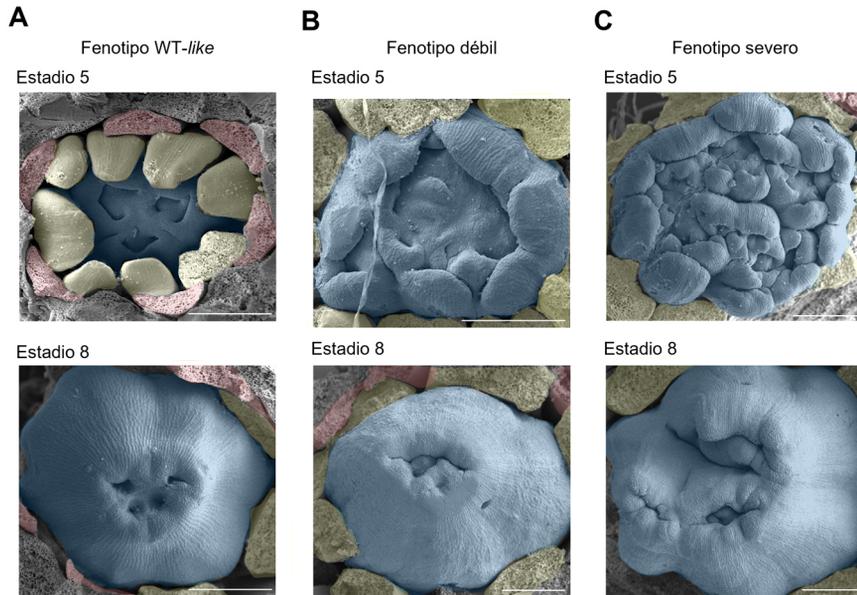


Figura 21. Diferenciación de los primordios de carpelos en los estadios 5 y 8 del desarrollo floral de plantas mutantes *fig*. (A-C) El estudio realizado mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) muestra la variación fenotípica observada en botones florales *fig*, con tres niveles de expresividad, (A) *WT-like*, idéntico al cultivar P73 utilizado como fondo genético silvestre, (B) fenotipo débil, y (C) fenotipo severo. Para propiciar una mejor visualización de los carpelos, se eliminaron los sépalos (verticilo 1) de los botones florales en estadio 5, y los sépalos, pétalos (verticilo 2) y estambres (verticilo 3) en los botones florales en estadio 8. Los pétalos están coloreados en rosa, los estambres en amarillo y los carpelos en azul. Escala = 300 μ m.

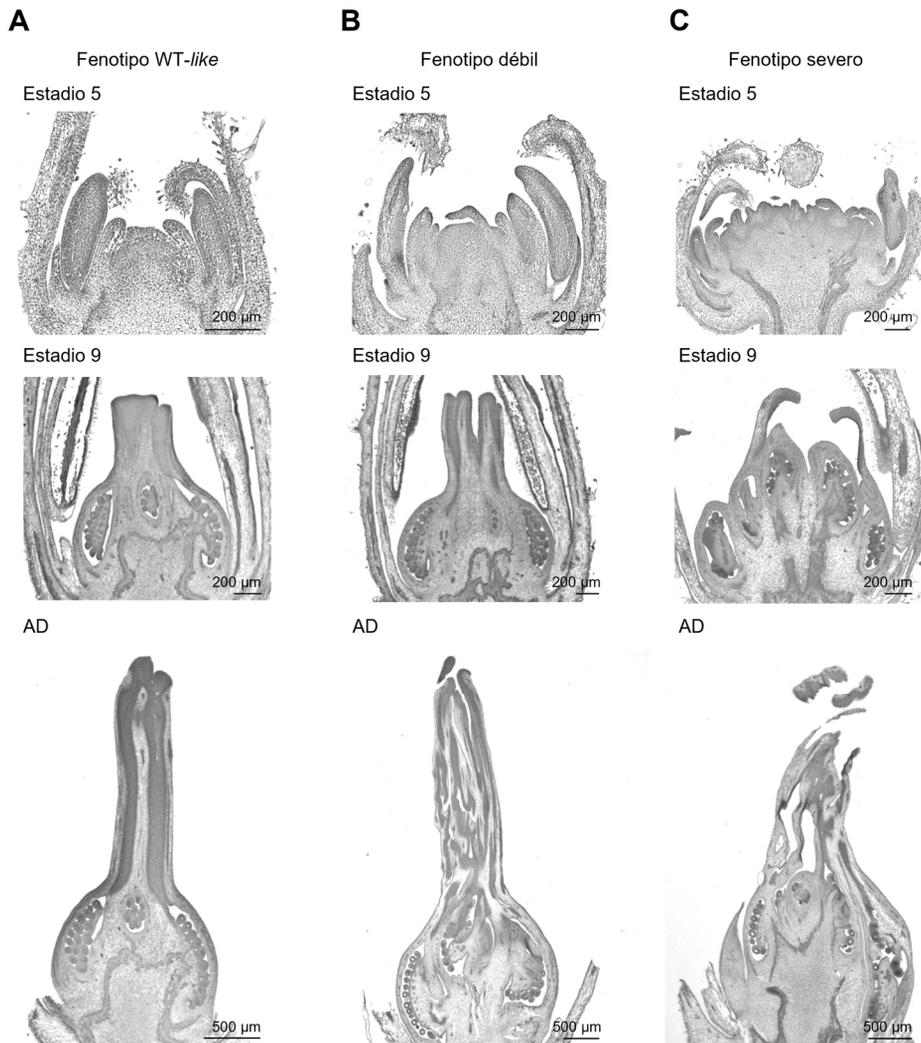


Figura 22. Formación del gineceo en los estadios 5, 9 y antesis (AD) del desarrollo floral de mutantes *fig*. El estudio realizado mediante microscopía óptica muestra la variación fenotípica observada en secciones histológicas de botones florales *fig*, con tres niveles de expresividad, (A) *WT-like*, idéntico al cultivar P73 utilizado como fondo genético silvestre, (B) fenotipo débil, y (C) fenotipo severo.

2. Aislamiento y caracterización molecular de la mutación *fig*

Dado que el mutante *fig* se identificó a partir de una colección de mutantes insercionales de T-DNA (Pérez-Martín *et al.*, 2017), la primera pregunta que surge es acerca de la causalidad de dicho fenotipo mutante, es decir, si está realmente causado por la inserción de una o varias copias del T-DNA utilizado como agente mutagénico. Una primera correlación fenotipo mutante – T-DNA se llevó a cabo mediante hibridaciones tipo Southern blot. Para ello, se analizó el ADN de la línea mutante original *fig*, esto es de una planta T₀, así como de una planta T₁ de fenotipo mutante obtenida mediante autofecundación. La hibridación se llevó a cabo utilizando una sonda quimérica que incluía la secuencia de los genes *NPTII* y *FALSIFLORA*; de esta forma es posible identificar la presencia del T-DNA (fragmento *NPTII*) y proporcionar un control positivo de la hibridación, toda vez que el gen *FALSIFLORA* está representado por una copia única en el genoma de tomate (Pérez-Martín *et al.*, 2017). Los resultados indicaron que, aun cuando la línea T₀ portaba una copia del gen *NPTII* en su genoma, la planta T₁ evaluada no contenía ninguna copia del gen *NPTII* (Figura 23A). A continuación, al objeto de verificar este resultado, se realizaron pruebas de PCR utilizando cebadores específicos que amplifican distintos fragmentos del elemento T-DNA que porta el vector binario pD991 (Figura 23B; Campisi *et al.*, 1999). Los resultados corroboraron la ausencia de fragmento alguno perteneciente a dicho elemento en 8 plantas T₂ de fenotipo mutante *fig* obtenidas mediante la autofecundación de la planta T₁ antes descrita (Figura 23C). Cabe concluir, por tanto, que el fenotipo *fig* no está asociado a una inserción de T-DNA, sino que estaría causado por una variación somaclonal surgida durante el proceso de transformación genética inherente al programa de mutagénesis insercional, ya que este proceso implica diversas metodologías de cultivos *in vitro* frecuentemente relacionadas con diferentes tipos de variación somaclonal.

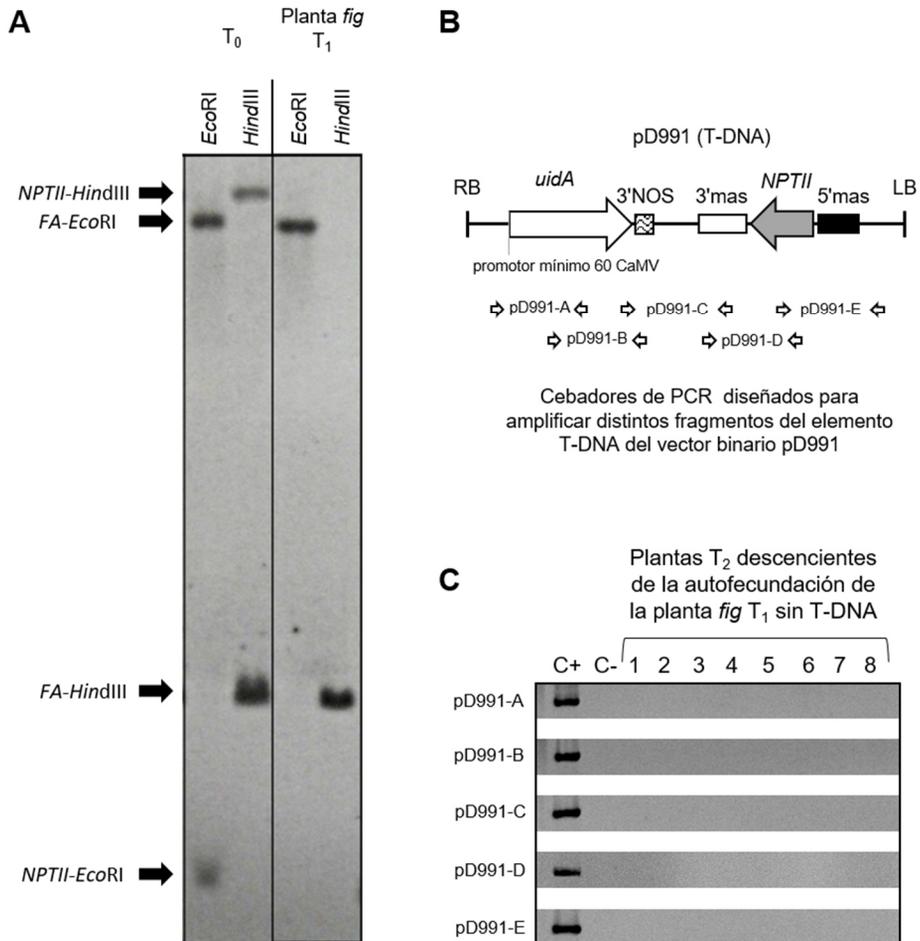


Figura 23. Caracterización molecular de la correlación fenotipo mutante *fig*–inserción de T-DNA en plantas de fenotipo mutante T₀, T₁ y T₂. **(A)** Hibridación tipo Southern blot de la planta mutante *fig* original, T₀, y la progenie T₁ de fenotipo mutante. **(B)** Representación esquemática del T-DNA del vector binario pD991 (Campisi *et al.*, 1999) y localización de los cebadores de PCR. **(C)** Ensayos de PCR en 8 plantas de una progenie T₂ obtenida a partir de la autofecundación de la planta T₁ acigota para la inserción de T-DNA. C+ y C-: controles positivo y negativo, respectivamente.

Con el fin de identificar a nivel molecular la mutación causante del fenotipo *fig*, se empleó una estrategia de mapeo mediante secuenciación (*mapping by sequencing*) de una población segregante F₂ derivada del cruzamiento de una planta mutante *fig*, acigota para el inserto de T-DNA, y una planta de la especie silvestre emparentada con tomate *S. pimpinellifolium* (accesión LA1589). Se evaluaron un total de 783 plantas, de las cuales 212 produjeron flores con carpelos supernumerarios y frutos indeterminados. La

segregación observada en esta progenie interespecífica F₂ fue 571 WT: 212 *fig*; que se ajusta a un patrón de herencia monogénica recesiva de la mutación *fig* ($\chi^2 = 1,80$, $P = 0,18$).

Seguidamente, se llevó a cabo la resecuenciación del genoma de dos *pools* de ADN constituidos por 25 plantas F₂ de fenotipo *fig* severo y 50 plantas de fenotipo WT, respectivamente. El análisis de las frecuencias alélicas reveló un fuerte sesgo hacia los alelos de referencia de tomate en una región del cromosoma 1 que incluye el centrómero (de 2,4 a 70 Mb) (Figura 24). En dicha región se identificaron tres mutaciones puntuales tipo SNP (del inglés *Single Nucleotide Polymorphism*) localizadas en el cuarto intrón del gen *Solyc01g010240*. Asimismo, se observó una notable disminución de la cobertura de secuencias correspondientes al cuarto intrón de este gen en el *pool* mutante, en comparación con otras regiones codificantes y no codificantes del locus *Solyc01g010240*.

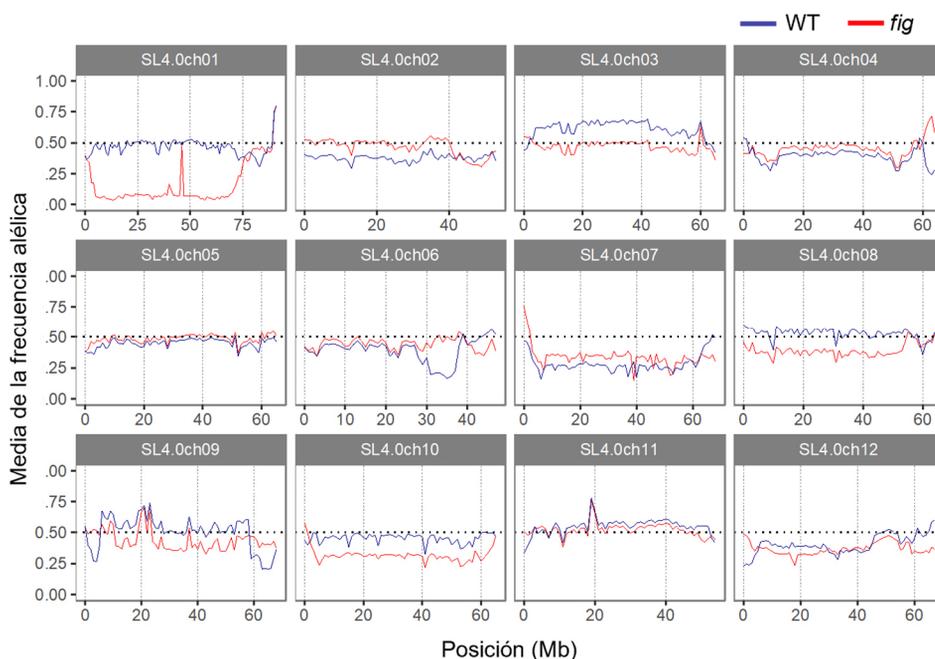


Figura 24. Mapeo mediante secuenciación masiva de la mutación *fig*. Distribución de la media de las frecuencias alélicas de los *pools* de ADN WT (línea azul) y *fig* (línea roja) en los 12 cromosomas del genoma de tomate.

Para confirmar los polimorfismos identificados, se realizaron análisis de PCR y secuenciación Sanger, utilizando cebadores que flanquean la región candidata en plantas de fenotipo *fig* y WT. Los resultados mostraron que el producto de PCR que incluía el cuarto intrón del gen *Solyc01g010240* del ADN genómico *fig* era de un tamaño mayor del esperado (Figura 25A). De hecho, el análisis de secuencias verificó que un fragmento de ADN de 367 pares de bases (pb) se había insertado en la posición 5.053.687 del cromosoma 1 del genoma mutante *fig*, interrumpiendo la secuencia del intrón 4 del locus *Solyc01g010240* (Figura 25B). El alineamiento BLASTn de la secuencia nucleotídica de la inserción de 367 pb frente al genoma de tomate permitió determinar que se trataba de una secuencia LTR (del inglés *Long Terminal Repeat*) altamente repetida que podría haber actuado como un elemento transponible. En la Tabla 8 se muestran los 10 resultados del alineamiento BLASTn de mayor puntuación, destacando entre ellos la región localizada entre las posiciones 6.336.872 y 6.337.201 del cromosoma 10, la cual muestra un porcentaje de identidad del 86 % con la secuencia nucleotídica de 367 pb. El análisis de co-segregación realizado en la población F₂ mostró que las 212 plantas mutantes *fig* portaban la inserción LTR en homocigosis, mientras que 393 y 178 plantas eran heterocigotas y homocigotas para la ausencia de la inserción, respectivamente. Estos resultados indican que el fenotipo *fig* está estrechamente ligado a la inserción de un elemento LTR en el cuarto intrón del gen *Solyc01g010240*.

Tabla 8. Regiones LTR del genoma de tomate homólogas a la secuencia de 367 pb inserta en el cuarto intrón del gen *Solyc01g010240*.

Nombre ¹	Posición	Identidad ²	e-value	Valor de puntuación BLASTn
LTR_10a	6337201..6336872	298/347 (85,88 %)	1.00E-94	350
LTR_9	5837029..583731	257/290 (88,62 %)	1.00E-93	346
LTR_7	3411312..3411533	213/225 (94,67 %)	1.00E-93	346
LTR_6	32822083..32822415	298/350 (85,14 %)	2.00E-91	339
LTR_3	6850109..6850403	261/296 (88,18 %)	8.00E-91	337
LTR_10b	13044618..13044267	311/370 (84,05 %)	4.00E-89	331
LTR_12	43053325..43053675	307/368 (83,42 %)	8.00E-86	320
LTR_11	30220980..30221310	295/350 (84,29 %)	8.00E-86	320
LTR_10c	13057748..13057415	294/350 (84,00 %)	1.00E-84	316
LTR_9b	50600880..50601216	297/354 (83,90 %)	4.00E-84	315

¹Todas las regiones homólogas a la inserción de 367 pb se han nombrado con las siglas LTR seguidas del número correspondiente al cromosoma donde están ubicadas según el genoma de referencia (Ensamblaje SL4.0). ²Número de nucleótidos coincidentes de la inserción de 367 nucleótidos con la secuencia de referencia (Ensamblaje SL4.0)/número total de nucleótidos alineados. Entre paréntesis se expresa el porcentaje de identidad entre las dos secuencias alineadas.

A pesar de que la inserción de 367 pb se produjo en una región no codificante del gen *Solyc01g010240*, este fue considerado un firme candidato a ser responsable del fenotipo *fig*, ya que se trata de un homólogo de *CRABS CLAW* de *Arabidopsis*, un gen clave en la regulación del desarrollo de carpelos y la determinación del meristemo floral (Alvarez & Smyth, 1999; Bowman & Smyth, 1999), procesos afectados en el mutante *fig* de tomate. Concretamente, se trataría del homólogo recientemente denominado como *Solanum lycopersicum CRABS CLAWa (SICRCa)* por Huang *et al.* (2013). Para definir el efecto de la inserción LTR en el procesamiento del ARNm del gen *SICRCa*, se llevó a cabo la clonación del ADN complementario (cDNA) y un estudio de expresión cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR). De esta forma, se pudo comprobar que, si bien las secuencias cDNA mutante y WT eran idénticas, los niveles de transcritos *SICRCa* se encontraban significativamente reducidos en botones florales del mutante *fig* desde el

inicio del desarrollo floral hasta el estadio 12 (Figura 25C). En resumen, la inserción de 367 pb en el cuarto intrón del gen *SICRCa* reduce a la mitad el nivel de expresión de este gen, aunque la secuencia de los transcritos correspondientes es normal, lo que permite identificar a *fig* como un alelo de falta de función del gen *SICRCa*.

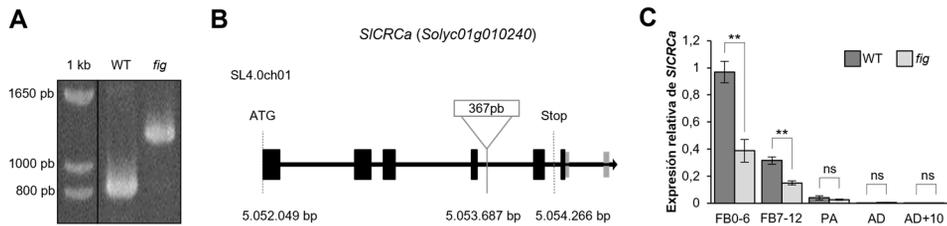


Figura 25. Caracterización molecular del gen *SICRCa*. (A) Imagen de electroforesis en la que se observan los distintos tamaños de los productos de PCR que incluyen el cuarto intrón del gen *Solyc01g010240* utilizando como molde ADN genómico procedente de una planta WT y *fig*, en cada caso. (B) Representación esquemática del gen *SICRCa* en el mutante *fig*. Los exones y las UTR están representadas por rectángulos de color negro y gris, respectivamente (Ensamblaje SL4.0). (C) Niveles de expresión relativa del gen *SICRCa* en flores WT y *fig* en diferentes estadios de desarrollo analizados mediante RT-qPCR. FBO-6: botones florales de estadios de desarrollo 0 a 6, FB7-12: botones florales de estadios de desarrollo 7 a 12, PA: flores en preantesis, AD: flores en antesis, AD+10: flores 10 días después de antesis. Los valores están representados por la media \pm la desviación estándar de tres réplicas biológicas y dos técnicas. Las diferencias significativas entre los niveles de expresión de muestras WT y *fig* fueron calculadas mediante una prueba estadística *t-Student* de dos colas y representadas por asteriscos. ** $P < 0,001$; * $P < 0,01$. ns: no existen diferencias significativas.

3. Análisis funcional del gen *SICRCa*

Con el propósito de corroborar que la falta de función de *SICRCa* es la responsable del fenotipo *fig*, se generaron líneas de silenciamiento mediante ARN de interferencia (RNAi) en el fondo genético silvestre (cv. P73). De forma similar a lo que ocurría en plantas mutantes *fig*, las líneas RNAi *SICRCa* de primera generación (T_0), mostraron un rango variable de fenotipos de indeterminación floral que pudimos agrupar en tres categorías, a saber, WT-like, débil y severo, análogos a los que posteriormente se observaron en los frutos producidos a partir de estas

flores (Figura 26A, B). Los análisis de expresión de cuatro líneas diploides independientes RNAi *SICRCa* T₀, mostraron una reducción de los niveles de transcritos de *SICRCa* cercana al 60 % en botones florales en estadios de 0 a 6 (Figura 26C).

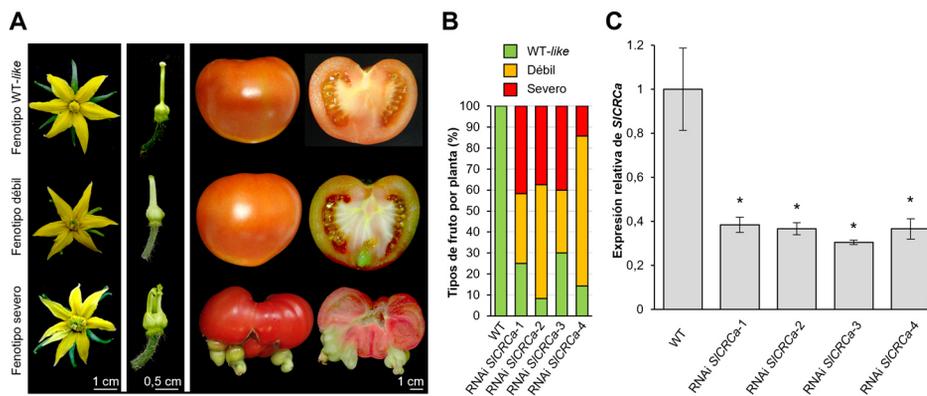


Figura 26. Caracterización fenotípica y expresión del gen *SICRCa* en líneas RNAi *SICRCa*. (A) Fenotipo que muestran las flores (izquierda), pistilos (centro) y frutos (derecha), representativos de las líneas RNAi *SICRCa* de fenotipo WT-like (idéntico al WT), débil y severo. (B) Porcentaje de los distintos fenotipos de fruto (WT-like, débil y severo) producidos por planta en líneas T₀ RNAi *SICRCa* y WT. (C) Cuantificación de transcritos del gen *SICRCa* en botones florales en estadios de desarrollo 0 a 6 (FBO-6) procedentes de líneas T₀ RNAi *SICRCa* y WT. Los valores están representados por la media \pm la desviación estándar de tres réplicas biológicas y dos réplicas técnicas. Las diferencias significativas de las líneas RNAi *SICRCa* respecto al WT fueron calculadas mediante una prueba estadística *t-Student* de dos colas y representadas por asteriscos. * $P < 0,01$.

A fin de obtener nuevos alelos *SICRCa* y profundizar en el análisis funcional de este gen, se generaron mutantes de función nula o *knock-out* utilizando el sistema CRISPR/Cas9, a partir de un único ARN guía dirigido al segundo exón del gen *SICRCa* (Figura 27A). Se evaluaron cuatro líneas diploides T₀ independientes CRISPR/Cas9-*slcrca* (CR-*slcrca*) que exhibieron flores y frutos semejantes a los observados en los mutantes *fig* y en las líneas RNAi *SICRCa*. Al igual que estos, las líneas CRISPR produjeron cierta diversidad de fenotipos florales y de fruto, siendo la mayoría de ellos de fenotipo severo (Figura 27B, C). Las cuatro líneas CR-*slcrca* evaluadas resultaron ser bialélicas para los alelos editados (Figura 27A). El primero de los dos alelos identificados en la línea CR-*slcrca*-1 presenta una delección de 12 nucleótidos que no afecta al marco de lectura, aunque se traduce en un

cambio aminoacídico de aspartato por asparagina en la posición 49 de la secuencia aminoacídica, así como a la delección de cuatro aminoácidos del dominio conservado *zinc finger* de la proteína SICRCa. Como veremos a continuación, estos aminoácidos deben ser fundamentales para la función de SICRCa a tenor de los fenotipos observados en estas líneas. El segundo alelo CRISPR de esta línea T₀, CR-*slcrca*-1 a₂, muestra una inserción de una A en el segundo exón de *SICRCa* que altera su marco de lectura y da lugar a un codón STOP prematuro en la posición 64 de la secuencia aminoacídica. Los dos alelos editados de la línea CR-*slcrca*-2 (CR-*slcrca*-2 a₁ y CR-*slcrca*-2 a₂) presentan una delección de una C y una G, respectivamente, en el segundo exón que da lugar a la aparición de sendos codones de STOP prematuros, siendo las proteínas hipotéticas resultantes de 47 y 54 aminoácidos en cada caso. Este último alelo del *locus SICRCa* también está presente en las líneas CR-*slcrca*-3 y CR-*slcrca*-4 (CR-*slcrca*-3 a₂ y CR-*slcrca*-4 a₂). Además, cada una de las líneas CR-*slcrca*-3 y CR-*slcrca*-4, portan otro alelo CRISPR adicional, CR-*slcrca*-3 a₁ y CR-*slcrca*-4 a₁, en los que se han delecionado 4 y 2 nucleótidos, respectivamente, dando lugar a codones de STOP prematuros en las posiciones 54 y 48 de la secuencia aminoacídica de SICRCa en cada caso (Figura 27A). En resumen, se identificaron dos tipos de alelos editados, aquellos que generan proteínas hipotéticas SICRCa truncadas y CR-*slcrca*-1 a₁, que da lugar a una proteína SICRCa con modificaciones en su dominio *zinc finger*. A pesar de estas diferencias, las cuatro líneas T₀ CR-*slcrca* exhibieron fenotipos mutantes análogos en flores y frutos, poniendo de manifiesto el carácter nulo de todos los alelos CRISPR identificados, si tenemos en cuenta la naturaleza recesiva de los mismos. En conjunto, los resultados de la caracterización fenotípica de las líneas CR-*slcrca* demuestran que la inserción de 367 pb en el cuarto intrón del gen *SICRCa* es responsable de las alteraciones en el desarrollo del carpelo y el fruto observadas en el mutante *fig*.

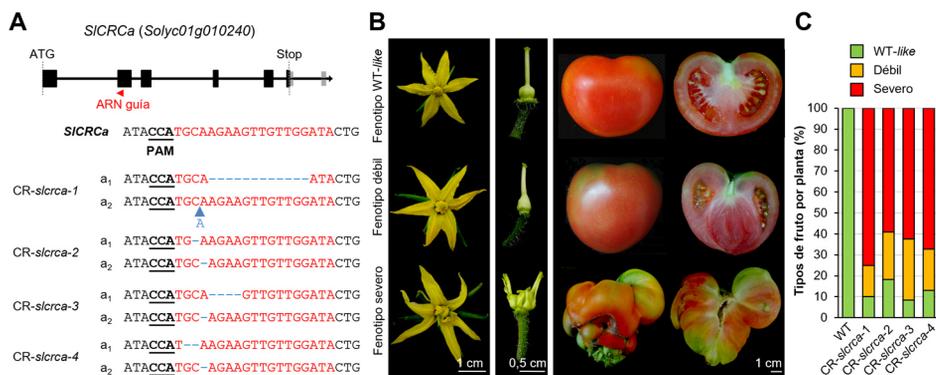


Figura 27. Caracterización fenotípica y molecular de líneas T₀ CR-*slrca*. (A) Alelos identificados mediante clonación y secuenciación de productos de PCR de la región editada mediante CRISPR/Cas9 de 4 líneas T₀ CR-*slrca*. Los nucleótidos subrayados y en negrita corresponden a la secuencia del motivo adyacente protoespaciador (PAM; del inglés *protospacer-adjacent motif*), las líneas discontinuas azules representan mutaciones InDel, la flecha azul señala el lugar de inserción de una adenina. (B) Fenotipo que muestran las flores (izquierda), pistilos (centro) y frutos (derecha) enteros y seccionados longitudinalmente, representativos de las líneas CR-*slrca* de fenotipo WT-like (idéntico al WT), débil y severo. (C) Porcentaje de los distintos fenotipos de fruto (WT-like, débil y severo) producidos por planta, en líneas T₀ CR-*slrca* y WT.

Por su parte, el análisis del patrón de expresión de *Slrca*, realizado mediante RT-qPCR, reveló una acumulación preferente de transcritos en botones florales de longitud inferior a 1 mm, es decir, en estadios 0-6, según Burkhin *et al.* (2003), y en menor medida en botones florales de longitud entre 1,5 y 5 mm (estadios 7-12), tal y como muestra la Figura 28A. Por el contrario, apenas son detectables niveles de transcritos *Slrca* en raíz, tallo y hoja, ni tampoco en etapas tardías del desarrollo floral (preantesis y antesis) o en las distintas etapas del desarrollo del fruto. Estos resultados coinciden con los depositados en las bases de datos de expresión génica *TomExpress* (Zouine *et al.*, 2017) y *Tomato meristem maturation gene expression atlas* (Park *et al.*, 2012; Figura 28B, C). Posteriormente, se realizó un análisis de hibridación *in situ* de ARN en botones florales WT jóvenes para examinar de manera más detallada el patrón de expresión espacio-temporal de *Slrca*, así como la identidad de los tejidos y los órganos en los que se expresa este gen.

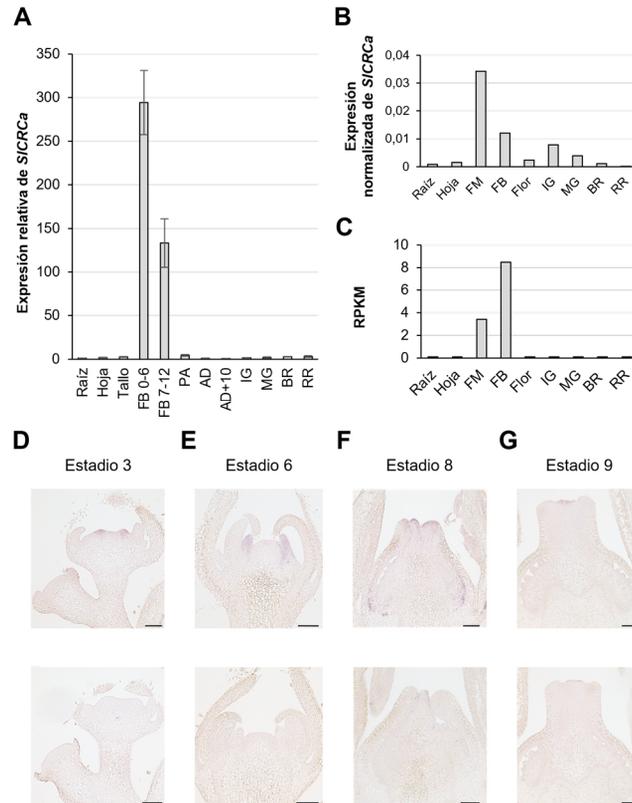


Figura 28. Análisis espacio-temporal del patrón de expresión de *SICRCa*. (A) Perfil de expresión del gen *SICRCa* en distintos tejidos y etapas de desarrollo de plantas WT, analizado mediante RT-qPCR. Los valores están representados por la media \pm la desviación estándar de tres réplicas biológicas y dos técnicas. (B) Perfil de expresión del gen *SICRCa* en distintos tejidos y etapas de desarrollo a partir de datos de expresión depositados en la base de datos *TomExpress* (Zouine *et al.*, 2017). Esta base de datos aúna resultados RNA-Seq de diferentes estudios, es por ello que los valores de expresión génica aparecen normalizados según el método propuesto por Maza *et al.* (2013). (C) Número de lecturas por kilobase de transcritos, por millón de lecturas mapeadas (RPKM; del inglés, *Reads Per Kilobase of transcript, per Million mapped reads*) para *SICRCa* en distintos tejidos y estadios de desarrollo. Los datos se obtuvieron de la base de datos *Tomato meristem maturation gene expression atlas* (Park *et al.*, 2012; Tomato Genome Consortium, 2012). (D-G) Hibridaciones *in situ* con la sonda antisentido (paneles superiores) y sentido (paneles inferiores) de ARNm de *SICRCa* en secciones histológicas de flores WT en diferentes etapas del desarrollo floral: (D) estadio 3; (E) estadio 6; (F) estadio 8 y (G) estadio 9. En (A) FBO-6: botones florales de estadios de desarrollo 0 a 6, FB7-12: botones florales de estadios de desarrollo 7 a 12, PA: flores en preantesis, AD: flores en antesis, AD+10: flores 10 días después de antesis. En (A-C) IG: fruto verde inmaduro, MG: fruto verde maduro, BR: fruto en estadio breaker, RR: fruto rojo maduro. En (B, C) FM: meristemo floral, FB: botón floral (general). Escala = 100 μ m.

Este análisis reveló que los transcritos de *SICRCa* se acumulan en los primordios de los carpelos desde su inicio, en la etapa floral 3 (Figura 28D), hasta la etapa 6 de desarrollo, cuando los carpelos crecen y emerge el primordio de la placenta (Figura 28E). En el estadio floral 8, la expresión de *SICRCa* se localiza en la superficie adaxial de la base de las paredes del ovario, así como en las células más distales del gineceo en desarrollo, que darán lugar al estilo y el estigma (Figura 28F). Sin embargo, en el estadio floral 9 no se detectó ARNm de *SICRCa* en las paredes del ovario, aunque su expresión permanece en la región distal del gineceo (Figura 28G). En etapas posteriores del desarrollo floral, la expresión de *SICRCa* parece cesar, y de hecho no se detecta evidencia de transcritos de *SICRCa* a partir del estadio de preantesis.

A continuación, con el fin de indagar en el papel funcional del gen *SICRCa* durante el desarrollo floral, se secuenció el ARN (RNA-Seq) de botones florales *fig* y WT en etapas de desarrollo comprendidas entre 0 y 6. A partir de este análisis se identificaron 2115 genes diferencialmente expresados (DEGs) en el mutante *fig* respecto al WT. Los DEGs se definieron para una probabilidad de falso positivo (FDR; del inglés *False Discovery Rate*) inferior a 0,05, de los cuales 978 están sobreexpresados y 1.137 muestran un menor nivel de expresión en el mutante *fig* respecto al WT (Anexo I), lo que indica que la expresión de *SICRCa* altera significativamente el transcriptoma detectable en los botones florales *fig*.

desarrollo de la estructura reproductiva (GO: 0048608) y el desarrollo floral (GO: 0009908) estaban sobrerrepresentados entre los DEGs regulados positivamente; mientras que los términos GO asociados a la fotosíntesis (GO: 0015979), plegamiento de proteínas (GO: 0006457), proceso biosintético de ácidos orgánicos (GO: 0016053) y la biosíntesis de moléculas pequeñas (GO: 0044283) se encontraban enriquecidos en los DEGs regulados negativamente (Anexo II; Figura 29A, B).

Respecto a la función molecular, los términos GO implicados en la unión a proteínas (GO: 0005515) se acumularon en los dos grupos DEGs. Además, los términos relativos a la actividad transportadora (GO: 0005215) y factor de transcripción, unión a secuencias específicas del ADN (GO: 0003700) se enriquecieron en DEGs sobreexpresados. Incluidos en los DEGs que muestran un menor nivel de expresión en el mutante *fig* respecto al WT, se encontraban sobrerrepresentados los términos de unión a clorofila (GO: 0016168) y de actividad de isomerasa (GO: 0016853). Los datos relativos a la función molecular se detallan en el Anexo II y la Figura 29C, D.

Entre los DEGs regulados positivamente asociados a los términos de desarrollo de la estructura reproductiva (GO: 0048608) y desarrollo de la flor (GO: 0009908), se hallaban los homólogos de los transportadores polares de auxinas de Arabidopsis PIN (*Solyc03g118740*, *Solyc04g007690* y *Solyc05g008060*) y los factores de transcripción de la familia AUXIN RESPONSE FACTOR (*Solyc09g007810* y *Solyc12g042070*), así como los homólogos de los genes homeóticos de Arabidopsis AP2 (*Solyc02g064960*), AP3 (*Solyc04g081000*), *FUL* (*Solyc03g114830*) y *SEP4* (*Solyc03g114840*), este último implicado además, en la determinación del meristemo floral (Ditta *et al.*, 2004). Dentro de este grupo de genes, también se encontró el homólogo de Arabidopsis *HECATE3* (*HEC3*, *Solyc11g005780*), que codifica un factor de transcripción bHLH que regula el desarrollo de tejidos reproductivos femeninos como el estigma, el estilo y el tracto transmisor. Por tanto, la sobreexpresión de los genes HEC provoca la producción ectópica de tejido estigmático (Gremski *et al.*, 2007). Para nuestra sorpresa, un segundo homólogo del gen *CRC* de Arabidopsis, denominado *Solanum lycopersicum CRABS CLAWb* (*SICRCb*; *Solyc05g012050*) aparece en este grupo de DEGs sobreexpresados en botones florales del mutante *fig*, lo que

podría sugerir un mecanismo de compensación ante la falta de función de *SICRCa*. En resumen, el análisis RNA-Seq reveló que diversos genes implicados en el proceso del desarrollo reproductivo y la formación del gineceo ven alterado su patrón de expresión asociado a la falta de función del gen *SICRCa*.

4. Análisis funcional del gen *SICRCb* y caracterización de la interacción entre los parálogos *SICRC*

Si bien el genoma de *Arabidopsis* contiene una copia única del gen *CRC*, una duplicación ancestral ocurrida antes de la diversificación de las solanáceas generó dos parálogos, *CRCa* y *CRCb*. Ambos se han mantenido en el genoma de esta familia, lo que parece concordar con su función relevante en un proceso complejo y diverso como es el desarrollo del fruto (Phukela *et al.*, 2020). El análisis comparativo de la secuencia aminoacídica de *CRC* de *Arabidopsis* (181 aminoácidos) con las de *SICRCa* (173 aminoácidos) y *SICRCb* (160 aminoácidos) de tomate mostró valores de identidad del 64 y 68 % respectivamente; por su parte, *SICRCa* y *SICRCb* presentan un 73 % de coincidencia. Junto a ello, se realizó un estudio de microsintenia para evaluar la conservación entre los bloques genómicos que albergan a los genes *CRC* de *Arabidopsis* y tomate. Dicho análisis reveló que, la región en la que se ubica *CRC* en el genoma de *Arabidopsis*, presenta mayor similitud con la que contiene al gen *SICRCb* de tomate, toda vez que en dichas regiones se localizan, en posiciones sinténicas, tres genes distintos, mientras que respecto a *SICRCa* solo se encuentra el gen *CRC* (Figura 30).

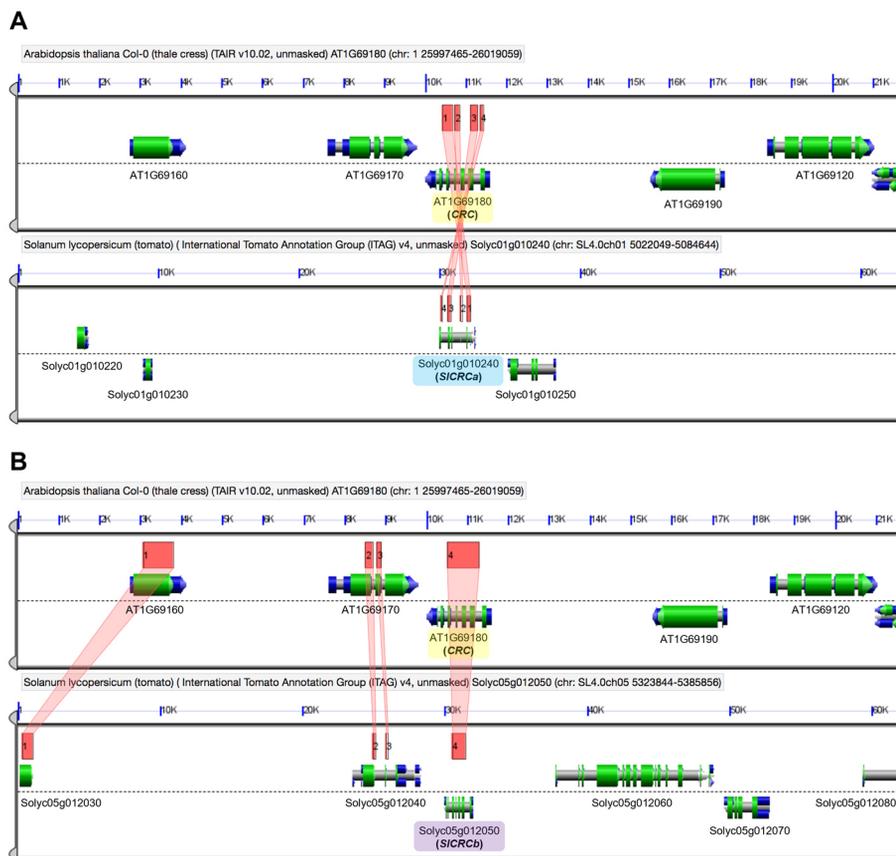


Figura 30. Análisis de microsintenia entre bloques genómicos que albergan a los genes *CRC* en Arabidopsis y tomate. (A, B) Estudio comparativo de las regiones genómicas que contienen el gen *CRC* de Arabidopsis (sombreado en amarillo) y los genes *SICRCa* (A, sombreado en azul) y *SICRCb* (B, sombreado en morado) de tomate.

Al objeto de iniciar el análisis funcional del papel del gen *SICRCb* se examinó su expresión espacio-temporal mediante RT-qPCR e hibridaciones *in situ*. Los resultados mostraron que, al igual que sucede con *SICRCa*, la expresión *SICRCb* es específica de tejidos reproductivos (Figura 31A). Sin embargo, mientras que la expresión de *SICRCa* se limita principalmente a las primeras etapas del desarrollo del meristemo floral (Figura 28A), los transcritos de *SICRCb* se detectaron en todas las etapas de desarrollo floral, desde botones florales en estado de desarrollo 0 a 6, hasta flores 10 días después de antesis (AD+10; Figura 31A). Tanto en tejidos vegetativos (raíz, tallo y hoja), como en fases avanzadas del desarrollo del fruto, el nivel de mensajeros de *SICRCb* es apenas detectable. Sin embargo, a nivel espacial, los estudios de

hibridación *in situ* realizados en las primeras etapas de desarrollo revelaron que la acumulación de transcritos de cada uno de los homólogos *SICRC* se localiza inicialmente en los primordios de los carpelos, en botones florales en estadio 3 (Figura 31B), y se mantiene hasta el estadio 6 (Figura 31C). En etapas más tardías del desarrollo floral, *SICRCb* se expresa preferentemente en las paredes del ovario y las regiones distales del gineceo (Figura 31D), donde permanece hasta el estadio 9 (Figura 31E).

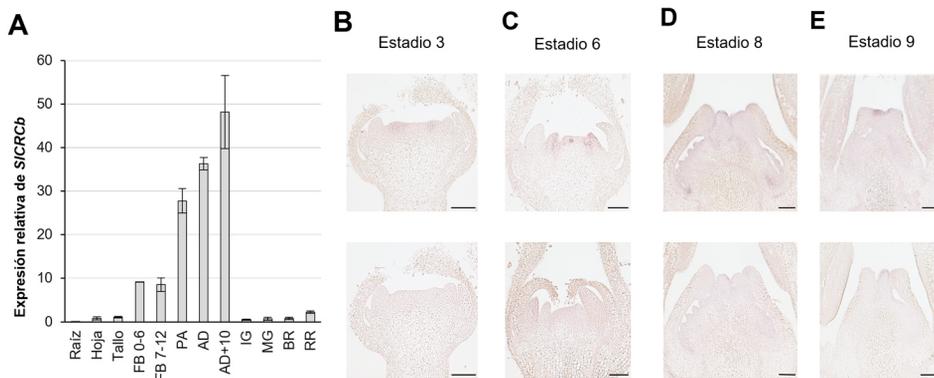


Figura 31. Análisis espacio-temporal del patrón de expresión de *SICRCb*. (A) Perfil de expresión del gen *SICRCb* en distintos tejidos y fases de desarrollo de plantas WT, analizado mediante RT-qPCR. (B-E) Hibridaciones *in situ* de *SICRCb* en secciones histológicas de flores WT en diferentes etapas del desarrollo floral: (B) estadio 3; (C) estadio 6; (D) estadio 8 y (E) estadio 9; se muestran de la hibridación *in situ* con la sonda antisentido (paneles superiores) y sentido (paneles inferiores). FBO-6: botones florales de estadios de desarrollo 0 a 6, FB7-12: botones florales de estadios de desarrollo 7 a 12, PA: flores en preantesis, AD: flores en antesis, AD+10: flores 10 días después de antesis, IG: fruto verde inmaduro, MG: fruto verde maduro, BR: fruto en estadio breaker, RR: fruto rojo maduro. Los valores están representados por la media \pm la desviación estándar de tres réplicas biológicas y dos técnicas. Escala en paneles B-E = 100 μ m.

De lo expuesto hasta el momento, dos tipos de resultados sugieren que las funciones de los parálogos *SICRC* de tomate puedan ser parcialmente redundantes. Por una parte, la coincidencia en los patrones de expresión espacial de *SICRCa* y *SICRCb* en etapas tempranas del desarrollo del gineceo, y por otra, el grado de expresividad variable y penetrancia incompleta que muestran los alelos mutantes del gen *SICRCa* (*fig*, *RNAi SICRCa* y *CR-slcrc*). Para comprobar la veracidad de esta hipótesis, se generaron mutaciones *knock-out* en el gen *SICRCb* utilizando el sistema CRISPR/Cas9 con un ARN guía único dirigido al segundo exón de este *locus* (Figura 32A).

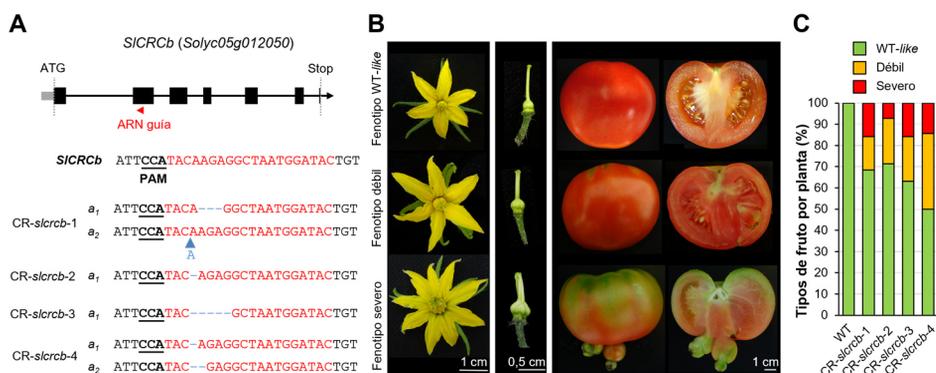


Figura 32. Caracterización de líneas T₀ CR-*slcrCb*. (A) Alelos identificados mediante clonación y secuenciación de productos de PCR de la región diana del ARN guía de 4 líneas T₀ CR-*slcrCb*. Los nucleótidos subrayados y en negrita corresponden a la secuencia del motivo adyacente protoespaciador (PAM; del inglés *protospacer-adjacent motif*), las líneas discontinuas azules representan mutaciones InDel, la flecha azul señala el lugar de inserción de una adenina. (B) De izquierda a derecha se muestran flores, pistilos y frutos cerrados y abiertos representativos de las líneas CR-*slcrCb* de fenotipo WT-like (idéntico al WT), débil y severo, respectivamente. (C) Porcentaje de los distintos tipos de fruto de fenotipo WT-like, débil y severo producidos por planta en líneas T₀ CR-*slcrCb* y WT.

Entre las líneas transgénicas T₀ obtenidas, se analizaron cuatro líneas diploides independientes CRISPR/Cas9-*slcrCb* (CR-*slcrCb*), que resultaron ser homocigotas o bialélicas para los alelos mutantes editados (Figura 32A). Fenotípicamente, las líneas *knock-out* de *SICRCb* desarrollaron flores con ovarios compuestos por numerosos carpelos que crecían unos dentro de otros y producían frutos anómalos, fenotipos muy similares a los observados en las líneas mutantes del locus *SICRCa* (*fig*, RNAi *SICRCa* y CR-*slcrCa*; Figura 32B). Asimismo, las líneas *knock-out* de *SICRCb* produjeron una amplia variabilidad de fenotipos relacionados con el desarrollo floral y del fruto. El porcentaje de frutos con fenotipo mutante débil o severo no superó el 50 % del total, oscilando el porcentaje de frutos con fenotipo severo entre el 7,1 y el 15,8 % (Figura 32C).

Junto a ello, el análisis RNA-Seq mostró niveles inusualmente elevados *SICRCb* en botones florales del mutante *fig*, lo que planteaba la existencia de un mecanismo de compensación de dosis génica entre los parálogos *SICRC* implicado en la determinación del gineceo. Para resolver esta incógnita, se cuantificó la expresión de los genes *SICRCa* y *SICRCb* en flores

seleccionadas en distintas etapas de desarrollo de los mutantes nulos *CR-slcrCb* y *CR-slcrCa*, respectivamente. En concordancia con los resultados obtenidos previamente en el análisis RNA-Seq del mutante *fig*, el gen *SICRCb* aparecía significativamente sobreexpresado en botones florales de plantas *CR-slcrCa* en estadios de desarrollo 0 a 6, también en estadios 7 a 12, e incluso en flores en antesis (Figura 33A). Del mismo modo, se pudo detectar un mayor número de transcritos *SICRCa* en botones florales de plantas *CR-slcrCb* en estadios de desarrollo 0 a 6 (Figura 33B).

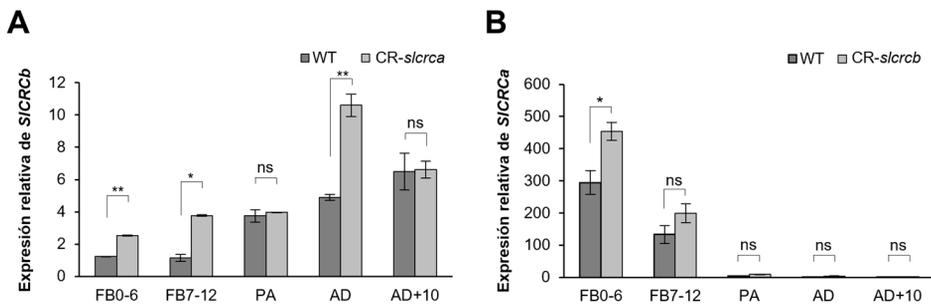


Figura 33. Análisis de expresión de los parálogos *SICRC* en mutantes nulos (líneas CRISPR) *CR-slcrCa* y *CR-slcrCb*. (A) Análisis de expresión de *SICRCb* en botones florales y flores de líneas *CR-slcrCa*. (B) Análisis de expresión de *SICRCa* en botones florales y flores de líneas *CR-slcrCb*. Como control en ambos casos se utilizaron muestras equivalentes de plantas WT. FBO-6: botones florales de estadios de desarrollo 0 a 6, FB7-12: botones florales de estadios de desarrollo 7 a 12, PA: flores en preantesis, AD: flores en antesis, AD+10: flores 10 días después de antesis. Los valores representan la media \pm la desviación estándar de tres réplicas biológicas y dos réplicas técnicas. Las diferencias significativas entre los niveles de expresión fueron calculadas mediante una prueba estadística *t-Student* de dos colas. ** $P < 0,001$; * $P < 0,01$. ns: no existen diferencias significativas.

Al objeto de incidir en el análisis de la relación entre los parálogos *SICRC* de tomate, se generaron dobles mutantes nulos *CR-slcrCa:slcrCb* a partir del cruzamiento de plantas individuales *CR-slcrCa* y *CR-slcrCb*. La pérdida simultánea de las funciones *SICRCa* y *SICRCb* causó alteraciones homeóticas en el desarrollo del carpelo, pudiéndose observar en el cuarto verticilo de flores *CR-slcrCa:slcrCb* células con identidad de estambre (Figura 34A; Figura 35). Tales transformaciones homeóticas en las flores *CR-slcrCa:slcrCb* dieron lugar a carpelos estaminoideos que se desarrollaron siguiendo un patrón reiterativo y dieron lugar a frutos de fenotipo severo en la totalidad de los casos (Figura 34B, C). La indeterminación que presentaron estos frutos fue

considerablemente más extrema que cualquiera de los exhibidos por los mutantes simples *CR-slcrc*a o *CR-slcrc*b. Tales resultados permiten concluir que la falta de función simultánea de ambos parálogos de tomate promueve un fenotipo más severo que el que originan mutaciones nulas en cada uno de los genes de forma independiente, y que además, dicho fenotipo se expresa de forma consistente en todas las flores analizadas, no estando sujeto a patrones de penetrancia incompleta o expresividad variable.

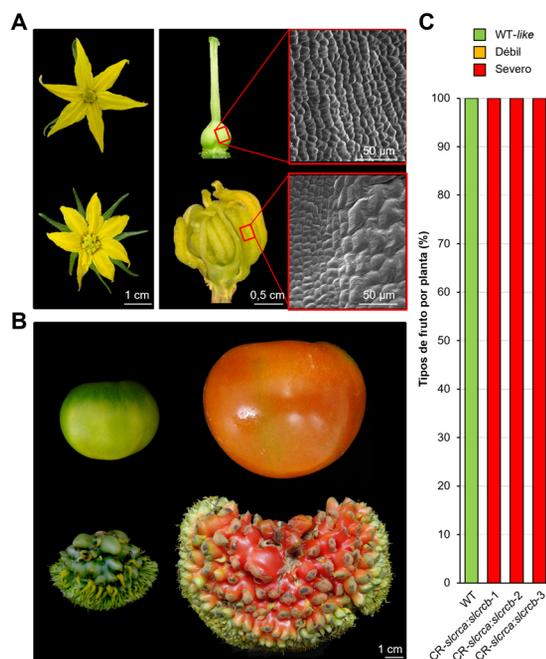


Figura 34. Caracterización fenotípica de flores y frutos desarrollados por líneas dobles mutantes *CR-slcrc*a:*slcrc*b. (A) De izquierda a derecha, flor en antesis, cambios homeóticos que afectan a la identidad de los órganos florales del cuarto verticilo (carpelos estaminoideos), y morfología de las células epidérmicas de tales órganos, tanto en flores WT (panel superior), como dobles mutantes (panel inferior). (B) De izquierda a derecha, fruto verde inmaduro y fruto rojo maduro producidos por líneas WT (panel superior) y mutantes dobles (panel inferior). (C) Porcentaje de frutos de fenotipo WT-like idéntico al WT, débil y severo producidos en líneas *CR-slcrc*a:*slcrc*b en relación con líneas WT.

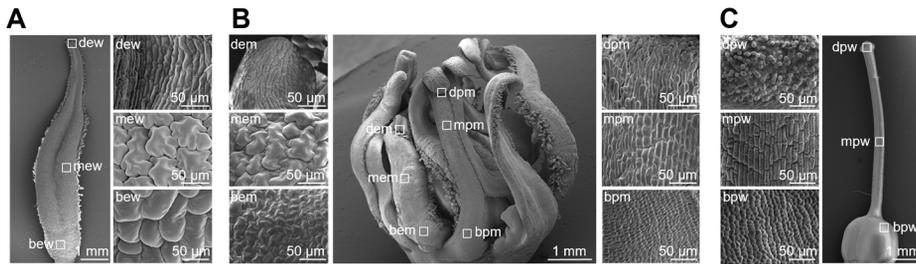


Figura 35. Morfología de las células epidérmicas de los órganos del tercer y cuarto verticilo de flores WT y dobles mutantes *CR-slcrc:sclrcb*. **(A)** Identidad de las células de la epidermis de un estambre WT de las zonas distal (dew), media (mew) y basal (bew). **(B)** Morfología de las células epidérmicas de las zonas distal, media y basal de los órganos florales desarrollados por los dobles mutantes *CR-slcrc:sclrcb* con identidad similar a la de estambre (dem, mem y bem, respectivamente) y con identidad de gineceo (dpm, mpm y bpm, respectivamente). **(C)** Morfología de las células epidérmicas del gineceo representativo de flores WT, a nivel de las zonas distal (dpw), media (mpw) y basal (bpw).

5. Análisis funcional de los parálogos *SICRC* en la determinación del meristemo floral

La determinación floral tiene lugar en las células meristemáticas del cuarto verticilo floral, proceso que a su vez requiere de la represión del gen *SIWUS* (Sun & Ito, 2015), el principal regulador de la actividad meristemática. Es por ello que se indagó acerca de la función de los parálogos *SICRC* en la determinación del MF de tomate examinando el patrón de expresión espacio-temporal de *SIWUS* en las líneas *CR-slcrc* simples y dobles. Los estudios de hibridación *in situ* realizado en flores WT detectaron la expresión de *SIWUS* en las células del centro organizador del MF desde las primeras etapas de desarrollo hasta el cese de la actividad meristemática en los estadios 4-5 (Chu *et al.*, 2019), momento en el cual comienzan a emerger los primordios de carpelos (Figura 36). A partir del estadio 6, la señal de *SIWUS* desaparece completamente en los carpelos en desarrollo de las flores WT, mientras que la acumulación de transcritos de *SIWUS* permanece en los carpelos de los mutantes simples *CR-slcrc*, *CR-sclrcb* y dobles *CR-slcrc:sclrcb* (Figura 36). Como se esperaba, se observó una ampliación del dominio celular donde se expresa *SIWUS* en flores *CR-slcrc:sclrcb*, cuya consecuencia no es sino el aumento significativo del

tamaño del MF acorde con la indeterminación severa que observamos en los carpelos dobles mutantes (Figura 34B; Figura 36).

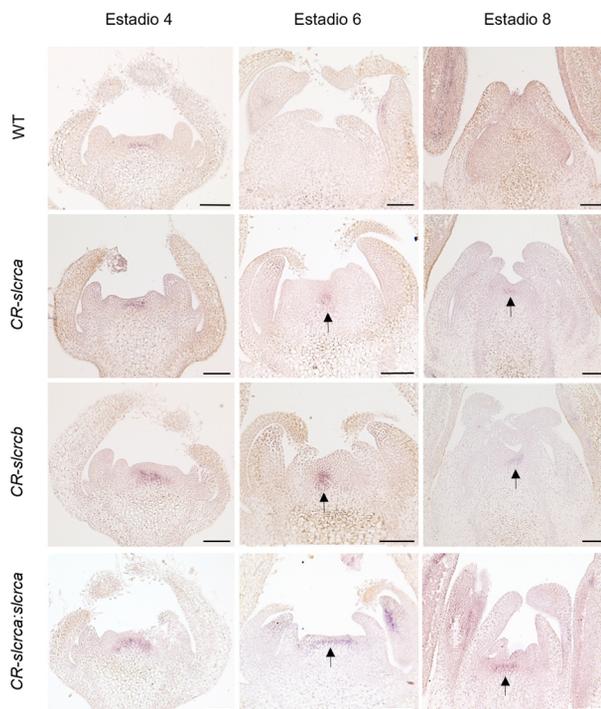


Figura 36. Expresión espacio-temporal de *SIWUS* en flores mutantes (*CR-slcrcra*, *CR-slcrcb* y *CR-slcrcra:slcrcb*) y WT. Hibridación *in situ* de mRNA de *SIWUS* en secciones histológicas de botones florales WT, *CR-slcrcra*, *CR-slcrcb* y *CR-slcrcra:slcrcb* en estadios de desarrollo floral 4 (izquierda), 6 (centro) y 8 (derecha). Las flechas señalan los dominios de células meristemáticas en los que encontramos expresión de *SIWUS* después del estadio 5. Escala = 100 μ m.

Recientemente, se ha demostrado que la terminación de la actividad meristemática de las células del MF en tomate está mediada por un complejo remodelador de la cromatina del que forman parte las proteínas SIIMA (Solyc02g087970), SIKNU (Solyc02g160370), SITPL1 (Solyc01g100050) y SIHDA1 (Solyc09g091440), y que permite la represión completa del gen *SIWUS* (Bollier *et al.*, 2018). El hecho de que la expresión de *SIWUS* esté desregulada en las flores *CR-slcrcra*, *CR-slcrcb* y *CR-slcrcra:slcrcb*, nos llevó a preguntarnos si los parálogos *SICRC* de tomate podrían participar de alguna forma en esta vía reguladora. Es sabido que SIKNU, SIIMA, SITPL1 y SIHDA1 presentan localización nuclear (Bollier *et al.*,

2018), razón por la que se analizó la presencia de SICRCa y SICRCb a nivel subcelular mediante la expresión transitoria de las versiones etiquetadas de ambas proteínas con la proteína verde fluorescente (GFP; del inglés *green fluorescence protein*). El análisis de microscopía confocal reveló la localización exclusivamente nuclear de SICRCa y SICRCb (Figura 37).

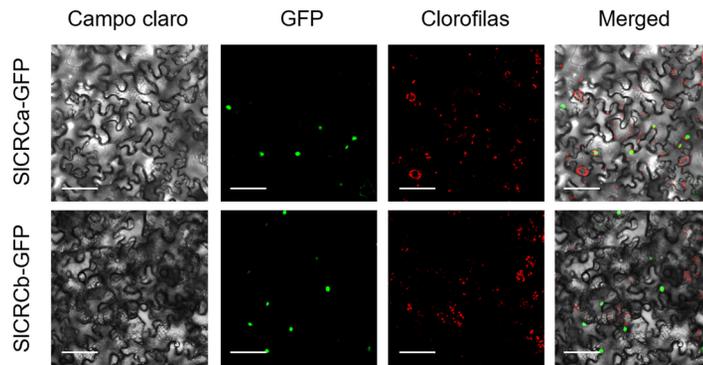


Figura 37. Localización subcelular de las proteínas SICRCa y SICRCb. La fluorescencia GFP indica la localización de SICRCa y SICRCb en el núcleo de células de la epidermis de hojas transformadas de *N. benthamiana*. Escala = 50 μ m.

A continuación, se realizaron ensayos de complementación de fluorescencia bimolecular (BiFC) para comprobar si los parálogos *SICRC* de tomate interactúan *in planta* con los miembros del complejo de remodelación de cromatina antes mencionado. Dichas interacciones se analizaron mediante experimentos de cotransformación transitoria de la región C-terminal de la proteína amarilla fluorescente (YFP; del inglés *yellow fluorescence protein*) fusionada a SICRCa (SICRCa-cYFP) o SICRCb (SICRCb-cYFP), así como de fusiones de la región N-terminal de YFP a SIKNU (nYFP-SIKNU), SIIMA (nYFP-SIIMA), SIHDA1 (nYFP-SIHDA1) o SITPL1 (nYFP-SITPL1). Además, se cotransfectó SICRCa-cYFP con SICRCb fusionada a la región N-terminal de YFP (nYFP-SICRCb).

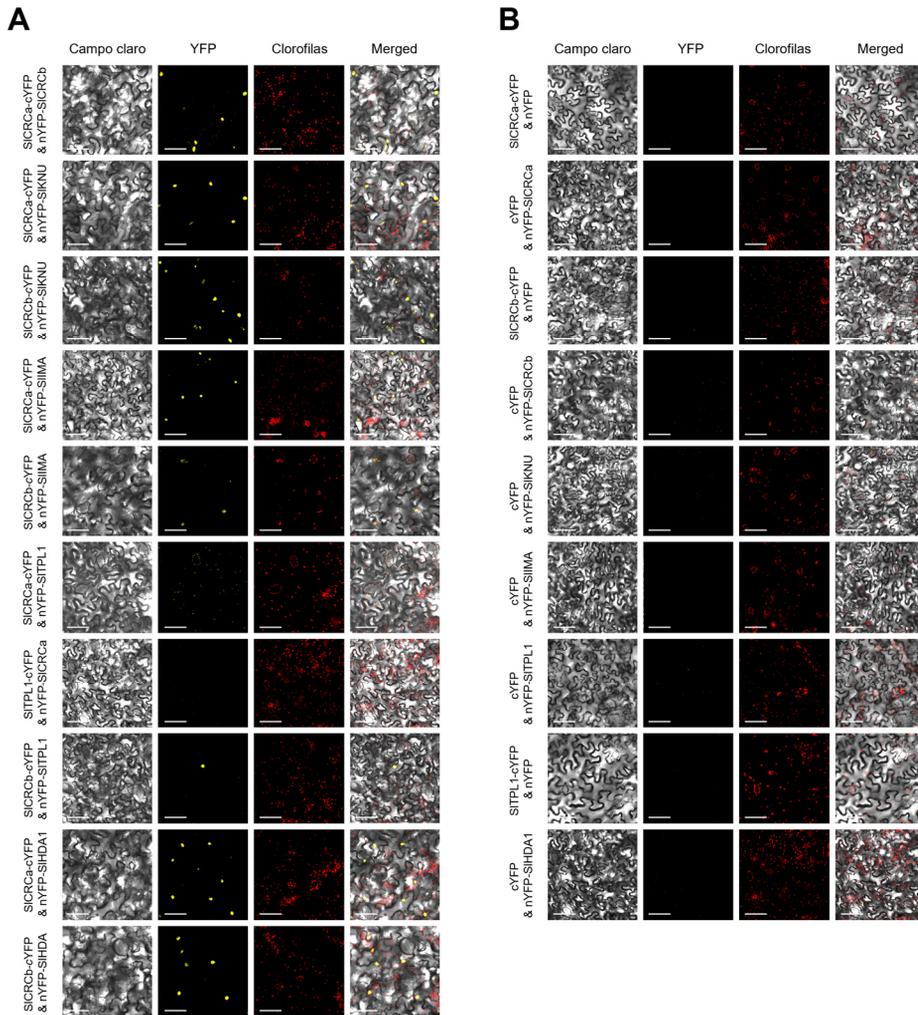


Figura 38. Estudio *in vivo* de las interacciones proteína-proteína de los parálogos SICRC mediante complementación de fluorescencia bimolecular (BiFC). **(A)** Imágenes de microscopía confocal de los análisis BiFC que muestran la interacción de las proteínas SICRCa y SICRCb, y de estas con las proteínas que forman parte del complejo proteico que regula la expresión de *SIWUS* (SIKNU, SIIMA, SITPL1, SHDA1). **(B)** Controles negativos en los que se contranfectó cada una de las proteínas de interés, SICRCa y SICRCb, fusionadas al extremo C- o N- terminal de la proteína YFP y su correspondiente vector vacío (C- o N-terminal sin fusionar). Escala = 50 μ m.

Tal y como indica la señal de fluorescencia observada en el núcleo de las células epidérmicas, SICRCa y SICRCb son capaces de interactuar físicamente entre sí y con SIKNU, SIIMA y SIHDA1 de forma individual. Además, se pudo comprobar que SICRCb también interacciona con SITPL1 (Figura 38A). Al no detectarse fluorescencia de YFP en la cotransfección de las construcciones SICRCa-cYFP/nYFP-SITPL1 se realizaron experimentos BiFC en la orientación opuesta y nuevamente se observó la ausencia de señal de fluorescencia YFP (Figura 38A). Como control negativo de estas interacciones, se cotransformaron cada una de las proteínas de interés fusionadas al extremo C- o N- terminal de la proteína YFP y su correspondiente vector vacío (C- o N- terminal de la proteína YFP sin fusionar). Como cabía esperar, el análisis mediante microscopía confocal arrojó la ausencia absoluta de interacción en estos controles (Figura 38B).

Con el propósito de verificar las interacciones proteína-proteína antes descritas, se realizaron estudios de coinmunoprecipitación (CoIP). Así, se cotransfectaron SICRCa o SICRCb ligadas a GFP (SICRCa^{GFP} o SICRCb^{GFP}, respectivamente) y los diferentes miembros del complejo de remodelación de la cromatina ligados a hemaglutinina (HA) (SIKNU^{HA}, SIIMA^{HA}, SIHDA1^{HA} o SITPL1^{HA}). De la misma forma, SICRCb^{GFP} se cotransformó con SICRCa marcado con HA (SICRCa^{HA}). Los extractos de proteínas totales se inmunoprecipitaron haciendo uso de un soporte sólido anti-GFP. Durante dicho proceso se recogieron tanto la fracción desechada como la retenida o purificada para seguidamente analizarlas mediante un ensayo Western blot y la incubación con anticuerpos anti-GFP (AbGFP) y anti-HA (AbHA), a fin de discernir entre proteínas precipitadas y copurificadas. El análisis CoIP reveló que SICRCa^{GFP} copurifica con SIKNU^{HA}, SIIMA^{HA} y SIHDA1^{HA}, y SICRCb^{GFP} con SIKNU^{HA}, SIIMA^{HA}, SIHDA1^{HA}, SITPL1^{HA} y SICRCa^{HA} (Figura 39). Por tanto, los ensayos de BiFC y CoIP proporcionaron resultados análogos que indican que las proteínas SICRCa y SICRCb se unen físicamente entre sí y a los miembros del complejo de remodelación de la cromatina encargado de reprimir la expresión de *SIWUS* para promover así la determinación del MF.

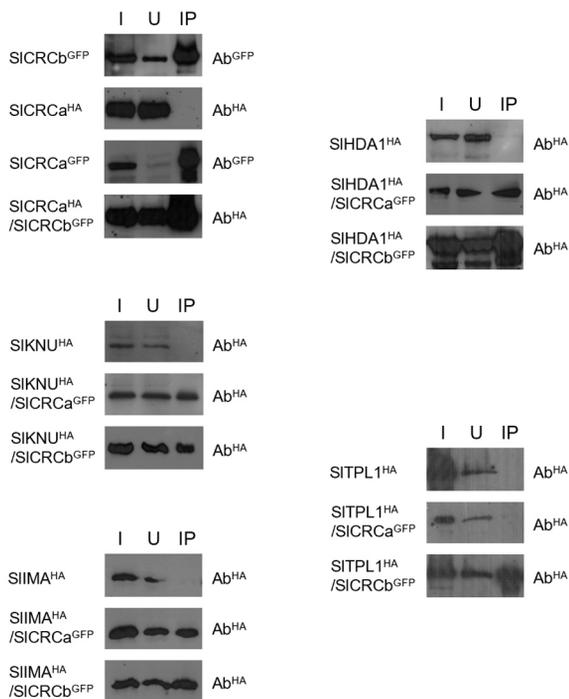


Figura 39. Estudio *in vivo* de las interacciones proteína-proteína de los parálogos SICRC mediante coimmunoprecipitación (CoIP). Imágenes del ensayo CoIP llevado a cabo en hojas de *N. benthamiana* para comprobar la interacción positiva o negativa de SICRCa-SICRCb, SICRCa-SIKNU, SICRCb-SIKNU, SICRCa-SIIMA, SICRCb-SIIMA, SICRCa-SIHDA1, SICRCb-SIHDA1, SICRCa-SITPL1 y SICRCb-SITPL1. I: extracto de proteínas totales de las hojas transformadas, U: extracto de proteínas desechadas en la purificación, IP: extracto de proteínas retenidas o copurificadas.

6. Interacción de los parálogos *SICRC* con los genes *TAG* y *TAGL1/ALQ*

Uno de los principales factores que regulan la determinación floral en *Arabidopsis* es el gen *AG*. Hasta el momento, en tomate se han evaluado distintos mutantes de pérdida de función del homólogo de *AG*, *TAG1*, generados mediante la expresión de ARN antisentido y ARN interferente. Los fenotipos de tales mutantes mostraron distintos grados de indeterminación del meristemo floral dependiendo del nivel de silenciamiento de *TAG1* y el fondo genético de cada uno de ellos (Pnueli *et al.*, 1994b; Pan *et al.*, 2010; Giménez *et al.*, 2016). En nuestro laboratorio se dispone de un mutante de función nula, *tag1*, el único hasta ahora identificado, que desarrolla flores indeterminadas, toda vez que desarrollan estructuras petaloideas y carpelos en el interior del gineceo, y los frutos carecen de septum, placenta o semillas (Figura 40). El fenotipo mutante *tag1* está causado por la sustitución de una guanina por una adenina que modifica el sitio aceptor de *splicing* del intrón 4 del *locus TAG1* (resultados no publicados). Por otra parte, tal y como hemos descrito, *ALQ/TAGL1* desempeña funciones esenciales durante el desarrollo reproductivo de tomate, unas redundantes y otras divergentes respecto a *TAG1* (Giménez *et al.*, 2010). Los frutos producidos por líneas RNAi *ALQ/TAGL1* muestran alteraciones en el desarrollo y maduración del fruto, aunque no indeterminación de este órgano (Figura 40; Giménez *et al.*, 2010). Sin embargo, el doble mutante *tag1:RNAi TAGL1* sí presenta un fenotipo de flor extremadamente indeterminado. Así, las flores dobles mutantes carecen completamente de carpelos, y por ende de frutos, y desarrollan sépalos y pétalos de manera reiterada, dando lugar a un fenotipo extremo de “flores dentro flores” (Figura 40).

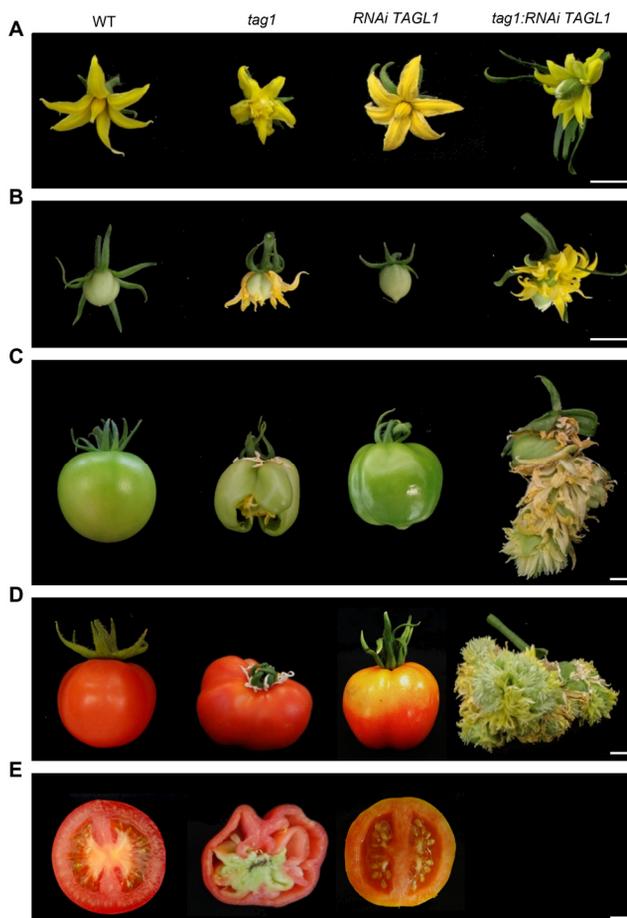


Figura 40. Características fenotípicas de los mutantes simples *tag1* y *RNAi TAGL1*, y del doble mutante *tag1:RNAi TAGL1*. Fenotipos característicos de flores en anthesis (A), fruto verde inmaduro (B), fruto verde maduro (C), fruto maduro (D) y secciones longitudinales de fruto (E) en plantas WT, *tag1*, *RNAi TAGL1* y *tag1:RNAi TAGL1*. Las plantas dobles mutantes *tag1:RNAi TAGL1* son incapaces de desarrollar frutos. Escala = 1 cm.

Trabajos relativamente recientes han aportado evidencias acerca del papel de los genes de clase C, *AG* y *SHP1/2* en tomate, y *pMADS3* y *FBP6* en petunia, en la regulación de los correspondientes ortólogos *CRC* (Gómez-Mena *et al.*, 2005; Ó'Maoiléidigh *et al.*, 2013; Morel *et al.*, 2018). Es por ello que las líneas mutantes descritas en tomate nos ofrecen la oportunidad de conocer el efecto que tiene la falta de función de *TAG1* y *TAGL1* en la actividad transcripcional de los parálogos *SICRC* de tomate. Con tal fin, hemos analizado mediante RNA-Seq la expresión de *SICRCa* y *SICRCb* en botones florales WT, *tag1*, *RNAi TAGL1* y *tag1:RNAi TAGL1* (etapas 0 a 12).

Los resultados de este análisis mostraron que *SICRCa* se encuentra significativamente sobreexpresado tanto en el mutante *tag1* (72 veces) como en los dobles mutantes *tag1:RNAi TAGL1* (13 veces), mientras que no se observaron diferencias de expresión de *SICRCa* en las líneas RNAi *TAGL1*. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con *SICRCa*, la expresión de *SICRCb* se encuentra inhibida en las tres líneas mutantes analizadas, a saber, *tag1* (4 veces), RNAi *TAGL1* (2 veces) y *tag1:RNAi TAGL1* (121 veces; Figura 41). En conjunto, estos resultados parecen indicar que *TAG1* regula negativamente a *SICRCa*, mientras que ambos *loci*, *TAG1* y *TAGL1/ALQ*, promueven de forma sinérgica la expresión de *SICRCb*.

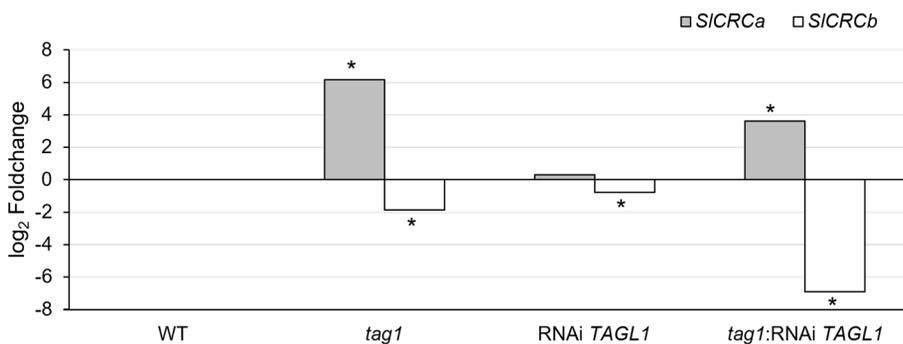


Figura 41. Análisis de expresión de los parálogos *SICRC* de tomate en botones florales (estadios de desarrollo 0 a 12) de los mutantes simples *tag1* y RNAi *TAGL1*, y del doble mutante *tag1:RNAi TAGL1*. Los valores representan el logaritmo en base dos de las veces de cambio que experimentan los niveles de expresión de los genes *SICRCa* y *SICRCb* en las distintas líneas mutantes respecto al WT. * $P < 0,05$ ajustado por FDR mediante el test de Fisher y el ajuste de múltiples pruebas de Bonferroni.

7. Complementación molecular del mutante *crc-1* de Arabidopsis

En Arabidopsis, las mutaciones del gen *CRC* causan alteraciones fenotípicas que afectan a la fusión de la región apical del gineceo, haciéndolo más corto y ancho que el de plantas WT, así como al desarrollo de nectarios (Alvarez & Smyth, 1999; Bowman & Smyth, 1999). A tenor de las diferencias fenotípicas entre los mutantes *crc* de Arabidopsis y los que afectan a los genes parálogos de tomate, *SICRCa* y *SICRCb*, nos preguntamos cuáles de las funciones de estos genes han podido conservarse en ambas especies, o si por el contrario, han tenido lugar procesos de divergencia funcional en el curso evolutivo que separó las familias de las crucíferas y las solanáceas. Para intentar responder esta cuestión, llevamos a cabo un análisis de complementación molecular del mutante *crc-1* de Arabidopsis que representa un alelo fuerte hipomórfico del ecotipo Landsberg *erecta* (*Ler*), mediante la expresión de *SICRCa* y *SICRCb*. Para la transformación genética del mutante *crc-1* se utilizaron las secuencias codificantes de *SICRCa* o *SICRCb* bajo el control del promotor del gen *CRC* de Arabidopsis (*pCRC::SICRCa* o *pCRC::SICRCb*).

En comparación con las plantas de fenotipo silvestre *Ler*, el análisis fenotípico de los mutantes *crc-1* confirmó la presencia de carpelos sin fusionar y la supresión completa del desarrollo de los nectarios. Del mismo modo, las silicuas fueron considerablemente más cortas y anchas que las desarrolladas por plantas WT (Figura 42). La expresión individualizada de los transgenes *pCRC::SICRCa* y *pCRC::SICRCb* permitió restaurar completamente la fusión de los carpelos (Figura 42C) y aumentaron ligeramente las longitudes de las silicuas respecto a las de las plantas *crc-1*, aunque no alcanzaron las dimensiones observadas en plantas WT (Figura 42A, B). Sin embargo, *SICRCa* y *SICRCb* no pudieron restituir el desarrollo de los nectarios en el mutante *crc-1* (Figura 42D). Como control, se realizó la transformación de plantas WT de Arabidopsis (ecotipo *Ler*) con los transgenes *pCRC::SICRCa* y *pCRC::SICRCb*. Los transformantes obtenidos no mostraron diferencias significativas en su desarrollo respecto a plantas *Ler* sin transformar (Figura 43). Estos resultados indican que los parálogos *SICRC*

de tomate son capaces de restaurar parcialmente el fenotipo silvestre cuando se expresan en plantas mutantes *crc-1*.

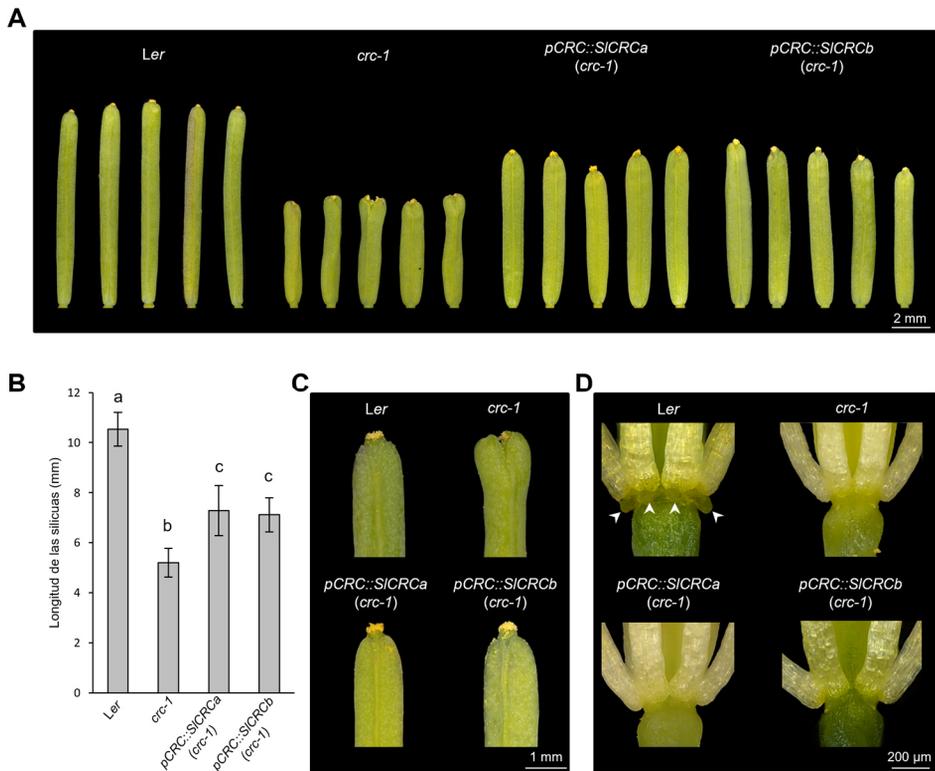


Figura 42. Complementación del mutante *crc-1* de *Arabidopsis* mediante transformación genética con los parálogos *SICRC* de tomate. (A) Siliqueas completas, (B) longitud media de las siliqueas en las diferentes líneas analizadas, (C) detalle de los ápices de siliqueas en los que se observan distintos grados de fusión de los carpelos y (D) presencia o ausencia de nectarios (flechas) en la base del tercer verticilo floral de plantas WT *Ler*, mutantes *crc-1* y mutantes *crc-1* transformados con construcciones portadoras de las secuencias codificantes de *SICRCa* o *SICRCb* bajo el control del promotor del gen *CRC* de *Arabidopsis* (*pCRC::SICRCa* y *pCRC::SICRCb*, respectivamente). Los datos mostrados en (B) representan la media \pm la desviación estándar. Las diferencias significativas se calcularon mediante comparaciones por pares de las medias utilizando la prueba de la mínima diferencia significativa (LSD; del inglés *Least Significant Difference*). Los valores seguidos por la misma letra no son estadísticamente diferentes ($P < 0,05$).

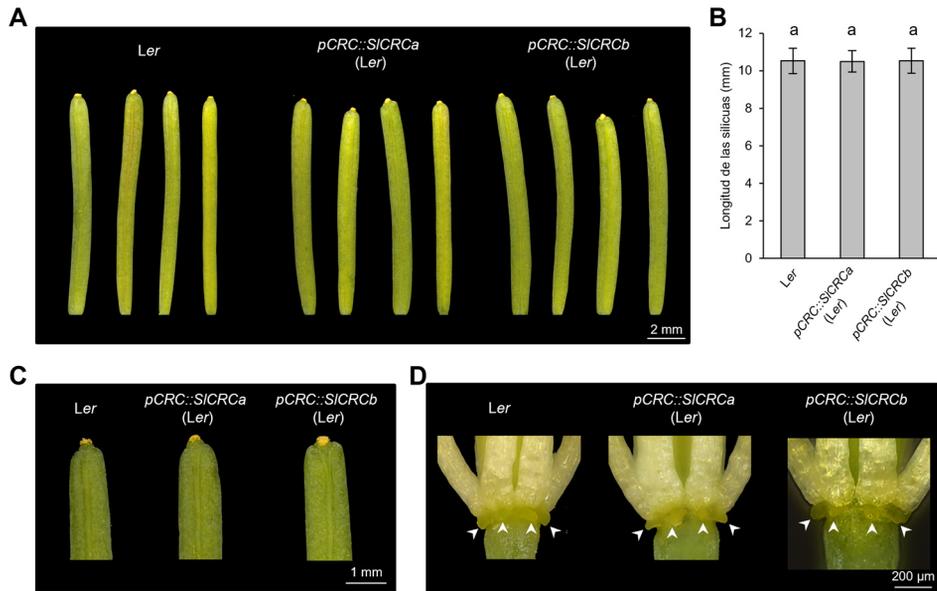


Figura 43. Transformación genética de plantas WT de Arabidopsis (*Ler*) con los parálogos *SICRC* de tomate. (A) silicuas completas, (B) longitud de las silicuas en las diferentes líneas analizadas, (C) detalle de los ápices de silicuas y (D) presencia de nectarios (flechas) en la base del tercer verticilo floral de plantas WT *Ler* y plantas *Ler* transformadas con las secuencias codificantes de *SICRCa* o *SICRCb* bajo el control del promotor del gen *CRC* de Arabidopsis (*pCRC::SICRCa* o *pCRC::SICRCb*). Los datos mostrados en (B) representan la media \pm la desviación estándar. Las diferencias significativas se calcularon mediante comparaciones por pares de las medias utilizando la prueba de la mínima diferencia significativa (LSD; del inglés *Least Significant Difference*). Los valores seguidos por la misma letra no son estadísticamente diferentes ($P < 0,05$).



Discusión

Discusión

La caracterización fenotípica, genética y molecular del mutante de tomate *fruit iterative growth (fig)* ha permitido identificar dos genes parálogos en esta especie, *Solanum lycopersicum CRABS CLAWa (SICRCa)* y *Solanum lycopersicum CRABS CLAWb (SICRCb)*. Su análisis funcional ha demostrado el papel clave que ambos desempeñan en la determinación del meristemo floral y el desarrollo de los carpelos.

A continuación, se aborda la discusión acerca de los aspectos esenciales de este trabajo, a saber, la relevancia funcional de los parálogos *SICRCa* y *SICRCb* en el desarrollo de la flor y el fruto de tomate, así como la conservación y diversificación de sus funciones respecto a los ortólogos *CRC* de angiospermas.

1. Los genes parálogos *SICRC* de tomate son necesarios para el desarrollo del carpelo

El destino de cada célula y el desarrollo de los diferentes órganos y tejidos vegetales dependen de procesos de proliferación, diferenciación y determinación celular que ocurren a nivel meristemático. Durante la transición floral, el meristemo apical del tallo (SAM) modifica su programa de desarrollo permitiendo el cambio de fase vegetativa a reproductiva, cuya consecuencia es la adquisición de una nueva identidad por el recién formado meristemo de inflorescencia (MI). A su vez, la actividad del MI genera un número determinado de meristemas florales (MF) en los flancos, a partir de los cuales se inicia el desarrollo de las flores que componen la inflorescencia de las angiospermas (Bowman, 1997; Thomson & Wellmer, 2019). El tomate es una especie de crecimiento indeterminado y simpodial, si bien el SAM, el MI y el MF son determinados. En el caso del meristemo floral, este da lugar a cuatro verticilos florales y en cada uno de ellos se inicia un número predeterminado de primordios de órganos florales. Tras la diferenciación de los primordios de carpelos en el cuarto verticilo, el más interno de la flor, cesa la actividad meristemática, lo que posibilita la determinación del MF y con ello la correcta formación de la flor (Lozano *et*

al., 2009; Sun & Ito, 2015; Thomson & Wellmer, 2019). El momento en el que se produce la determinación del meristemo floral constituye un factor decisivo, pues de él depende el número de carpelos que conformarán la flor de tomate. Ello convierte al proceso de determinación floral en un evento de interés biológico, a la vez que agronómicamente importante para el desarrollo del fruto, toda vez que define las características externas de éste, esencialmente la forma y el tamaño, y con ello su valor comercial.

Dos de los rasgos singulares del mutante recesivo *fig* son la producción de un elevado número de carpelos en el cuarto verticilo de la flor y la formación de frutos en cuyo interior se inicia el desarrollo de nuevos frutos de origen carpelar. Este patrón de desarrollo tiene lugar de forma reiterada, y no es sino el resultado de la indeterminación del meristemo floral en el dominio más interno de este. Además, el fenotipo indeterminado del mutante *fig* muestra penetrancia incompleta, lo que permite encontrar frutos de fenotipo WT en las plantas homocigóticas para dicha mutación. Así mismo, la mutación *fig* presenta expresividad variable, pudiéndose distinguir al menos tres fenotipos que difieren en la severidad de las anomalías en el desarrollo del gineceo. Uno de estos fenotipos, al que denominamos *WT-like*, es idéntico al de plantas WT; por su parte, un fenotipo débil lo muestran frutos con una apariencia externa WT, pero en su interior tiene lugar la formación de nuevos frutos, mientras que un fenotipo severo es el conocido como “fruto dentro de fruto”, a saber, frutos que emergen al exterior desde el interior de un fruto ya desarrollado, repitiéndose este rasgo de manera indeterminada.

El empleo de técnicas de mapeo mediante secuenciación masiva (*mapping by sequencing*) permitió identificar una inserción de 367 pb en el cuarto intrón del *locus SICRCa* como mutación causal candidata del fenotipo *fig*. *SICRCa* codifica un factor de transcripción de la familia YABBY, homólogo al gen *CRC* de *Arabidopsis* (Alvarez & Smith, 1999; Bowman & Smith, 1999, Huang *et al.*, 2013). A partir de la generación de líneas RNAi y CRISPR del gen *SICRCa*, obtuvimos una serie alélica de este gen cuyos fenotipos mostraron evidentes similitudes a los observados en el mutante *fig*, incluyendo penetrancia incompleta y expresividad variable. Estos resultados, no solo permiten concluir que la secuencia de 367 pb inserta en

el cuarto intrón del gen *S1CRCa* es responsable del fenotipo mutante *fig*, sino más importante aún, indican que la función de *S1CRCa* es absolutamente necesaria para la determinación del meristemo floral y, por ende, para la formación del fruto de tomate. Esta misma función es compartida por los ortólogos de *CRC* en monocotiledóneas como el arroz (*O. sativa*; Yamaguchi et al., 2004) y maíz (*Z. mays*; Strable & Vollberch, 2019), así como en la eudicotiledonea basal *E. californica* (Orashakova et al., 2009) y las eudicotiledoneas superiores *A. thaliana* (Alvarez & Smyth, 1999; Bowman & Smyth, 1999) y *P. hybrida* (Morel et al., 2018), lo que sin duda refleja la importancia de la función de *CRC*, y la necesidad de la misma, para el correcto establecimiento de los patrones de desarrollo del fruto de las angiospermas.

La inserción de 367 pb en el cuarto intrón del gen *S1CRCa* de tomate no impide totalmente la transcripción de este gen, pero sí que reduce a la mitad el nivel de transcritos en plantas mutantes. Los datos fenotípicos y de expresión relativa de *S1CRCa* en plantas mutantes *fig* y RNAi *S1CRCa*, pusieron de manifiesto que distintas líneas con similares reducciones en los niveles de transcritos producían frutos de fenotipos WT-like, débil y severo en porcentajes variables. No parece por tanto existir una correlación directa entre los niveles transcripcionales de *S1CRCa* y la severidad del fenotipo mutante, lo que indica una respuesta de dosis no lineal como la propuesta para genes reguladores del desarrollo involucrados en redes transcripcionales complejas (Birchler et al., 2016). Es lo que sucede, a modo de ejemplo, con las mutaciones *lc* y *fas*; ambas aumentan sinérgicamente el número de lóculos del fruto de tomate, sin embargo, no existe una correlación directa entre el fenotipo y los niveles de expresión de los loci afectados por dichas mutaciones, sino que la relación que se establece entre ellos es mucho más compleja Rodríguez-Leal et al. (2017).

El análisis filogenético de los miembros de la familia YABBY de tomate llevado a cabo por Huang et al. (2013) mostraba la presencia de dos genes parálogos en el genoma de esta hortícola, a los que denominaron *S1CRCa* y *S1CRCb*. Un estudio más detallado reveló que un evento de duplicación ancestral ocurrido en el nodo de las solanáceas habría originado los dos clados hermanos *CRCa* y *CRCb* (Phukela et al., 2020). Esta duplicación se

habría producido específicamente en solanáceas, pues la gran mayoría de angiospermas contienen una copia única de *CRC*, a excepción de *Mimulus guttatus*, *Linum usitatissimum* y *Coffee arabica*, *Z. mays*, *P. equestris* y *Dendrobium catenatum*, que presentan dos copias de *CRC* generadas probablemente mediante duplicación génica (Lee *et al.* 2005b; Bartholmes *et al.* 2012; Phukela *et al.*, 2020; Strable *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2021). Todos los miembros de la familia Solanaceae comparten la paralogía *CRCa-CRCb*, y por ende, cabe pensar que durante la diversificación, los miembros de esta familia han retenido en sus genomas una copia completa de ambos genes (Phukela *et al.*, 2020). Una excepción la constituye el género *Nicotiana* ssp., en el que tres de las cinco especies estudiadas, a saber, *N. attenuata*, *N. sylvestris* y *N. benthamiana* carecen del parálogo *CRCb*, mientras que *N. benthamiana* contiene dos copias de *CRCa*. De las otras dos especies analizadas, *N. tabacum* contiene dos copias de *CRCa* y una de *CRCb*, siendo *N. tomentosiformis* la única especie cuyo genoma mantiene los parálogos *CRCa* y *CRCb* (Phukela *et al.*, 2020). Cabría pensar que la pérdida de *CRCb* en algunas de las especies de este género tendría un origen ancestral en el genoma de *Nicotiana* spp. y que, con posterioridad y de manera independiente, se habría producido la duplicación y ganancia de la función de *S1CRCb* en especies como *N. tabacum* y *N. tomentosiformis*. Por otra parte, el origen alotetraploide de *N. tabacum* y *N. benthamiana* explicaría la existencia de dos copias de *CRCa* en los genomas de estas especies (Kenton *et al.* 1993; Bombarely *et al.* 2012).

Asimismo, resultan de interés los resultados de los análisis de microsintenia de la región genómica donde se ubica *CRC* en los miembros de la familia Solanaceae. Los segmentos genómicos alrededor de los loci *CRCa* y *CRCb* muestran porcentajes variables de retención y pérdida de genes, lo que sugiere eventos independientes de fraccionamiento ocurridos en cada genoma tras la duplicación (Bombarely *et al.* 2016; Phukela *et al.*, 2020). Curiosamente, el porcentaje de retención de los genes de estos segmentos aumenta al aproximarse a las posiciones que ocupan los genes *CRCa* y *CRCb*, y disminuye al alejarse de ellos (Phukela *et al.*, 2020), lo que constituye una indicación más acerca de la conservación y la relevancia funcional de ambos genes.

La presencia en el genoma de angiospermas de genes parálogos implicados en la regulación del desarrollo floral no es exclusivo de los genes *SICRC*. En tomate, dos parejas de parálogos, *TAP3-TM6* y *TPI-TPIB*, especifican la identidad de pétalos y estambres en el segundo y tercer verticilo de la flor, respectivamente. Así, mientras que los homólogos de *AP3*, *TAP3* y *TM6*, han divergido funcionalmente, *TPI* y *TPIB*, homólogos de *PI*, actúan de manera redundante promoviendo la identidad de pétalos y estambres (De Martino *et al.*, 2006; Geuten & Irish, 2010). De igual manera, los genes *SHP1* y *SHP2* representan un buen ejemplo de genes parálogos cuyas funciones redundantes han demostrado tener un papel importante en el desarrollo del fruto de *Arabidopsis* (Ma *et al.*, 1991; Liljegren *et al.*, 2000). Pues bien, a tenor de estos y otros múltiples casos bien documentados en la bibliografía científica, en este trabajo generamos mutantes nulos del gen *SICRCb* mediante la tecnología CRISPR/Cas9, para así indagar en su función y en los posibles eventos de diversificación o conservación funcional que se hubieran podido producir entre los parálogos *SICRCa* y *SICRCb* de tomate. Las líneas CRISPR editadas en el gen *SICRCb* (CR-*SICRCb*) desarrollaron un fenotipo y un patrón de herencia muy similares a los observados en las distintas líneas mutantes de *SICRCa* (*fig*, RNAi *SICRCa* y CR-*slcrca*); en ellas se pudo constatar el desarrollo de flores con ovarios multicarpelares y frutos indeterminados con distintos grados de penetrancia y expresividad. Estos resultados indican la existencia de cierto grado de redundancia funcional de los parálogos *SICRCa* y *SICRCb* en tomate.

El análisis de los patrones de expresión de los genes *SICRCa* y *SICRCb* muestran una acumulación de transcritos específica de flores en ambos casos. No obstante, mientras *SICRCa* se expresa en estadios tempranos de desarrollo floral (estadios 0 a 6), y deja de hacerlo en el estadio del preantesis, niveles transcripcionales significativos del gen *SICRCb* se mantienen durante todo el desarrollo floral, incluso 10 días después de antesis, resultados que concuerdan con los aportados por Huang *et al.* (2013) y Ezura *et al.* (2017). Además, los experimentos de hibridación *in situ* señalan la presencia de transcritos de ambos genes, *SICRCa* y *SICRCb*, en dominios meristemáticos donde se diferencian los primordios de carpelos en etapas tempranas del desarrollo, lo que sin duda refleja una función de

ambos parálogos estrechamente ligada al desarrollo de la flor, y más concretamente del carpelo.

En resumen, la conservación evolutiva de *SICRCa* y *SICRCb* en los genomas de las solanáceas, junto con los fenotipos de los distintos alelos de falta de función de *SICRCa* y *SICRCb*, y la expresión específica en dominios carpelares que presentan ambos genes durante el desarrollo floral, revelan un papel esencial de los parálogos *SICRC* de tomate en el control de la determinación del meristemo floral, y, por ende, en el desarrollo del gineceo de tomate.

2. Los parálogos *SICRC* de tomate regulan la determinación del meristemo floral mediante la inhibición de *SIWUS*

El gen *WUS* desempeña un papel crucial en el mantenimiento de las células madre del meristemo floral en *A. thaliana*. En esta especie se ha descrito una compleja red de regulación de la actividad de *WUS* que incluye señales en cascada, control transcripcional, mecanismos epigenéticos y regulación hormonal de la función meristemática (Laux *et al.*, 1996; Mayer *et al.*, 1998; Schoof *et al.*, 2000; Shang *et al.*, 2019). Durante los primeros estadios del desarrollo floral, el número de células indeterminadas se mantiene constante gracias a un mecanismo de retroalimentación negativo de los genes *CLAVATA* (*CLV1*, *CLV2* y *CLV3*) y *WUS*. A medida que avanza el desarrollo floral, la actividad de los genes *CLV* disminuye y se activan otras vías reguladoras dependientes de *AGAMOUS* (*AG*), que promueven la determinación de la actividad de las células madre (Smyth *et al.*, 1990; Schoof *et al.*, 2000; Lenhard *et al.*, 2001; Lohmann *et al.*, 2001; Sun & Ito, 2015). Así pues, el gen *AG* desempeña dos papeles fundamentales en el desarrollo de la flor. Por un lado, como *MADS-BOX* de clase C determina la identidad de estambres y carpelos en el tercer y cuarto verticilo, respectivamente, y por otro, reprime la actividad de *WUS* para controlar el crecimiento determinado del meristemo en el verticilo más interno de la flor (Bowman *et al.*, 1991; Lenhard *et al.*, 2001; Lohmann *et al.*, 2001).

El fenotipo de fruto indeterminado que muestran el mutante *fig*, y las líneas RNAi *SICRCa*, *CR-slcrca* y *CR-slcrCb*, se acentúa en el doble mutante *CR-slcrca:slcrCb* (Figura 27B; Figura 32B; Figura 34A, B), observación que sugería que la actividad del gen de tomate homólogo a *WUS*, *SIWUS*, podría estar desregulada en estos mutantes. Los análisis de expresión de *SIWUS* confirmaron la expresión prolongada de *SIWUS* en botones florales de los mutantes nulos de *SICRCa* y *SICRCb*, tanto simples como dobles (Figura 36). Así, mientras que *SIWUS* deja de expresarse en los carpelos WT a partir del estadio 6 del desarrollo floral, esta se mantiene en un grupo de células indiferenciadas del centro organizador del MF de las flores mutantes *CR-slcrca* y *CR-slcrCb*. A partir de estas, se originan nuevos primordios carpelares que darán lugar a frutos secundarios en el interior de los frutos maduros de estos mutantes; en definitiva, un fenotipo indeterminado de “fruto dentro de fruto”. Más reseñable aún es el hecho de que en estos mismos estadios, el dominio de expresión de *SIWUS* aumenta en flores de plantas dobles mutantes *CR-slcrca:slcrCb*, aumentando con ello el tamaño del meristemo floral, y de forma muy severa el número de carpelos y el grado de indeterminación del fruto (Figura 34; Figura 36). Estos resultados constatan que los parálogos *SICRC* participan en la regulación transcripcional de *SIWUS* delimitando sinérgicamente su dominio de expresión en el meristemo floral de tomate, promoviendo así la determinación de dicho meristemo.

En *Arabidopsis*, la represión de *WUS* en el meristemo floral está regulada por la vía AG-*WUS*, y tiene lugar mediante distintos mecanismos que operan en una secuencia temporal. Así, durante el estadio 3 del desarrollo floral, AG inhibe directamente la transcripción de *WUS* mediante el reclutamiento de las proteínas del Grupo Polycomb (PcG), y en etapas posteriores, lo hace de forma indirecta a través de la activación de *KNU* y *CRC* (Sun *et al.*, 2009, 2014, 2019; Liu *et al.*, 2011; Yamaguchi *et al.*, 2017, 2018). Por un lado, la proteína *KNU* se une al promotor de *WUS* para reprimir la expresión de este último mediante el desalojo del remodelador de la cromatina ATPasa *SPLAYED* y la interacción con proteínas PcG (Sun *et al.*, 2019), y por otro, *KNU* es reclutado por *AtMIF2*, que actúa como adaptador proteico para formar un complejo represor de la transcripción junto con las proteínas

TPL1 y HDA19. Una vez formado, este complejo se une a través de AtMIF2 a secuencias reguladoras del *locus WUS* para reprimir epigenéticamente su expresión. Este mecanismo propuesto en *Arabidopsis* se encuentra bien conservado en tomate, donde las proteínas homólogas SIIMA, SIKNU, SITPL1 y SIHDA1 interaccionan formando un complejo homólogo al de *Arabidopsis*, que silencia la expresión de *SIWUS* mediante un mecanismo que implica la desacetilización de histonas (Bollier *et al.*, 2018).

Hasta ahora, el papel de *CRC* en esta compleja red de regulación se había centrado en la función de este gen como modulador de la homeostasis de auxinas. Se sabe que se requieren niveles adecuados de esta fitohormona para regular la actividad del meristemo floral a través de *WUS* (Liu *et al.*, 2014; Yamaguchi *et al.*, 2017, 2018). Para ello, durante el estadio 6 de desarrollo floral, *CRC* inhibe la expresión de *TRN2*, que codifica una proteína transmembrana implicada en la distribución asimétrica de auxinas a través del transporte polar, e induce sinérgicamente con *AG*, la actividad de *YUC4*, una flavin monooxigenasa necesaria para la síntesis de auxinas. No obstante, el modo en que las auxinas regulan la expresión de *WUS* permanece aún por resolver (Yamaguchi *et al.*, 2017, 2018). Nuestros resultados revelan una nueva función para los parálogos *SICRC* de tomate en la regulación del equilibrio entre proliferación de células meristemáticas y su determinación. Mediante experimentos de interacción proteína-proteína (BiFC y CoIP), hemos demostrado, por primera vez, que las proteínas *SICRC* de tomate se unen físicamente a los miembros del complejo remodelador de la cromatina del que forman parte SIIMA, SIKNU, SITPL1 y SIHDA19 (Figura 38; Figura 39), lo que permite pensar que las proteínas *SICRC* pueden actuar como componentes de dicho complejo, indispensable para regular la actividad meristemática. Basándonos en los resultados obtenidos, proponemos un modelo hipotético según el cual los productos génicos de *SICRCa* y *SICRCb* regulan la determinación floral como parte del complejo represor antes reseñado. Dicho complejo se uniría a regiones reguladoras de *SIWUS*, estableciendo de esta forma el patrón expresión espacio-temporal de este gen durante el desarrollo floral, lo que supondría la represión de *SIWUS* una vez iniciado el desarrollo de carpelos (Figura 44).

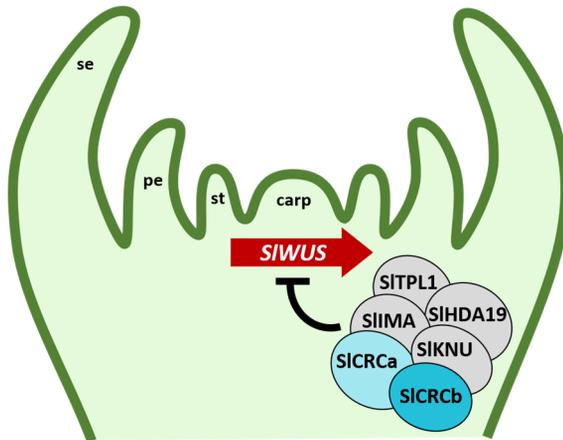


Figura 44. Modelo que integra a las proteínas SICRCa y SICRCb en el complejo proteico implicado en la represión de *SIWUS*.

Representación gráfica del complejo remodelador de la cromatina formado por SIIMA, SIKNU, SICRCa, SICRCb, SITPL1 y SIHDA19 que se une a regiones reguladoras de *SIWUS* reprimiendo su expresión, promoviendo así la determinación del MF.

Estudios previos han descrito que el complejo compuesto por IMA, SIKNU, SITPL1 y SIHDA1 reprime la expresión de *SIWUS* a través de la desacetilación de histonas (Bollier *et al.*, 2018). Sería, por tanto, de interés evaluar el estado de la cromatina en el promotor de *SIWUS* de flores de tomate procedentes de plantas WT y mutantes de pérdida de función *CRC* (mutantes *CR-slcrc*a, *CR-slcrc*b y *CR-slcrc*a:*slcrc*b), a fin de esclarecer el papel de los parálogos *SICRC* de tomate en la represión de *SIWUS*. Si el modelo propuesto es válido, las mutaciones en *SICRC* alterarían la funcionalidad del complejo represor de *SIWUS*, de forma que las flores mutantes presentarían un mayor grado de acetilación respecto a las flores silvestres. Una opción para evaluar estas marcas de acetilación sería mediante ChIP-Seq (*Chromatin immunoprecipitation sequencing*), una técnica que se basa en la secuenciación masiva de las regiones de ADN que permanecen unidas a una proteína de interés, en este caso histonas H3 acetiladas, tras la inmunoprecipitación con un anticuerpo dirigido contra residuos de lisina acetilados en la histona H3. El estudio comparativo de la región promotora del gen *SIWUS* de las muestras ensayadas permitiría constatar la veracidad de nuestra hipótesis.

Por otra parte, demostrar el papel de los parálogos *SICRC* de tomate en la regulación de la homeostasis de auxinas, así como determinar si las interacciones de *CRC* se encuentran conservadas en otras especies de angiospermas son aspectos que aún quedan por dilucidar. Futuros avances en el grado de conservación o divergencia en el mecanismo molecular que

desencadena la determinación floral serán de gran utilidad para la mejora de los cultivares de tomate, toda vez que el número de carpelos del gineceo, y en consecuencia el número final de lóculos que forman un fruto, constituyen parámetros comerciales que definen caracteres agronómicos relativos al tamaño y calidad externa de este último.

3. Redundancia funcional y compensación entre los parálogos *SICRC*

Dada la relevancia funcional que los parálogos *SICRC* tienen en la determinación del meristemo floral y el desarrollo de los carpelos, cabe preguntarse acerca de los mecanismos a través de los cuales *SICRCa* y *SICRCb* intervienen en la regulación de estos procesos.

Los resultados descritos en esta Tesis Doctoral indican una redundancia parcial de las funciones de los parálogos *SICRC* en la determinación del MF. En primer lugar, tanto la indeterminación del MF causada por la pérdida total o parcial de la función de *SICRCa*, como su patrón de herencia en el que destaca la penetrancia incompleta y expresividad variable de los fenotipos mutantes, fueron características coincidentes con las observadas en las líneas CRISPR del gen parálogo *SICRCb* (*CR-slcrb*) (Figura 19; Figura 26; Figura 27; Figura 32). Además, *SICRCa* y *SICRCb* presentan una elevada homología en sus secuencias aminoacídicas, y los análisis de expresión llevados a cabo mediante hibridación *in situ* revelaron el solapamiento de los patrones de expresión espacial y temporal de *SICRCa* y *SICRCb* en etapas tempranas del desarrollo del gineceo (Figura 28D-G; Figura 31B-E). Otro resultado que apoya la redundancia funcional de ambos parálogos lo encontramos al evaluar fenotípicamente las líneas dobles mutantes *CR-slcra:slcrb*. Estas líneas mostraron indeterminación del meristemo floral y un fenotipo de “fruto dentro de fruto” considerablemente más extremo que cualquiera de los exhibidos por los mutantes simples *CR-slcra* o *CR-slcrb*. Además, merece señalar que, al contrario de lo observado en los mutantes simples, el fenotipo de las líneas *CR-slcra:slcrb* no está afectado por fenómenos de penetrancia incompleta y/o variación de la expresividad, sino

que por el contrario, las alteraciones de los dobles mutantes CR-*slcrca:slcrb* son de igual magnitud y se presentan por igual en la totalidad de sus flores (Figura 34).

En Arabidopsis, son muchos los trabajos que describen el fenómeno de redundancia funcional entre genes de una misma familia génica con perfiles de expresión solapantes. Algunos de los trabajos más elegantes en su diseño, y con una contribución más relevante en la comprensión del proceso de determinación, lo encontramos en los genes de la familia MADS-box, formada por docenas de miembros, muchos de los cuales regulan aspectos esenciales del desarrollo reproductivo. Un buen ejemplo es el referido a los genes *SHP1* y *SHP2* antes reseñados, que controlan de forma redundante la diferenciación de las células de la zona de dehiscencia de las valvas en la silicua de Arabidopsis, y la lignificación de las mismas, facilitando así su separación en etapas finales de la maduración del fruto. De hecho, los frutos producidos por plantas mutantes individuales *shp1* y *shp2* son idénticos a los WT, mientras que los frutos dobles mutantes *shp-1 shp-2* son completamente indehiscentes (Liljegren *et al.*, 2000). De forma similar a los parálogos *SICRC* de tomate, *SHP1* y *SHP2* presentan patrones de expresión solapantes y codifican proteínas con una elevada homología en sus secuencias aminoacídicas. En consecuencia, nuestros resultados nos permiten concluir que los parálogos *SICRC* operan como reguladores positivos de la determinación del MF, y actúan de manera parcialmente redundante para garantizar el correcto desarrollo de la flor.

Otra característica relevante del mutante *fig* es el nivel anormalmente elevado de mensajeros *SICRCb* encontrados al analizar mediante RNA-Seq los perfiles globales de expresión de este mutante en botones florales en estadios de 0 a 6 del desarrollo floral. Este mismo resultado se pudo constatar mediante ensayos RT-qPCR realizados en líneas CRISPR que carecían de la función de *SICRCa*. Y al contrario, los niveles de transcritos de *SICRCa* aumentaban significativamente en los botones florales (estadios de 0 a 6) de las líneas CR-*slcrb* (Figura 33). Estos datos sugieren la existencia de un mecanismo de compensación activo entre *SICRCa* y *SICRCb* necesario para regular transcripcionalmente la determinación del meristemo floral. La compensación a nivel transcripcional ha sido descrita recientemente como

una alternativa celular para controlar la actividad meristemática en tomate a través de los parálogos CLV3/EMBRYO-SURROUNDING REGION (CLE) (Rodríguez-Leal *et al.*, 2019). De forma parecida a lo que ocurre en los mutantes CR-*slcrca* y CR-*slcrb*, la pérdida de función de *SICLV3* promueve la regulación positiva de su parálogo *SICLE9* para lograr mantener la homeostasis de células madre en el SAM, aun en situaciones de pérdida de función de alguno de estos genes. Cabría pensar, por tanto, en un equilibrio de los niveles de mensajeros de los genes *SICRCa* y *SICRCb*, de manera que la dosis de cada uno de ellos pueda ser ajustada mediante un mecanismo compensatorio que implique la regulación mutua y positiva de ambos *loci*. Ello permitiría atenuar los efectos que posibles mutaciones individuales en estos genes pudieran tener sobre el desarrollo del fruto de tomate, un aspecto que la domesticación, y más aún la selección artificial y la mejora genética, han debido favorecer para así asegurar la viabilidad y calidad de las cosechas de esta hortaliza. No obstante, este mecanismo de compensación podría estar modulado por factores ambientales, e incluso integrar a otros determinantes genéticos, para así dar respuesta a los patrones de herencia caracterizados por la penetrancia incompleta y la expresividad variable observadas en los mutantes nulos e hipomorfos de los *loci* *SICRCa* y *SICRCb*.

4. Conservación y divergencia funcional de los parálogos *SICRC*

Durante la evolución de las angiospermas, la duplicación génica ha tenido un papel primordial, habiendo propiciado la aparición de nuevos miembros de familias génicas, y con ello procesos de neo y subfuncionalización. Una de las familias más estudiadas en relación al control genético del desarrollo y los mecanismos evolutivos que han propiciado la divergencia funcional de sus miembros, es la familia YABBY de factores de transcripción. Los genes YABBY se encuentran presentes en el ancestro común de plantas terrestres, habiendo evolucionado y divergido desde las algas hasta las eudicotiledóneas más modernas (Worden *et al.*, 2009; Evkaikina *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2020; Romanova *et al.*, 2021). Un estudio evolutivo reciente, realizado por Romanova *et al.* (2021), propone que un

gen *YABBY* ancestral, responsable del desarrollo de hojas y esporangios, habría experimentado eventos sucesivos de duplicación y divergencia funcional, hasta constituir una familia génica especializada en la regulación de caracteres vegetativos y reproductivos en las angiospermas más evolucionadas. En tomate, se han descrito nueve genes de la familia *YABBY*, de los cuales *SICRCa*, *SICRCb*, y *SIINO* son de naturaleza genuinamente reproductiva, habida cuenta de que los primeros solo se expresan durante el desarrollo de carpelos y el segundo en los óvulos (Bowman, 2000; Yamada *et al.*, 2011). En las dos últimas décadas, se han llevado a cabo estudios de los genes ortólogos *CRC*, según los cuales su función en la determinación del meristemo floral y la formación del gineceo se ha conservado en las angiospermas, si bien otras funciones habrían sido adquiridas después de la divergencia evolutiva de sus respectivos linajes. Así, en monocotiledóneas como el arroz, el ortólogo de *CRC*, *DROOPING LEAF (DL)*, especifica la identidad del carpelo y además tiene un papel fundamental en la formación del nervio central de la hoja, función que comparte con otras monocotiledóneas como *Z. mays*, *A. asparadoides*, *L. longiflorum* o *T. aestivum*, las leguminosas *P. sativum* y *M. truncatula*, y la eudicotiledónea basal *A. formosa* (Bowman & Smyth, 1999; Yamaguchi *et al.*, 2004; Fourquin *et al.*, 2005, 2007, 2014; Lee *et al.*, 2005a, b; Ishikawa *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009; Nakayama *et al.*, 2010; Bartholmes *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2013; Morel *et al.*, 2018; Strable *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2021; Gong *et al.*, 2021)

Asimismo, la función de *CRC* en el control del desarrollo de los nectarios parece haberse conservado en varias eudicotiledóneas superiores como *Lepidium africanum*, *Arabidopsis* o *petunia*, a pesar de no ser necesaria para la formación de estos órganos en monocotiledóneas ni en las especies basales de eudicotiledóneas como *A. formosa* o *E. sagittatum* (Lee *et al.*, 2005b). Entre las solanáceas, se encuentran especies que desarrollan nectarios, como es *petunia (Petunia spp.)* y otras que carecen de ellos como tomate (*S. lycopersicum*) y todas las especies del género *Solanum*, sin que exista una relación filogenética clara que explique tal diferencia. Hasta el momento, el papel funcional de los parálogos *CRC* en solanáceas ha sido estudiado en *petunia*, donde los genes *PhCRC1* y *PhCRC2* conservan las funciones denominadas ancestrales, a saber, la regulación del desarrollo del

carpelo y la determinación del MF, y además, actúan de forma redundante para promover la formación de nectarios (Morel *et al.*, 2018). Por su parte, en *P. floridana*, la única copia funcional, *PFCRC*, está implicada igualmente en la determinación del meristemo floral y el desarrollo de carpelos. No obstante, un trabajo reciente de Gong *et al.* (2021) le atribuye a este ortólogo de *CRC* una nueva función en el desarrollo floral, especificando la identidad de pétalos, estambres y carpelos, a través de la interacción con los genes de clase B, *DOUBLE-LAYERED-LANTERN1* (*DOLL1*; syn. *PFGLO1*) y *Physalis floridana GLOBOSA2* (*PFGLO2*). En este trabajo, hemos constatado que la función de los parálogos *SICRC* en el desarrollo del gineceo de tomate se ha conservado respecto a la descrita en *Arabidopsis*. De hecho, la expresión individual de *SICRCa* y *SICRCb* en el mutante *crc-1* de *Arabidopsis* es capaz de restaurar completamente la fusión de los carpelos y parcialmente la longitud de las silicuas, lo que avala la hipótesis del papel ancestral de los genes *CRC-like* en ambos procesos del desarrollo floral, la formación del carpelo y la terminación del meristemo floral. En cambio, ninguno de los parálogos *SICRC* pudo reestablecer el desarrollo de nectarios en la flor de *Arabidopsis* (Figura 42), lo que indica que esta función no parece estar compartida por los genes *CRC* de angiospermas. Cabe señalar al respecto, que en las especies del género *Solanum*, la polinización ancestral es alógama, a través de insectos atraídos por estímulos visuales como es el color intenso, amarillo-anaranjado, de las anteras, en las cuales estos recolectan polen abundante en lugar del néctar producido por los nectarios. Así, durante la evolución de las especies del género *Solanum*, el hecho de no necesitar nectarios para atraer a los insectos polinizadores habría conducido a la ausencia de este tipo de estructuras (Rick *et al.*, 1979). En definitiva, nuestros resultados apoyan la hipótesis que propone que la capacidad de desarrollar nectarios en diversos linajes de las eudicotiledóneas superiores obedece a fenómenos de neofuncionalización de los genes *CRC* (Fourquin *et al.*, 2005, 2014; Lee *et al.*, 2005b; Yamada *et al.*, 2011).

A la vista de que el desarrollo de nectarios no es un proceso común a todas las angiospermas, un análisis comparativo de las secuencias aminoacídicas codificadas por los ortólogos *CRC* en estas especies resultaría de interés

evolutivo a fin de reconocer dominios funcionales específicos involucrados en la formación de estos órganos. Dado que el papel de los genes de la subfamilia *CRC* en la formación de los nectarios parece ser una función adquirida durante la evolución de las angiospermas, únicamente descrita en eudicotiledóneas superiores, esperaríamos encontrar dominios funcionales de las proteínas *CRC* específicos para la formación de estos órganos únicamente en aquellas especies que requieren de la función *CRC* para tal propósito. Una alternativa para profundizar en la funcionalidad de *CRC* vendría de la caracterización de líneas transgénicas que expresaran estos dominios en plantas en las que el desarrollo de nectarios dependa de la función *CRC* pero que carezcan de ella, esto es, en mutantes de pérdida de función, como *crc* de *Arabidopsis* o *crc1 crc2* de *petunia*.

5. Los genes *S/CRC* podrían coordinar el desarrollo de carpelos y la determinación del meristemo floral de tomate

Dos son los procesos biológicos esenciales que regula *CRC* en aquellas angiospermas en las que los correspondientes ortólogos han sido estudiados en detalle, a saber, el desarrollo de los carpelos y la determinación del meristemo floral. No se trata de eventos independientes y, por tanto, ambos procesos deben estar coordinados en el espacio y en el tiempo, de manera que la determinación del meristemo floral solo tenga lugar una vez los carpelos han adquirido su identidad característica, y no en etapas anteriores del desarrollo floral. De hecho, recientemente, Yamaguchi *et al.* (2017) han propuesto que la regulación precisa de la homeostasis de auxinas a través de los genes *TRN2* y *YUC4* podría suponer un mecanismo que conecte ambos procesos. No obstante, poco se conoce acerca de estos y otros factores genéticos que pudieran coordinar la formación y la determinación de los carpelos, ni de los mecanismos moleculares implicados en la misma.

En *Arabidopsis*, el gen *AG* desempeña una doble función estableciendo la identidad de estambres y carpelos y regulando la determinación del meristemo floral. Cabría pensar que la interacción de *AG* con *CRC* fuese

parte del mecanismo de coordinación que proponemos. Evidencias previas de Gómez-Mena *et al.* (2005) y Ó'Maoiléidigh *et al.* (2013) indican que *AG* activa la expresión de *CRC* mediante unión directa al promotor de este último. Más recientemente, Morel *et al.* (2018) han descrito un mecanismo de regulación de los genes *CRC* conservado en *Arabidopsis* y *petunia* según el cual los genes de función C, *AG* y *SHP1/2* en *Arabidopsis*, y *PMADS3* y *FBP6* en *petunia*, promueven la expresión de *CRC* y *PhCRC1/2*. El homólogo de los loci *SHP1/2* en tomate es el gen *TAGL1*, implicado en el desarrollo y maduración del fruto. En esta hortícola, las plantas de genotipo doble mutante *tag1:RNAi TAGL1* son incapaces de desarrollar el gineceo y, en su lugar, muestran indeterminación a nivel del cuarto verticilo. Ello indicaría que *TAGL1* promueve, de forma parcialmente redundante con *TAG1*, la determinación del meristemo floral (Giménez *et al.*, 2010; Figura 40). Los datos de RNA-Seq obtenidos a partir de botones florales WT, *tag1*, RNAi *TAGL1* y *tag1:RNAi TAGL1*, reflejan el silenciamiento de la actividad de *SICRCb* en los mutantes simples *tag1*, RNAi *TAGL1* (Figura 41). Además, esta reducción en los niveles de transcritos *SICRCb* se acentúa considerablemente en el doble mutante, indicando que la expresión de *SICRCb* depende de *TAG1* y *TAGL1*. Sin embargo, en contraste con lo que sucede con *SICRCb*, los niveles de transcritos de *SICRCa* se ven incrementados tanto en el mutante simple *tag1* como en el doble *tag1:RNAi TAGL1*, y no lo están cuando falta la función de *TAGL1*. Cabe pensar pues, que *TAGL1* no participaría en el control de la expresión de *SICRCa*, que a su vez estaría reprimida por *TAG1*. En conjunto, los datos de RNA-Seq sugieren que el mecanismo de control de la expresión de los ortólogos *CRC* por los genes MADS-box de clase C descrito en *Arabidopsis* y *petunia* se habría conservado para el locus *SICRCb* de tomate pero no para *SICRCa*. De esta forma, los parálogos *SICRCa* y *SICRCb* no estarían regulados por los mismos mecanismos moleculares, lo que podría estar relacionado con una función parcialmente redundante, no completa, de ambos genes.

Las diferencias en la actividad transcripcional de *SICRCa* y *SICRCb* y su relación con los MADS-box *TAG1* y *TAGL1*, podrían tener su origen en cambios en el patrón de regulación de la expresión de *SICRCa*. El análisis de microsintenia realizado en este trabajo entre los bloques genómicos que

albergan a los genes *CRC* de *Arabidopsis* y tomate apoyarían esta hipótesis, y es que la región en la que se ubica *CRC* en el genoma de *Arabidopsis* presenta mayor similitud con la que contiene al gen *SICRCb* de tomate (Figura 30). De este modo, es posible que las mutaciones producidas en el entorno genómico de *SICRCa* hayan ocasionado diferencias en el control de la expresión de este gen respecto a su parálogo *SICRCb*. En cualquier caso, la redundancia parcial de los genes *SICRC* de tomate, y las interacciones que parecen mantener con *TAG1* y *TAGL1*, podrían ser parte de un mecanismo que permitiera coordinar la formación del carpelo y la determinación del meristemo floral en tomate.

Por otro lado, la caracterización de los mutantes de clase B *ap3* y *pi* de *Arabidopsis*, *spw1* de arroz y *Si3* en maíz, ha mostrado la expresión ectópica de los ortólogos correspondientes de *CRC*, *DL* y *DRL1/2*, en los órganos carpeloideos que, de forma anómala, se desarrollan en el tercer verticilo floral de cada una de estas especies (Bowman & Smyth, 1999; Nagasawa *et al.*, 2003; Yamaguchi *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005a; Luo *et al.*, 2020). En arroz también se ha descrito que el gen *DL* reprime la expresión de *SPW1* en el cuarto verticilo floral, puesto que la pérdida de la función *DL* da como resultado la expansión de los dominios de expresión de *SPW1* en el verticilo más interno de la flor, lo que conlleva la transformación del gineceo en estambres (Nagasawa *et al.*, 2003). Además, se sabe que *AP3* y *PI* se unen al promotor de *CRC* para reprimir su expresión en *Arabidopsis* (Wuest *et al.*, 2012; Ó'Maoiléidigh *et al.*, 2013). En conjunto, estos resultados indican que los ortólogos *CRC* podrían actuar de forma antagónica a los genes de clase B promoviendo el desarrollo de estambres en el tercer verticilo de la flor y carpelos en el cuarto. Muy recientemente, Gong *et al.* (2021) han descrito la interacción del gen *PFCRC* con los genes de clase B *DOLL1* y *PFGL2* en la especie *P. floridana*. Así, se ha demostrado que existe una interacción regulatoria entre estos genes que difiere en función del verticilo floral en el que se produzca. En el segundo y tercer verticilo floral, *DOLL1* se une al promotor de *PFCRC* para reprimir su expresión, promoviendo de este modo la identidad de pétalos y estambres; en cambio, en el cuarto verticilo floral, la identidad de carpelo, así como el crecimiento y desarrollo del mismo,

dependen de la función de DOLL1 que activa de forma directa la expresión de *PFCRC*.

En tomate, hemos mostrado que las líneas dobles mutantes que carecen de las funciones *SICRCa* y *SICRCb* desarrollan carpelos estaminoideos en el cuarto verticilo floral (Figura 34A,B; Figura 35). Estas transformaciones homeóticas, aunque parciales, sugieren un papel adicional de los parálogos *SICRC* de tomate en la identidad del carpelo, reprimiendo la actividad de los genes de clase B en el verticilo más interno de la flor. Así pues, cabría pensar que se requiere de una interacción antagónica entre los genes *CRC* y los genes MADS-box de clase B para la correcta diferenciación de estambres y carpelos en los verticilos reproductivos de la flor. Estudios adicionales de los patrones de expresión de genes de clase B en los mutantes *crc* de angiospermas basales y superiores permitirían discernir si la interacción de los genes *CRC* y de clase B obedece a un mecanismo ancestral de regulación génica que se ha conservado en plantas superiores, o si por el contrario es el resultado de procesos de especialización independientes ocurridos durante la evolución de estas. En cualquier caso, un análisis comparativo de los patrones de expresión mediante hibridación *in situ* de los genes de clase B de tomate *TAP3*, *TM6*, *TPI* y *TPIB* en flores de plantas WT y de mutantes nulos *SICRC* (*CR-slcrca*, *CR-slcrb* y *CR-slcrca:slcrb*) permitiría avanzar en esta hipótesis.

Otra posible explicación a la presencia de estructuras estaminoideas en el cuarto verticilo de los dobles mutantes *CR-slcrca:slcrb* estaría relacionada con la desregulación de factores que establecen los límites entre órganos florales adyacentes (*boundary genes*). A este respecto, se ha constatado que la mutación *crc* incrementa las anomalías en la determinación del meristemo floral y promueve la conversión homeótica de carpelos en estambres en los mutantes de pérdida de función del locus *SUPERMAN* de *Arabidopsis* (Lee *et al.*, 2019b). Además, en esta especie, *CRC* y *SUP* regulan conjuntamente la expresión de factores involucrados en el desarrollo de los estambres tales como *ARABIDOPSIS HISTIDINE PHOSPHOTRANSFER PROTEIN6* (*AHP6*), *AUXIN-RESPONSIVE GENE AUX/IAA19* (*IAA19*), *REPRODUCTIVE MERISTEM 25* (*REM25*), y *TREHALOSE- 6-PHOSPHATE PHOSPHATASE I* (*TPPI*), este último necesario para definir los límites entre

órganos florales (Lee *et al.*, 2019b). Estos hallazgos sugieren que modificaciones a nivel transcripcional de los homólogos de estos genes en los dobles mutantes *CR-slrcra:slrcrb* de tomate podrían estar implicadas en los cambios homeóticos encontrados en sus flores y frutos. Por tanto, el estudio de las interacciones de los parálogos *S/CRC* con los homólogos de *SUP*, *AHP6*, *IAA19*, *REM25* y *TPPI* en tomate, así como de otros genes que regulan la identidad de estambres y carpelos, aportaría una información valiosa para comprender los mecanismos genéticos y moleculares que coordinan la identidad de los órganos reproductivos de la flor y la determinación del meristemo floral de tomate.



Conclusiones

Conclusiones

En este trabajo se describen los resultados de la caracterización fenotípica y genética del mutante *fruit iterative growth (fig)*, a partir del cual se ha identificado una inserción en la secuencia genómica de *SICRCa* como factor causal de las anomalías en el desarrollo de carpelos y en la determinación del meristemo floral observadas en dicho mutante. La caracterización molecular y funcional del gen *SICRCa* y de su parálogo *SICRCb*, nos ha permitido profundizar en el mecanismo genético y molecular que subyace a la determinación del meristemo floral y la formación del gineceo. Las conclusiones deducidas del conjunto de los resultados descritos en esta Tesis Doctoral son las siguientes:

PRIMERA.— La mutación *fig* promueve la indeterminación del meristemo floral a nivel del cuarto verticilo y, en consecuencia, la formación reiterada de un elevado número de carpelos y frutos, responsables en última instancia de un fenotipo característico de “fruto dentro de fruto”.

SEGUNDA.— Si bien el mutante *fig* se identificó a partir del escrutinio de una colección de mutantes insercionales de T-DNA, el análisis molecular de la mutación responsable del fenotipo observado ha revelado que se trata de una variación somaclonal que se hereda de forma monogénica y recesiva. Mediante técnicas de mapeo por secuenciación se ha aislado la mutación *fig*, causada por una inserción de 367 pb de una secuencia altamente repetida en el cuarto intrón del gen *SICRCa*, quien a su vez codifica un factor de transcripción de la familia YABBY. La caracterización de diferentes variantes alélicas del *locus SICRCa*, obtenidas mediante tecnología RNAi y CRISPR/Cas, ha demostrado que el fenotipo *fig* se debe a la falta de función de dicho gen.

TERCERA.— Los fenotipos de penetrancia incompleta y expresividad variable promovidos tanto por la mutación *fig* como por los alelos hipomorfos y nulos del gen *SICRCa*, demuestran que la pérdida total o parcial de la función de *SICRCa* impide el cese de la actividad del meristemo floral, lo que conlleva el desarrollo de un gineceo aberrante, de naturaleza indeterminada. No obstante, los niveles de expresión de *SICRCa* no parecen mantener una correlación directa con la severidad del fenotipo indeterminado.

CUARTA.— Los análisis de expresión de los parálogos *SICRCa* y *SICRCb* indican que la actividad de ambos es específica del desarrollo floral. No obstante, ambos difieren en el patrón temporal, toda vez que la acumulación de transcritos de *SICRCa* tiene lugar en etapas tempranas del desarrollo floral, mientras que los mensajeros de *SICRCb* están presentes durante todo el desarrollo de la flor de tomate.

QUINTA.— La expresión de los parálogos *SICRC* coincide con el inicio de los primordios de carpelos y continúa durante el desarrollo de estos órganos. Este patrón de expresión unido a los cambios homeóticos observados en las líneas CRISPR con falta de función de ambos parálogos, indican que los genes *SICRCa* y *SICRCb* se requieren para el desarrollo normal de los carpelos de tomate.

SEXTA.— De igual forma, ambos parálogos *SICRC* son absolutamente necesarios para la correcta determinación del meristemo floral en tomate, tal y como prueba el hecho de que la pérdida total o parcial de la función de dichos genes, ya sea de manera individual o conjunta, impida la adecuada determinación del meristemo floral.

SÉPTIMA.— Los estudios de expresión de los genes *SICRCa* y *SICRCb* en mutantes nulos CR-*slcrb* y CR-*slcrca*, señalan la existencia de un mecanismo de compensación activa entre ambos parálogos que tendría como finalidad amortiguar la severidad de las alteraciones producidas ante la pérdida de función de cualquiera de los loci *SICRCa* o *SICRCb* durante el desarrollo reproductivo de tomate.

OCTAVA.— Los mutantes simples de falta o pérdida de función de los genes *SICRCa* y *SICRCb* muestran, todos ellos, penetrancia incompleta y expresividad variable. Sin embargo, esta característica del patrón de herencia de dichos genes no se observa en las líneas dobles mutantes, CR-*slcrca:slcrb*, en las que el fenotipo de indeterminación del meristemo floral es más extremo que en cada uno de los mutantes simples y se mantiene estable durante el crecimiento reproductivo de la planta. Estos resultados evidencian la función de los parálogos *SICRC* como reguladores positivos de la determinación del meristemo floral, función que ejercen de manera parcialmente redundante para garantizar el correcto desarrollo de la flor.

NOVENA.— En las líneas editadas en los genes *SICRCa*, *SICRCb*, o en las correspondientes dobles mutantes, *CR-slcrcas:slcrcb*, el gen *SIWUS* mantiene su expresión en botones florales, incluso después del cese de la actividad meristemática. Este hecho, junto con las alteraciones observadas en el desarrollo reproductivo de estas líneas mutantes, indican que *SICRCa* y *SICRCb* participan en la regulación transcripcional del gen *SIWUS*.

DÉCIMA.— Los estudios de interacción proteína-proteína confirman que *SICRCa* y *SICRCb* se unen al complejo remodelador de la cromatina que reprime la expresión de *SIWUS* para promover la determinación floral, lo que sin duda ofrece una perspectiva novedosa acerca del mecanismo molecular que regula este proceso.

UNDÉCIMA.— El desarrollo de los carpelos y la determinación del meristemo floral deben ser procesos coordinados en el espacio y el tiempo. Nuestros resultados acerca de la caracterización fenotípica de los dobles mutantes *CR-slcrcas:slcrcb* y de los niveles de expresión de los parálogos *SICRC* en mutantes de clase C sugieren que esta función coordinadora podría estar mediada por los genes *SICRC* y su interacción con otros genes, entre ellos los genes MADS-box de función B y C.

DUODÉCIMA.— La expresión de cada uno de los genes parálogos *SICRC* bajo el control del promotor del gen *CRC* de *Arabidopsis*, es capaz de restaurar la fusión de los carpelos del mutante *crc-1* de *Arabidopsis* y restituye parcialmente la longitud de las silicuas de dicho mutante. Sin embargo, en ningún caso los ensayos de complementación molecular lograron reestablecer la formación de nectarios en la flor de *Arabidopsis*. Cabe pensar, por tanto, que las funciones conservadas entre los genes *CRC* de tomate y *Arabidopsis* se circunscriben al desarrollo del carpelo y la determinación del meristemo floral.



Bibliografía

Bibliografía

Abe, M., Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Daimon, Y., Yamaguchi, A., Ikeda, Y., Ichinoki, H., Notaguchi, M., Goto, K. & Araki, T. (2005). FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science*, 309(5737), 1052-1056.

Aflitos, S., Schijlen, E., De Jong, H., De Ridder, D., Smit, S., Finkers, R., Wang, J., Zhang, G., Li, N., Mao, L., Bakker, F., Dirks, R., Breit, T., Gravendeel, B., Huits, H., Struss, D., Swanson-Wagner, R., Van Leeuwen, H., Van Ham, R.C., Fito, L., ... Peters, S. 100 Tomato Genome Sequencing Consortium. (2014). Exploring genetic variation in the tomato (*Solanum* section *Lycopersicon*) clade by whole-genome sequencing. *The Plant Journal*, 80 (1), 136-48.

Aichinger, E., Kornet, N., Friedrich, T. & Laux, T. (2012). Plant stem cell niches. *Annual Review of Plant Biology*, 63, 615-636.

Aida, M., Ishida, T., Fukaki, H., Fujisawa, H. & Tasaka, M. (1997). Genes involved in organ separation in Arabidopsis: an analysis of the *cup-shaped cotyledon* mutant. *The Plant Cell*, 9(6), 841-857.

Alabadí, D., Blázquez, M.A., Carbonell, J., Ferrándiz, C. & Pérez-Amador, M.A. (2009). Instructive roles for hormones in plant development. *International Journal of Developmental Biology*, 53(8-10), 1597-1608.

Allen, K.D. & Sussex, I.M. (1996). *Falsiflora* and *anantha* control early stages of floral meristem development in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Planta*, 200, 254-264.

Alvarez, J. & Smyth, D.R. (1999). *CRABS CLAW* and *SPATULA*, two Arabidopsis genes that control carpel development in parallel with *AGAMOUS*. *Development*, 126(11), 2377-2386.

Alvarez, J. & Smyth, D.R. (2002). *CRABS CLAW* and *SPATULA* genes regulate growth and pattern formation during gynoecium development in *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Plant Sciences*, 163(1), 17-41.

Ampomah-Dwamena, C., Morris, B.A., Sutherland, P., Veit, B. & Yao, J.-L. (2002). Down-Regulation of *TM29*, a tomato *SEPALLATA* homolog, causes parthenocarpic fruit development and floral reversion. *Plant Physiology*, 130 (2), 605-617.

Andrés, F. & Coupland, G. (2012). The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nature Reviews Genetics*, 13(9), 627-639.

Angiosperm Phylogeny Group IV. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181, 1-20.

Atarés, A., Moyano, E., Morales, B., Schleicher, P., García-Avellán, J.O., Antón, T., García-Sogo, B., Pérez-Martín, F., Lozano, R., Flores, F.B., Moreno, V., Bolarín, M.C. & Pineda, B. (2011). An insertional mutagenesis programme with an enhancer trap for the identification and tagging of genes involved in abiotic stress tolerance in the tomato wild-related species *Solanum pennellii*. *Plant Cell Reports*, 30(10), 1865-1879.

Aukerman, M.J. & Sakai, H. (2003). Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its *APETALA2*-like target genes. *The Plant Cell*, 15(11), 2730-2741.

Baker, C.C., Sieber, P., Wellmer, F. & Meyerowitz, E.M. (2005). The *early extra petals1* mutant uncovers a role for microRNA *miR164c* in regulating petal number in *Arabidopsis*. *Current Biology*, 15(4), 303-315.

Balanzà, V., Martínez-Fernández, I., Sato, S., Yanofsky, M.F., Kaufmann, K., Angenent, G.C., Bemer, M. & Ferrándiz, C. (2018). Genetic control of meristem arrest and life span in *Arabidopsis* by a *FRUITFULL-APETALA2* pathway. *Nature Communications*, 9(1), 565.

Bartholomes, C., Hidalgo, O. & Gleissberg, S. (2012). Evolution of the *YABBY* gene family with emphasis on the basal eudicot *Eschscholzia californica* (Papaveraceae). *Plant Biology*, 14(1), 11-23.

Barton, M. K. (2010). Twenty years on: the inner workings of the shoot apical meristem, a developmental dynamo. *Developmental Biology*, 341(1), 95-113.

Barton, M.K. & Poethig, R.S. (1993). Formation of the shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana*: an analysis of development in the wild type and in the *shoot meristemless* mutant. *Development*, 119, 823-831.

Basu, A. & Imrhan, V. (2007). Tomatoes versus lycopene in oxidative stress and carcinogenesis: conclusions from clinical trials. *European Journal of Clinical Nutrition*, 61(3), 295-303.

Benjamini, Y. & Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 57, 289- 300.

Benková, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertová, D., Jürgens, G. & Friml, J. (2003). Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell*, 115(5), 591-602.

Berger, Y., Harpaz-Saad, S., Brand, A., Melnik, H., Sirding, N., Alvarez, J.P., Zinder, M., Samach, A., Eshed, Y. & Ori, N. (2009). The NAC-domain transcription factor GOBLET specifies leaflet boundaries in compound tomato leaves. *Development*, 136(5), 823-832.

Bernardello, G. (2007). A systematic survey of floral nectaries. En: S.W. Nicolson, M. Nepi & E. Pacin. (eds), *Nectaries and Nectar*. Springer, Dordrecht. ISBN: 978-1-4020-5937-7.

Besnard, F., Yassin, R., Morin V., Marteaux, B., Brunoud, G., Chambrier, P., Rozier, F., Mirabet, V., Legrand, J., Laine, S., Thevenon, E., Farcot E., Cellier, C., Das, P., Bishopp, A., Dumas, R., Parcy, F., Helariutta, Y., Boudaoud, A., Godin, C., ... Vernoux, T. (2014). Cytokinin signalling inhibitory fields provide robustness to phyllotaxis. *Nature*, 505(7483), 417-421.

Bhatia, N. & Heisler, M.G. (2018). Self-organizing periodicity in development: organ positioning in plants. *Development*, 145(3), dev149336.

Bhatia, N., Bozorg, B., Larsson, A., Ohno, C., Jönsson, H. & Heisler, M.G. (2016). Auxin Acts through MONOPTEROS to regulate plant cell polarity and pattern phyllotaxis. *Current Biology*, 26(23), 3202-3208.

Birchler, J. A., Johnson, A. F. & Veitia, R. A. (2016). Kinetics genetics: incorporating the concept of genomic balance into an understanding of quantitative traits. *Plant Science*, 245, 128-134.

Blanca, J., Cañizares, J., Cordero, L., Pascual, L., Díez, M.J. & Nuez, F. (2012). Variation revealed by SNP genotyping and morphology provides insight into the origin of the tomato. *PLoS One*, 7(10), e48198.

Blanca, J., Montero-Pau, J., Sauvage, C., Bauchet, G., Illa, E., Díez, M.J., Francis, D., Causse, M., van der Knaap, E. & Cañizares, J. (2015). Genomic variation in tomato, from wild ancestors to contemporary breeding accessions. *BMC Genomics*, 16(1), 257.

Bleckmann, A., Weidtkamp-Peters, S., Seidel, C.A.M. & Simon, R. (2010). Stem cell signaling in Arabidopsis requires CRN to localize CLV2 to the plasma membrane. *Plant Physiology*, 152(1), 166-176.

Bollier, N., Sicard, A., Leblond, J., Latrasse, D., Gonzalez, N., Gévaudant, F., Benhamed, M., Raynaud, C., Lenhard, M., Chevalier, C., Hernould, M. & Delmas, F. (2018). At-MINI ZINC FINGER2 and SI-INHIBITOR OF MERISTEM ACTIVITY, a conserved missing link in the regulation of floral meristem termination in arabidopsis and tomato. *The Plant Cell*, 30(1), 83-100.

Bombarely, A., Moser, M., Amrad, A., Bao, M., Bapaume, L., Barry, C.S., Bliet, M., Boersma, M.R., Borghi, L., Bruggmann, R., Bucher, M., D'Agostino, N., Davies, K., Druge, U., Dudareva, N., Egea-Cortines, M., Delledonne, M., Fernandez-Pozo, N., Franken, P., Grandont, L., ... Kuhlemeier, C. (2016). Insight into the evolution of the Solanaceae from the parental genomes of *Petunia hybrida*. *Nature Plants*, 2 (6), 16074.

Bombarely, A., Rosli, H.G., Vrebalov, J., Moffett, P., Mueller, L.A. & Martin, G.B. (2012). A draft genome sequence of *Nicotiana benthamiana* to enhance molecular plant-microbe biology research. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(12), 1523–1530.

Bommert, P., Satoh-Nagasawa, N., Jackson, D. & Hirano, H.Y. (2005). Genetics and evolution of inflorescence and flower development in grasses. *Plant & Cell Physiology*, 46(1), 69-78.

Bowman, J.L. (1997). Evolutionary conservation of angiosperm flower development at the molecular and genetic levels. *Journal of Biosciences*, 22(4), 515-527.

Bowman, J.L. (2000). The YABBY gene family and abaxial cell fate. *Current Opinion in Plant Biology*, 3(1), 17–22.

Bowman, J.L. & Eshed, Y. (2000). Formation and maintenance of the shoot apical meristem. *Trends in Plant Science*, 5(3), 110-115.

Bowman, J.L. & Smyth, D.R. (1999). *CRABS CLAW*, a gene that regulates carpel and nectary development in *Arabidopsis*, encodes a novel protein with zinc finger and helix-loop-helix domains. *Development*, 126(11), 2387-2396.

Bowman, J.L., Smyth, D.R. & Meyerowitz, E.M. (1989). Genes directing flower development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 1, 37-52.

Bowman, J.L., Smyth, D.R. & Meyerowitz, E.M. (1991). Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. *Development*, 112(1), 1-20.

Bowman, J.L., Smyth, D.R. & Meyerowitz, E.M. (2012). The ABC model of flower development: then and now. *Development*, 139(22), 4095-4098.

Bowman, J.L., Alvarez, J., Weigel, D., Meyerowitz, E.M. & Smyth, D.R. (1993). Control of flower development in *Arabidopsis thaliana* by *APETALA1* and interacting genes. *Development*, 119, 721-743.

Bowman, J.L., Sakai, H., Jack, T., Weigel, D., Mayer, U. & Meyerowitz, E.M. (1992). *SUPERMAN*, a regulator of floral homeotic genes in *Arabidopsis*. *Development*, 114(3), 599-615.

Brand, U., Fletcher, J.C., Hobe, M., Meyerowitz, E.M. & Simon, R. (2000). Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by *CLV3* activity. *Science*, 289(5479), 617-619.

Brandstatter, I. & Kieber, J.J. (1998). Two genes with similarity to bacterial response regulators are rapidly and specifically induced by cytokinin in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 10(6), 1009-1019.

Breuil-Broyer, S., Trehin, C., Morel, P., Boltz, V., Sun, B., Chambrier, P., Ito, T. & Negrutiu, I. (2016). Analysis of the *Arabidopsis superman* allelic series and the interactions with other genes demonstrate developmental robustness and joint specification of male-female boundary, flower meristem termination and carpel compartmentalization. *Annals of Botany*, 117(5), 905-923.

Brown, W.H. (1938). The bearing of nectaries on the phylogeny of flowering plants. *American Philosophical Society*, 79, 549-570+572-595.

Brukhin, V., Hernould, M., Gonzalez, N., Chevalier, C. & Mouras, A. (2003). Flower development schedule in tomato *Lycopersicon esculentum* cv. sweet cherry. *Sexual Plant Reproduction*, 15, 311-320.

Busi, M.V., Bustamante, C., D'Angelo, C., Hidalgo-Cuevas, M., Boggio, S.B., Valle, E.M. & Zabaleta, E. (2003). MADS-box genes expressed during tomato seed and fruit development. *Plant Molecular Biology*, 52(4), 801-815.

Byrne, M.E., Simorowski, J. & Martienssen, R.A. (2002). *ASYMMETRIC LEAVES1* reveals *knox* gene redundancy in *Arabidopsis*. *Development*, 129(8), 1957-1965.

Byrne, M.E., Barley, R., Curtis, M., Arroyo, J.M., Dunham, M., Hudson, A. & Martienssen, R.A. (2000). *Asymmetric leaves1* mediates leaf patterning and stem cell function in *Arabidopsis*. *Nature*, 408(6815), 967-971.

Cairns, B.R. (2005). Chromatin remodeling complexes: Strength in diversity, precision through specialization. *Current Opinion in Genetics & Develoement*, 15(2), 185-190.

Campisi, L., Yang, Y., Yi, Y., Heiling, E., Herman, B., Cassista, A.J., Allen, D.W., Xiang, H. & Jack, T. (1999) Generation of enhancer trap lines in *Arabidopsis* and characterization of expression patterns in the inflorescence. *The Plant Journal*, 17(6), 699–707.

Canene-Adams, K., Campbel, J.K., Zaripheh, S., Jeffery, E.H. & Erdman, J.W. (2005). The tomato as a functional food. *The Journal of Nutrition*, 135(5), 1226-1230.

Carles, C.C. & Fletcher, J.C. (2003). Shoot apical meristem maintenance: the art of a dynamic balance. *Trends in Plant Science*, 8(8), 394-401.

Carrera, E., Ruiz-Rivero, O., Peres, L.E., Atares, A. & Garcia-Martinez, J.L. (2012). Characterization of the *procera* tomato mutant shows novel functions of the SIDELLA protein in the control of flower morphology, cell division and expansion, and the auxin-signaling pathway during fruit-set and development. *Plant Physiology*, 160(3), 1581-1596.

Carter, J.D., Pereira, A., Dickerman, A.W. & Veileux, R.E. (2013). An active Ac/Ds transposon system for activation tagging in tomato cultivar M82 using clonal propagation. *Plant Physiology*, 162(1), 145-156.

Carvalho, R.F., Campos, M.L., Pino, L.E., Crestana, S.L., Zsögön, A., Lima, J.E., Benedito, V.A. & Peres, L.E. (2011). Convergence of developmental mutants into a single tomato model system: 'Micro-Tom' as an effective toolkit for plant development research. *Plant Methods*, 7(1), 18.

Causier, B., Schwarz-Sommer, Z. & Davies, B. (2010). Floral organ identity: 20 years of ABCs. *Seminars in Cell Development Biology*, 21(1), 73-79.

Chahtane, H., Vachon, G., Le Masson, M., Thévenon, E., Périgon, S., Mihajlovic, N., Kalinina, A., Michard, R., Moyroud, E., Monniaux, M., Sayou, C., Grbic, V., Parcy, F. & Tichtinsky, G. (2013). A variant of LEAFY reveals its capacity to stimulate meristem development by inducing *RAX1*. *The Plant Journal*, 74(4), 678-689.

Chamarro, J. (1995). Anatomía y fisiología de la planta. En: F. Nuez. (ed), *El cultivo del tomate*. Mundi-Prensa, Madrid, 4392. ISBN: 9788471145499.

Chandler, J.W. (2011). The Hormonal Regulation of Flower Development. *Journal of Plant Growth Regulation*, 30, 242-254.

Chandler, J.W. & Werr, W. (2017). DORNROSCHE, DORNROSCHE-LIKE, and PUCHI redundantly control floral meristem identity and organ initiation in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 68(13), 3457-3472.

Chávez Montes, R.A., Herrera-Ubaldo, H., Serwatowska, J. & de Folter, S. (2015). Towards a comprehensive and dynamic gynoecium gene regulatory network. *Current Plant Biology*, 3-4, 3-12.

Chen, X. (2004). A microRNA as a transcriptional repressor of *APETALA2* in *Arabidopsis* flower development. *Science*, 303(5666), 2022-2025.

Chen, Y.Y., Hsiao, Y.Y., Li, C.I., Yeh, C.M., Mitsuda, N., Yang, H.X., Chiu, C.C., Chang, S.B., Liu, Z.J. & Tsai, W.C. (2021). The ancestral duplicated *DL/CRC* orthologs, *PeDL1* and *PeDL2*, function in orchid reproductive organ innovation. *Journal of Experimental Botany*, 8, erab195.

Cheng, Y., Dai, X. & Zhao, Y. (2006). Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in *Arabidopsis*. *Genes & Development*, 20(13), 1790-1799.

Cheng, Y., Qin, G., Dai, X. & Zhao, Y. (2008). *NPY* genes and AGC kinases define two key steps in auxin-mediated organogenesis in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(52), 21017-21022.

Chu, Y.H., Jang, J.C., Huang, Z. & van der Knaap, E. (2019). Tomato locule number and fruit size controlled by natural alleles of *lc* and *fas*. *Plant Direct*, 3(7), e00142.

Chuang, C.F., Running, M.P., Williams, R.W. & Meyerowitz, E.M. (1999). The *PERIANTHIA* gene encodes a bZIP protein involved in the determination of floral organ number in *Arabidopsis thaliana*. *Genes & Development*, 13(3), 334-344.

Chung, M.Y., Vrebalov, J., Alba, R., Lee, J., McQuinn, R., Chung, J.D., Klein, P. & Giovannoni, J. (2010). A tomato (*Solanum lycopersicum*) *APETALA2/ERF* gene, *SlAP2a*, is a negative regulator of fruit ripening. *The Plant Journal*. 64(6), 936-947.

Clark, S.E., Jacobsen, S.E., Levin, J.Z. & Meyerowitz, E.M. (1996). The *CLAVATA* and *SHOOT MERISTEMLESS* loci competitively regulate meristem activity in *Arabidopsis*. *Development*, 122(5), 1567-1575.

Clough, S. J. & Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 16(6), 735-743.

Cnops, G., Neyt, P., Raes, J., Petrarulo, M., Nelissen, H., Malenica, N., Luschnig, C., Tietz, O., Ditengou, F., Palme, K., Azmi, A., Prinsen, E. & Van Lijsebettens, M. (2006). The *TORNADO1* and *TORNADO2* genes function in several patterning processes during early leaf development in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 18(4), 852-866.

Coen, E.S. & Meyerowitz, E.M. (1991). The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature*, 353(6339), 31-37.

Das, P., Ito, T., Wellmer, F., Vernoux, T., Dedieu, A., Traas, J. & Meyerowitz, E.M. (2009). Floral stem cell termination involves the direct regulation of *AGAMOUS* by *PERIANTHIA*. *Development*, 136(10), 1605-1611.

Daum, G., Medzihradzsky, A., Suzuki, T. & Lohmann, J.U. (2014). A mechanistic framework for noncell autonomous stem cell induction in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(40), 14619-14624.

De Martino, G., Pan, I., Emmanuel, E., Levy, A. & Irish, V.F. (2006). Functional analyses of two tomato *APETALA3* genes demonstrate diversification in their roles in regulating floral development. *The Plant Cell*, 18(8), 1833-1845.

Denay, G., Chahtane, H., Tichtinsky, G. & Parcy, F. (2017). A flower is born: an update on *Arabidopsis* floral meristem formation. *Current Opinion in Plant Biology*, 35, 15-22.

Deng, M.H., Zhao, K., Lv, J.H., Huo, J.L., Zhang, Z.Q., Zhu, H.S., Zou, X.X. & Wen, J.F. (2020) Flower transcriptome dynamics during nectary development in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Genetics and Molecular Biology*, 43(2), e20180267.

DePristo, M.A., Banks, E., Poplin, R., Garimella, K.V., Maguire, J.R., Hartl, C., Philippakis, A.A., del Angel, G., Rivas, M.A., Hanna, M., McKenna, A., Fennell, T.J., Kernysky, A.M., Sivachenko, A.Y., Cibulskis, K., Gabriel, S.B., Altshuler, D. & Daly, M.J. (2011). A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nature Genetics*, 43(5), 491-498.

DeYoung, B.J., Bickle, K.L., Schrage, K.J., Muskett, P., Patel, K. & Clark, S.E. (2006). The CLAVATA1-related BAM1, BAM2 and BAM3 receptor kinase-like proteins are required for meristem function in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 45(1), 1-16.

Dielen, V., Marc, D. & Kinet, J.M. (1998). Flowering in the *uniflora* mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.): description of the reproductive structure and manipulation of flowering time. *Plant Growth Regulation*, 25, 149-157.

Dielen, V., Quinet, M., Chao, J., Batoko, H., Havelange, A. & Kinet, J.M. (2004). *UNIFLORA*, a pivotal gene that regulates floral transition and meristem identity in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *New Phytologist*, 161(2), 393-400.

Diss, G., Ascencio, D., DeLuna, A. & Landry, C.R. (2014). Molecular mechanisms of paralogous compensation and the robustness of cellular networks. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 322(7), 488-499.

Ditta, G., Pinyopich, A., Robles, P., Pelaz, S. & Yanofsky, M. F. (2004). The *SEP4* gene of *Arabidopsis thaliana* functions in floral organ and meristem identity. *Current Biology*, 14(21), 1935-1940.

Drews, G.N., Bowman, J.L. & Meyerowitz, E.M. (1991). Negative regulation of the Arabidopsis homeotic gene *AGAMOUS* by the *APETALA2* product. *Cell*, 65(6), 991-1002.

Du, H., Ran, J.H., Feng, Y.Y. & Wang, X.Q. (2020). The flattened and needlelike leaves of the pine family (Pinaceae) share a conserved genetic network for adaxial-abaxial polarity but have diverged for photosynthetic adaptation. *BMC Evolutionary Biology*, 20(1), 131.

Ellul, P., Garcia-Sogo, B., Pineda, B., Ríos, G., Roig, L.A. & Moreno, V. (2003). The ploidy level of transgenic plants in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato cotyledons (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is genotype and procedure dependent. *Theoretical and Applied Genetics*, 106(2), 231-238.

Emmanuel, E. & Levy, A. (2002) Tomato mutants as tools for functional genomics. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(2), 112-117.

Evans, M.M. & Barton, M.K. (1997). Genetics of angiosperm shoot apical meristem development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48, 673-701.

Evkaikina, A.I., Berke, L., Romanova, M.A., Proux-Wéra, E., Ivanova, A.N., Rydin, C., Pawlowski, K. & Voitsekhovskaja, O.V. (2017). The *Huperzia selago* shoot tip transcriptome sheds new light on the evolution of leaves. *Genome Biology and Evolution*, 9(9), 2444–2460.

Ezura, K., Ji-Seong, K., Mori, K., Suzuki, Y., Kuhara, S., Ariizumi, T. & Ezura, H. (2017). Genome-wide identification of pistil-specific genes expressed during fruit set initiation in tomato (*Solanum lycopersicum*). *PLoS One*, 12(7), e0180003.

Fernández-Lozano, A. (2019). Aislamiento y caracterización funcional de *EXCESSIVE NUMBER OF FLORAL ORGANS (ENO)*, un nuevo regulador de la actividad del meristemo floral y el tamaño del fruto de tomate.[Tesis Doctoral, Universidad de Almería]. Repositorio Universidad de Almería.

Fernández-Lozano, A., Yuste-Lisbona, F.J., Pérez-Martín, F., Pineda, B., Moreno, V., Lozano, R. & Angosto, T. (2015). Mutation at the 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*, 232, 41-48.

Ferrándiz, C., Gu, Q., Martienssen, R. & Yanofsky, M.F. (2000). Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by *FRUITFULL*, *APETALA1* and *CAULIFLOWER*. *Development*, 127(4), 725-734.

Ferreira e Silva, G.F., Silva, E.M., Azevedo, M. da S., Guivin, M.A.C., Ramiro, D.A., Figueiredo, C.R., Carrer, H., Peres, L.E. & Nogueira, F.T. (2014). MicroRNA156-targeted SPL/SBP box transcription factors regulate tomato ovary and fruit development. *The Plant Journal*, 78(4), 604-618.

Fiers, M., Ku, K.L. & Liu, C.M. (2007). CLE peptide ligands and their roles in establishing meristems. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(1), 39-43.

Fletcher, J.C. & Meyerowitz, E.M. (2000). Cell signaling within the shoot meristem. *Current Opinion in Plant Biology*, 3(1), 23-30.

Foolad, M.R. Genome mapping and molecular breeding of tomato. (2007). *International Journal of Plant Genomics*, 2007, 64358.

Fornara, F., de Montaigu, A. & Coupland, G. (2010). SnapShot: control of flowering in *Arabidopsis*. *Cell*, 141(3), 550.

Fourquin, C., Primo, A., Martínez-Fernández, I., Huet-Trujillo, E. & Ferrándiz, C. (2014). The *CRC* orthologue from *Pisum sativum* shows conserved functions in carpel morphogenesis and vascular development. *Annals of Botany*, 114(7), 1535-1544.

Fourquin, C., Vinauger-Douard, M., Chambrier, P., Berne-Dedieu, A. & Scutt, C.P. (2007). Functional conservation between *CRABS CLAW* orthologues from widely diverged angiosperms. *Annals of Botany*, 100(3), 651-657.

Fourquin, C., Vinauger-Douard, M., Fogliani, B., Dumas, C. & Scutt, C.P. (2005). Evidence that *CRABS CLAW* and *TOUSLED* have conserved their roles in carpel development since the ancestor of the extant angiosperms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(49), 4649-4654.

Freeling, M. & Hake, S. (1985). Developmental genetics of mutants that specify knotted leaves in maize. *Genetics*, 111(3), 617-634.

Gallois, J.L., Woodward, C., Reddy, G.V. & Sablowski, R. (2002). Combined SHOOT MERISTEMLESS and WUSCHEL trigger ectopic organogenesis in *Arabidopsis*. *Development*, 129(13), 3207-3217.

Gälweiler, L., Guan, C., Müller, A., Wisman, E., Mendgen, K., Yephremov, A. & Palme, K. (1998). Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science*, 282(5397), 2226-2230.

García-Alcázar, M., Giménez, E., Pineda, B., Capel, C., García-Sogo, B., Sánchez, S., Yuste-Lisbona, F.J., Angosto, T., Capel, J., Moreno, V. & Lozano, R. (2017). Albino T-DNA tomato mutant reveals a key function of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (DXS1) in plant development and survival. *Science Reports*, 7, 45333

Geuten, K. & Irish, V. (2010). Hidden variability of floral homeotic B genes in Solanaceae provides a molecular basis for the evolution of novel functions. *The Plant Cell*, 22(8), 2562-2578.

Giménez, E., Castañeda, L., Pineda, B., Pan, I.L., Moreno, V., Angosto, T. & Lozano, R. (2016). *TOMATO AGAMOUS1* and *ARLEQUIN/TOMATO AGAMOUS-LIKE1* MADS-box genes have redundant and divergent functions required for tomato reproductive development. *Plant Molecular Biology*, 91(4-5), 513-531.

Giménez, E., Dominguez, E., Pineda, B., Heredia, A., Moreno, V., Lozano, R. & Angosto, T. (2015). Transcriptional activity of the MADS Box *ARLEQUIN/TOMATO AGAMOUS-LIKE1* gene is required for cuticle development of tomato fruit. *Plant Physiology*, 168(3), 1036-1048.

Giménez, E., Pineda, B., Capel, J., Antón, M.T., Atarés, A., Pérez-Martín, F., García-Sogo, B., Angosto, T., Moreno, V. & Lozano, R. (2010). Functional analysis of the *Arlequin* mutant corroborates the essential role of the *ARLEQUIN/TAGL1* gene during reproductive development of tomato. *PLoS One*, 5(12), e14427.

Gleave, A. P. (1992). A versatile binary vector system with a T-DNA organisational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome. *Plant Molecular Biology*, 20(6), 1203-1207.

Gong, P., Song, C., Liu, H., Li, P., Zhang, M., Zhang, J., Zhang, S. & He, C. (2021). *PFCRC* mediates neofunctionalization of physalis *GLOBOSA* genes in carpel development. *Journal of Experimental Botany*, 28, erab309

Gómez-Mena, C., de Folter, S., Costa, M.M., Angenent, G.C. & Sablowski, R. (2005). Transcriptional program controlled by the floral homeotic gene *AGAMOUS* during early organogenesis. *Development*, 132(3), 429-438.

Gremski, K., Ditta, G. & Yanofsky, M.F. (2007). The *HECATE* genes regulate female reproductive tract development in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 134(20), 3593-3601.

Gruel, J., Landrein, B., Tarr, P., Schuster, C., Refahi, Y., Sampathkumar, A., Hamant, O., Meyerowitz, E.M. & Jönsson, H. (2016). An epidermis-driven mechanism positions and scales stem cell niches in plants. *Science Advances*, 2(1), e1500989.

Guo, Y., Han, L., Hymes, M., Denver, R. & Clark, S.E. (2010). *CLAVATA2* forms a distinct CLE-binding receptor complex regulating Arabidopsis stem cell specification. *The Plant Journal*, 63(6), 889-900.

Han, Y., Zhang, C., Yang, H. & Jiao, Y. (2014). Cytokinin pathway mediates *APETALA1* function in the establishment of determinate floral meristems in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(18), 6840-6845.

Hao, Y., Wang, X., Li, X., Bassa, C., Mila, I., Audran, C., Maza, E., Li, Z., Bouzayen, M., van Der Rest, B. & Zouine, M. (2014). Genome-wide identification, phylogenetic analysis, expression profiling, and protein-protein interaction properties of *TOPLESS* gene family members in tomato. *Journal of Experimental Botany*, 65(4), 1013-1023.

Harrison, S.J., Mott, E.K., Parsley, K., Aspinall, S., Gray, J.C. & Cottage, A. (2006). A rapid and robust method of identifying *transformed Arabidopsis thaliana* seedlings following floral dip transformation. *Plant Methods*, 2, 19.

Heijmans, K., Ament, K., Rijpkema, A.S., Zethof, J., Wolters-Arts, M., Gerats, T. & Vandenbussche, M. (2012). Redefining C and D in the *Petunia ABC*. *The Plant Cell*, 24(6), 2305-2317.

Heisler, M.G., Ohno, C., Das, P., Sieber, P., Reddy, G. V., Long, J.A. & Meyerowitz, E.M. (2005). Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the *Arabidopsis* inflorescence meristem. *Current Biology*, 15(21), 1899-1911.

Hennig, L. & Derkacheva, M. (2009). Diversity of Polycomb group complexes in plants: Same rules, different players? *Trends in Genetics*, 25(9), 414-423.

Hileman, L.C., Sundstrom, J.F., Litt, A., Chen, M., Shumba, T. & Irish, V.F. (2006). Molecular and phylogenetic analyses of the MADS-box gene family in tomato. *Molecular Biology and Evolution*, 23(11), 2245-58.

Hirano, H.Y. (2008). Genetic regulation of meristem maintenance and organ specification in rice flower development. En: H. Y. Hirano, A. Hirai, Y. Sano & T. Sasaki (eds), *Rice Biology in the Genomics Era*. Springer, Heidelberg. ISBN: 978-3-540-74250-0.

Ho, L.C. & J.D. Hewitt (1986). Fruit development. En: J.G. Atherton & J. Rudich (eds), *The Tomato Crop: A Scientific Basis for Improvement*, (201-239). Chapman & Hall, London.

Hong, R.L., Hamaguchi, L., Busch, M.A. & Weigel, D. (2003). Regulatory elements of the floral homeotic gene *AGAMOUS* identified by phylogenetic footprinting and shadowing. *The Plant Cell*, 15(6), 1296-1309.

Hu, W., dePamphilis, C.W. & Ma, H. (2008). Phylogenetic analysis of the plant-specific *Zinc Finger-Homeobox* and *Mini Zinc Finger* gene families. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(8), 1031-1045.

Huang, T. & Irish, V.F. (2015). Temporal control of plant organ growth by TCP transcription factors. *Current Biology*, 25(13), 1765-1770.

Huang, T., López-Giráldez, F., Townsend, J.P. & Irish, V.F. (2012). RBE controls microRNA164 expression to effect floral organogenesis. *Development*, 139(12), 2161-2169.

Huang, Z., Van Houten, J., Gonzalez, G., Xiao, H. & Van Der Knaap, E. (2013). Genome-wide identification, phylogeny and expression analysis of *SUN*, *OFP* and *YABBY* gene family in tomato. *Molecular Genetics and Genomics*, 288(3-4), 111-129.

Imamura, A., Hanaki, N., Nakamura, A., Suzuki, T., Taniguchi, M., Kiba, T., Ueguchi, C., Sugiyama, T. & Mizuno, T. (1999). Compilation and characterization of *Arabidopsis thaliana* response regulators implicated in His-Asp phosphorelay signal transduction. *Plant & Cell Physiology*, 40(7), 733-742.

Ishikawa, M., Ohmori, Y., Tanaka, W., Hirabayashi, C., Murai, K., Ogihara, Y., Yamaguchi, T. & Hiro-Yuki, H. (2009). The spatial expression patterns of *DROOPING LEAF* orthologs suggest a conserved function in grasses. *Genes & Genetic Systems*, 84(2), 137-146.

Janssen, B.J., Lund, L. & Sinha, N. (1998). Overexpression of a homeobox gene, *LeT6*, reveals indeterminate features in the tomato compound leaf. *Plant Physiology*, 117(3), 771-786.

Jatoi, A., Burch, P., Hillman, D., Vanyo, J.M., Dakhil, S., Nikcevich, D., Rowland, K., Morton, R., Flynn, P.J., Young, C. & Tan, W; North Central Cancer Treatment Group. (2007). A tomato-based, lycopene-containing intervention for androgen-independent prostate cancer: results of a phase ii study from the north central cancer treatment group. *Urology*, 69(2), 289-294.

Jeong, S., Trotochaud, A.E. & Clark, S.E. (1999). The Arabidopsis *CLAVATA2* gene encodes a receptor-like protein required for the stability of the *CLAVATA1* receptor-like kinase. *The Plant Cell*, 11(10), 1925-1934.

Ji, L., Liu, X., Yan, J., Wang, W., Yumul, R.E., Kim, Y.J., Dinh, T.T., Liu, J., Cui, X., Zheng, B., Agarwal, M., Liu, C., Cao, X., Tang, G. & Chen, X. (2011). *ARGONAUTE10* and *ARGONAUTE1* regulate the termination of floral stem cells through two microRNAs in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics*, 7(3), e1001358.

Jürgens, G. (1985). A group of genes controlling the spatial expression of the bithorax complex in *Drosophila*. *Nature*, 316, 153-155.

Karlova, R., Rosin, F.M., Busscher-Lange, J., Parapunova, V., Do, P.T., Fernie, A.R., Fraser, P.D., Baxter, C., Angenent, G.C. & de Maagd, R.A. (2011). Transcriptome and metabolite profiling show that *APETALA2a* is a major regulator of tomato fruit ripening. *The Plant Cell*, 23(3), 923-941.

Kempin, S.A., Savisge, B. & Yanofsky, M.F. (1995). Molecular basis of the cauliflower phenotype in *Arabidopsis*. *Science*, 267(5197), 522-525.

Kende, H. & Zeevaart, J. (1997). The Five "Classical" Plant Hormones. *The Plant Cell*, 9(7), 1197-1210.

Kenton, A., Parokony, A.S., Gleba, Y.Y. & Bennett, M.D. (1993). Characterization of the *Nicotiana tabacum* L. genome by molecular cytogenetics. *Molecular & General Genetics*, 240(2), 159–169.

Khan, M.R., Ai, X.Y. & Zhang, J.Z. (2014). Genetic regulation of flowering time in annual and perennial plants. *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*, 5(3), 347-359.

Kinoshita, A., Betsuyaku, S., Osakabe, Y., Mizuno, S., Nagawa, S., Stahl, Y., Simon, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Fukuda, H. & Sawa, S. (2010). RPK2 is an essential receptor-like kinase that transmits the CLV3 signal in *Arabidopsis*. *Development*, 137(22), 3911-3920.

Kim, D., Pertea, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R. & Salzberg, S.L. (2013). TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biology*, 14(3), R36.

Koenig, D., Jiménez-Gómez, J.M., Kimura, S., Fulop, D., Chitwood, D.H., Headland, L.R., Kumar, R., Covington, M.F., Devisetty, U.K., Tat, A.V., Tohge, T., Bolger, A., Schneeberger, K., Ossowski, S., Lanz, C., Xiong, G., Taylor-Teeples, M., Brady, S.M., Pauly, M., Weigel, D., ... Maloof, J.N. (2013). Comparative transcriptomics reveals patterns of selection in domesticated and wild tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(28), E2655-E2662.

Köhler, C. & Villar, C.B. (2008). Programming of gene expression by Polycomb group proteins. *Trends in Cell Biology*, 18(5), 236-243.

Kramer, E.M., Dorit, R.L. & Irish, V.F. (1998). Molecular evolution of genes controlling petal and stamen development: duplication and divergence within the *APETALA3* and *PISTILLATA* MADS-box gene lineages. *Genetics*, 149(2), 765-783.

Křeček, P., Skůpa, P., Libus, J., Naramoto, S., Tejos, R., Friml, J. & Zažímalová, E. (2009). The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. *Genome Biology*, 10(12), 249.

Krizek, B. (2009). *AINTEGUMENTA* and *AINTEGUMENTA-LIKE6* act redundantly to regulate Arabidopsis floral growth and patterning. *Plant Physiology*, 150(4), 1916-1929.

Krizek, B.A. & Fletcher, J.C. (2005). Molecular mechanisms of flower development: an armchair guide. *Nature Reviews. Genetics*, 6(9), 688-698.

Krizek, B.A., Lewis, M.W. & Fletcher, J.C. (2006). *RABBIT EARS* is a second-whorl repressor of *AGAMOUS* that maintains spatial boundaries in Arabidopsis flowers. *The Plant Journal*, 45(3), 369-383.

Krogan, N.T., Hogan, K. & Long, J.A. (2012). *APETALA2* negatively regulates multiple floral organ identity genes in Arabidopsis by recruiting the co-repressor *TOPLESS* and the histone deacetylase *HDA19*. *Development*, 139(22), 4180-4190.

Kumaran, M.K., Bowman, J.L. & Sundaresan, V. (2002). *YABBY* polarity genes mediate the repression of *KNOX* homeobox genes in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 14(11), 2761-2770.

Kurakawa, T., Ueda, N., Maekawa, M., Kobayashi, K., Kojima, M., Nagato, Y., Sakakibara, H. & Kozuka, J. (2007). Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature*, 445(7128), 652-655.

Kuroha, T., Tokunaga, H., Kojima, M., Ueda, N., Ishida, T., Nagawa, S., Fukuda, H., Sugimoto, K. & Sakakibara, H. (2009). Functional analyses of *LONELY GUY* cytokinin-activating enzymes reveal the importance of the direct activation pathway in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 21(10), 3152-3169.

Kwon, C.S., Chen, C. & Wagner, D. (2005). *WUSCHEL* is a primary target for transcriptional regulation by *SPLAYED* in dynamic control of stem cell fate in Arabidopsis. *Genes & Development*, 19(8), 992-1003.

Landrein, B., Formosa-Jordan, P., Malivert, A., Schuster, C., Melnyk, C.W., Yang, W., Turnbull, C., Meyerowitz, E.M., Locke, J.C.W. & Jönsson, H. (2018). Nitrate modulates stem cell dynamics in *Arabidopsis* shoot meristems through cytokinins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(6), 1382-1387.

Langmead, B. & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 9(4), 357-359.

Larsson, E., Roberts, C.J., Claes, A.R., Franks, R.G. & Sundberg, E. (2014). Polar auxin transport is essential for medial versus lateral tissue specification and vascular-mediated valve outgrowth in *Arabidopsis* gynoecia. *Plant Physiology*, 166(4), 1998-2012.

Lau, O.S. & Deng, X.W. (2010). Plant hormone signaling lightens up: integrators of light and hormones. *Current Opinion in Plant Biology*, 13(5), 571-577.

Laux, T., Mayer, K.F., Berger, J. & Jürgens, G. (1996). The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development*, 122(1), 87-96.

Lawrence, M., Huber, W., Pagès, H., Aboyoun, P., Carlson, M., Gentleman, R., Morgan, M.T. & Carey, V.J. (2013). Software for Computing and Annotating Genomic Ranges. *PLoS Computational Biology*, 9(8), e1003118.

Lee, J., Oh, M., Park, H. & Lee, I. (2008). SOC1 translocated to the nucleus by interaction with AGL24 directly regulates *LEAFY*. *The Plant Journal*, 55(5), 832-843.

Lee, J.Y., Baum, S.F., Alvarez, J., Patel, A., Chitwood, D.H. & Bowman, J.L. (2005a). Activation of *CRABS CLAW* in the nectaries and carpels of *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 17(1), 25-36.

Lee, J.Y., Baum, S.F., Oh, S.-H., Jiang, C.-Z., Chen, J.-C. & Bowman, J.L. (2005b). Recruitment of *CRABS CLAW* to promote nectary development within the eudicot clade. *Development*, 132(22), 5021-5032.

Lee, Z.H., Hirakawa, T., Yamaguchi, N. & Ito, T. (2019a). The roles of plant hormones and their interactions with regulatory genes in determining meristem activity. *International Journal of Molecular Science*, 20(16), 4065.

Lee, Z.H., Tatsumi, Y., Ichihashi, Y., Suzuki, T., Shibata, A., Shirasu, K., Yamaguchi, N. & Ito, T. (2019b). CRABS CLAW and SUPERMAN coordinate hormone-, stress-, and metabolic-related gene expression during *Arabidopsis* stamen development. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 7, 437.

Leibfried, A., To, J.P., Busch, W., Stehling, S., Kehle, A., Demar, M., Kieber, J.J. & Lohmann, J.U. (2005). WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. *Nature*, 438(7071), 1172-1175.

Lenhard, M., Jürgens, G. & Laux, T. (2002). The *WUSCHEL* and *SHOOTMERISTEMLESS* genes fulfil complementary roles in *Arabidopsis* shoot meristem regulation. *Development*, 129(13), 3195-3206.

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*, 105(6), 805-814.

Lewis, E.B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature*, 276(5688), 565-570.

Li, F.W., Nishiyama, T., Waller, M., Frangedakis, E., Keller, J., Li, Z., Fernandez-Pozo, N., Barker, M.S., Bennett, T., Blázquez, M.A., Cheng, S., Cuming, A.C., de Vries, J., de Vries, S., Delaux, P.M., Diop, I.S., Harrison, C.J., Hauser, D., Hernández-García, J., Kirbis, A., ... Szövényi, P. (2020). *Anthoceros* genomes illuminate the origin of land plants and the unique biology of hornworts. *Nature Plants*, 6(3), 259-272.

Li, G., Liu, S., Wang, J., He, J., Huang, H., Zhang, Y. & Xu, L. (2014). ISWI proteins participate in the genome-wide nucleosome distribution in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 78(4), 706-714.

Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G. & Durbin, R; 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16), 2078-2079.

Li, Z., Jiang, Y., Liu, D., Ma, J., Li, J., Li, M. & Sui, S. (2018). Floral Scent Emission from Nectaries in the Adaxial Side of the Innermost and Middle Petals in *Chimonanthus praecox*. *International Journal of Molecular Science*, 19(10), 3278.

Lifschitz, E. & Eshed, Y. (2006). Universal florigenic signals triggered by *FT* homologues regulate growth and flowering cycles in perennial day-neutral tomato. *Journal of Experimental Botany*, 57(13), 3405-3414.

Lifschitz, E., Eviatar, T., Rozman, A., Shalit, A., Goldshmidt, A., Amsellem, Z., Alvarez, J.P. & Eshed, Y. (2006). The tomato *FT* ortholog triggers systemic signals that regulate growth and flowering and substitute for diverse environmental stimuli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(16), 6398-6403.

Liljegren, S.J., Ditta, G.S., Eshed, Y., Savidge, B., Bowman, J.L., Yanofsky, M.F. (2000). *SHATTERPROOF* MADS-box genes control seed dispersal in *Arabidopsis*. *Nature*, 404(6779), 66-70.

Liljegren, S.J., Gustafson-Brown, C., Pinyopich, A., Ditta, G.S. & Yanofsky, M.F. (1999). Interactions among *APETALA1*, *LEAFY*, and *TERMINAL FLOWER1* specify meristem fate. *The Plant Cell*, 11(6), 1007-1018.

Lin, T., Zhu, G., Zhang, J., Xu, X., Yu, Q., Zheng, Z., Zhang, Z., Lun, Y., Li, S., Wang, X., Huang, Z., Li, J., Zhang, C., Wang, T., Zhang, Y., Wang, A., Zhang, Y., Lin, K., Li, C., Xiong, G., ... Huang, S. (2014). Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding. *Nature Genetics*, 46(11), 1220-1226.

Lippman, Z.B., Cohen, O., Alvarez, J.P., Abu-Abied, M., Pekker, I., Paran, I., Eshed, Y. & Zamir, D. (2008). The making of a compound inflorescence in tomato and related nightshades. *PLoS Biology*, 6(11), 2424-2435.

Litt, A. & Kramer, E.M. (2010). The ABC model and the diversification of floral organ identity. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 21(1), 129-137.

Liu, C., Chen, H., Er, H.L., Soo, H.M., Kumar, P.P., Han, J.H., Liou, Y.C. & Yu, H. (2008). Direct interaction of *AGL24* and *SOC1* integrates flowering signals in *Arabidopsis*. *Development*, 135(8), 1481-1491.

Liu, X., Dinh, T.T., Li, D., Shi, B., Li, Y., Cao, X., Guo, L., Pan, Y., Jiao, Y. & Chen, X. (2014). *AUXIN RESPONSE FACTOR 3* integrates the functions of *AGAMOUS* and *APETALA2* in floral meristem determinacy. *The Plant Journal*, 80(4), 629-641.

Liu, X., Kim, Y.J., Müller, R., Yumul, R.E., Liu, C., Pan, Y., Cao, X., Goodrich, J. & Chen, X. (2011). *AGAMOUS* terminates floral stem cell maintenance in arabidopsis by directly repressing *WUSCHEL* through recruitment of polycomb group proteins. *The Plant Cell*, 23(10), 3654-3670.

Lohmann, J.U., Hong, R.L., Hobe, M., Busch, M.A., Parcy, F., Simon, R. & Weigel, D. (2001). A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in *Arabidopsis*. *Cell*, 105(6), 793-803.

Long, J.A., Moan, E.I., Medford, J.I. & Barton, M.K. (1996). A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene of *Arabidopsis*. *Nature*, 379(6566), 66-69.

Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 550.

Lozano, R., Angosto, T., Gómez, P., Payan, C., Capel, J., Huijser, P., Salinas, J. & Martínez-Zapater, J.M. (1998). Tomato flower abnormalities induced by low temperatures are associated with changes of expression of MADS-Box genes. *Plant Physiology*, 117(1), 91-100.

Lozano, R., Giménez, E., Cara, B., Capel, J. & Angosto, T. (2009). Genetic analysis of reproductive development in tomato. *The International Journal of Developmental Biology*, 53(8-10), 1635-1648.

Luo, H., Meng, D., Liu, H., Xie, M., Yin, C., Liu, F., Dong, Z. & Jin, W. (2020) Ectopic Expression of the Transcriptional Regulator *silky3* Causes Pleiotropic Meristem and Sex Determination Defects in Maize Inflorescences. *The Plant Cell*, 32(12),3750-3773.

Ma, H., Yanofsky, M.F. & Meyerowitz, E.M. (1991). *AGL1-AGL6*, an *Arabidopsis* gene family with similarity to floral homeotic and transcription factor genes. *Genes & Development*, 5(3),484-495.

Mähönen, A.P., Bishopp, A., Higuchi, M., Nieminen, K.M., Kinoshita, K., Törmäkangas, K., Ikeda, Y., Oka, A., Kakimoto, T. & Helariutta, Y. (2006). Cytokinin signaling and its inhibitor *ahp6* regulate cell fate during vascular development. *Science*, 311(5757), 94-98.

Maier, A.T., Stehling-Sun, S., Wollmann, H., Demar, M., Hong, R.L., Haubeiss, S., Weigel, D. & Lohmann, J.U. (2009). Dual roles of the bZIP transcription factor PERIANTHIA in the control of floral architecture and homeotic gene expression. *Development*, 136(10), 1613-1620.

Malcomber, S.T. & Kellogg, E.A. (2005). *SEPALLATA* gene diversification: brave new whorls, *Trends in Plant Science*, 10(9), 427-435.

Mandel, M.A. & Yanofsky, M.F. (1995). A gene triggering flower formation in *Arabidopsis*. *Nature*, 377(6549), 522-524.

Marsch-Martínez, N. & de Folter, S. (2016). Hormonal control of the development of the gynoecium. *Current Opinion in Plant Biology*, 29, 104-114.

Martí, E., Gisbert, C., Bishop, G.J., Dixon, M.S. & García-Martínez, J.L. (2006). Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom. *Journal of Experimental Botany*, 57(9), 2037-2047.

Mason, M.G., Mathews, D.E., Argyros, D.A., Maxwell, B.B., Kieber, J.J., Alonso, J.M., Ecker, J.R. & Schaller, G.E. (2005). Multiple type-B response regulators mediate cytokinin signal transduction in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 17(11), 3007-3018.

Mathews, H., Clendennen, S.K., Caldwell, C.G., Liu, X.L., Connors, K., Matheis, N., Schuster, D.K., Menasco, D.J., Wagoner, W., Lightner, J. & Wagner, D.R. (2003). Activation tagging in tomato identifies a transcriptional regulator of anthocyanin biosynthesis, modification, and transport. *The Plant Cell*, 15(8), 1689-1703.

Matsukura, C., Aoki, K., Fukuda, N., Mizoguchi, T., Asamizu, E., Saito, T., Shibata, D. & Ezura, H. (2007). Comprehensive resources for tomato functional genomics based on the miniature model tomato Micro-Tom. *Current Genomics*, 9(7), 436-443.

Mayer, K.F., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jürgens, G. & Laux, T. (1998). Role of *WUSCHEL* in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* Shoot meristem. *Cell*, 95(6), 805-815.

Maza, E., Frasse, P., Senin, P., Bouzayen, M. & Zouine, M. (2013). Comparison of normalization methods for differential gene expression analysis in RNA-Seq experiments: a matter of relative size of studied transcriptomes. *Communicative & Integrative Biology*, 6(6), e25849.

Menda, N., Semel, Y., Peled, D., Eshed, Y. & Zamir, D. (2004). *In silico* screening of a saturated mutation library of tomato. *The Plant Journal*, 38(5), 861-872.

Meng, W.J., Cheng, Z.J., Sang, Y.L., Zhang, M.M., Rong, X.F., Wang, Z.W., Tang, Y.Y. & Zhang, X.S. (2017). Type-B ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORS specify the shoot stem cell niche by dual regulation of *WUSCHEL*. *The Plant Cell*, 29(6), 1357-1372.

Michaelson, M.J., Price, H.J., Ellison, J.R., & Johnston, J.S. (1991). Comparison of plant DNA contents determined by feulgen microspectrophotometry and laser flow cytometry. *American Journal of Botany*, 78(2), 183-188.

Miller, J.C. & Tanksley, S.D. (1990). RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. *Theoretical and Applied Genetics*, 80(4), 437-448.

Mitchum, M.G., Wang, X. & Davis, E.L. (2008). Diverse and conserved roles of CLE peptides. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(1), 75-81.

Miwa, H., Betsuyaku, S., Iwamoto, K., Kinoshita, A., Fukuda, H. & Sawa, S. (2008). The receptor-like kinase SOL2 mediates CLE signaling in *Arabidopsis*. *Plant & Cell Physiology*, 49(11), 1752-1757.

Molinero-Rosales, N., Jamilena, M., Zurita, S., Gómez, P., Capel, J. & Lozano, R. (1999). *FALSIFLORA*, the tomato orthologue of *FLORICAULA* and *LEAFY*, controls flowering time and floral meristem identity. *The Plant Journal*, 20(6), 685-693.

Molinero-Rosales, N., Latorre, A., Jamilena, M. & Lozano, R. (2004). *SINGLE FLOWER TRUSS* regulates the transition and maintenance of flowering in tomato. *Planta*, 218(3), 427-434.

Morel, P., Heijmans, K., Ament, K., Choppy, M., Trehin, C., Chambrier, P., Rodrigues Bento, S., Bimbo, A. & Vandenbussche, M. (2018). The floral C-lineage genes trigger nectary development in petunia and Arabidopsis. *The Plant Cell*, 30(9), 2020-2037.

Müller, B. & Sheen, J. (2007). Advances in cytokinin signaling. *Science*, 318(5847), 68-69.

Müller, J. & Verrijzer, P. (2009). Biochemical mechanisms of gene regulation by polycomb group protein complexes. *Current Opinion in Genetics & Development*, 19(2), 150-158.

Müller, N.A., Wijnen, C.L., Srinivasan, A., Ryngajllo, M., Ofner, I., Lin, T., Ranjan, A., West, D., Maloof, J.N., Sinha, N.R., Huang, S., Zamir, D. & Jiménez-Gómez, J.M. (2016). Domestication selected for deceleration of the circadian clock in cultivated tomato. *Nature Genetics*, 48(1), 89-93.

Müller, R., Bleckmann, A. & Simon, R. (2008). The receptor kinase CORYNE of *Arabidopsis* transmits the stem cell-limiting signal CLAVATA3 independently of CLAVATA1. *The Plant Cell*, 20(4), 934-946.

Muños, S., Ranc, N., Botton, E., Bérard, A., Rolland, S., Duffé, P., Carretero, Y., Le Paslier, M.C., Delalande, C., Bouzayen, M., Brunel, D. & Causse, M. (2011). Increase in tomato locule number is controlled by two single-nucleotide polymorphisms located near *WUSCHEL*. *Plant Physiology*, 156(4), 2244-2254.

Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.

Nagasawa, N., Miyoshi, M., Kitano, H., Satoh, H. & Nagato, Y. (1996) Mutations associated with floral organ number in rice. *Planta*, 198(4), 627-633.

Nagasawa, N., Miyoshi, M., Sano, Y., Satoh, H., Hirano, H., Sakai, H. & Nagato, Y. (2003). *SUPERWOMAN1* and *DROOPING LEAF* genes control floral organ identity in rice. *Development* 130(4), 705–718.

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*, 104(1), 34-41.

Nakayama, H., Yamaguchi, T. & Tsukaya, H. (2010). Expression patterns of *AaDL*, a *CRABS CLAW* ortholog in *Asparagus asparagoides* (Asparagaceae), demonstrate a stepwise evolution of *CRC/DL* subfamily of *YABBY* genes. *American Journal of Botany*, 97(4), 591-600.

Nemhauser, J.L., Feldman, L.J. & Zambryski, P.C. (2000). Auxin and *ETTIN* in *Arabidopsis* gynoecium morphogenesis. *Development*, 127(18), 3877-3888.

Nibau, C., Di Stilio, V.S., Wu, H.M. & Cheung, A.Y. (2011). *Arabidopsis* and Tobacco *SUPERMAN* regulate hormone signalling and mediate cell proliferation and differentiation. *Journal of Experimental Botany*, 62(3), 949-961.

Nilsson, O., Lee, I., Blázquez, M.A. & Weigel, D. (1998). Flowering-Time genes modulate the response to *LEAFY* activity. *Genetics*, 150(1), 403-410.

Nimchuk, Z.L., Zhou, Y., Tarr, P.T., Peterson, B.A. & Meyerowitz, E.M. (2015). Plant stem cell maintenance by transcriptional cross-regulation of related receptor kinases. *Development*, 142(6), 1043-1049.

Nuez, F. (1995). El cultivo del tomate. Mundi-Prensa, Madrid. ISBN 9788471145499.

Ó'Maoiléidigh, D.S., Wuest, S.E., Rae, L., Raganelli, A., Ryan, P.T., Kwaśniewska, K., Das, P., Lohan, A.J., Loftus, B., Graciet, E. & Wellmer, F. (2013). Control of Reproductive floral organ identity specification in *Arabidopsis* by the C function regulator *AGAMOUS*. *The Plant Cell*, 25(7), 2482-2503.

Ohad, N., Yadegari, R., Margossian, L., Hannon, M., Michaeli, D., Harada, J.J., Goldberg, R.B. & Fischer, R.L. (1999). Mutations in *FIE*, a WD Polycomb group gene, allow endosperm development without fertilization. *The Plant Cell*, 11(3), 407-415.

Ohmori, Y., Tanaka, W., Kojima, M., Sakakibara, H. & Hirano, H.-Y. (2013). *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN4* is involved in meristem maintenance and is negatively regulated by the CLE gene *FCP1* in rice. *The Plant Cell*, 25(1), 229-241.

Oka, M., Miyamoto, K., Okada, K. & Ueda, J. (1999). Auxin polar transport and flower formation in *Arabidopsis thaliana* Transformed with indoleacetamide hydrolase (*iaaH*) gene. *Plant & Cell Physiology*, 40(2), 231-237.

Okamura, J.K., Szeto, W., Lotys-Prass, C. & Jofuku, K.D. (1997). Photo and hormonal control of meristem identity in the Arabidopsis flower mutants *apetala2* and *apetala1*. *The Plant Cell*, 9(1), 37-47.

Oliveros, J.C., Franch, M., Tabas-Madrid, D., San-León, D., Montoliu, L., Cubas, P. & Pazos, F. (2016). Breaking-Cas—interactive design of guide RNAs for CRISPR-Cas experiments for ENSEMBL genomes. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W267-W271.

Olmstead, R.G., Sweere, J.A., Spangler, R.E., Bohs, L. & Palmer, J.D. (1999). Phylogeny and provisional classification of the Solanaceae based on chloroplast DNA. En: M. Nee, D.E. Symon, R.N. Lester & J.P. Jessop (eds), *Solanaceae IV: advances in biology and utilization*, (111-137). Royal Botanic Gardens, Kew.

Orashakova, S., Lange, M., Lange, S., Wege, S. & Becker, A. (2009). The *CRABS CLAW* ortholog from California poppy (*Eschscholzia californica*, Papaveraceae), *EcCRC*, is involved in floral meristem termination, gynoecium differentiation and ovule initiation. *The Plant Journal*, 58(4), 682-693.

Ori, N., Eshed, Y., Chuck, G., Bowman, J.L. & Hake, S. (2000). Mechanisms that control *knox* gene expression in the *Arabidopsis* shoot. *Development*, 127(24), 5523-5532.

Pan, I.L., McQuinn, R., Giovannoni, J.J. & Irish, V.F. (2010). Functional diversification of *AGAMOUS* lineage genes in regulating tomato flower and fruit development. *Journal of Experimental Botany*, 61(6), 1795-1806.

Parcy, F., Nilsson, O., Busch, M.A., Lee, I. & Weigel, D. (1998). A genetic framework for floral patterning. *Nature*, 395(6702), 561-566.

Park, S.J., Jiang, K., Schatz, M.C. & Lippman, Z.B. (2012). Rate of meristem maturation determines inflorescence architecture in tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(2), 639-644.

Pautler, M., Tanaka, W., Hirano, H.Y. & Jackson, D. (2013). Grass meristems I: shoot apical meristem maintenance, axillary meristem determinacy and the floral transition. *Plant & Cell Physiology*, 54(3), 302-312.

Payne, T., Johnson, S.D. & Koltunow, A.M. (2004). *KNUCKLES (KNU)* encodes a C2H2 zinc-finger protein that regulates development of basal pattern elements of the *Arabidopsis* gynoecium. *Development*, 131(15), 3737-3749.

Pelaz, S., Ditta, G.S., Baumann, E., Wisman, E. & Yanofsky, M.F. (2000). B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA* MADS-box genes. *Nature*, 405 (6783), 200-203.

Perales, M. & Reddy, G.V. (2012). Stem cell maintenance in shoot apical meristems. *Current Opinion in Plant Biology*, 15(1), 10-16.

Perales, M., Rodriguez, K., Snipes, S., Yadav, R.K., Diaz-Mendoza, M. & Reddy, G.V. (2016). Threshold-dependent transcriptional discrimination underlies stem cell homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(41), E6298-E6306.

Peralta, I.E. & Spooner, D.M. (2001). Granule-bound starch synthase (GBSSI) gene phylogeny of wild tomatoes (*Solanum* L. section *Lycopersicon* [Mill.] Wettst. subsection *Lycopersicon*). *American Journal of Botany*, 88(10), 1888-1902.

Pérez-Martín, F., Yuste-Lisbona, F.J., Pineda, B., Angarita-Díaz, M.P., García-Sogo, B., Antón, T., Sánchez, S., Giménez, E., Atarés, A., Fernández-Lozano, A., Ortiz-Atienza, A., García-Alcázar, M., Castañeda, L., Fonseca, R., Capel, C., Goergen, G., Sánchez, J., Quispe, J.L., Capel, J., Angosto, T., ... Lozano, R. (2017). A collection of enhancer trap insertional mutants for functional genomics in tomato. *Plant Biotechnology Journal*, 15(11), 1439-1452.

Pérez-Martín, F., Yuste-Lisbona, F.J., Pineda, B., García-Sogo, B., Olmo, I.D., de Dios Alché, J., Egea, I., Flores, F.B., Piñeiro, M., Jarillo, J.A., Angosto, T., Capel, J., Moreno, V. & Lozano, R. (2018). Developmental role of the tomato Mediator complex subunit MED18 in pollen ontogeny. *The Plant Journal*, 96(2), 300-315.

Périlleux, C., Lobet, G. & Tocquin, P. (2014). Inflorescence development in tomato: gene functions within a zigzag model. *Frontiers in Plant Science*, 5, 121.

Pfeiffer, A., Janocha, D., Dong, Y., Medzihradzsky, A., Schöne, S., Daum, G., Suzaki, T., Forner, J., Langenecker, T., Rempel, E., Schmid, M., Wirtz, M., Hell, R. & Lohmann, J.U. (2016). Integration of light and metabolic signals for stem cell activation at the shoot apical meristem. *Elife*, 5, e17023.

Phukela, B., Geeta, R., Das, S. & Tandon, R. (2020). Ancestral segmental duplication in Solanaceae is responsible for the origin of *CRCa-CRCb* paralogues in the family. *Molecular Genetics and Genomics*, 295(3), 563-577.

Picken, A.J.F. (1984). A review of pollination and fruit-set in the tomato (*Lycopersicon-esculentum* Mill). *Journal of Horticultural Science*, 59 (1), 1-13.

Pien, S. & Grossniklaus, U. (2007). Polycomb group and trithorax group proteins in *Arabidopsis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1769(5-6), 375-382.

Pinyopich, A., Ditta, G.S., Savidge, B., Liljegren, S.J., Baumann, E., Wisman, E. & Yanofsky, M.F. (2003). Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel and ovule development. *Nature*, 424(6944), 85-88.

Pnueli, L., Abu-Abied, M., Zamir, D., Nacken, W., Schwarz-Sommer, Z. & Lifschitz, E. (1991). The MADS box gene family in tomato: temporal expression during floral development, conserved secondary structures and homology with homeotic genes from *Antirrhinum* and *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 1(2), 255-266.

Pnueli, L., Hareven, D., Broday, L., Hurwitz, C. & Lifschitz, E. (1994a). The *TM5* MADS box gene mediates organ differentiation in the three inner whorls of tomato flowers. *The Plant Cell*, 6(2), 175-186.

Pnueli, L., Hareven, D., Rounsley, S.D., Yanofsky, M.F. & Lifschitz, E. (1994b). Isolation of the tomato *AGAMOUS* gene *TAG1* and analysis of its homeotic role in transgenic plants. *The Plant Cell*, 6(2), 163-173.

Poethig, R.S. (1990). Phase change and the regulation of shoot morphogenesis in plants. *Science*, 250(4983), 923-930.

Prigge, M.J., Otsuga, D., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Drews, G.N. & Clark, S.E. (2005). Class III homeodomain-leucine zipper gene family members have overlapping, antagonistic, and distinct roles in *Arabidopsis* development. *The Plant Cell*, 17(1), 61-76.

Prunet, N., Morel, P., Thierry, A.M., Eshed, Y., Bowman, J.L., Negrutiu, I. & Trehin, C. (2008). *REBELOTE*, *SQUINT*, and *ULTRAPETALA1* function redundantly in the temporal regulation of floral meristem termination in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 20(4), 901-919.

Quinet, M., Bataillel, G., Dobrev, P.I., Capel, C., Gómez, P., Capel, J., Lutts, S., Motyka, V., Angosto, T. & Lozano, R. (2014). Transcriptional and hormonal regulation of petal and stamen development by *STAMENLESS*, the tomato (*Solanum lycopersicum* L.) orthologue to the B-class *APETALA3* gene. *Journal of Experimental Botany*, 65(9), 2243-2256.

Quinet, M., Dubois, C., Goffin, M.C., Chao, J., Dielen, V., Batoko, H., Boutry, M. & Kinet, J.M. (2006). Characterization of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) mutants affected in their flowering time and in the morphogenesis of their reproductive structure. *Journal of Experimental Botany*, 57(6), 1381-1390.

R Development Core Team. (2020). R: a language and environment for statistical computing: reference index. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>

Ranc, N., Muños, S., Santoni, S. & Causse, M. (2008). A clarified position for *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* in the evolutionary history of tomatoes (Solanaceae). *BMC Plant Biology*, 8, 130.

Rao, A.V. (2002). Lycopene, tomatoes, and the prevention of coronary heart disease. *Experimental Biology and Medicine (MayWood, N.J.)*, 227(10), 908-913.

Rao, A.V. & Agarwal, S. (2000). Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease. *Journal of American College of Nutrition*, 19(5), 563-569.

Reinhardt, D., Frenz, M., Mandel, T. & Kuhlemeier, C. (2003). Microsurgical and laser ablation analysis of interactions between the zones and layers of the tomato shoot apical meristem. *Development*, 130(17), 4073-4083.

Rick, C.M. (1978). Potential genetic resources in tomato species: clues from observations in native habitats. En A.M. Srb (ed), *Genes, enzymes, and populations*, (2, 255-269). Basic Life Sciences, Springer, Boston, M.A. ISBN 9781468428827.

Rick, C.M. (1979) Biosystematic studies in *Lycopersicon* and closely related species of *Solanum*. En: J.C. Hawkes, R. N. Lester & A.D. Skelding (eds), *The biology of the Solanaceae*. (1-27). Academic Press, New York.

Rick, C.M. & Butler, L. (1956). Cytogenetics of the Tomato. *Advances in Genetics*, 8, 267-382.

Rodríguez-Leal, D., Lemmon, Z. H., Man, J., Bartlett, M. E. & Lippman, Z. B. (2017). Engineering quantitative trait variation for crop improvement by genome editing. *Cell*, 171(2), 470-480.e8.

Rodríguez-Leal, D., Xu, C., Kwon, C.T., Soyars, C., Demesa-Arevalo, E., Man, J., Liu, L., Lemmon, Z.H., Jones, D.S., Van Eck, J., Jackson, D.P., Bartlett, M.E., Nimchuk, Z.L. & Lippman, Z.B. (2019). Evolution of buffering in a genetic circuit controlling plant stem cell proliferation. *Nature Genetics*, 51(5), 786-792.

Rojas-Gracia, P., Roque, E., Medina, M., Rochina, M., Hamza, R., Angarita-Díaz, M.P., Moreno, V., Pérez-Martín, F., Lozano, R., Cañas, L., Beltrán, J.P. & Gómez-Mena, C. (2017). The parthenocarpic *hydra* mutant reveals a new function for a *SPOROCTELESS*-like gene in the control of fruit set in tomato. *New Phytology*. 214(3), 1198-1212.

Romanova, M.A., Maksimova, A.I., Pawlowski, K. & Voitsekhovskaja, O.V. (2021). *YABBY* genes in the development and evolution of land plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), 4139.

Running, M.P. & Meyerowitz, E.M. (1996). Mutations in the *PERIANTHIA* gene of *Arabidopsis* specifically alter floral organ number and initiation pattern. *Development*, 122(4), 1261-1269.

Sablowski, R. (2007). Flowering and determinacy in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 58(5), 899-907.

Sakai, H., Medrano, L.J. & Meyerowitz, E.M. (1995). Roles of *SUPERMAN* in maintaining *Arabidopsis* floral organ boundaries. *Nature*, 378(6553), 199-203.

Sakakibara, H. (2005). Cytokinin biosynthesis and regulation. *Vitamins and Hormones*, 72, 271-287.

Sakakibara, H. (2006). Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 431-449.

Salinas, M., Xing, S., Höhmann, S., Berndtgen, R. & Huijser, P. (2012). Genomic organization, phylogenetic comparison and differential expression of the SBP-box family of transcription factors in tomato. *Planta*, 235(6), 1171-1184.

Satina, S., Blakeslee, A.F. & Avery, A.G. (1940). Demonstration of the three germ layers in the shoot apex of datura by means of induced polyploidy in periclinal chimeras. *American Journal of Botany*, 27(10), 895-905.

Sato, S. & Tabata T. (2016) Tomato Genome Sequence. En: H. Ezura, T. Ariizumi, J. Garcia-Mas & J. Rose (eds), *Functional Genomics and Biotechnology in Solanaceae and Cucurbitaceae Crops. Biotechnology in Agriculture and Forestry*, (7). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. ISBN 9783662485330.

Sawarkar, R. & Paro, R. (2010). Interpretation of developmental signaling at chromatin: the polycomb perspective. *Developmental Cell*, 19, 651-661.

Schatlowski, N., Creasey, K., Goodrich, J. & Schubert, D. (2008). Keeping plants in shape: Polycomb-group genes and histone methylation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 19(6), 547-553.

Schmitz, G., Tillmann, E., Carriero, F., Fiore, C., Cellini, F. & Theres, K. (2002). The tomato *Blind* gene encodes a MYB transcription factor that controls the formation of lateral meristems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(2), 1064-1069.

Schoof, H., Lenhard, M., Haecker, A., Mayer, K.F.X., Jürgens, G. & Laux, T. (2000). The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes. *Cell*, 100(6), 635-644.

Schultz, E.A. & Haughn, G.W. (1991). *LEAFY*, a homeotic gene that regulates inflorescence development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 3(8), 771-781.

Schwab, R., Palatnik, J.F., Riester, M., Schommer, C., Schmid, M. & Weigel, D. (2005). Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. *Developmental Cell*, 8(4), 517-527.

Schwarz-Sommer, Z., Huijser, P., Nacken, W., Saedler, H. & Sommer, H. (1990). Genetic control of flower development by homeotic genes in *Antirrhinum majus*. *Science*, 250(4983), 931-936.

Semiarti, E., Ueno, Y., Tsukaya, H., Iwakawa, H., Machida, C. & Machida, Y. (2001). The *ASYMMETRIC LEAVES2* gene of *Arabidopsis thaliana* regulates lamina formation of a symmetric lamina, establishment of venation and repression of meristem-related homeobox genes in leaves. *Development*, 128(10), 1771-1783.

Shang, E., Ito, T. & Sun, B. (2019). Control of floral stem cell activity in *Arabidopsis*. *Plant Signaling & Behavior*, 14(11), 1659706.

Sicard, A., Hernould, M. & Chevalier, C. (2008). The INHIBITOR OF MERISTEM ACTIVITY (IMA) protein: the nexus between cell division, differentiation and hormonal control of development. *Plant Signaling & Behavior*, 3(10), 908-910.

Sieber, P., Wellmer, F., Gheyselinck, J., Riechmann, J.L. & Meyerowitz, E.M. (2007). Redundancy and specialization among plant microRNAs: role of the *MIR164* family in developmental robustness. *Development*, 134(6), 1051-1060.

Sieburth, L.E., Running, M.P. & Meyerowitz, E.M. (1995). Genetic separation of third and fourth whorl functions of *AGAMOUS*. *The Plant Cell*, 7(8), 1249-1258.

Siegfried, K.R., Eshed, Y., Baum, S.F., Otsuga, D., Drews, G.N. & Bowman, J.L. (1999). Members of the *YABBY* gene family specify abaxial cell fate in *Arabidopsis*. *Development*, 126(18), 4117-4128.

Sikora, P., Chawade, A., Larsson, M., Olsson, J. & Olsson, O. (2011). Mutagenesis as a tool in plant genetics, functional genomics, and breeding. *International Journal of Plant Genomics*, 2011, 314829.

Simonini, S., Deb, J., Moubayidin, L., Stephenson, P., Valluru, M., Freire-Rios, A., Sorefan, K., Weijers, D., Friml, J. & Østergaard, L. (2016). A noncanonical auxin-sensing mechanism is required for organ morphogenesis in *Arabidopsis*. *Genes & Development*, 30(20), 2286-2296.

Smaczniak, C., Immink, R.G., Muiño, J.M., Blanvillain, R., Busscher, M., Busscher-Lange, J., Dinh, Q.D., Liu, S., Westphal, A.H., Boeren, S., Parcy, F., Xu, L., Carles, C.C., Angenent, G.C. & Kaufmann, K. (2012). Characterization of MADS-domain transcription factor complexes in *Arabidopsis* flower development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(5), 1560-1565.

Smyth, D.R., Bowman, J.L. & Meyerowitz, E.M. (1990). Early Flower Development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2(8), 755-767.

Somssich, M., Je, B.I., Simon, R. & Jackson, D. (2016). CLAVATA-WUSCHEL signaling in the shoot meristem. *Development*, 143(18), 3238-3248.

Srikanth, A. & Schmid, M. (2011). Regulation of flowering time: all roads lead to Rome. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(12), 2013-2037.

Strable, J. & Vollbrecht, E. (2019). Maize YABBY genes *drooping leaf1* and *drooping leaf2* regulate floret development and floral meristem determinacy. *Development*, 146(6), dev171181.

Strable, J., Wallace, J.G., Unger-Wallace, E., Briggs, S., Bradbury, P.J., Buckler, E.S. & Vollbrecht, E. (2017). Maize YABBY genes *drooping leaf1* and *drooping leaf2* regulate plant architecture. *The Plant Cell*, 29(7), 1622-1641.

Sun, B. & Ito, T. (2015). Regulation of floral stem cell termination in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 6, 17.

Sun, B., Looi, L.S., Guo, S., He, Z., Gan, E.S., Huang, J., Xu, Y., Wee, W.Y. & Ito, T. (2014). Timing mechanism dependent on cell division is invoked by Polycomb eviction in plant stem cells. *Science*, 343(6170), 1248559.

Sun, B., Xu, Y., Ng, K.H. & Ito, T. (2009). A timing mechanism for stem cell maintenance and differentiation in the *Arabidopsis* floral meristem. *Genes & Development*, 23(15), 1791-1804.

Sun, B., Zhou, Y., Cai, J., Shang, E., Yamaguchi, N., Xiao, J., Looi, L.-S., Wee, W.-Y., Gao, X., Wagner, D. & Ito, T. (2019). Integration of transcriptional repression and polycomb-mediated silencing of *WUSCHEL* in floral meristems. *The Plant Cell*, 31(7), 1488-1505.

Sun, W., Huang, W., Li, Z., Lv, H., Huang, H. & Wang, Y. (2013). Characterization of a Crabs Claw Gene in Basal Eudicot Species *Epimedium sagittatum* (Berberidaceae). *International Journal of Molecular Science*, 14(1), 1119-1131.

Suzaki, T., Yoshida, A. & Hirano, H.Y. (2008). Functional diversification of CLAVATA3-related CLE proteins in meristem maintenance in rice. *The Plant Cell*, 20(8), 2049-2058.

Suzaki, T., Ohneda, M., Toriba, T., Yoshida, A. & Hirano, H.Y. (2009). *FON2 SPARE1* redundantly regulates floral meristem maintenance with *FLORAL ORGAN NUMBER2* in rice. *PLoS Genetics*, 5(10), e1000693.

Suzaki, T., Sato, M., Ashikari, M., Miyoshi, M., Nagato, Y. & Hirano, H.-Y. (2004). The gene *FLORAL ORGAN NUMBER1* regulates floral meristem size in rice and encodes a leucine-rich repeat receptor kinase orthologous to *Arabidopsis* CLAVATA1. *Development*, 131(22), 5649-5657.

Suzaki, T., Toriba, T., Fujimoto, M., Tsutsumi, N., Kitano, H. & Hirano, H.Y. (2006). Conservation and diversification of meristem maintenance mechanism in *Oryza sativa*: function of the *FLORAL ORGAN NUMBER2* gene. *Plant & Cell Physiology*, 47(12), 1591-1602.

Szymkowiak, E.J. & Irish, E.E. (2006). *JOINTLESS* suppresses sympodial identity in inflorescence meristems of tomato. *Planta*, 223(4), 646-658.

Takeda, S., Matsumoto, N. & Okada, K. (2004). *RABBIT EARS*, encoding a SUPERMAN-like zinc finger protein, regulates petal development in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 131(2), 425-434.

Takei, K., Sakakibara, H. & Sugiyama, T. (2001). Identification of Genes Encoding Adenylate Isopentenyltransferase, a Cytokinin Biosynthesis Enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(28), 26405-26410.

Tanksley, S.D. (2004). The genetic, developmental, and molecular bases of fruit size and shape variation in tomato. *The Plant Cell*, 16, S181-S189.

Tantikanjana, T. & Nasrallah, J.B. (2012). Non-cell-autonomous regulation of crucifer self-incompatibility by Auxin Response Factor ARF3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(47), 19468-19473.

The Tomato Genome Consortium. (2012). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, 485(7400), 635-41.

Theissen, G. & Saedler, H. (2001). Plant biology. Floral quartets. *Nature*, 409(6819), 469-471.

Theissen, G., Melzer, R. & Ruümppler, F. (2016). MADS-domain transcription factors and the floral quartet model of flower development: linking plant development and evolution. *Development*, 143(18), 3259-3271.

Thomson B. & Wellmer, F. (2019). Molecular regulation of flower development. *Current Topics in Developmental Biology*, 131, 185- 210.

Thouet, J., Quinet, M., Lutts, S., Kinet, J.M. & Périlleux, C. (2012). Repression of floral meristem fate is crucial in shaping tomato inflorescence. *PLoS One*, 7(2), e31096.

Tian, T., Liu, Y., Yan, H., You, Q., Yi, X., Du, Z., Xu, W. & Su, Z. (2017). AgriGO v2.0: a GO analysis toolkit for the agricultural community. *Nucleic Acids Research*, 45(W1), W122-W129.

Tiwari, S.B., Hahen, G. & Guilfoyle, T. (2003). The roles Of Auxin Response Factor domains in auxin-responsive transcription. *The Plant Cell*, 15(2), 533-543.

To, J.P., Haberer, G., Ferreira, F.J., Deruère, J., Mason, M.G., Schaller, G.E., Alonso, J.M., Ecker, J.R. & Kieber, J.J. (2004). Type-A Arabidopsis response regulators are partially redundant negative regulators of cytokinin signaling. *The Plant Cell*, 16(3), 658-671.

Turck, F., Roudier, F., Farrona, S., Martin-Magniette, M.L., Guillaume, E., Buisine, N., Gagnot, S., Martienssen, R.A., Coupland, G. & Colot, V. (2007). Arabidopsis TFL2/LHP1 specifically associates with genes marked by trimethylation of histone H3 lysine 27. *PLoS Genetics*, 3(6), 855-866.

Van der Knaap, E., Chakrabarti, M., Chu, Y.H., Clevenger, J.P., Illa-Berenguer, E., Huang, Z., Keyhaninejad, N., Mu, Q., Sun, L., Wang, Y. & Wu, S. (2014). What lies beyond the eye: the molecular mechanisms regulating tomato fruit weight and shape. *Frontiers in Plant Science*, 5, 227.

Van Harten, A.M. (1998). Mutation breeding: theory and practical applications. Cambridge University Press, Cambridge, UK. ISBN: 978052147074.

Vázquez-Vilar, M., Bernabé-Orts, J.M., Fernández-Del-Carmen, A., Ziarsoolo, P., Blanca, J., Granell, A. & Orzaez, D. (2016). A modular toolbox for gRNA-Cas9 genome engineering in plants based on the GoldenBraid standard. *Plant Methods*, 12, 10.

Verkerk K. (1971). Chimerism of the tomato plant after seed irradiation with fast neutrons. *Netherlands Journal of Agricultural Science*, 19, 197-203.

Villanueva, J.M., Broadhvest, J., Hauser, B.A., Meister, R.J., Schneitz, K. & Gasser, C.S. (1999). *INNER NO OUTER* regulates abaxial-adaxial patterning in *Arabidopsis* ovules. *Genes & Development*, 13(23), 3160–3169.

Vollbrecht, E., Veit, B., Sinha, N. & Hake, S. (1991). The developmental gene *Knotted-1* is a member of a maize homeobox gene family. *Nature*, 350(6315), 241-243.

Vrebalov, J., Pan, I.L., Arroyo, A.J., McQuinn, R., Chung, M., Poole, M., Rose, J., Seymour, G., Grandillo, S., Giovannoni, J. & Irish, V.F. (2009). Fleshy fruit expansion and ripening are regulated by the tomato *SHATTERPROOF* gene *TAGL1*. *The Plant Cell*, 21(10), 3041-3062.

Vrebalov, J., Ruezinsky, D., Padmanabhan, V., White, R., Medrano, D., Drake, R., Schuch, W. & Giovannoni, J. (2002). A MADS-Box gene necessary for fruit ripening at the *Tomato Ripening-Inhibitor (Rin) Locus*. *Science*, 296(5566), 343-346.

Vroemen, C.W., Mordhorst, A.P., Albrecht, C., Kwaaitaal, M.A. & de Vries, S. (2003). The *CUP-SHAPED COTYLEDON3* gene is required for boundary and shoot meristem formation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 15(7), 1563-1577.

Wagner, D., Sablowski, R.W. & Meyerowitz, E.M. (1999). Transcriptional activation of APETALA1 by LEAFY. *Science*, 285(542), 582-584.

Wang, A., Tang, J., Li, D., Chen, C., Zhao, X. & Zhu, L. (2009). Isolation and functional analysis of *LiYAB1*, a *YABBY* family gene, from lily (*Lilium longiflorum*). *Journal of Plant Physiology*, 166(9), 988-995.

Wang, F., Muto, A., Van de Velde, J., Neyt, P., Himanen, K., Vandepoele, K. & Van Lijsebettens, M. (2015). Functional analysis of the Arabidopsis *TETRASPANIN* gene family in plant growth and development. *Plant Physiology*, 169(3), 2200-2214.

Wang, J., Tian, C., Zhang, C., Shi, B., Cao, X., Zhang, T.Q., Zhao, Z., Wang, J.W. & Jiao, Y. (2017). Cytokinin signaling activates *WUSCHEL* expression during axillary meristem initiation. *The Plant Cell*, 29(6), 1373-1387.

Wang, Y., Tang, X., Cheng, Z., Mueller, L., Giovannoni, J. & Tanksley, S.D. (2006). Euchromatin and pericentromeric heterochromatin: comparative composition in the tomato genome. *Genetics*, 172(4), 2529-2540.

Watanabe, S., Mizoguchi, T., Aoki, K., Kubo, Y., Mori, H., Imanishi, S., Yamazaki, Y., Shibata, D. & Ezura, H. (2007). Ethylmethanesulfonate (EMS) mutagenesis of *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom for large-scale mutant screens. *Plant Biotechnology*, 24, 33-38.

Weigel, D. & Meyerowitz, E.M. (1994). The ABCs of floral homeotic genes. *Cell*, 78(2), 203-209.

Weigel, D., Alvarez, J., Smyth, D.R., Yanofsky, M.F. & Meyerowitz, E.M. (1992). *LEAFY* controls floral meristem identity in Arabidopsis. *Cell*, 69(5), 843-859.

Wellmer, F., Graciet, E. & Riechmann, J.L. (2014). Specification of floral organs in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 65(1), 1-9.

Werner, T., Köllmer, I., Bartrina, I., Holst, K. & Schmölling, T. (2006). New insights into the biology of cytokinin degradation. *Plant Biology*, 8(3), 371-381.

Wesley, S.V., Helliwell, C.A., Smith, N.A., Wang, M.B., Rouse, D.T., Liu, Q., Gooding, P.S., Singh, S.P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P.A., Robinson, S.P., Gleave, A.P., Green, A.G. & Waterhouse, P.M. (2001). Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants: construct design for gene silencing. *The Plant Journal*, 27(6), 581-590.

Wigge, P.A., Kim, M.C., Jaeger, K.E., Busch, W., Schmid, M., Lohmann, J.U. & Weigel, D. (2005). Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science*, 309(5737), 1056-1059.

Williams, C.E. & Clair, D.A. (1993). Phenetic relationships and levels of variability detected by restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA analysis of cultivated and wild accessions of *Lycopersicon esculentum*. *Genome*, 36(3), 619-630.

Winer, J., Jung, C. K., Shackel, I. & Williams, P. M. (1999). Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Analytical Biochemistry*, 270(1), 41-49.

Worden, A.Z., Lee, J.H., Mock, T., Rouzé, P., Simmons, M.P., Aerts, A.L., Allen, A.E., Cuvelier, M.L., Derelle, E., Everett, M.V., Foulon, E., Grimwood, J., Gundlach, H., Henrissat, B., Napoli, C., McDonald, S.M., Parker, M.S., Rombauts, S., Salamov, A., Von Dassow, P., ... Grigoriev, I.V. (2009). Green evolution and dynamic adaptations revealed by genomes of the marine picoeukaryotes *Micromonas*. *Science*, 324(5924), 268-272.

Wu, M.F., Sang, Y., Bezhani, S., Yamaguchi, N., Han, S.K., Li, Z., Su, Y., Slewinski, T.L. & Wagner, D. (2012). SWI2/SNF2 chromatin remodeling ATPases overcome polycomb repression and control floral organ identity with the LEAFY and SEPALLATA3 transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(9), 3576-3581.

Wu, M.F., Yamaguchi, N., Xiao, J., Bargmann, B., Estelle, M., Sang, Y. & Wagner, D. (2015). Auxin-regulated chromatin switch directs acquisition of flower primordium founder fate. *Elife*, 4, e09269.

Xie, M., Chen, H., Huang, L., O'Neil, R.C., Shokhirev, M.N. & Ecker, J.R. (2018). A B-ARR-mediated cytokinin transcriptional network directs hormone cross-regulation and shoot development. *Nature Communications*, 9(1), 1604.

Wuest, S.E., O'Maoileidigh, D.S., Rae, L., Kwasniewska, K., Raganelli, A., Hanczaryk, K., Lohan, A.J., Loftus, B., Graciet, E. & Wellmer, F. (2012). Molecular basis for the specification of floral organs by APETALA3 and PISTILLATA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(33), 13452-13457.

Xu, C., Liberatore, K.L., MacAlister, C.A., Huang, Z., Chu, Y.H., Jiang, K., Brooks, C., Ogawa-Ohnishi, M., Xiong, G., Pauly, M., Van Eck, J., Matsubayashi, Y., van der Knaap, E. & Lippman, Z.B. (2015). A cascade of arabinosyltransferases controls shoot meristem size in tomato. *Nature Genetics*, 47(7), 784-792.

Xu, Y., Prunet, N., Gan, E.S., Wang, Y., Stewart, D., Wellmer, F., Huang, J., Yamaguchi, N., Tatsumi, Y., Kojima, M., Kiba, T., Sakakibara, H., Jack, T.P., Meyerowitz, E.M. & Ito, T. (2018). SUPERMAN regulates floral whorl boundaries through control of auxin biosynthesis. *The EMBO Journal*, 37(11), e97499.

Yadav, R.K., Perales, M., Gruel, J., Girke, T., Jönsson, H. & Reddy, G.V. (2011). WUSCHEL protein movement mediates stem cell homeostasis in the *Arabidopsis* shoot apex. *Genes & Development*, 25(19), 2025-2030.

Yadav, R.K., Perales, M., Gruel, J., Ohno, C., Heisler, M., Girke, T., Jönsson, H. & Reddy, G.V. (2013). Plant stem cell maintenance involves direct transcriptional repression of differentiation program. *Molecular Systems Biology*, 9, 654.

Yamada, T., Yokota, S., Hirayama, Y., Imaichi, R., Kato, M. & Gasser, C.S. (2011). Ancestral expression patterns and evolutionary diversification of YABBY genes in angiosperms. *The Plant Journal*, 67(1), 26-36.

Yamaguchi, A., Kobayashi, Y., Goto, K., Abe, M. & Araki, T. (2005). TWIN SISTER OF FT (TSF) acts as a floral pathway integrator redundantly with FT. *Plant & Cell Physiology*, 46(8), 1175-1189.

Yamaguchi, A., Wu, M.-F., Yang, L., Wu, G., Poethig, R.S. & Wagner, D. (2009). The microRNA regulated SBP-box transcription factor SPL3 is a direct upstream activator of *LEAFY*, *FRUITFULL*, and *APETALA1*. *Developmental Cell*, 17(2), 268-278.

Yamaguchi, N., Huang, J., Tatsumi, Y., Abe, M., Sugano, S.S., Kojima, M., Takebayashi, Y., Kiba, T., Yokoyama, R., Nishitani, K., Sakakibara, H. & Ito, T. (2018). Chromatin-mediated feed-forward auxin biosynthesis in floral meristem determinacy. *Nature Communications*, 9(1), 5290.

Yamaguchi, N., Huang, J., Xu, Y., Tanoi, K. & Ito, T. (2017). Fine-tuning of auxin homeostasis governs the transition from floral stem cell maintenance to gynoecium formation. *Nature Communications*, 8(1), 1125.

Yamaguchi, N., Jeong, C.W., Nole-Wilson, S., Krizek, B.A. & Wagner, D. (2016). *AINTEGUMENTA* and *AINTEGUMENTA-LIKE6/PLETHORA3* induce *LEAFY* expression in response to auxin to promote the onset of flower formation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 170(1), 283-293.

Yamaguchi, N., Winter, C.M., Wu, M.-F., Kanno, Y., Yamaguchi, A., Seo, M. & Wagner, D. (2014). Gibberellin acts positively then negatively to control onset of flower formation in *Arabidopsis*. *Science*, 344(6184), 638-641.

Yamaguchi, N., Wu, M.F., Winter, C.M., Berns, M.C., Nole-Wilson, S., Yamaguchi, A., Coupland, G., Krizek, B.A. & Wagner, D. (2013). A molecular framework for auxin-mediated initiation of flower primordia. *Developmental Cell*, 24(3), 271-282.

Yamaguchi, T. & Hirano, H.Y. (2006). Function and diversification of MADS-box genes in rice. *TheScientificWorldJournal*, 6, 1923–1938.

Yamaguchi, T., Nagasawa, N., Kawasaki, S., Matsuoka, M., Nagato, Y. & Hirano, H.-Y. (2004). The *YABBY* gene *DROOPING LEAF* regulates carpel specification and midrib development in *Oryza sativa*. *The Plant Cell*, 16(2), 500-509.

Yanai, O., Shani, E., Dolezal, K., Tarkowski, P., Sablowski, R., Sandberg, G., Samach, A. & Ori, N. (2005) *Arabidopsis* KNOX1 proteins activate cytokinin biosynthesis. *Current Biology*, 15(17), 566-71.

Yang, M., You, W., Wu, S., Fan, Z., Xu, B., Zhu, M., Li, X. & Xiao, Y. (2017). Global transcriptome analysis of *Huperzia serrata* and identification of critical genes involved in the biosynthesis of huperzine A. *BMC Genomics*, *18*(1), 245.

Yanofsky, M.F., Ma, H., Bowman, J.L., Drews, G.N., Feldmann, K.A. & Meyerowitz, E.M. (1990). The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. *Nature*, *346*(6279), 35-39.

Yant, L., Mathieu, J., Dinh, T.T., Ott, F., Lanz, C., Wollmann, H., Chen, X. & Schmid, M. (2010). Orchestration of the floral transition and floral development in *Arabidopsis* by the Bifunctional transcription factor APETALA2. *The Plant Cell*, *22*(7), 2156-2170.

Yen, K., Vinayachandran, V., Batta, K., Koerber, R.T. & Pugh, B.F. (2012). Genome-wide nucleosome specificity and directionality of chromatin remodelers. *Cell*, *149*(7), 1461-1473.

Yoshida, N., Yanai, Y., Chen, L., Kato, Y., Hiratsuka, J., Miwa, T., Sung, Z.R. & Takahashi, S. (2001). EMBRYONIC FLOWER2, a novel Polycomb Group Protein homolog, mediates shoot development and flowering in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, *13*(11), 2471.

Yuste-Lisbona, F.J., Fernández-Lozano, A., Pineda, B., Bretones, S., Ortiz-Atienza, A., García-Sogo, B., Müller, N.A., Angosto, T., Capel, J., Moreno, V., Jiménez-Gómez, J.M. & Lozano, R. (2020). *ENO* regulates tomato fruit size through the floral meristem development network. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *117*(14), 8187-8195.

Yuste-Lisbona, F.J., Jiménez-Gómez, J.M., Capel, C. & Lozano, R. (2021). Effective mapping by sequencing to isolate causal mutations in the tomato genome. *Methods in Molecular Biology*, *2264*, 89-103

Yuste-Lisbona, F.J., Quinet, M., Fernández-Lozano, A., Pineda, B., Moreno, V., Angosto, T. & Lozano, R. (2016). Characterization of *vegetative inflorescence (mc-vin)* mutant provides new insight into the role of *MACROCALYX* in regulating inflorescence development of tomato. *Scientific Reports*, *6*, 18796.

Zhang, B., Holmlund, M., Lorrain, S., Norberg, M., Bakó, L.S., Fankhauser, C. & Nilsson, O. (2017a). *BLADE-ON-PETIOLE* proteins act in an E3 ubiquitin ligase complex to regulate *PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4* abundance. *ELife*, 6, e26759.

Zhang, J., Wang, Y., Naeem, M., Zhu, M., Li, J., Yu, X., Hu, Z. & Chen, G. (2019). An AGAMOUS MADS-box protein, *SLMBP3*, regulates the speed of placenta liquefaction and controls seed formation in tomato. *Journal of Experimental Botany*, 70(3), 909-924.

Zhang, T.Q., Lian, H., Zhou, C.M., Xu, L., Jiao, Y. & Wang, J.W. (2017b). A two-step model for de novo activation of *WUSCHEL* during plant shoot regeneration. *The Plant Cell*, 29(5), 1073-1087.

Zhang, T.Q., Lian, H., Zhou, C.M., Xu, L., Jiao, Y. & Wang, J.W. (2018). *AUXIN RESPONSE FACTOR3* regulates floral meristem determinacy by repressing cytokinin biosynthesis and signaling. *The Plant Cell*, 30(2), 324-346.

Zhang, X., Clarenz, O., Cokus, S., Bernatavichute, Y. V., Pellegrini, M., Goodrich, J. & Jacobsen, S.E. (2007). Whole-genome analysis of histone H3 lysine 27 trimethylation in *Arabidopsis*. *PLoS Biology*, 5(5), 1026-1035.

Zhao, L., Lu, J., Zhang, J., Wu, P.Y., Yang, S. & Wu, K. (2015). Identification and characterization of Histone deacetylases in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Frontiers in Plant Science*, 5, 760.

Zhao, Y., Liu, C., Ge, D., Yan, M., Ren, Y., Huang, X. & Yuan, Z. (2020). Genome-wide identification and expression of *YABBY* genes family during flower development in *Punica granatum* L. *Gene*, 752, 144784.

Zhao, Z., Andersen, S.U., Ljung, K., Dolezal, K., Miotk, A., Schultheiss, S.J. & Lohmann, J.U. (2010). Hormonal control of the shoot stem-cell niche. *Nature*, 465(7301), 1089-1092.

Zheng, B. & Chen, X. (2011). Dynamics of histone H3 lysine 27 trimethylation in plant development. *Current Opinion in Plant Biology*. 14(2), 123-129.

Zouine, M., Maza, E., Djari, A., Lauvernier, M., Frasse, P., Smouni, A., Pirrello, J. & Bouzayen, M. (2017). TomExpress, a unified tomato RNA-Seq platform for visualization of expression data, clustering and correlation networks. *The Plant Journal*, 92 (4), 727-735.

Zubo, Y.O., Blakley, I.C., Yamburenko, M.V., Worthen, J.M., Street, I.H., Franco-Zorrilla, J.M., Zhangd, W., Hilla, K., Rainesd, T., Solano, R., Kieber, J.J., Loraine, A.E. & Schaller, G.E. (2017). Cytokinin induces genome-wide binding of the type-B response regulator ARR10 to regulate growth and development in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(29), E5995-E6004.

Zúñiga-Mayo, V.M., Marsch-Martínez, N. & de Folter, S. (2012). JAIBA, a class-II HD-ZIP transcription factor involved in the regulation of meristematic activity, and important for correct gynoecium and fruit development in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 71(2), 314-26.

Zürcher, E. & Müller, B. (2016). Cytokinin synthesis, signaling, and function--advances and new insights. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 324, 1-38.



Anexos

Anexos

Anexo I. Lista de genes diferencialmente expresados en botones florales *fig* respecto a los WT ($P < 0,05$).

<https://drive.google.com/file/d/11sNkaC3PrfnGT1u4nOm9N3rr8n31mAfa/view?usp=sharing>

Anexo II. Análisis funcional de enriquecimiento de los términos *Gene Ontology* (GO) en botones florales *fig* respecto al WT.

<https://drive.google.com/file/d/1gbS03Ta983yqAcbG7X8T4nET2KWzi8MA/view?usp=sharing>



Universidad de Almería

Grupo de Investigación
Universidad de Almería



Genética y Fisiología
del Desarrollo Vegetal