

**Generación de líneas T-DNA de tomate  
(*Solanum Lycopersicum* cv.P73) e  
identificación de mutantes de inserción**

**MARÍA DEL PILAR ANGARITA DÍAZ**

EDITORIAL  
UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA



**GENERACIÓN DE LÍNEAS T-DNA DE TOMATE (*SOLANUM  
LYCOPERSICUM* CV. P73) E IDENTIFICACIÓN DE MUTANTES  
DE INSERCIÓN**

**TESIS DOCTORAL**

**Presentada por:**

**MARÍA DEL PILAR ANGARITA DIAZ**

**Director:**

**DR. VICENTE MORENO FERRERO**

**DR. BENITO JOSÉ PINEDA CHAZA**

*Colección Tesis Doctorales*

© María del Pilar Angarita Díaz

© 2012, de la presente edición: Editorial Universitat Politècnica de València  
Telf.: 963 877 012 / [www.lalibreria.upv.es](http://www.lalibreria.upv.es)

ISBN: 978-84-8363-842-2 (versión impresa)

Queda prohibida la reproducción, distribución, comercialización, transformación, y en general, cualquier otra forma de explotación, por cualquier procedimiento, de todo o parte de los contenidos de esta obra sin autorización expresa y por escrito de sus autores.

**GENERACIÓN DE LÍNEAS T-DNA DE TOMATE (*SOLANUM  
LYCOPERSICUM* CV. P73) E IDENTIFICACIÓN DE MUTANTES  
DE INSERCIÓN**

Memoria presentada por MARÍA DEL PILAR ANGARITA DIAZ realizada en el laboratorio de Cultivo *in Vitro* y Mejora Vegetal del Departamento de Biotecnología de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos para optar al grado de Doctor Ingeniero Agrónomo por el Departamento de Biotecnología de la Universidad Politécnica de Valencia

Valencia, a 27 de Febrero de 2009

MARÍA DEL PILAR ANGARITA DIAZ



D. VICENTE MORENO FERRERO, Doctor en Ciencias Biológicas y Catedrático de Genética del Departamento de Biotecnología, de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de la Universidad Politécnica de Valencia y

D. BENITO JOSÉ PINEDA CHAZA, Doctor Ingeniero Agrónomo e Investigador Contratado por el Departamento de Biología Aplicada (Área de Genética) de la Universidad de Almería

**EXPONEN:**

Que la presente Tesis Doctoral ‘Generación de líneas T-DNA de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. p73) e identificación de mutantes de inserción’ realizada por M<sup>a</sup> DEL PILAR ANGARITA DIAZ para optar al grado de Doctor se ha llevado a cabo bajo su dirección en el laboratorio de Cultivo *In Vitro* y Mejora Vegetal del Departamento de Biotecnología de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de la Universidad Politécnica de Valencia, y por la presente

**AUTORIZA:**

La presentación de la memoria adjunta a los efectos académicos oportunos.

Valencia, a 27 de Febrero de 2009

DR. D. VICENTE MORENO FERRERO  
DR. D. BENITO JOSÉ PINEDA CHAZA



## RESUMEN

Los programas de genómica funcional en especies de interés agronómico o especies silvestres relacionadas no sólo conducirán a importantes avances del conocimiento, sino también a un salto cualitativo en el campo de la mejora. En particular, el empleo de herramientas genómicas ayudará a superar dos de los retos que todavía subsisten en el campo de la mejora molecular (i.e., vía transformación): la identificación de los genes que realmente controlan los caracteres de interés agronómico y la detección de señales de regulación que permitan modular la expresión de los transgenes a nivel espacial y temporal, evitando el coste energético que genera el empleo de promotores constitutivos (e.g., 35S), así como los efectos pleiotrópicos indeseables que usualmente ocasionan. Entre las vías para lograr tales objetivos, destaca la mutagénesis insercional por T-DNA, que en los últimos años se ha convertido en una herramienta básica para la identificación y etiquetado de genes, así como para el análisis de su función. En efecto, la interrupción de un gen endógeno o la integración del T-DNA en la vecindad del mismo pueden ocasionar la anulación o alteración de función, dando una valiosa información sobre el papel de un cierto gen en un carácter dado. Otra aplicación de la mutagénesis insercional por T-DNA estriba en la detección de elementos de regulación mediante el empleo de los denominados “sistemas trampa” (*trapping*) que permiten detectar secuencias reguladoras y asignar una función a partir de datos de expresión del delator que mimetiza la expresión del gen endógeno. El aspecto más relevante de estas aproximaciones es que, tras la identificación de un cierto gen, éste queda etiquetado por el T-DNA, lo que facilita su clonación.

En nuestro laboratorio estamos abordando un proyecto en colaboración con los grupos de los Dres. Rafael Lozano y Trinidad Angosto (Universidad de Almería) y de la Dra. M<sup>a</sup> Carmen Bolarín (CEBAS, CSIC, Murcia) en el que estamos utilizando dos herramientas genómicas (mutagénesis insercional y *trapping*) en tomate (cvs. P73 y MoneyMaker) y una especie silvestre relacionada (*Solanum pennellii*) para identificar secuencias codificantes o elementos de regulación de genes implicados en procesos del desarrollo vegetativo (arquitectura de la planta) y reproductivo (flor y fruto), así como en dos tipos de estrés abiótico (salinidad y estrés hídrico).

La aportación de esta Tesis Doctoral en este proyecto de investigación ha sido la generación una colección de líneas de inserción por T-DNA en tomate y la identificación de mutantes afectados en caracteres relacionados con el desarrollo. En concreto, se han generado más de 1200 líneas T-DNA y se han obtenido sus descendencias TG2. La caracterización de estas líneas en TG1 ha conducido a la detección de 255 mutantes (de tipo dominante, semidominante o aditivo) afectados en caracteres vegetativos y/o reproductivos. Asimismo, se ha caracterizado una pequeña muestra de progenies TG2 (en concreto 37) lo que ha permitido la identificación de 6 mutantes recesivos. Además, el empleo de una trampa de intensificadores para generar las líneas de T-DNA ha permitido identificar un buen número de genotipos que pueden tener un notable interés por el patrón de expresión que exhiben.

## RESUM

Els programes de genòmica funcional en espècies d'interès agronòmic o espècies silvestres relacionades no sols conduiran a importants avanços del coneixement, sinó també a un bot qualitatiu en el camp de la millora. En particular, l'ocupació de ferramentes genòmiques ajudarà a superar dos dels reptes que encara subsistixen en el camp de la millora molecular (ie, via transformació): la identificació dels gens que realment controlen els caràcters d'interès agronòmic i la detecció de senyals de regulació que permeten modular l'expressió dels transgens a nivell espacial i temporal, evitant el cost energètic que genera l'ocupació de promotors constitutius (e.g., 35S), així com els efectes pleiotròpics indesitjables que usualment ocasionen. Entre les vies per a aconseguir tals objectius, destaca la mutagènesis insercional per T-DNA, que en els últims anys s'ha convertit en una ferramenta bàsica per a la identificació i etiquetat de gens, així com per a l'anàlisi de la seua funció. En efecte, la disrupció d'un gen endogen o la integració del T-DNA en el veïnat del mateix poden ocasionar l'anul·lació o alteració de funció, donant una valuosa informació sobre el paper d'un cert gen en un caràcter donat. Una altra aplicació de la mutagènesis insercional per T-DNA consistix en la detecció d'elements de regulació per mitjà de l'ocupació dels denominats "sistemes trampa" (*trapping*) que permeten detectar seqüències reguladores i assignar una funció a partir de dades d'expressió del delator que mimetitzava l'expressió del gen endogen. L'aspecte més rellevant d'estes aproximacions és que, després de la identificació d'un cert gen, este queda etiquetat pel T-DNA, la qual cosa facilita la seua clonació.

En el nostre laboratori estem abordant un projecte en col·laboració amb els grups dels Dres. Rafael Saludable i Trinidad Angost (Universitat d'Almeria) i de la Dra. M<sup>a</sup> Carmen Bolarín (CEBAS, CSIC, Múrcia) en el que estem utilitzant dos ferramentes genòmiques (mutagènesis insercional i *trapping*) en tomaca (cvs. P73 i Moneymaker) i una espècie silvestre relacionada (*Solanum pennellii*) per a identificar seqüències codificantes o elements de regulació de gens implicats en processos del desenrotllament vegetatiu (arquitectura de la planta) i reproductiu (flor i fruit), així com en dos tipus d'estrés abiòtic (salinitat i estrés hídric).

L'aportació d'aquesta Tesi Doctoral en este projecte d'investigació ha sigut la generació una col·lecció de línies d'inserció per T-DNA en tomaca i la identificació de mutants afectats en caràcters relacionats amb el desenrotllament. En concret, s'han generat més de 1200 línies T-DNA i s'han obtingut les seues descendències TG2. La caracterització d'estes línies en TG1 ha conduït a la detecció de 255 mutants (de tipus dominant, semidominant o additiu) afectats en caràcters vegetatius i/o reproductius. Així mateix, s'ha caracteritzat una xicoteta mostra de progènies TG2 (en concret 37) el que ha permès la identificació de 6 mutants recessius. A més, l'ús d'una trampa d'intensificadors per a generar les línies de T-DNA ha permès identificar un bon nombre de genotips que poden tindre un notable interès pel patró d'expressió que exhibixen.

## SUMMARY

Functional genomic programs in agronomic species or their wild relatives will not only lead to important advances in general knowledge, but present also a qualitative leap in the field of plant breeding. In particular, the use of genomic tools will help to overcome two of the challenges that still remain in the field of molecular breeding (ie, via transformation): the identification of genes that actually control the agronomic characters and detection of signals regulation mechanisms that modulate the spatiotemporal expression of transgenes, avoiding the energy waste generated by the use of constitutive promoters (eg, 35S) and the pleiotropic effects that usually are caused. Among the possibilities to achieve these objectives, insertional mutagenesis by T-DNA highlights, because has become in recent years a basic tool for the identification and tagging of genes, and for analysing their function. Indeed, the disruption of an endogenous gene or the T-DNA insertion in its vicinity can cause the disruption or alteration of its function, providing valuable information about the role of a gene in a given character. Other application of insertional mutagenesis by T-DNA is the detection of regulatory elements using the so-called "trapping" system. It is a system of indentifying genes on the basis of the expression pattern of a reporter gene that is randomly integrated into the genome. The reporter gene is expressed in a fashion that mimics the normal expression pattern of a gene at the insertion site. The most relevant of these approaches is that the disrupted gene is tagged by the T-DNA, which facilitates its cloning.

In our laboratory we are working on a project in collaboration with the groups of Drs. Rafael Lozano and Trinidad Angosto (University of Almería) and Dr. M<sup>a</sup> Carmen Bolarín (CEBAS, CSIC, Murcia) in which we are using two genomic tools (insertional mutagenesis and trapping) in tomato (cvs. P73 and Moneymaker) and a related wild species (*Solanum pennellii*) to identify coding sequences or regulatory elements of genes involved in processes of vegetative development (plant architecture) and reproductive development (flower and fruit) as well as two types of abiotic stress (salinity and hydric stress ).

The present doctoral thesis contributes to this research project by the generation of a collection of T-DNA insertion lines in tomato and the identification of mutants affected in characters related to development. In particular 1200 T-DNA lines were generated and for most of them the descendent TG2 has been obtained. The characterization of these lines TG1 has led to the detection of 255 mutants (dominant, semidominant or additive type) affected in vegetative and/or reproductive characters. In addition, TG2 progenies (specifically 37) have been characterized which has allowed the identification of 6 recessive mutants. Moreover, the use of the enhancer trap to generate lines of T-DNA has permitted to identify genotypes with interesting expression patterns.

*A Dios*  
*A Carlos*  
*A mi madre*

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas, que de una u otra forma han hecho posible la realización de esta tesis. Desde las personas que me orientaron y enseñaron, hasta las que me apoyaron y dieron su amistad.

En primer lugar, un especial agradecimiento a mis directores, Vicente Moreno por la oportunidad que me dio al dejarme formar parte del laboratorio de Cultivos Celulares y por el privilegiado aprendizaje y formación que para mí ha supuesto trabajar en su grupo durante estos años. A Benito Pineda, por la orientación y dedicación en todo el proceso experimental y por su valiosa ayuda en esta última fase de escritura.

A mis compañeros de laboratorio y de proyecto, a Begoña por haberme dado la posibilidad de disfrutar y aprender de su experiencia en el campo de cultivo *in vitro*, a Alex por resolverme dudas y ayudarme en varios temas y a Terete, por su colaboración en las distintas fases, especialmente en el fenotipado realizado en el invernadero y por su incondicional amistad dentro y fuera del laboratorio.

A mis compañeras del IBMCP, Rosa y Yania con quienes comparto una excelente amistad fuera del mundo de la investigación.

A Peter, Geráldine y Lorena, que a pesar de ser los últimos en incorporarse en el laboratorio, me han enriquecido en muchos aspectos de mi vida y con los que he construido una buena amistad.

También quiero agradecerle a Luis Roig por su ayuda con temas relacionados con el departamento de Biotecnología.

A Jesús Romero por su gran apoyo en el invernadero y a Vicente Navarro por la colaboración en el laboratorio.

A las “niñas” que ya no están en el laboratorio pero con las que mantengo una buena amistad, mil gracias a mi gran amiga Mati, que desde el primer momento me brindó incondicionalmente su amistad y ayuda, a Lourdes que me enriqueció con diferentes conocimientos, y a Mar quien me introdujo en el mundo del cultivo *in vitro* siendo una buena maestra. También quiero recordar a Phillipe, Maica, Nohemí, Fernando, Juan Antonio, Inés, Jonathan, Bernardo, Alida, Alejandra, Nuria, Mussa, Susana, Sandra Patricia, Andrea y Miguel.

Un especial agradecimiento a María del Carmen Bolarín, Rafael Lozano, Trinidad Angosto, Juan Capell y a las personas que forman parte de sus grupos de investigación, Elenita, Estela, Fernando, Jose, Belén, Borja, Juan Francisco, por el trabajo en equipo. Gracias de nuevo a Rafael Lozano por permitirme realizar una estancia en el laboratorio de Genética Molecular de Plantas de la Universidad de Almería, donde aprendí y además conocí gente fabulosa. A Fernando con quien aprendí algunas técnicas de biología molecular, a Tamara por su amistad y apoyo, a Sandra por regalarme ese toque

de alegría, a Estela, María Salinas, Rocío, María Matilla, Carmen, María Ángeles, María del Mar, Esteban, José Antonio y Jose María quienes me hicieron sentir a gusto y como en casa.

Gracias a los “chamitos” José Alfredo y Rossi, y a Carolina, por los buenos momentos compartidos.

Muchas gracias a las personas que nos hicieron sentir como en casa en esta experiencia de vivir en España. A Julia, Eduardo, Yolanda, Luis, Sandra, Mauricio, a la familia de Teresa, Paco, Teresa y Paquito, a la familia de Mati, Vicente y Rosa y a las personas que he conocido en esta última etapa en España, a los compañeros del SENA y a los cooperantes, en especial a Sonia, Silvia, Violeta y Fana.

Darle las gracias de una manera muy especial a mi familia, a mi madre, mi suegra, mi hermano, hermana y cuñado, mis abuelitas, tíos/as, primos/as, sobrino/as, a todos porque han estado pendientes de nuestros progresos y siempre con una voz de aliento cuando lo hemos necesitado.

Por último, pero no menos importante para mí, agradecer a Carloncho por todo su apoyo, ayuda, amor, consejos, felicidad y mucho más...

# ÍNDICE

## I. Introducción

1. El tomate.....	1
1.1. Origen, taxonomía, morfología y valor dietético .....	1
1.2. Preferencias en el consumo del tomate .....	4
1.3. Importancia económica y distribución geográfica .....	6
1.4. El comercio exterior del tomate en España .....	7
1.5. Mejora genética del tomate .....	9
1.6. El tomate en el contexto de la investigación científica .....	10
2. La genética del desarrollo en tomate .....	10
2.1. Arquitectura vegetativa .....	10
2.2. Transición a la floración .....	12
2.3. Desarrollo reproductivo .....	15
2.3.1. Inflorescencia e iniciación de la floración .....	15
2.3.2. Desarrollo de los órganos florales .....	20
2.3.3. Desarrollo del óvulo y del carpelo .....	21
2.3.4. Desarrollo del fruto .....	25
2.3.5. Control hormonal del desarrollo del fruto y partenocarpia .....	26
2.3.6. Regulación genética de la maduración del fruto .....	28
2.4. Consideraciones en torno a la genética del desarrollo en tomate .....	36
3. La mutagénesis insercional como herramienta de genómica funcional .....	37
3.1. Mutagénesis con transposones.....	38
3.2. Mutagénesis con T-DNA .....	40
3.3. La naturaleza de las mutaciones en las plantas transgénicas .....	43
3.4. Mutagénesis con vectores modificados de T-DNA .....	44
3.4.1. Etiquetado mediante activación transcripcional .....	44
3.4.2. Etiquetado mediante ‘trapping’ .....	47
<b>II. Objetivos</b>	<b>53</b>

## III. Materiales y Métodos

1. Material vegetal.....	55
2. Técnicas básicas de cultivo <i>in vitro</i> .....	55
2. 1. Esterilización de semillas .....	55
2. 2. Obtención de plántulas axénicas y extracción de explantes de cotiledón .....	55
2. 3. Cultivo de explantes primarios .....	55
2. 4. Regeneración de plantas a partir de explantes primarios .....	56
2. 5. Propagación clonal de plantas .....	56
3 Determinación del nivel de ploidía en las plantas regeneradas mediante citometría de flujo .....	56
4. Aclimatación y trasplante .....	57
5. Nomenclatura de los medios de cultivo .....	58

6. Soluciones minerales, soluciones vitamínicas y medios de cultivo .....	58
6.1. Solución mineral MS de Murashige y Skoog (1962) .....	58
6.2. Solución vitamínica SH .....	59
6.3. Medio de germinación .....	59
6.4. Medio de inducción de organogénesis .....	59
6.5. Medio de enraizamiento .....	59
7. Transformación genética vía <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	60
7.1. Fuente de material vegetal .....	60
7.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> : cepa bacteriana, plásmido y genes incluidos en el T-DNA .....	60
7.3. Crecimiento bacteriano .....	61
7.4. Preparación del cultivo bacteriano para la transformación .....	61
7.5. Método de transformación: selección y regeneración de plantas transgénicas .....	61
7.6. Medios de cultivo específicos para la transformación .....	62
7.7. Evaluación del nivel de resistencia a la kanamicina en transformantes primarios .....	63
8. Cultivo de las plantas para la identificación de mutaciones dominantes, semidominantes o aditivas y mutaciones recesivas .....	63

#### **IV. Resultados**

1. Generación de una colección de líneas T-DNA de tomate .....	65
2. Análisis de la expresión del gen delator en líneas t-dna obtenidas con la trampa de intensificadores (vector pD991) .....	68
2. 1. Análisis de la expresión del gen delator en plantas cultivadas <i>in vitro</i> .....	68
2. 2. Análisis de la expresión del gen delator en plantas cultivadas <i>in vivo</i> .....	73
2.2.1. Expresión del gen delator en estructuras vegetativas .....	75
2.2.2. Expresión del delator en diferentes fases del desarrollo de la hoja .....	81
2.2.3. Expresión del gen delator en flores .....	84
2.2.4. Expresión del gen delator en frutos .....	90
2.3. Consideraciones adicionales en torno a los análisis de expresión del delator .....	93
3. Identificación de mutantes en la colección de líneas T-DNA .....	101
3. 1. Caracterización fenotípica del cultivar de tomate p73 .....	101
3.2. Mutantes alterados en el desarrollo vegetativo .....	106
3.2.1. Mutantes con efectos dominantes, semidominantes o aditivos .....	106
3.2.1.a. Mutantes de la colección de plantas transgénicas con construcciones convencionales .....	106
<i>vitro blooming</i> (código 10b P4) .....	106
<i>sharp pointed leaf</i> 9 (código 9a Sp) .....	111
<i>necrotic leaf</i> (código 120b P4) .....	114
<i>dwarf 17</i> (código 17a Tm) .....	116
Otros mutantes con efectos dominantes, semidominantes o aditivos de la colección de plantas transgénicas con construcciones convencionales.....	119
3.2.1.b. Mutantes de la colección de plantas transgénicas con la trampa de intensificadores .	121

14 ET73 ( <i>compact 1b</i> ) .....	121
343 ET73 .....	125
605 ET73 .....	130
744 ET73 .....	135
816 ET73 .....	138
860 ET73 .....	140
Otros mutantes con efectos dominantes, semidominantes o aditivos de la colección de líneas T-DNA con la trampa de intensificadores .....	141
3.2.2. Mutantes con efectos recesivos .....	143
3.2.2.a. Mutantes de la colección de plantas transgénicas con construcciones convencionales .....	143
<i>nanotom</i> (código 16a P8) .....	143
3.2.2.b. Mutantes de la colección de plantas transgénicas con la trampa de intensificadores .....	158
57 ET73 .....	158
140 ET73 .....	160
<i>Seedling lethal 111</i> .....	161
3.3. Mutantes alterados en el desarrollo reproductivo .....	170
3.3.1. Mutantes con efectos dominantes, semidominantes o aditivos .....	170
3.3.1.a. Mutantes de la colección de plantas transgénicas con construcciones convencionales .....	170
<i>pat 76</i> (código 76b Cf) .....	170
<i>small seedles tomato</i> (código 79b Tm) .....	174
<i>long shoot and flower</i> (código 134f P4) .....	176
Otros mutantes de la colección de plantas transgénicas con construcciones estándar .....	178
3.3.1.b. Mutantes de la colección de plantas transgénicas con la trampa de intensificadores .....	179
282 ET73 .....	179
630 ET73 .....	184
740 ET73 .....	186
Otros mutantes de la colección de plantas transgénicas con la trampa de intensificadores .....	193
3.3.2. Mutantes con efectos recesivos .....	194
3.3.2.a. Mutantes de la colección de plantas transgénicas con construcciones convencionales .....	194
<i>frankenstein</i> (código 102a P4) .....	194
3.3.2.b. Mutantes de la colección de plantas transgénicas con la trampa de intensificadores .....	197
41 ET73 .....	197
<b>V. Discusión</b>	<b>201</b>
<b>VI Conclusiones</b>	<b>235</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>239</b>

## 1. EL TOMATE

### 1.1. Origen, taxonomía, morfología y valor dietético

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.), universalmente considerado como hortícola y generalmente cultivada como anual aún tratándose de una planta perenne (Rick, 1978), es objeto de una amplia industria agrícola.

Como suele suceder con las plantas cultivadas, los orígenes y primeros pasos de su domesticación permanecen oscuros. Sin embargo, se puede tener una cierta seguridad sobre tres aspectos. Primero, el centro de origen del género *Solanum* es la región andina que se extiende desde el Sur de Colombia al Norte de Chile, pero parece que podría ser en México donde se domesticó, quizá porque allí crecería y crece como mala hierba entre los huertos y milpas. Segundo, el tomate alcanzó un avanzado estado de domesticación antes de ser conocido en Europa. Grabados pertenecientes a los herbarios más antiguos revelan que los primeros tipos cultivados en Europa tenían frutos grandes. A mediados del siglo XVI se consumían en México tomates de distintas formas y tamaños, e incluso rojos y amarillos, pero por entonces ya habían sido traídos a Europa y servían como alimento en España e Italia. Tercero, el antecesor más directo, el tomate-cereza silvestre (*S. lycopersicum* variedad *cerasiforme*), es espontáneo en toda América tropical y subtropical y se ha extendido a lo largo de los trópicos del Viejo Mundo.

El tomate carecía de nombre nativo en la región andina, en tanto que se conocía en la lengua nahua de México como *tomatl*, término que es sin duda el origen del nombre moderno. Las primeras crónicas del Nuevo Mundo son desgraciadamente escasas en sus referencias a los tomates. El cronista peruano Guamán Poma menciona el consumo esporádico del fruto del tomate silvestre en el imperio inca, pero no hace mención de frutos de tipo grande. El nombre de *mala peruviana*, que se aplicó al tomate tras su introducción en Italia, ha sido origen de confusión sobre la región de domesticación de dicha planta. La primera mención del tomate en el Viejo Mundo se debe a las descripciones publicadas en 1554 por el herborista Pier Andrea Mattioli. La misma precocidad de esa fecha apoya la teoría de un origen mexicano, habida cuenta de que la ciudad de México se tomó en 1519, que la conquista completa de Perú se fecha en 1531 y que se precisaría un cierto tiempo para la introducción, cultivo y valoración de la cosecha en Europa. La edición de 1554 del herbario de Mattioli establece que ‘el tomate se come en Italia con aceite, sal y pimienta’. La planta se llamó primero *pomi d’oro* y *mala aurea* (manzana de oro) y también *poma*

*amoris* (manzana de amor). Estos y otros nombres equivalentes persistieron hasta bien entrado el siglo XIX.

El tomate común es una planta dicotiledónea que se encuadra en la familia de las solanáceas, que comprende la patata, el tabaco y la petunia, así como la hierbamora, belladona y otras plantas venenosas. La taxonomía aceptada es la siguiente (Foolad, 2007):

REINO:	<i>Plantae</i>
Subreino:	<i>Traqueobinta</i>
Superdivisión:	<i>Spermatophyta</i>
Clase:	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase:	<i>Asteridae</i>
Orden:	<i>Solanales</i>
Suborden:	<i>Solanineae</i>
Familia:	<i>Solanaceae</i>
Género:	<i>Solanum</i>
Especie:	<i>lycopersicum</i>

En la primera clasificación taxonómica, al tomate cultivado se le denominó *Solanum lycopersicon* (Linnaeus, 1753). Por estar estrechamente relacionada con la belladonna y la mandrágora (plantas del género *Solanum*) fue considerada una planta venenosa. En 1754, Miller hace una distinción asignando al tomate cultivado el género *Lycopersicon* y la especie *esculentum* (Miller, 1754), lo que ayuda a aceptar a esta especie como una planta comestible. El género *Lycopersicon* se distinguió inicialmente del género *Solanum* sobre la base de caracteres diferenciales en hojas y anteras. Así pues, *Lycopersicon* tiene hojas pinadas y la dehiscencia se produce en el lateral de las anteras mientras que *Solanum* tiene hojas con tendencia a ser simples y la dehiscencia se produce en el extremo de las anteras. Las relaciones filogenéticas entre *Solanum* y *Lycopersicon* han sido el origen de largos debates durante mucho tiempo. Así pues, algunos investigadores reconocían *Lycopersicon* como un género distinto mientras que otros sugerían que éste debía estar unido al género *Solanum*. Recientemente y basándose en datos morfológicos y moleculares, se ha readoptado el nombre científico de *Solanum lycopersicum* para el tomate cultivado mientras que las otras especies de *Lycopersicon* han sido incorporadas al género *Solanum* (Foolad, 2007 y referencias de este artículo).

El tomate es una planta que puede desarrollarse de forma rastrera, semierecta o erecta. Su sistema radicular está compuesto por una raíz principal (corta y débil), raíces secundarias (numerosas y potentes) y raíces adventicias. En el tallo principal, de un grosor

de 2 a 4 cm, se desarrollan hojas, tallos secundarios (cuya ramificación es simpodial) e inflorescencias. La hoja es compuesta e imparipinada, con foliolos peciolados, lobulados y con borde dentado. La flor es perfecta, regular e hipogina y consta de 5 o más sépalos. La flor suele tener el mismo número de sépalos que de pétalos, estos últimos de color amarillo. Los estambres, que se desarrollan fusionados, forman un cono estaminal que envuelve al gineceo (con un ovario bi o plurilocular). Las flores se agrupan en inflorescencias de tipo racemoso (dicasio) y se unen al eje floral por medio de un pedicelo articulado que contiene la zona de abscisión, distinguible por un engrosamiento con un pequeño surco originado por una reducción del espesor del cortex. El fruto es una baya bi o plurilocular que está constituido por el pericarpio, el tejido placentario y las semillas.

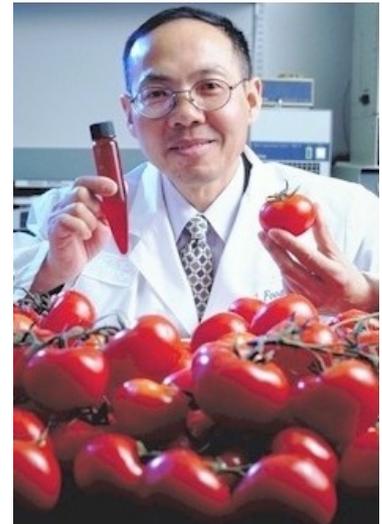
El agua representa entre el 88 y 95% del peso del fruto de tomate, correspondiendo el mayor valor a los cultivares de industria y el menor a los tipos cereza. Con ese alto contenido en agua, su valor nutritivo no puede residir en su poder energético sino en sus sales y vitaminas (tabla 1). Aunque hay otras frutas y hortalizas con mayores contenidos vitamínicos, el alto consumo del tomate lo convierte en la principal fuente de vitaminas en muchos países. A título ilustrativo, la popularidad actual del tomate en los Estados Unidos es difícil de explicar por puras razones nutritivas. El tomate no ocupa ningún lugar destacado en cuanto a concentración de componentes dietéticos se refiere. De hecho, el tomate ocupa, entre los principales frutos y hortalizas, el decimosexto lugar como fuente de vitamina A y el decimotercero como fuente de vitamina C. En términos de consumo, sin embargo, los tomates son la tercera fuente de ambas vitaminas en los Estados Unidos. Esta aparente contradicción se explica por el volumen relativamente alto de tomates consumidos.

**Tabla 1.** Composición del tomate maduro

En 100 g de materia seca		En 100 g de materia fresca	
Glucosa	22 g	Vitamina A ( $\beta$ caroteno)	540-760 $\mu$ g
Fructosa	25 g	Vitamina B <sub>1</sub> (tiamina)	50-60 $\mu$ g
Sacarosa	1 g	Vitamina B <sub>2</sub> (riboflavina)	20-50 $\mu$ g
Proteínas	8 g	Vitamina B <sub>3</sub> (ác. pantoténico)	50-750 $\mu$ g
Pectinas	7 g	Vitamina B <sub>6</sub> (complejo)	80-110 $\mu$ g
Celulosa y hemicelulosa	10 g	Niacina	500-700 $\mu$ g
Ácido cítrico	9 g	Ácido fólico	6-20 $\mu$ g
Ácido málico	4 g	Biotina	1-4 $\mu$ g
Sales minerales (K, Ca, Mg, P)	8 g	Vitamina C	15-23 $\mu$ g
Lípidos	2 g	Vitamina E ( $\alpha$ tocoferol)	40-1200 $\mu$ g
Otros	4 g		

Fuente: Cuartero J. (2001)

Por otro lado, el tomate ha venido despertando en los últimos años un gran interés entre la comunidad científica por el efecto beneficioso que parece tener sobre nuestro organismo. Son cada vez más los estudios que parecen confirmar que este vegetal es una fuente inagotable de propiedades preventivas y curativas. El licopeno (un carotenoide que da lugar al característico color rojo de los tomates) posee propiedades antioxidantes y actúa protegiendo a las células humanas del estrés oxidativo, uno de los principales responsables de las enfermedades cardiovasculares, cáncer y envejecimiento. Cada vez existen más estudios epidemiológicos que sugieren que el consumo de licopeno tiene un efecto beneficioso sobre la salud humana, reduciendo notablemente la incidencia de las patologías cancerosas (sobre todo, de pulmón, próstata y tracto digestivo) y cardiovasculares. También existen evidencias científicas que indican que previene el síndrome de degeneración macular, principal causa de ceguera en la gente mayor de 65 años. En los últimos años se han publicado diversos artículos científicos en relación con la eficacia del tomate en la prevención del cáncer y los infartos (Gerster, 1997; Rao y Agarwal, 1998; Zhao *et al.*, 1998; Giovannucci y Clinton, 1998; Rao *et al.*, 1999; Jain *et al.*, 1999; Amir *et al.*, 1999; Porrini y Riso, 2000; Rao y Agarwal, 2000; Takeoka *et al.*, 2001; Watanabe *et al.*, 2001; Nara *et al.*, 2001).

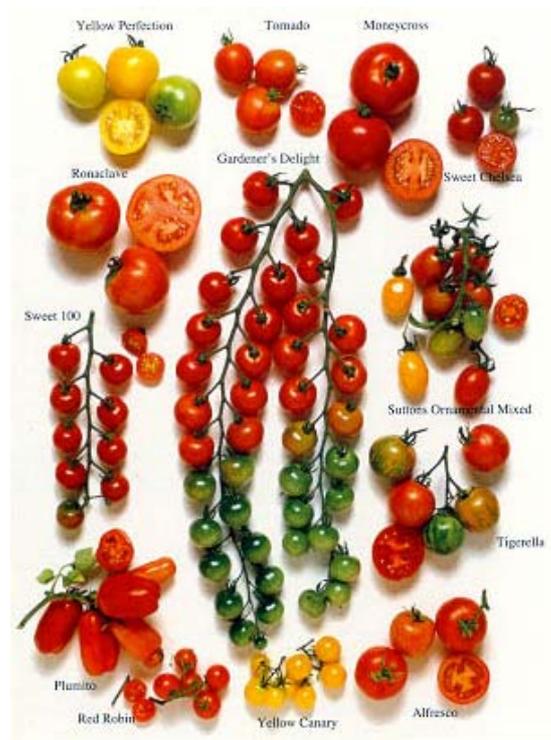


Científicos de la Universidad Purdue y del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) desarrollaron un tomate que contiene tres veces más licopeno, un antioxidante que puede ayudar a prevenir procesos de tipo canceroso.

## 1.2. Preferencias en el consumo del tomate

Uno de los mayores atractivos de cualquier producto para el consumidor es su diversidad, y una de las razones de la amplia aceptación del tomate radica en la multitud de tipos que la conjunción del aspecto exterior (forma, tamaño y color) y las cualidades internas (sabor, aroma, textura y dureza) produce (fig.1).

En general, las características más apreciadas por el consumidor son el color y sabor. En cualquier caso, las preferencias por un tipo de tomate determinado son muy variadas y dependen del país, tipo de población, uso al que se destina, etc. Estas cambian también según las costumbres de consumo. Por ejemplo, los japoneses y chinos prefieren tomates con baja acidez, ya que los suelen consumir como fruta; sin embargo, en la mayoría de países tropicales, donde los tomates se usan cocinados, se acepta una alta acidez.



**Figura 1.** Grandes o pequeños, redondos o alargados, rojos o amarillos, en ramillete..., tomates para todos. La popularidad del tomate se puede atribuir a su color atractivo, aroma y versatilidad, pero quizás sea su enorme diversidad uno de los mayores atractivos de esta especie.

En Estados Unidos, el tomate en fresco no tiene tanta importancia como en Europa, ya que el consumidor americano es menos exigente que el europeo. Esto hace que predominen las explotaciones de tomate sin entutorar, cuya recolección se realiza de forma mecánica, por lo que el tomate nunca llega a alcanzar la calidad y presentación que exigen los mercados europeos. En Europa hay tendencias claramente definidas. En Portugal, España, Italia y el sureste francés tienen más éxito los tomates asurcados, aunque en los últimos años comienzan a tener bastante aceptación los tomates lisos. Los restantes países muestran una mayor preferencia hacia este último tipo de tomate.

Los sistemas de clasificación de acuerdo con el tamaño del fruto se adoptan sobre todo en los países desarrollados, donde generalmente son más apreciados los tomates grandes para ensalada. La forma es otra característica que marca diferencias en cuanto a preferencias, siendo los tomates redondos los de mayor demanda. Como siempre, hay excepciones, así por ejemplo las poblaciones rurales de países como Filipinas y Ecuador están más acostumbradas a consumir tomates achatados con formas irregulares. Las preferencias por el color son extremadamente variables dependiendo de los países, de la estación y del uso al que se destina. En Taiwan, donde los tomates se recolectan cuando empieza el viraje de color y se venden antes de alcanzar la madurez, prefieren tomates con desigual pigmentación. Este tipo de tomates también tienen una buena aceptación en Brasil y Colombia. En Europa y Norteamérica, por el contrario, son más apreciados los tomates

rojos. Por otra parte, se consideran mejores los tomates multiloculares con paredes gruesas en comparación con los que tienen poca carne en la zona central y cavidades mayores para las semillas. Otras características como la firmeza y pequeño tamaño de las cicatrices hacen que el tomate sea más atractivo para el consumidor.

En cuanto a las variedades, en las explotaciones comerciales se utilizan híbridos casi exclusivamente. El mercado de los cultivares híbridos se caracteriza por su dinamismo y por la rápida sustitución de unos híbridos por otros. Las empresas de semillas tratan de lanzar al mercado continuamente nuevos híbridos, quizás para dar idea de eficacia y capacidad investigadora, aunque esos nuevos híbridos no superen a los que incluso ellas mismas vendían. Actualmente hay en el mercado centenares de híbridos aunque su duración en el mercado será, a buen seguro, corta en la mayoría de los casos.

### **1.3. Importancia económica y distribución geográfica**

A nivel mundial, el tomate es la hortaliza de mayor difusión y valor económico. Su demanda aumenta continuamente y con ella su cultivo, producción y comercio. Según fuentes de la FAO, la superficie mundial del tomate (fresco y de transformación) en 2007 fue de más de 4 millones de has, con una producción de 126,2 millones de toneladas y un rendimiento medio de 27.289 Kg/ha (tabla 2).

España ocupa el séptimo lugar del mundo en producción, muy por debajo de China, EEUU, Turquía, India, Egipto e Italia. En la UE, la producción de tomate se reparte entre Italia, primer país de la UE en cuanto a producción, seguido de España, Grecia y Portugal (tabla 3).

Los datos de producción en España en los quince últimos años han experimentado un incremento muy favorable: de una producción de 2,4 millones de toneladas en una superficie de 60.600 ha en 1985, se ha pasado a una producción actual (2007) de 3,6 millones de toneladas en 55.600 hectáreas. El sector productor de tomate se concentra principalmente en las comunidades autónomas de Andalucía, Murcia, Canarias y Comunidad Valenciana.

**Tabla 2.** Producción, superficie y rendimiento de los principales países productores del mundo en 2007 (Anuario FAO)

Países	Producción (t)	Superficie (ha)	Rendimiento (Kg/ha)
<b>Asia</b>	67.798.472	2.827.803	23.975
- China	33.645.000	1.455.200	23.120
- Turquía	9.919.673	270.000	36.739
- India	8.585.800	479.200	17.916
<b>Europa</b>	20.497.562	594.643	34.470
- UE	15.764.070	300.901	52.389
<b>América N. y Central</b>	15.468.766	327.554	44.712
- EEUU	11.500.000	175.000	65.714
- Méjico	2.900.000	130.000	22.307
<b>América Sur</b>	6.415.428	141.088	45.471
- Brasil	3.364.438	56.678	59.360
- Chile	1.270.000	19.500	65.128
<b>África</b>	14.507.140	660.215	21.973
- Egipto	7.550.000	194.000	38.917
- Túnez	1.000.000	26.300	38.022
- Marruecos	1.140.000	20.000	57.000
<b>Mundo</b>	<b>126.246.708</b>	<b>4.626.232</b>	<b>27.289</b>

**Tabla 3.** Producción, superficie y rendimiento de los principales países productores de la Unión Europea en 2007 (Anuario FAO)

Países	Producción (t)	Superficie (ha)	Rto. (Kg/ha)
España	3.615.500	55.600	65.018
Francia	750.000	4.500	166.667
Grecia	1.450.000	26.500	54.717
Italia	6.025.613	118.224	50.967
Portugal	1.000.000	12.500	80.000
<b>Total UE</b>	<b>15.764.070</b>	<b>300.901</b>	<b>52.389</b>

#### 1.4. El comercio exterior del tomate en España

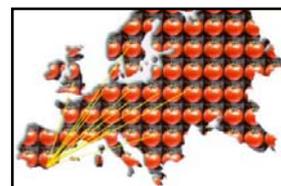
En España, el tomate fresco para consumo directo es la principal hortaliza en relación con la exportación. Es el país que más exporta entre los principales productores mundiales (tabla 4). Asimismo, ocupa un primer lugar en el comercio de exportación de los países de la UE. Tras la integración de España a la UE, el sector exportador del tomate ha sabido adaptarse con un gran esfuerzo a los mecanismos compensatorios de intercambios (MCI). Posteriormente, y como estado miembro de la UE, ha sabido acoplarse íntegramente a su ordenamiento jurídico en materias fiscales y sociales, aunque continuamente surgen problemas emanados principalmente de los Acuerdos de Asociación. El tomate es uno de los productos de negociación que siempre está presente en los acuerdos bilaterales o de asociación. Desde 1991, año en que desaparecieron los cupos y

las restricciones a la exportación al resto de la Europa Comunitaria, se dispararon las exportaciones y hasta hoy parecen no haber tocado techo.

**Tabla 4.** Balanza comercial de tomate fresco de los principales países productores del mundo en 2005 (Anuario FAO)

Países	Exportaciones		Importaciones		Saldo (E-I)
	Cantidad (t)	Valor (1000\$)	Cantidad (t)	Valor (1000\$)	Valor (1000\$)
España	923.405	1.040.955	72.354	36.518	1.004.437
China	85.931	17.987	42	67	17.920
EEUU	188.173	226.405	951.787	1.075.119	-848.714
Turquía	250.182	145.773	56	31	145.742
India	11.743	2.464	51	25	2.439
Egipto	18.470	3.753	71	10	3.743
Italia	91.875	168.924	99.325	128.380	40.544

En Europa, España lidera el comercio de la exportación, que en su mayor parte va dirigida al mercado de la Unión Europea, siendo Alemania, Países Bajos, Reino Unido y Francia los principales mercados comunitarios (tabla 5).



**Tabla 5.** Exportaciones españolas de tomate fresco (Anuario FAO)

Países	2003	2004	2005
	Cantidad (t)	Cantidad (t)	Cantidad (t)
Alemania	238.698	243.791	198.893
Francia	147.611	160.251	147.733
Países Bajos	165.370	181.902	170.609
Reino Unido	190.018	207.075	183.845
Italia	22.426	31.023	38.998
Resto U.E.	149.393	165.525	161.723
No comunitarios	32.544	28.864	21.604

## 1.5. Mejora genética del tomate

La mejora genética de nuevos cultivares de tomate empezó hace más de 200 años en Europa. Hasta los años 50, la mejora de tomate incluía el desarrollo de cultivares multipropósitos para hacer frente a varias necesidades. En los últimos 40 años, la meta universal para la mejora de tomate tanto para consumo en fresco como procesado ha sido el incremento de la producción de fruto por unidad de área. También se han contemplado como objetivos principales la calidad externa o comercial (presentación, aspecto, firmeza, conservación...), la extensión y adaptación de los ciclos a las necesidades y oportunidades de los mercados, precocidad en la maduración, capacidad para resistir temperaturas adversas, resistencia a la quebrantadura inducida por la lluvia y la resistencia de las plantas a fisiopatías y patógenos. En buena medida estos objetivos se han alcanzado, aunque descuidando un aspecto que ahora se empieza a considerar prioritario: la calidad organoléptica del fruto. Es decir, el complejo sabor-aroma-textura de la carne del fruto que se aprecia al comerlo. Últimamente se observa una preferencia por estos valores gustativos conservados en las variedades tradicionales y que se han perdido, en mayor o menor medida, en muchas de las variedades actuales. Esto está llevando a plantear el sabor como un importante objetivo en la mejora genética del tomate.



El propio mercado ha sido el que ha premiado con su elección la calidad de las variedades tradicionales, que se echa de menos en muchos de los cultivares híbridos

Por otro lado, los objetivos de mejora han dependido de los métodos de cultivo (en campo o en invernadero) o de si el producto es para consumo en fresco o procesado. Los caracteres específicos de interés para los cultivares de mercado en fresco incluyen morfología redondeada, firmeza, uniformidad de tamaño, forma y color, así como aspectos relacionados con la presentación (e.g., apariencia libre de marcas o anomalías) y la calidad (e.g., textura, sabor y aroma) (Foolad, 2007; Paran and Knaap, 2007). El material vegetal utilizado en el cultivo de tomate para industria difiere del que se utiliza para tomate fresco como un resultado de diferentes requerimientos de calidad de acuerdo al uso destinado. Se utilizan cultivares que ofrezcan facilidad para la separación del fruto, de crecimiento determinado, vigor medio, maduración agrupada y buena cobertura del fruto

para la cosecha mecanizada. La forma de los frutos suele ser globosa o prismática para la elaboración de concentrados y triturados, y aperada para la elaboración de tomates pelados enteros. Aunque no de una manera tan clara como en el caso del cultivo para fresco, hay un predominio cada vez mayor de los cultivares híbridos frente a las variedades, debido más a la protección de facto que buscan los obtentores de semillas que a las ventajas que supone la utilización de los mismos.

## **1.6. El tomate en el contexto de la investigación científica**

El tomate se ha convertido en un excelente modelo tanto para la investigación básica como para la investigación aplicada de plantas como consecuencia de una combinación de razones científicas y agronómicas. La importancia del tomate como producto agrícola ha sido puesta de manifiesto no sólo por las instituciones públicas sino también por el sector privado, y más concretamente por las empresas dedicadas a la mejora genética y biotecnología vegetal, que han decidido invertir sus recursos para llevar a cabo y apoyar proyectos de investigación orientada al estudio de distintos procesos. La experimentación científica se ve favorecida porque se trata de una planta autógama diploide ( $2n = 24$ ), con un ciclo de vida corto, un elevado potencial reproductivo y de fácil polinización y propagación vegetativa. Además, su genoma es relativamente pequeño (950 Mpb) y existen numerosas fuentes genéticas y genómicas disponibles: poblaciones cartografiadas, marcadores de DNA (Tanksley *et al*, 1992), colecciones de ESTs (van der Hoeven *et al*, 2002), *microarrays* y bases de datos públicos (revisado por Yano *et al*, 2007) así como librerías de insertos genómicos tipo YAC (Bonnema *et al*, 1996) y BAC (Hamilton *et al*, 1999; Budiman *et al*, 2000). Asimismo, conviene indicar que en 2004 se inició el programa de secuenciación del genoma de tomate (al menos de las 220 Mpb de secuencias eucromáticas, donde se ha sugerido que se encuentran la mayor parte de los genes) a través del consorcio internacional Solanaceae Genome Project (SOL) (Mueller *et al*, 2005). Todos estos aspectos hacen del tomate uno de los más efectivos modelos entre las especies cultivadas.

## **2. LA GENÉTICA DEL DESARROLLO EN TOMATE**

### **2.1 Arquitectura vegetativa**

En la mayor parte de los cultivares de tomate la fase vegetativa es corta. La primera inflorescencia comienza a desarrollarse después de que aparezcan las primeras 6-12 hojas y la transición floral empieza cuando la tercera hoja está completamente expandida. Al

contrario de lo que ocurre en *Arabidopsis thaliana* y *Antirrhinum majus*, con un patrón de crecimiento monopodial, el tomate exhibe un hábito de crecimiento simpodial. Mientras que en las especies que exhiben una arquitectura monopodial el meristemo apical del brote (SAM) es indeterminado y los órganos vegetativos y reproductivos se generan en sus flancos, el SAM de tomate es determinado y el desarrollo del primer brote se completa cuando aparece la primera inflorescencia. A este primer brote se le denomina ‘segmento inicial’. A continuación, se desarrolla un nuevo brote vegetativo del meristemo axilar más alto, es decir, un meristemo simpodial localizado en la axila de la hoja más joven justo por debajo de la inflorescencia. El meristemo simpodial permite a la planta continuar su crecimiento, desarrollando tres nudos vegetativos (hojas) antes de terminar en una nueva inflorescencia. Este patrón de crecimiento se repite a través de sucesivos segmentos determinados o unidades ‘simpodiales’. Por tanto, la arquitectura de tomate implica una alternancia regular de fases vegetativas y reproductivas entre el brote primario y los brotes axilares (Atherton and Harris, 1986).

A pesar de las diferencias entre los sistemas monopodiales y simpodiales, los genes que mantienen el estado indeterminado del brote en *Arabidopsis*, *TERMINAL FLOWER 1* (*TFL1*), y *Antirrhinum*, *CENTRORADIALIS* (*CEN*), tienen un ortólogo en el genoma de tomate, el gen *SELF-PRUNING* (*SP*). Este gen controla la transición del desarrollo vegetativo a reproductivo en los meristemos de inflorescencia (Pnueli *et al*, 1998). La anulación de función del gen *SP* no tiene efectos en la arquitectura del segmento inicial, pero promueve una reducción gradual del número de nudos vegetativos que se generan en los sucesivos segmentos simpodiales, llegando a un punto en el cual la fase vegetativa se completa con el desarrollo de dos inflorescencias consecutivas (Yeager, 1927). En este sentido, se ha podido comprobar que la sobreexpresión de los genes *SP* o *CEN* en tomate da lugar a una extensión de la fase vegetativa en los brotes simpodiales (Pnueli *et al*, 1998). *CEN*, *TFL1* y *SP* son miembros de una nueva familia de genes reguladores denominados *CETS*, que codifican una familia de proteínas capaces de interactuar con una amplia variedad de proteínas de señalización.

El desarrollo normal del meristemo simpodial requiere también la actuación del gen *SINGLE FLOWERS TRUSS* (*SFT*), cuya mutación detiene el crecimiento de la yema simpodial y permite que la planta continúe su crecimiento sobre la base de meristemos vegetativos ectópicos que surgen de la inflorescencia (Kerr, 1982). La reducción del nivel de expresión de *SP* en el mutante *single flower truss* (*sft*) sugiere que *SFT* controla el

desarrollo simpodial en función de su interacción con *SP*, probablemente actuando corriente arriba como regulador de *SP* en el meristemo simpodial (Molinero-Rosales *et al*, 2004).

La formación de ramas laterales está regulada por los genes *LATERAL SUPPRESSOR (LS)* y *BLIND (BL)*. Mientras que *BL* afecta a los meristemos simpodiales y axilares (Rick and Butler, 1956; Schmitz *et al*, 2002), *LS* está implicado solamente en el desarrollo de los meristemos axilares (Malayer and Guard, 1964; Schumacher *et al*, 1999). Entre las anormalidades fenotípicas que exhibe el mutante *lateral suppressor (ls)*, la más significativa es la ausencia de meristemos laterales en el segmento inicial. La clonación y caracterización de *LS* ha revelado que codifica para un factor de transcripción de la familia GRAS (Schumacher *et al*, 1999). Se ha comprobado que la expresión del gen ortólogo de *Arabidopsis LAS* en el mutante de tomate *ls* restaura el fenotipo silvestre, lo que indica que debe existir un mecanismo conservado que regula la iniciación de los meristemos axilares (Greb *et al*, 2003). El gen *BL* es un factor de transcripción tipo MYB (clase R2R3) implicado en la regulación de varios procesos biológicos. El fenotipo del doble mutante *ls + bl* sugiere que *BL* y *LS* participan en diferentes rutas que promueven el desarrollo de meristemos laterales (Schmitz *et al*, 2002).

## **2.2. Transición a la floración**

En tomate, la transición a la floración implica que el meristemo apical desaparece cuando se desarrolla la primera inflorescencia. Este proceso está controlado por factores ambientales y endógenos, siendo estos últimos de naturaleza genética y hormonal. Se considera que tomate es una planta de día neutro ya que el tiempo de floración, medido como el número de hojas desarrolladas hasta la primera inflorescencia, no se ve afectado por el fotoperiodo (Kinet and Peet, 1997). De hecho, algunos genes (aislados y caracterizados) forman parte de una ruta autónoma que controla la transición a la floración. En el segmento inicial, *FALSIFLORA (FA)* y *SINGLE FLOWER TRUSS (SFT)* promueven la transición floral (Molinero-Rosales *et al*, 1999; Molinero-Rosales *et al*, 2004; Lifschitz *et al*, 2006), mientras que *SP* regula este proceso en los segmentos simpodiales (Pnueli *et al*, 1998). Mutaciones en los *loci FA* o *SFT* dan lugar a fenotipos de floración tardía independientes de fotoperiodo y a alteraciones que afectan al desarrollo de la inflorescencia. *FA* es ortólogo de *LEAFY (LFY)* y *FLORICAULA (FLO)*, dos genes de identidad floral de *Arabidopsis* y *Antirrhinum* respectivamente, aunque, al igual que *FA*, sólo *LFY* controla la transición floral (Molinero-Rosales, 1999).

*SFT* es un ortólogo del gen de *Arabidopsis* *FLOWERING LOCUS (FT)* y desencadena señales que regulan la transición a la floración y el crecimiento simpodial en tomate (Lifschitz *et al*, 2006). El doble mutante *sft + fa* no es capaz de florecer, lo que sugiere que *FA* y *SFT* regulan la transición floral a través de una ruta independiente. De hecho, se ha confirmado que la expresión de *FA* no está afectada por la mutación *sft* (Molinero-Rosales, 2004). En petunia, una simple mutación en el gen *PETUNIA FLOWERING GENE (PFG)*, un gen MADS-box homólogo al gen *APETALA 1 (API)* de *Arabidopsis*, anula la transición a la floración (Immink *et al*, 1999). Curiosamente, la sobreexpresión de *API* en tomate ocasiona floración temprana en tomate sin que ello modifique el desarrollo simpodial (Ellul *et al*, 2004). Por el contrario, en *Arabidopsis* se requieren mutaciones en los tres genes relacionados con la floración (*CO*, *FCA* y *GAI*, que actúan en la ruta metabólica de día largo, autónoma o mediada por giberelinas, respectivamente), para impedir la floración (Reeves and Coupland, 2001). Los procesos de domesticación en petunia (una especie ornamental) y tomate (una especie de cosecha) pueden haber llevado a una reducción del número de genes necesarios para la floración a través de una eliminación de genes redundantes para este carácter. Alternativamente, las interacciones génicas que controlan la transición a la floración pueden diferir entre especies diferentes, aunque las funciones de genes individuales puedan ser similares.

Los mutantes de floración tardía *uniflora (uf)* y *compound inflorescence (s)* exhiben mayor retraso de floración en condiciones medioambientales de invierno (baja irradiación y escasa disponibilidad de asimilados en el meristemo apical). Esto implica que la transición a la floración está también regulada por una ruta dependiente de condiciones medioambientales (Dielen *et al*, 1998; Quinet *et al*, 2006b). Al igual que ocurre en *fa + sft*, el doble mutante *sft + uf* no es capaz de florecer, lo que sugiere que *UF* y *SFT* promueven la floración a través de una ruta reguladora paralela (Lifschitz and Eshed, 2006). Aunque aún no se conocen completamente las interacciones genéticas entre *UF* y *FA*, la mutación *uf* tiene efectos epistáticos sobre otras muchas mutaciones que afectan a la floración (Quinet *et al*, 2006a), indicando que *UF* es un regulador clave de la floración en tomate.

La mutación del gen *SP* produce un acortamiento progresivo de la transición floral en los segmentos simpodiales, pero no tiene consecuencias sobre el tiempo de floración en el segmento inicial (Pnueli *et al*, 1998). No obstante, el alelo *sp* es capaz de rescatar el fenotipo de floración en los dobles mutantes de ausencia de floración *sft + fa* y *sft + uf* (Lifschitz and Eshed, 2006), lo que indica que *SP* tiene que desempeñar un papel

importante en la inducción de la floración. Adicionalmente, la mutación *fa* produce el efecto inverso a la mutación *sp*, es decir, ocasiona un incremento de los nudos vegetativos en el primer segmento simpodial. Este hecho, unido a su patrón de expresión, prueban su implicación en el desarrollo simpodial de tomate. Aunque la función de *SP* parece ser antagonista con la de *FA*, la transición del desarrollo vegetativo a reproductivo depende de un balance entre los niveles de transcripción de *SP* y *FA* (Molinero-Rosales *et al*, 1999). Asimismo, para que se produzca el proceso de transición floral en el segmento inicial y en los segmentos simpodiales tiene que existir un equilibrio entre las actividades de *SFT* y *SP* (Lifschitz and Eshed, 2006). Por tanto, es bastante probable que existan diferentes escenarios del desarrollo como consecuencia de las interacciones genéticas entre los genes de floración en el segmento inicial y los segmentos simpodiales (Lozano *et al*, 2008).

Por otro lado, *JOINTLESS (J)* y *BLIND (BL)* promueven floración autónoma en tomate, aunque las alteraciones más evidentes en los mutantes *j* y *bl* afectan al desarrollo de la inflorescencia. La caracterización molecular de estos genes y sus interacciones con genes de identidad del meristemo corroboran este papel funcional (Mao *et al*, 2000; Schmitz *et al*, 2002; Szymkowiak and Irish, 2006).

Aunque la floración en tomate es autónoma, ciertas señales medioambientales pueden modificar esta característica del desarrollo. Por ejemplo, las bajas temperaturas (10-15°C) reducen el número de nudos hasta la primera inflorescencia. Asimismo, se ha observado que en condiciones de día corto se produce una reducción en el tiempo de floración (Samach and Lotan, 2007). Además, se ha observado un adelanto de la floración en condiciones de elevada irradiación, un efecto que se ha relacionado con una mayor capacidad para el desarrollo foliar y un incremento de la disponibilidad de asimilados en el meristemo (Kinet and Peet, 1997; Dielen *et al*, 2004). La luz es percibida por las plantas a través de los fotorreceptores, *PHYTOCHROME (PHY)* y *CRYPTOCHROME (CRY)*. Giliberto *et al* (2005) comprobaron que tanto la sobreexpresión como el silenciamiento del gen de tomate *CRY2* incrementan el número de días hasta que se desarrolla la primera flor en antesis, sin que se vea alterado el tiempo de floración. Jiménez-Gómez *et al* (2007), mediante una aproximación basada en el análisis de QTLs, comprobaron que el gen *PHY2B*, así como *FALSIFLORA*, co-localizan con un QTL con efectos mayores que es responsable de la transición floral en esta especie.

La floración autónoma en tomate está también modulada por giberelinas, aunque el papel que desempeñan durante la transición floral no se ha estudiado en profundidad. Las

giberelinas (GAs) promueven floración en tomate ya que los mutantes deficientes en GAs requieren giberelinas exógenas para florecer (Koornneef *et al*, 1990). Se ha comprobado que en plantas con elevadas concentraciones de GAs se desarrollan más hojas hasta la floración (Kinet and Peet, 1997). Además, experimentos realizados *in vitro* han demostrado que el efecto estimulador de las citoquininas sobre la iniciación floral puede ser inhibido por giberelinas. Probablemente, las hormonas vegetales modulan la floración en tomate a través de interacciones génicas que se producen en diferentes rutas reguladoras. El problema es que se conoce poco sobre la naturaleza de tales interacciones.

Muchos de los mutantes con alteraciones en el tiempo de floración tienen un fenotipo de floración tardía. De los 41 mutantes de tomate identificados en un cribado *in silico*, sólo cuatro exhibieron un fenotipo de floración temprana (Menda *et al*, 2004). Esas observaciones, junto con la influencia de las señales medioambientales en el tiempo de floración, sugieren que la selección de las combinaciones génicas favorables para floración ha desempeñado un papel crucial a lo largo del proceso de domesticación del tomate, conduciendo a floración temprana y asegurando producción de fruto bajo condiciones desfavorables (Lozano *et al*, 2008).

### **2.3. Desarrollo reproductivo**

Las inflorescencias de tomate han sido descritas clásicamente como una cima, aunque las evidencias disponibles permiten que se puedan considerar como racimos (Quinet and Kinet, 2007). La iniciación del desarrollo reproductivo vincula la conversión del meristemo apical en meristemo de inflorescencia, a partir del cual se desarrolla lateralmente el meristemo floral dando lugar a la primera flor. Los sucesivos meristemos florales se desarrollan por debajo del primero, alrededor de un eje principal. El proceso culmina con la producción de una flor terminal. Típicamente, la inflorescencia determinada está compuesta por 5-10 flores (Allen and Susseex, 1996).

#### **2.3.1. Inflorescencia e iniciación de la floración**

Los genes *BL* y *UF* afectan la actividad del meristemo de inflorescencia. En este sentido, el desarrollo de la inflorescencia concluye con el desarrollo de un número reducido de flores en el mutante *bl* o con una simple flor en el mutante *uf* (Rick and Butler, 1956; Fehleisen, 1967; Dielen *et al*, 1998; Schmitz *et al*, 2002). La insólita estructura reproductiva del mutante *uf* (Figura 2) resulta de su incapacidad para desarrollar inflorescencias, y no por el aborto de yemas florales (Dielen *et al*, 2004). Además, los

mutantes dobles *uf + sft*, *uf + bl* y *uf + j* desarrollan una flor simple normal (Quinet *et al*, 2006a; Quinet and Kinet, 2007), lo que demuestra una interacción epistática de *UF* con *SFT*, *BL* y *J*.

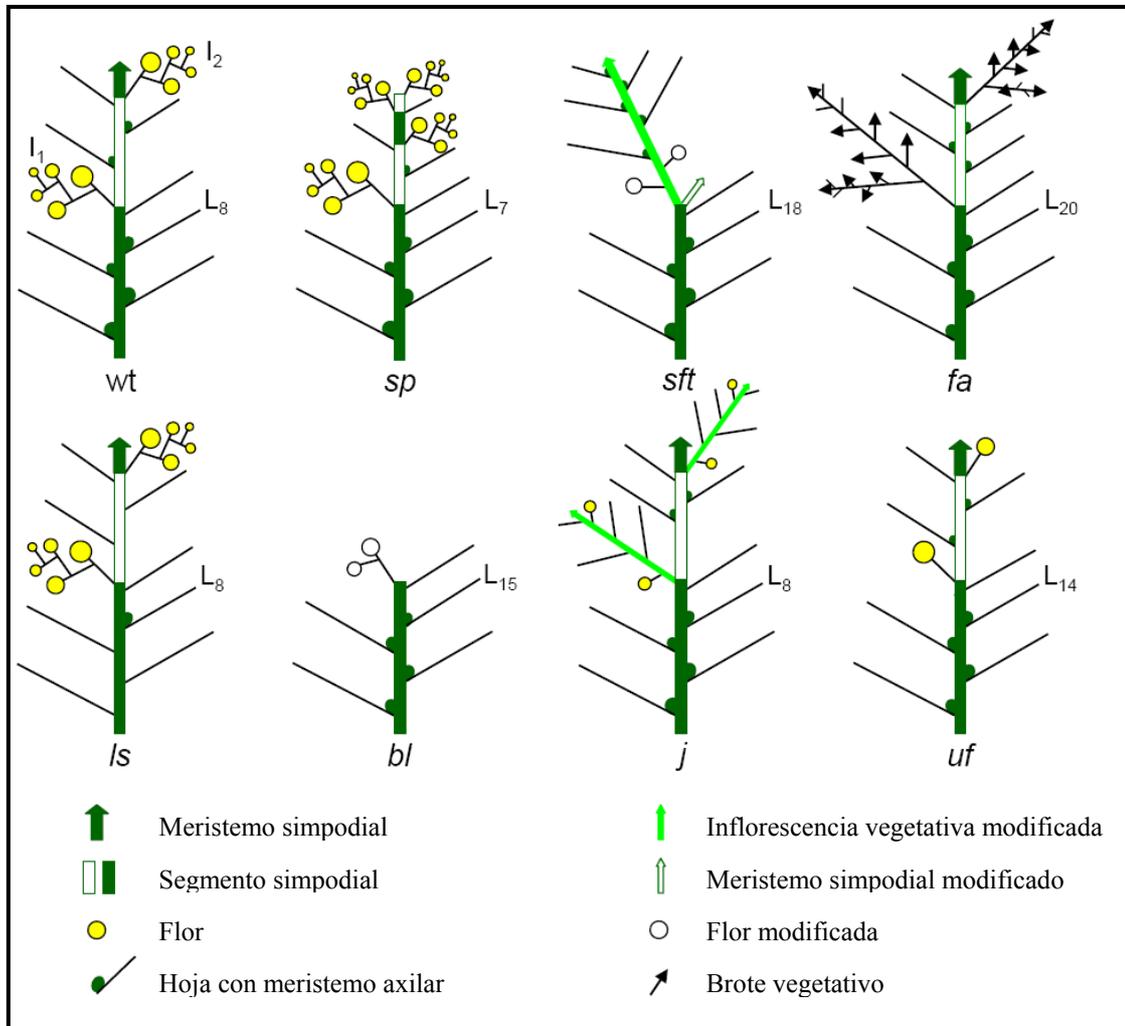
Los fenotipo de los mutantes *jointless (j)* y *macrocalyx (mc)* exhiben una reversión del meristemo de inflorescencia a vegetativo (figura 2), lo que indica que para el mantenimiento de la identidad del meristemo de inflorescencia se requieren los genes *J* y *MC* (Rick and Sawant, 1955; Rick and Butler, 1956; Vrebalov *et al*, 2002; Szymkowiak and Irish, 2006). La identidad del meristemo de inflorescencia también se pierde en el mutante *sft* después del desarrollo de una o dos flores (figura 2). Después revierte a un estado vegetativo y la posición de la siguiente flor la ocupa un brote de naturaleza simpodial. *SFT* previene el cambio de identidad del meristemo de inflorescencia una vez que la floración se ha iniciado (Molinero-Rosales *et al*, 2004).

En resumen, los genes *BL*, *J*, *SFT*, *MC* y *UF* desempeñan papeles importantes en el mantenimiento de la identidad del meristemo de inflorescencia y se requieren para otros procesos relacionados con la floración, como por ejemplo la transición a la floración (*BL*, *SFT* y *UF*), el crecimiento simpodial (*J* y *SFT*) y el desarrollo de los órganos florales (*MC*).

Después del desarrollo floral, la identidad floral en el meristemo de inflorescencia viene determinada por el gen *FALSIFLORA* (Molinero-Rosales *et al*, 1999). El alelo *fa* promueve la sustitución de flores por brotes vegetativos secundarios (figura 2), tal y como ocurre en los mutantes *lfy* de *Arabidopsis* y *flo* de *Antirrhinum*. El análisis detallado de las inflorescencias de *fa* ha determinado que son los meristemas que derivan del meristemo de inflorescencia los que no son capaces de adquirir identidad floral (Allen and Sussex, 1996). *FA* es un ortólogo del gen *LFY* de *Arabidopsis*, y los análisis efectuados han confirmado a este gen como el principal responsable de la transición de meristemo de inflorescencia a meristemo floral en la especie modelo (Weigel *et al*, 1992; Blázquez and Weigel, 2000). La alta similitud de secuencias entre *FA* y *LFY* ha hecho que se convierta en un plausible candidato para análisis sobre los mecanismos que determinan la identidad del meristemo floral en tomate.

Mutaciones de los genes *ANANTHA (AN)* y *COMPOUND INFLORESCENCE (S)* también modifican la identidad de los meristemas florales dando lugar a inflorescencias compuestas muy ramificadas (Rick and Butler, 1956; Allen and Sussex, 1996), indicando

errores en el desarrollo de los meristemas que emergen del meristemo de inflorescencia para especificar identidad floral. El análisis de dobles mutantes ha mostrado que *FA* actúa corriente arriba de *AN*, confirmando la función que desempeña el gen *FA* en la especificación de la identidad floral.



**Figura 2.** Representación esquemática de la arquitectura vegetativa y las estructuras reproductivas del tomate silvestre y algunos mutantes alterados en el proceso de transición floral y en el desarrollo de la inflorescencia (modificado a partir de Lozano *et al*, 2008)

El fenotipo del mutante *fa* se consigue también a través de la sobreexpresión del gen *SP* en los contextos genéticos del tomate silvestre y del mutante *sp*. Asimismo, la sobreexpresión de *SP* en el mutante *an* es capaz de modificar su naturaleza reproductiva y como consecuencia se desarrollan brotes vegetativos. Estos resultados indican que no se puede descartar una contribución del gen *SP* sobre el control de la identidad del meristemo floral. Además, los dominios de expresión de *SP* coinciden con los de *FA*, siendo este, al igual que *AN*, epistático a *SP* (Pnueli *et al*, 1998; Molinero-Rosales *et al*, 1999). Por

consiguiente, la regulación negativa que existe entre *LFY* y *TFL1* en *Arabidopsis* no es probable que ocurra entre *FA* y *SP* en tomate. En tomate, lo más probable es que *FA* regule la identidad floral activando *AN* y reduciendo la actividad de *SP* en los meristemas reproductivos (Lozano *et al*, 2008).

Tabla 6. Mutaciones de tomate que afectan a genes de identidad de meristemo

Mutante	Fenotipo	Gen aislado	Referencia	Ortólogo de Arabidopsis
<i>self-pruning (sp)</i>	Alteración en el desarrollo del meristemo simpodial.	<i>SP</i>	Yeager, 1927 Nueli et al, 1998	<i>TERMINAL FLOWER1</i>
<i>single flower truss (sft)</i>	Floración tardía, desarrollo simpodial alterado	<i>SFT (SPD3)</i>	Kerr, 1982 Lifschitz et al, 2006	<i>FLOWERING LOCUS T</i>
<i>lateral supresor (ls)</i>	Ausencia de meristemos axilares	<i>LS</i>	Rick and Butler, 1956 Schumacher et al, 1999	Familia génica <i>VHHD</i>
<i>blind (bl) = torosa (to)</i>	Ausencia de meristemos simpodiales	<i>BL</i>	Malayer and Guard, 1964 Schmitz et al, 2002	<i>RAX R2R3 Myb</i>
<i>falsiflora (fa)</i>	Floración tardía, pérdida de la identidad del meristemo floral	<i>FA</i>	Stubbe, 1963 Molineri Rosales et al, 1999	<i>LEAFY</i>
<i>uniflora (uf)</i>	Floración tardía, inflorescencia compuesta por una sola flor		Dielen et al, 1998	
<i>compound inflorescence (s)</i>	Floración tardía, alteración en el desarrollo del meristemo de inflorescencia		Quinet et al, 2006	
<i>anantha (an)</i>	Inflorescencias muy ramificadas, identidad del meristemo floral alterada		Allen and Sussex, 1996	
<i>jointless (j)</i>	Identidad del meristemo de inflorescencia alterada	<i>J</i>	Rick and Butler, 1956 Mao et al, 2000	<i>AGL24</i>

### 2.3.2. Desarrollo de los órganos florales

En el estado maduro, la flor simétrica y hermafrodita de tomate se compone de cuatro verticilos. El primer verticilo está compuesto por 5-6 sépalos, el segundo verticilo está compuesto por un número similar de pétalos, en el tercer verticilo hay 6 estambres que forman un cono alrededor del estilo y el cuarto verticilo lo compone un número variable de carpelos fusionados.

Los análisis genéticos en *Arabidopsis* y *Antirrhinum* han permitido proponer un modelo con tres funciones génicas (A, B y C), cada una de las cuales está codificada por un número reducido de genes que actúa en solitario o a través de interacciones para determinar identidad de órgano floral en los cuatro verticilos. El denominado modelo ABC (Coen and Meyerowitz, 1991; Meyerowitz *et al*, 1991) asume que mutaciones que afecten a genes de la clase A, B o C promueven cambios homeóticos en los órganos florales de dos verticilos consecutivos. Muchos de los genes ABC pertenecen a la familia MADS-box que codifica factores de transcripción. Las proteínas MADS se unen al DNA en forma de complejos multiméricos, controlando de esa forma el desarrollo de los órganos florales (Robles and Pelaz, 2005).

La caracterización de mutaciones homeóticas y de plantas transgénicas de anulación de función o de sobreexpresión de genes homólogos del tipo ABC ha confirmado este modelo en tomate (tabla 7). *MACROCALIX (MC)* es un homólogo de *API* de *Arabidopsis*, un gen de clase A (Vrebalov *et al*, 2002). La expresión de MC se detecta en sépalos y el silenciamiento de este gen en tomate provoca una conversión homeótica de sépalos a estructuras tipo hoja (Rick and Butler, 1956). Tanto el fenotipo mutante como el patrón de expresión de *MC* son muy similares a los de *SQUAMOSA (SQUA)*, el ortólogo de *API* en *Antirrhinum*.

Se han identificado diversos mutantes de clase B en tomate que exhiben transformaciones parciales o completas en el segundo y tercer verticilo floral (Nash *et al*, 1985; Sawhney, 1992). Entre ellos, *stamenless (sl)* y su mutante alélico *corollaless (cs)* desarrollan sépalos en vez de pétalos en el segundo verticilo y carpelos en vez de estambres en el tercer verticilo (Gómez *et al* 1999). *SL* es un gen de clase B homólogo a *DEFICIENS (DEF)* en *Antirrhinum* y *APETALA3 (AP3)* en *Arabidopsis*, ambos relacionados con el desarrollo de pétalos y estambres. Adicionalmente, entre los diversos

genes MADS-box de tomate (*TOMATO MADS BOX*, abreviado como *TM* o *TDR*), *TM6* también comparte homología con *AP3* (Gómez *et al*, 1999).

Hasta la fecha, no se han descrito mutantes que afecten a genes de clase C, es decir, mutantes con cambios homeóticos en los órganos reproductivos. Sin embargo, se ha clonado el gen *AGAMOUS1* de tomate (*TAG1*), un ortólogo del gen *AGAMOUS* (*AG*) de *Arabidopsis*. El fenotipo de las plantas transgénicas de tomate que sobreexpresan o silencian el gen *TAG1* corrobora el papel que desempeña este gen en la especificación de la identidad de los estambres y carpelos (Pnueli *et al*, 1994a).

Recientemente, el descubrimiento de dos nuevas clases de genes ha obligado a extender el modelo ABC. Los genes de clase D, que controlan la identidad de los óvulos, se describieron por primera vez en petunia tras la caracterización molecular y funcional de los genes *FLORAL BINDING PROTEIN7* (*FBP7*) y *FBP11* (Angenent *et al*, 1995). El gen de clase D de *Arabidopsis* es *SEEDSTICK* (*STK*) que, al igual que *FBP7* y *FBP11*, se expresa específicamente en óvulos (Pinyopich *et al*, 2003). Asimismo, se ha podido comprobar que los genes de clase A, B y C requieren una función adicional para que se produzca el adecuado desarrollo de los cuatro verticilos florales. Esa función la llevan a cabo los genes *SEPALLATA* (*SEP*) de clase E. Sobre la base de sus patrones de expresión y de sus fenotipos de anulación de función, *TM5* (Pnueli *et al*, 1994b) y *TM29* (Ampomah-Dwamena *et al*, 2002) han sido descritos como dos genes de tomate tipo *SEPALLATA*.

La actividad de genes de identidad de órgano floral parece depender de *FA* ya que los genes *TM5*, *TM6* y *TAG1* no se expresan en el mutante *fa* (Kato *et al*, 2005). Por tanto, *FA* desempeña un importante papel en el control de la identidad del meristemo floral, pero también promueve la inducción de genes de identidad de órgano floral.

### **2.3.3. Desarrollo del óvulo y del carpelo**

Teniendo en cuenta la importancia de los carpelos como órganos sexuales de la flor, protegiendo los óvulos y permitiendo la formación de las semillas, se ha dedicado mucho esfuerzo para identificar genes y proteínas implicados en la regulación del desarrollo del carpelo. Como se ha mencionado anteriormente, en *Arabidopsis*, el gen *AG* determina la identidad del carpelo, aunque requiere de la actividad de genes *SEPALLATA* (Pelaz *et al*, 2000). No obstante, se ha demostrado que se pueden desarrollar órganos carpeloideos en ausencia de actividad de *AG*, lo que indica que deben de existir rutas adicionales independientes de *AG* que pueden especificar el desarrollo del carpelo (Pinyopich *et al*,

2003). *SHATTERPROOF1 (SHP1)*, *SHP2* y *SEEDSTICK (STK)* son los genes que parece que actúan en estas rutas. De hecho, *AG* actúa de forma redundante con los genes *SHP* promoviendo el desarrollo del carpelo. Por otra parte, *AG*, *SHP* y *STK* desempeñan papeles redundantes en la especificación de la identidad del óvulo (Liljegren *et al*, 2000; Pinyopich *et al*, 2003; Favaro *et al*, 2003). Aunque no se han observado interacciones proteína-proteína entre los genes *AG*, *STK* y *SHP*, los tres interactúan con *SEP3*, lo que sugiere que las proteínas SEP median en la formación de un complejo proteico implicado en especificar identidad de óvulo y de carpelo (Favaro *et al*, 2003). Mediante la sobreexpresión y anulación de función de los genes MADS-box *FBP7* y *FBP11*, dos ortólogos de *STK* en petunia, se han confirmado sus funciones específicas en óvulos y sus interacciones con las proteínas tipo SEPALLATA, *FBP2*, *FBP5* y *FBP9* (Angenent *et al*, 1995; Ferrario *et al*, 2003).

En el tomate, algunos homólogos de los genes mencionados en el párrafo anterior están implicados en el desarrollo de los óvulos y carpelos (tabla 7). En efecto, los genes tipo *SEPALLATA TM5* y *TM29 (TAGL2)* regulan la identidad de los órganos florales y el desarrollo del fruto (Pnueli *et al*, 1994b; Ampomah-Dwamena *et al*, 2002). La anulación de función de esos genes *SEP* da lugar a alteraciones homeóticas en los tres verticilos internos parecidas a las que se producen en plantas transgénicas de petunia cuando no se expresan los genes *FBP2* y *FBP5*. Tras la fertilización, la expresión de *TM29* queda confinada al ovario, especialmente en semillas en desarrollo y haces vasculares.

Como se ha comentado anteriormente, *TAG1*, el ortólogo de *AG* en tomate, se requiere para el adecuado desarrollo de los carpelos en el cuarto verticilo de las flores (Pnueli *et al*, 1994a). Conviene indicar que se han aislado otros genes MADS-box tipo *AG* que se expresan a lo largo del desarrollo del fruto de tomate (Busi *et al*, 2003). Las secuencias de nucleótidos de *TAGL1* y *TAGL11* comparten una elevada similitud con *SHP1 (AGL1)* y *STK (AGL11)* respectivamente. Además, los patrones de expresión de *TAGL1* y *TAGL11* son muy similares, y sus transcritos se detectan primordialmente en los integumentos interiores del óvulo y en las paredes del carpelo. Estos resultados sugieren funciones solapadas de los dos genes en la especificación de la identidad del óvulo y en el control del desarrollo del fruto, tal y como ocurre con sus homólogos *SHP1* y *STK* en *Arabidopsis*. Experimentos llevados a cabo en levadura han revelado la formación de dímeros entre *TM29* y *TAG1*, *TAGL1* y *TAGL11*. Todos estos datos parecen indicar que las proteínas codificadas por *TM29*, *TAG1*, *TAGL1* y *TAGL11* desempeñan un papel

importante en la regulación de la expresión génica durante los primeros estadios del desarrollo del fruto, funcionando juntos como complejos transcripcionales (Busi *et al*, 2003). A pesar de que se trata de diferentes tipos de frutos (silicuas en *Arabidopsis*, bayas en tomate), los genes mencionados anteriormente comparten en ambas especies similitudes en estructura y función, así como patrones de expresión e interacciones comparables, lo que parece indicar que las rutas moleculares relacionadas con el desarrollo del fruto están muy conservadas (Lozano *et al*, 2008).

El desarrollo de una flor como una estructura verticilada y determinada implica que la determinación del meristemo floral podría ocurrir desde el momento en el que se ha adquirido la identidad del carpelo. En *Arabidopsis*, este proceso está regulado por *WUSCHEL* (*WUS*) y *SHOOTMERISTEMLESS* (*STM*) operando en diferentes dominios meristemáticos. El cese de la actividad en el meristemo floral depende de un proceso de retro-alimentación en el que están presentes los genes *WUS*, *LFY* y *AG*, de forma que los dos primeros activan la expresión de *AG*, pero cuando se ha completado el desarrollo de los órganos florales, *AG* reprime la actividad de *WUS* (Lohmann *et al*, 2001). En petunia, la formación de complejos multiméricos entre factores de transcripción MADS-box de las clases C, D y E podría ser la responsable de la represión de *TERMINATOR*, el gen homólogo a *WUS* en esta especie (Ferrario *et al*, 2006). Por lo que respecta a tomate, la anulación de función de *TAG1* promueve indeterminación de la flor y sustitución de los carpelos por estructuras florales ectópicas. Tales cambios homeóticos confirman el papel que desempeña *TAG1* en la determinación del meristemo floral (Pnueli *et al*, 1994a).

Recientemente, mediante aproximaciones de mapeo y análisis de genes candidatos del gen *FASCIATED* (*F*) se han obtenido interesantes datos sobre la actividad del meristemo floral en tomate (Tanksley, 2004). En este sentido, *F* afecta el tamaño del meristemo floral y alteraciones de su nivel de expresión promueven desarrollo de frutos multiloculares de gran tamaño. En cualquier caso, son necesarios más estudios sobre las interacciones genéticas entre el homólogo de *WU* en tomate y genes de identidad de meristemo floral (e.g: *FA* y *TAG1*). Estas interacciones podrían proporcionar evidencias sobre la conservación de rutas genéticas que regulan la determinación de los meristemas florales en diferentes especies vegetales (Lozano *et al*, 2008).

**Tabla 7. Mutantes y genes de tomate implicados en el desarrollo de la flor**

<b>Mutante o gen</b>	<b>Fenotipo</b>	<b>Gen</b>	<b>Referencia</b>	<b>Ortólogo de Arabidopsis</b>
Clase A <i>macrocalyx (mc)</i>	Sépalos largos, inflorescencia indeterminada	<i>LcMADS-MC (MC)</i>	Rick and Sawant, 1955 Verbalov et al, 2002	<i>APETALA1</i>
Clase B <i>stamenless (sl)</i>	Conversión homeótica de sépalos y estambres en sépalos y carpelos respectivamente	<i>SL</i>	Nash et al, 1985 Gomez et al, 1999	<i>APETALA3</i>
<i>TM6</i>	El silenciamiento de <i>TM6</i> altera el desarrollo de estambres	<i>TM6</i>	De Martino et al, 2006	<i>APETALA3-like</i>
Clase C <i>TAG1</i>	La anulación de función de <i>TAG1</i> ocasiona transformaciones homeóticas de estambres y carpelos	<i>TAG1</i>	Pnueli et al, 1994 <sup>a</sup>	<i>AGAMOUS</i>
Clase E <i>TM5</i>	La anulación de función altera la diferenciación de órganos en los tres verticilos internos	<i>TM5</i>	Pnueli et al, 1994b	<i>SEPALLATA3</i>
<i>TM29</i>	La anulación de función de <i>TM29</i> afecta al mantenimiento de la identidad del meristema floral (alteración en los tres verticilos internos)	<i>TM29</i>	Ampomah-Dwamena et al, 2002	<i>SEPALLATA</i>

#### 2.3.4. Desarrollo del fruto

Tras la fertilización de los óvulos, los carpelos se transforman en un órgano complejo que da lugar a un fruto maduro. El desarrollo del fruto asegura la dispersión de las semillas y la posterior supervivencia de la planta. Dependiendo de los mecanismos que facilitan la dispersión de la semilla, los frutos pueden ser clasificados como secos o carnosos. En frutos secos, la semilla puede ser dispersada por diferentes agentes externos (e.g.: aire, lluvia o contacto físico). Para ello, es necesario que previamente se establezca un programa de senescencia que conduzca en última instancia a la dehiscencia del fruto. Sin embargo, los frutos carnosos, y más concretamente sus componentes comestibles, resultan atractivos para animales, utilizándolos como parte de su dieta. Esto facilita la dispersión de las semillas sin ningún otro tipo de requerimiento. Las plantas de tomate producen frutos rojos carnosos como resultado de un proceso de desarrollo que incluye tres fases (Gillaspy *et al*, 1993). La primera fase comienza en el estadio de anthesis y está relacionada con el desarrollo del ovario y la decisión de abortar o continuar con el desarrollo del fruto (cuajado). En la segunda fase, el crecimiento del fruto ocurre principalmente como consecuencia de divisiones celulares, siendo en esta fase donde comienzan a desarrollarse los embriones. Finalmente, en la tercera fase cesa la división celular y el fruto continúa creciendo a través de la expansión celular hasta que alcanza el tamaño final. Una vez que el fruto está completamente desarrollado y las semillas alcanzan la madurez, aumenta significativamente la respiración y la síntesis de etileno, lo que conduce a la maduración. Como consecuencia, se producen cambios bioquímicos y fisiológicos que afectan al color, textura, sabor, aroma y contenido nutricional. Posteriormente, tiene lugar un proceso de reblandecimiento debido a la degradación de paredes celulares en diferentes compartimentos del fruto (Giovannoni, 2004). Por otra parte, el marcado incremento de la respiración y la elevada producción de etileno, características que ocurren usualmente en combinación desde el comienzo de la maduración, son específicos de los frutos climatéricos como el del tomate.

Teniendo en cuenta la importancia económica y nutricional de los frutos como componentes esenciales de las dietas de humanos y animales, se están realizando grandes esfuerzos para mejorar la producción y la calidad del fruto. *Arabidopsis* ha sido un excepcional modelo para el estudio de los factores genéticos, moleculares y hormonales que regulan el desarrollo y la dehiscencia de los frutos. Sin embargo, las contribuciones más que significativas en el campo de la regulación hormonal del crecimiento del ovario,

la fisiología de la maduración y el control genético del tamaño y la forma del fruto han convertido al tomate en el mejor sistema modelo para el estudio del desarrollo de frutos de tipo carnoso (Giovannoni, 2004; Tanksley, 2004; Gorguet *et al*, 2005).

### **2.3.5. Control hormonal del desarrollo del fruto y partenocarpia**

Según Gillaspay *et al* (1993), la fertilización de los óvulos desencadena que un ovario se desarrolle en fruto porque la germinación del polen genera el estímulo para que comience el crecimiento. Desde un punto de vista hormonal, las auxinas y las giberelinas son algunos de los reguladores que controlan el cuajado de un fruto. Además, las auxinas y el etileno controlan los estadios tempranos del desarrollo del fruto induciendo la expresión de varias familias génicas (Balbi and Lomax, 2003). Sin embargo, el cuajado de un fruto puede ocurrir en ausencia de fertilización, un evento fisiológico al que se le denomina partenocarpia y que concluye con el desarrollo de frutos sin semillas (Lukyanenko, 1991).

Los primeros estudios fisiológicos sugerían que la partenocarpia en tomate estaba relacionada con un desequilibrio en el control hormonal (ver Gorguet *et al*, 2005). El bajo nivel de citoquininas y giberelinas detectado en el mutante estéril de tomate *stamenless-2* sugiere que esas hormonas pueden alterar la fertilidad (Sawhney and Shukla, 1994). Siguiendo con esta línea de argumentación, cuando se altera de forma específica la ruta de señalización de citoquininas o giberelinas en anteras o polen de plantas transgénicas de maíz, tabaco y *Arabidopsis* se produce el aborto de estos órganos (Huang *et al*, 2003). Estos resultados parecen confirmar las implicaciones funcionales de las citoquininas y giberelinas en el desarrollo reproductivo de las plantas. Adicionalmente, se ha reportado que el ácido jasmónico y el etileno están implicados en la maduración del polen, dehiscencia de la antera y la antesis de la flor (ver referencias en Gorguet *et al*, 2005).

Por otro lado, las giberelinas desempeñan un papel clave durante el cuajado y desarrollo del fruto de tomate. Según García-Martínez *et al* (1991), las giberelinas producidas por las semillas en desarrollo promueven el desarrollo normal del fruto. De acuerdo con esto, la aplicación de giberelinas exógenas podría reemplazar el efecto de las giberelinas producidas por las semillas, dando lugar al cuajado y desarrollo de frutos partenocárpicos. Las auxinas también están implicadas en el desarrollo de frutos partenocárpicos. De hecho, la actividad enzimática relacionada con la biosíntesis de giberelinas está regulada por auxinas, siendo éstas además necesarias para mantener un nivel adecuado de giberelinas activas (García-Martínez *et al*, 1997; Ross *et al*, 2000).

Evidencias recientes han mostrado que las etapas tempranas del desarrollo del fruto en tomate dependen de genes cuya expresión está mediada por auxinas y etileno. Por tanto, es probable que las giberelinas estén implicadas en etapas posteriores del desarrollo del fruto y de las semillas, mientras que el resto de las hormonas regulen los primeros estadios de este proceso (Lozano *et al*, 2008).

Los mecanismos fisiológicos que desencadenan el desarrollo partenocárpico del fruto son hoy por hoy desconocidos. Sin embargo, la caracterización de mutantes partenocárpicos ha permitido entender mejor las bases moleculares y genéticas de este proceso (tabla 8). El mutante recesivo *pat* exhibe un desarrollo anormal de las flores y se caracteriza por un prematuro crecimiento del ovario, un número reducido de óvulos viables y un incremento del número de capas celulares en el pericarpio (Soressi and Salamini, 1975; Mazzucato *et al*, 1998). La mutación recesiva *pat-2* también induce partenocarpia (Philouze and Maisonneuve, 1978; Nuez *et al*, 1986), y tiene efectos pleiotrópicos sobre otros caracteres (e.g.: reducción del vigor de la planta, de la fructificación y de la producción) dependiendo del acervo genético. La tercera fuente genética de partenocarpia es de naturaleza multigénica y en ella participan los genes *pat-3* y *pat-4* como los más determinantes principales de este carácter (Nuez *et al*, 1986).

Se ha sugerido que la mutación *pat* podría estar relacionada con un gen que desempeña funciones homeóticas atendiendo a las similitudes que comparte el fenotipo del mutante con los observados en las plantas que exhiben menor nivel de expresión de los genes MADS-box *TM5* y *TM29* (Mazzucato *et al*, 1998). No obstante, aún no está claro si la partenocarpia está directamente regulada por proteínas TM o se debe a cambios de tipo hormonal relacionados con el desarrollo anormal de los órganos reproductivos. Lozano *et al* (1998) comprobaron que niveles permanentes de expresión del gen *TM4* (*TDR4*), un gen de tomate homólogo a *FUL*, incrementan notablemente el crecimiento de frutos partenocárpicos bajo condiciones de bajas temperaturas. De forma similar, en flores tratadas con GAs, (que suelen dar lugar a frutos partenocárpicos) se observa un considerable incremento del nivel de transcritos de *Le-DEF*, un gen MADS-box de clase B de tomate requerido para el desarrollo de pétalos y estambres. Estos resultados sugieren que los cambios en los niveles de expresión de genes MADS-box mediados por las giberelinas podrían ser el origen de la partenocarpia en tomate, ya sea regulando el desarrollo de los órganos reproductivos (estambres o carpelos) o a través de cambios en la señalización o biosíntesis de las GAs. Adicionalmente, las interacciones con *PAT* pueden

regular el desarrollo sincrónico del polen y del ovario y, por tanto, la formación del fruto. Beraldi *et al* (2004) han cartografiado recientemente el gen *PAT*, lo que podría conducir no sólo a su clonación sino también al análisis más detallado de las interacciones genéticas que regulan el desarrollo de los frutos partenocárpicos.

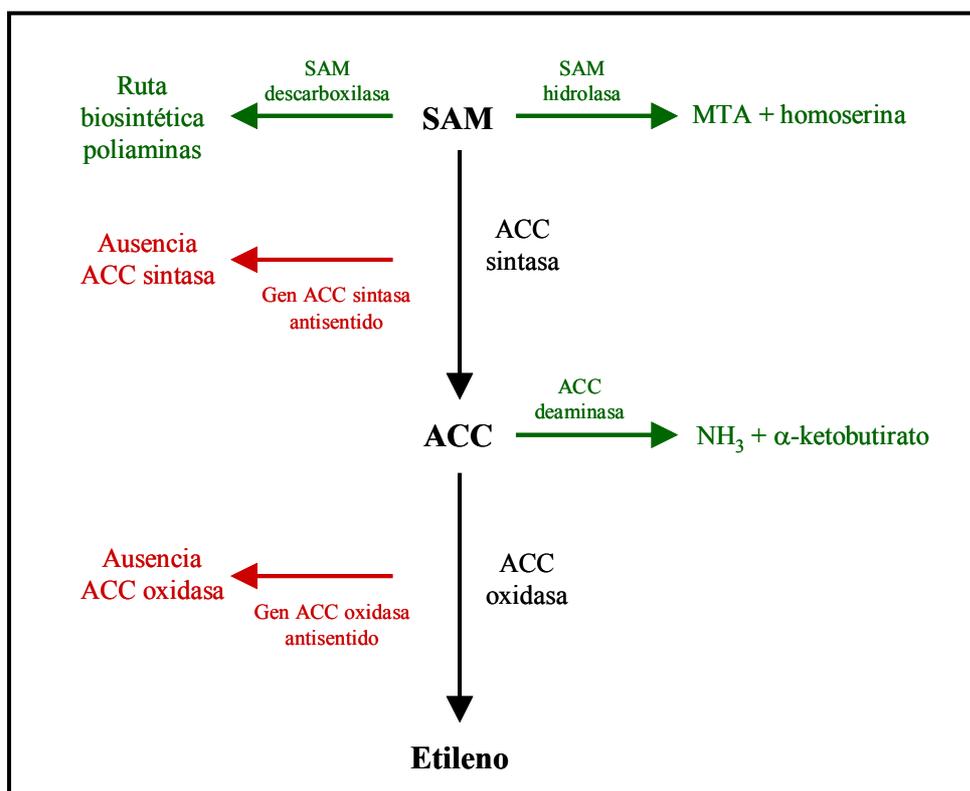
El incremento de los niveles biosintéticos de GAs observado en *pat2* y *pat3/pat4* podría ser el responsable del desarrollo de frutos de tipo partenocárpico de estos mutantes (Fos *et al*, 2000; Fos *et al*, 2001). Se ha comprobado que el alelo mutante *lateral supressor* inhibe el desarrollo de frutos partenocárpicos en *pat-2* (Philouze, 1983), de lo que se deduce que este proceso en el mutante *pat2* requiere de la actividad del gen *LATERAL SUPRESSOR*. El resultado concuerda con la función propuesta para *LS* como regulador de la sensibilidad a GAs (Schumacher *et al*, 1999). Por tanto, los mecanismos que explican el desarrollo partenocárpico en *pat2* y *pat3/pat4* podrían estar relacionados con cambios en la regulación de las GAs.

Considerados globalmente, estos resultados indican que la partenocarpia es un proceso del desarrollo complejo que está regulado por factores genéticos, ambientales y hormonales. Su interés científico y genético podría promover esfuerzos adicionales con el fin de elucidar las bases genéticas y moleculares de los mecanismos que desencadenan el desarrollo de un fruto partenocárpico.

### **2.3.6. Regulación genética de la maduración del fruto**

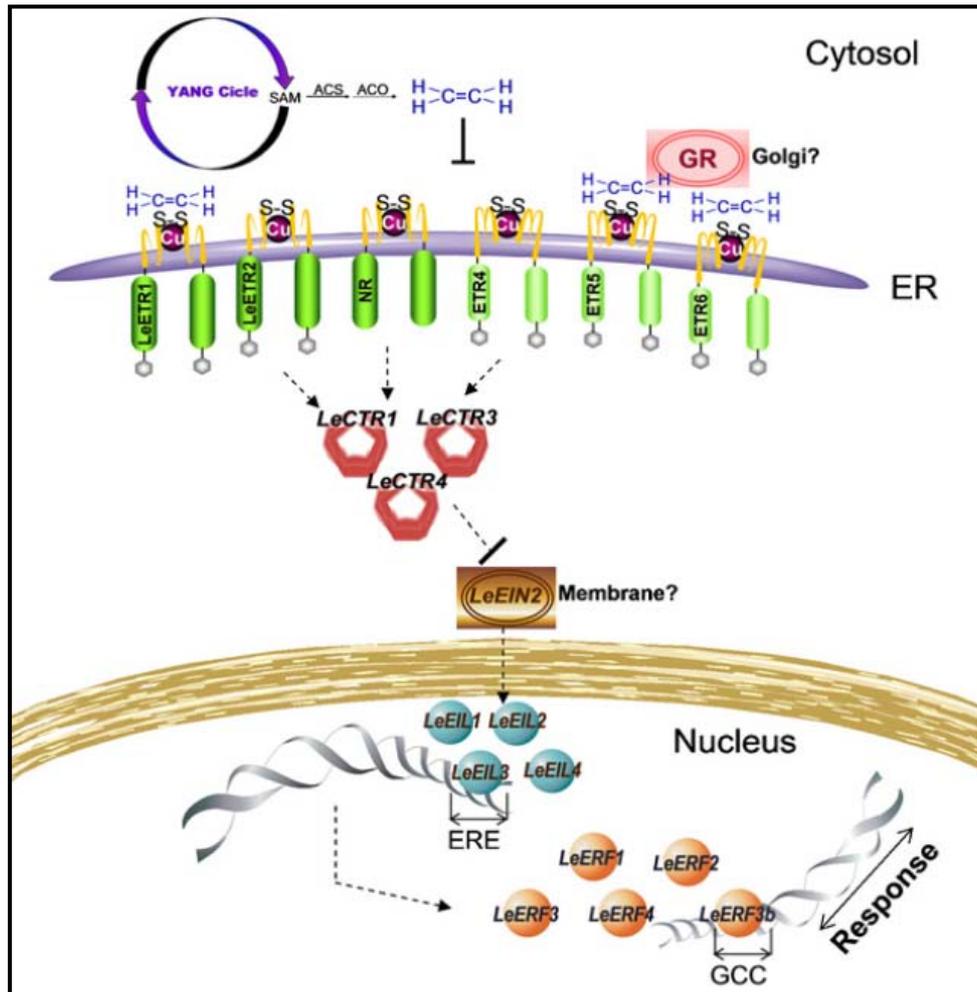
La maduración en tomate se produce cuando el desarrollo del ovario ha finalizado y las semillas son maduras. Estudios fisiológicos han determinado que el proceso de maduración se caracteriza por una elevada respiración y por la síntesis autocatalítica de etileno (Lelievre *et al*, 1997). La síntesis autocatalítica de etileno es el principal determinante de los cambios fenotípicos que alteran el color, textura, aroma y susceptibilidad a patógenos en el fruto. Teniendo en cuenta la importancia del etileno en este proceso, muchos de los trabajos de investigación en este campo se han realizado con genes implicados en la regulación dependiente de etileno, principalmente los relacionados con la biosíntesis, percepción y señalización de esta hormona (figuras 3 y 4).

Por lo que respecta a la biosíntesis, el etileno se sintetiza a partir de S-adenosilmetionina (SAM). La etapa limitante de la ruta es la síntesis de ácido-1-aminociclopropano-carboxílico (ACC), catalizado por la ACC sintasa. La última etapa de la vía la cataliza una oxidasa (ACC oxidasa) que requiere oxígeno como sustrato. Las primeras estrategias para tratar de retrasar la maduración de los frutos han estado relacionadas con la alteración de genes implicados en esta ruta (figura 3).



**Figura 3.** Síntesis y alteración de los niveles de etileno a partir del SAM (revisado por Stearns and Glick, 2003). En verde, enzimas que degradan los precursores de la síntesis de etileno. El enzima SAM descaboxilasa convierte el SAM en SAM descaboxilado que puede ser usado para la síntesis de poliaminas (Kumar *et al*, 1996). El enzima SAM hidrolasa convierte el SAM en 5' metil-tioadenosina (MTA) y homoserina (Good *et al*, 1994). El enzima ACC deaminasa, descubierto en microorganismos del suelo (Honma and Shimomura, 1978), convierte el ACC en amonio (NH<sub>3</sub>) y α-ketobutirato. Mayores niveles de expresión de estos enzimas reducen la disponibilidad de precursores para la síntesis de etileno. En rojo, se representan las estrategias para reducir los niveles de etileno sobre la base de la anulación de función de los dos enzimas de la ruta de biosíntesis de esta hormona. Todas estas estrategias han sido muy útiles para modificar la producción de etileno en plantas transgénicas.

Por otro lado, ya se ha identificado la mayor parte de los componentes de la ruta de percepción y señalización del etileno en tomate (figura 4) sobre la base de los estudios previos llevados a cabo en *Arabidopsis*.



**Figura 4.** Percepción del etileno y transducción de señales en tomate (revisado por Cara and Giovannoni, 2008). El etileno se une a la familia de receptores (representado en la gráfica como *LeETR1*, *LeETR2*, *NR*, *LeETR4*, *LeETR5* y *LeETR6*) mediante un cofactor de cobre. Los iones de cobre son suministrados a los receptores a través de un transportador de cobre (*RAN1* – Hirayama *et al*, 1999). Las proteínas CTR1 de tomate (*LeCTR1*, *LeCTR3* y *LeCTR4*) son reguladores negativos de la ruta. Tras la inactivación de las proteínas CTR1, se activa una cascada MAPK que activa la señalización por etileno a través de *LeEIN2* y proteínas tipo EIN3 (*LeEIL1*-*LeEIL4*). Los factores de transcripción *LeEIL* activan un segundo grupo de factores de transcripción (representado por *LeERF1*-*LeERF4*) que activan los genes diana de respuesta a etileno.

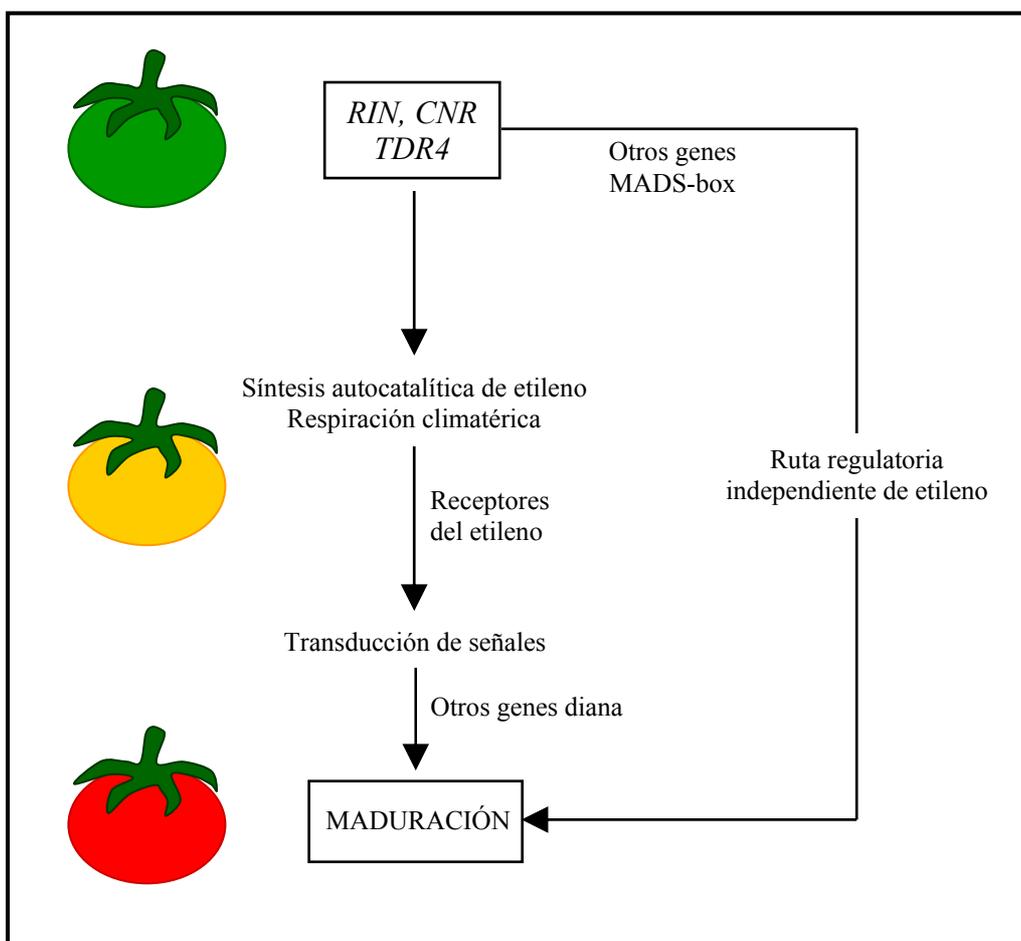
ETR: Ethylene receptor; CTR: Constitutive triple response; EIN: Ethylene insensitive; EIL: EIN3-like; ERF: Ethylene response factor.

En esta especie, el etileno es percibido por una familia de seis receptores de etileno. Uno de esos receptores se identificó a partir del mutante *Never-ripe* (*Nr*) de tomate. Se ha podido comprobar que el gen *NR* (*Le-ETR3*) codifica una proteína homóloga al receptor de etileno de *Arabidopsis ETR1* (Wilkinson *et al*, 1995; Hackett *et al*, 2000). Asimismo, se ha observado que la transformación genética de tomate con la versión mutada del gen *ETR1* (*etr1-1*) de *Arabidopsis* da lugar a plantas que exhiben un retraso de la maduración de los

frutos (Wilkinson *et al*, 1997). El resto de los receptores en tomate se han clonado por homología de secuencias con los genes *ETR1* y *ETR2* de *A. thaliana* y *NR* de tomate (Lashbrook *et al*, 1998; Tieman and Klee, 1999; Klee and Tieman, 2002). Corriente abajo de los receptores de etileno se encuentra una familia de reguladores negativos (proteínas kinasas) de la respuesta a etileno codificada por los genes *CTR*. A diferencia de lo que ocurre en *Arabidopsis*, con sólo un gen *CTR* (*CTR1*), en tomate se han identificado tres genes *CTR*: *LeCTR1*, *LeCTR3* y *LeCTR4* (Leclercq *et al*, 2002; Adams-Phillips *et al*, 2004). Corriente abajo, se encuentra la cascada de señalización del etileno iniciada por *LeEIN2*. En *Arabidopsis*, la pérdida de función de *EIN2* da lugar a insensibilidad a etileno, indicando la importancia de este gen en la ruta de señalización del etileno (Chen and Bleeker, 1995). En este sentido, Zhu *et al* (2006) demostraron que la anulación de función de *LeEIN2* da lugar a ausencia de maduración en tomate. Corriente abajo se encuentra una familia de factores de transcripción compuesta por 4 genes tipo *EIN3* (*Le-EIL1-LeEIL4*) (Tieman *et al*, 2001; Yokotani *et al*, 2003). Actuando corriente debajo de los anteriores se encuentra la familia *ERF* (factores de respuesta a etileno). En tomate se han descrito cinco genes pertenecientes a esta familia (*LeERF1*, *LeERF2*, *LeERF3*, *LeERF4* y *LeERF3b*) capaces de unirse a cajas box del tipo GCC de los genes regulados por etileno (Cara and Giovannoni, 2008).

Por otro lado, existe una serie de genes que actúan corriente arriba o en paralelo a la ruta regulada por etileno y que intervienen de forma dramática en el proceso de maduración del fruto de tomate. Entre ellos, el gen *TDR4* está relacionado con el desarrollo del fruto de tomate (Seymour *et al*, 2002; Busi *et al*, 2003) y codifica un factor de transcripción tipo *SQUAMOSA*. *TDR4* se expresa en el meristemo floral a lo largo de sus primeros estadios de desarrollo, mientras que en estadios posteriores a la antesis se acumula principalmente en óvulos y paredes del carpelo. Tras la fructificación y a lo largo de la fase de división celular, la expresión de *TDR4* se observa en diferentes tejidos del ovario. Aunque el nivel de expresión parece ser menor durante el desarrollo del fruto, cuando se inicia la maduración se detectan niveles elevados del mensajero de este gen. Teniendo en cuenta los patrones de expresión y sobre la base de la homología de secuencias, Seymour *et al* (2002) propusieron que *TDR4* podría ser el ortólogo de *FRUITFULL* (*FUL*) de *Arabidopsis*. Sin embargo, la formación de dímeros *TDR4-TM29* y *TDR4-TAG1* que describió Busi *et al* (2003) apoya la hipótesis que sugiere que este gen participa como un factor de unión entre el desarrollo de la flor y el fruto. De hecho, los

genes MADS-box de tomate implicados en el desarrollo del fruto se expresan también en diferentes estadios del desarrollo de la flor, lo que sugiere que el desarrollo del fruto y las semillas pueden ser considerados como una continuación del programa del desarrollo floral. *TM29*, *TAGL1* y *TAGL11* se inducen inmediatamente después de la antesis en el ovario (Busi *et al*, 2003). Esto los convierte en candidatos a participar en las rutas de señalización que desencadenan el desarrollo del fruto (figura 5).



**Figura 5.** Regulación genética de la maduración en tomate. Los factores de transcripción codificados por *RIN* y *CNR* están implicados en el control de la maduración mediado por etileno, pero también participan en una ruta independiente de etileno. Presumiblemente, el gen *TDR4* también está implicado en este mecanismo de control de la maduración. Aún quedan por descubrir otros reguladores y genes diana. Los receptores de etileno implicados en la transducción de señal promueven una cascada de activación génica que permite la maduración de los frutos de tomate (modificado a partir Lozano *et al*, 2008)

Conviene indicar no obstante que existen otras similitudes entre *FUL* y *TDR4* que deben ser aún analizadas, particularmente la existencia de interacciones genéticas de *TDR4* con genes MADS-box implicados en la maduración del fruto, interacciones que son parecidas a las que ocurren entre *FUL* y genes *SHP* (Lozano *et al*, 2008).

Algunas de las evidencias de un control transcripcional del desarrollo del fruto proceden de la caracterización de mutantes alterados en el proceso de maduración (revisado por Giovannoni, 2004 y 2007). Entre ellos, los mutantes *ripening-inhibitor* (*rin*), *non-ripening* (*nor*) y *Colorless non-ripening* (*Cnr*) desarrollan frutos incapaces de madurar (tabla 8) incluso después de un tratamiento con etileno. Además, estos mutantes comparten una serie de características, como la ausencia de producción de etileno y el incremento de respiración climatérica (Vrebalov *et al*, 2002; Giovannoni *et al*, 2004; Manning *et al*, 2006). Estos resultados indican que los genes afectados *RIN*, *NOR* y *CNR* promueven maduración en el fruto a través de una ruta reguladora que actúa corriente arriba de la biosíntesis y señalización del etileno. Adicionalmente, los cambios de expresión de genes regulados por etileno en los frutos de los mutantes *rin*, *nor* y *Cnr* (Giovannoni, 2007) indicarían que *RIN*, *NOR* y *CNR* podrían participar también en una ruta independiente de etileno (figura 5). *RIN* es un gen MADS-box de tipo SEP cuyo alelo mutante recesivo está causado por una deleción parcial que da lugar a un transcrito quimérico (Vrebalov *et al*, 2002). La mutación *Cnr* promueve una alteración dominante epigenética (epimutación) en el promotor de un gen SBP-box (Manning *et al*, 2006), mientras que el gen *NOR* codifica un factor de transcripción de tipo NAC (Giovannoni *et al*, 2004).

Las interacciones genéticas entre los reguladores de la maduración y otros genes relacionados con el desarrollo del fruto están siendo elucidados, aunque las relaciones jerárquicas entre las proteínas codificadas por estos genes son desconocidas. El nivel de transcrito de *TDR4* aumenta en los frutos de tomate cuando empiezan a madurar (Seymour *et al*, 2002; Eriksson *et al*, 2004). En los mutantes *rin*, *nor* y *Cnr* se produce una reducción del nivel de expresión de *TDR4*. La pérdida de función de *TDR4* produce un pequeño incremento de la firmeza de la pared celular en los frutos, lo que concuerda con el papel que desempeña *TDR4* en la regulación de la estructura de la pared celular (Eriksson *et al*, 2004). Además, se ha podido comprobar que la inactivación de *TDR4* mediante la estrategia de RNAi genera frutos incapaces de madurar (Angosto *et al*, datos no publicados). Por ello, se ha propuesto que el gen *TDR4* podría ser uno de los candidatos para regular el proceso de maduración junto con *RIN*, *NOR* y *CNR* (Eriksson *et al*, 2004). La formación de dímeros entre *TDR4* y otras proteínas MADS-box (*TM29* y *TAG1*) detectados mediante análisis de doble híbrido en levadura podrían ser extendidos a *RIN*, como un mecanismo hipotético de control de la maduración similar al que opera para la especificación de la identidad de los órganos florales (Giovannoni, 2004). En este sentido,

se ha propuesto una interacción entre las proteínas CNR y TDR4 (Manning *et al*, 2006) sobre la base de la habilidad que tienen los productos génicos SBP-box para interactuar con las secuencias del promotor *SQUAMOSA*. La expresión de *RIN* y *NOR* no se ve afectada en los frutos del mutante *Cnr*, lo que sugiere que están actuando en una ruta separada de *CNR* o corriente arriba en la cascada de maduración (Eriksson *et al*, 2004; Giovannoni, 2007).

Tabla 8. Mutantes y genes de tomate implicados en el desarrollo del fruto

Mutante o gen	Fenotipo	Gen	Referencia	Ortólogo de Arabidopsis
<i>pat</i>	Frutos partenocárpicos, alteraciones homeóticas de los órganos florales reproductivos		Soressi and Salamini, 1975 Mazzucato et al, 1998	
<i>pat-2</i>	Frutos partenocárpicos (niveles de GAs alterados)		Phylouze and Maisonneuve, 1978 Fos et al, 2000	
<i>pat-3 / pat-4</i>	Frutos partenocárpicos (niveles de GAs alterados)		Nuez et al, 1986 Fos et al, 2001	
<i>TM29</i>	Frutos partenocárpicos	<i>TM29</i>	Ampomah-Dwamena et al, 2002	<i>SEPALLATA</i>
<i>TDR4</i>	Su silenciamiento génico altera la estructura de la pared celular del fruto y éste no es capaz de completar el proceso de maduración	<i>TDR4</i>	Seymour et al, 2002 Eriksson et al, 2004 Angosto et al (no publicado)	<i>FRUITFULL</i>
<i>nor</i>	Frutos que no maduran	<i>NAC</i>	Tigchelaar et al, 1978 Giovannoni et al, 2004	<i>NAC domain TF</i>
<i>rin</i>	Frutos que no maduran	<i>LeMADS-RIN (RIN)</i>	Dostal et al, 1974 Vrebalov et al, 2002	<i>SEPALLATA-like</i>
<i>Cnr</i>	Frutos que no maduran, pérdida de adhesión celular	<i>LeSPB-CNR (CNR)</i>	Thompson et al, 2006 Manning et al, 2006	<i>SBL3</i>

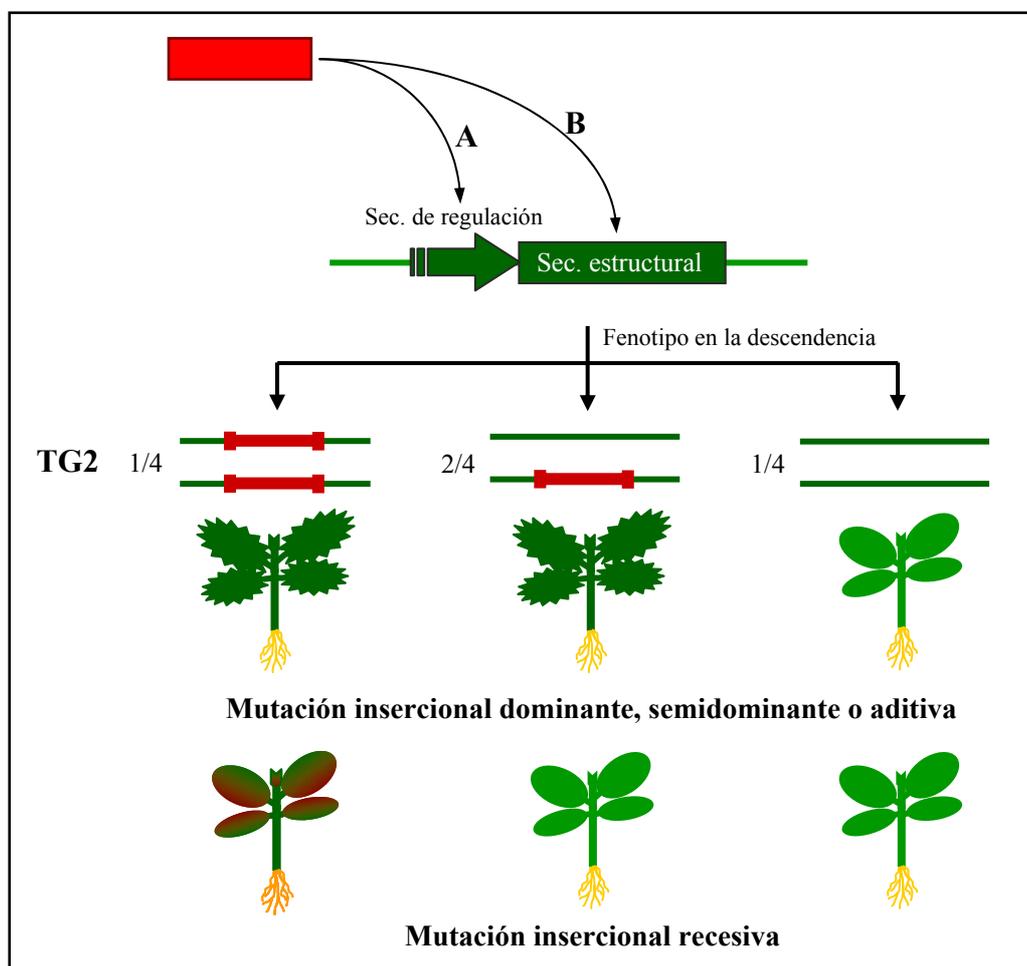
## 2.4. Consideraciones en torno a la genética del desarrollo en tomate

En las últimas dos décadas se han conseguido notables avances en el campo de la genética del desarrollo del tomate. La clonación y análisis funcional de genes de tomate homólogos a los de otras especies modelo (e.g.: *Arabidopsis*, *Anthirrinum*, *Petunia*) ha revelado que muchos procesos del desarrollo están controlados por genes y proteínas altamente conservados entre especies. Sin embargo, las características específicas del tomate parecen requerir nuevas funciones génicas. En este sentido, muchos de los procesos relacionados con el desarrollo aún son desconocidos en esta especie. Caracteres como la arquitectura de planta, precocidad, androesterilidad, partenocarpia o la maduración y conservación post-cosecha del fruto, tienen una gran importancia agronómica y dependen del establecimiento de patrones de desarrollo adecuados que, a su vez, están finamente regulados por distintos genes capaces de responder a señales endógenas y otras de naturaleza ambiental. Por esta razón, la identificación y caracterización funcional de nuevos genes implicados en los procesos del desarrollo suscita un enorme interés, tanto desde un punto de vista científico como aplicado, ya que se podrían establecer las bases para la mejora específica de caracteres de relevancia comercial en esta especie.

Desde un punto de vista metodológico, la identificación de nuevos genes se puede abordar por diferentes vías, entre las cuales el análisis genético y molecular de mutantes constituye una de las más exitosas. En el caso del tomate, la colección del ‘Tomato Genetic Resource Center’ (TGRC, Univ. California, Davis: <http://tgrc.ucdavis.edu>) incluye 1023 mutantes espontáneos y variantes naturales correspondientes a 625 *loci*. El empleo de estos mutantes ha posibilitado el aislamiento de genes como *LS* y *FA*, entre otros. Recientemente, se han generado poblaciones de mutantes inducidos a través de neutrones rápidos (Verkerk, 1971; Emmanuel and Levy, 2002; Menda *et al*, 2004), EMS (Menda *et al*, 2004; Watanabe *et al*, 2007) y radiación gamma (Matsukura *et al*, 2007). No obstante, teniendo en cuenta la escasez de información genética disponible y el nivel incipiente de la genómica funcional en esta especie, clonar los genes en las colecciones antes descritas resulta técnicamente complicado, debiéndose recurrir a estrategias de mapeo posicional y/o genes candidatos. Alternativamente, la mutagénesis insercional representa una de las alternativas más prometedoras para la identificación y caracterización funcional de los genes que regulan dichos procesos (Emmanuel and Levy, 2002), tal y como está ocurriendo en *Arabidopsis* (Alonso and Ecker, 2006), arroz (Jung *et al*, 2008) o maíz (Candela and Hake, 2008).

### 3. LA MUTAGÉNESIS INSERCIONAL COMO HERRAMIENTA DE GENÓMICA FUNCIONAL

La mutagénesis insercional es una herramienta biotecnológica en la que se asocian el análisis genético tradicional y las técnicas modernas de genética molecular con el objetivo de identificar, clonar y caracterizar funcionalmente el gen mutado. Esta estrategia se basa en el hecho de que un inserto transgénico (transposón o T-DNA) se puede utilizar como ‘agente mutagénico’ para la obtención de líneas de pérdida o alteración de función en plantas. En efecto, la integración del inserto en la vecindad de un gen endógeno o la disrupción del mismo pueden ocasionar la alteración o anulación de su función (figura 6).



**Figura 6.** Efecto mutagénico provocado por la integración del T-DNA en un gen endógeno. A) La integración en la secuencia de regulación puede alterar la expresión nativa del gen. Puede ocurrir que alguna de las secuencias de regulación del T-DNA controle la expresión del gen endógeno. Si es así, se pueden generar mutantes de inserción con efectos de tipo dominante, semidominante o aditivo. Si no es así, se podrían generar mutantes de naturaleza recesiva como consecuencia de la inactivación de la secuencia de regulación del gen endógeno. B) La integración del T-DNA en la secuencia estructural del gen provoca la disrupción del mismo. En este caso, lo más normal es que se generen mutantes de anulación de función o mutantes ‘knockout’ que típicamente suelen ser recesivos.

Un punto crucial en la estrategia de la mutación insercional es el grado de saturación, es decir, la necesidad de obtener un elevado número de líneas para que haya una cierta probabilidad de que al menos haya una inserción en cada gen. Según Bouchez y Hofte (1998), en *A. thaliana* harían falta unos 120.000 insertos independientes para obtener un nivel de saturación del 95% (probabilidad de que cualquier gen estuviese afectado al menos una vez). En todo caso, cuando esta estrategia se aplica en una especie de interés agronómico, no se trata de etiquetar todos y cada uno de los genes del genoma, sino de llegar a identificar algunos de los genes que controlan los caracteres de interés agronómico.

### **3.1. Mutagénesis con transposones**

Los transposones son elementos genéticos móviles que pueden moverse de un sitio a otro a través del genoma. La utilización de transposones tiene la enorme ventaja de que se pueden generar otras líneas a partir de las existentes por removilización del elemento insertado a un lugar diferente con respecto a la localización que ocupaba el inserto original. El cambio de posición del elemento transponible puede provocar la disrupción de un determinado gen, generando un fenotipo mutante de pérdida de función. De igual manera, si el elemento transponible estaba provocando la disrupción de un determinado gen, al cambiar de posición se puede recuperar la función del mismo.

Mediante el uso de los elementos móviles *Ac/Ds* se han podido aislar genes en petunia, tabaco, *Arabidopsis*, tomate y lino (Sundaresan, 1996). En uno de los primeros ensayos se puso de manifiesto la actividad del sistema *Ac* a través de sucesivas generaciones en plantas transgénicas de tabaco (Hehl y Baker, 1990). Más tarde, se pudieron observar resultados similares en petunia (Robbins *et al.*, 1994). En un trabajo más reciente, se utilizó el sistema heterólogo *Ac* dotado de una transposasa para generar mutaciones insercionales en arroz (Enoki *et al.*, 1999). También resulta interesante la explotación de los elementos *Mu* del maíz, que se caracterizan por la excepcional frecuencia de inducción de mutaciones germinales así como por la diversa naturaleza de los mutantes aislados. Son particularmente interesantes los efectos de los elementos *Mu-1* que muestran una capacidad de inserción preferencial en regiones ricas en citosina no metilada, que coincide con la presencia de secuencias únicas, de bajo número de copias y sobre todo codificantes (Bennetzen *et al.*, 1993). Por esta razón, este sistema se ha convertido en uno de los preferidos para la obtención de mutantes insercionales de maíz (Cresse *et al.*, 1995).

En tomate, los experimentos de mutagénesis insercional con transposones se han llevado a cabo principalmente con el sistema *Ac/Ds*, tras demostrarse que en esta especie esos elementos transponibles eran perfectamente activos (Yoder *et al*, 1988; Yoder, 1990; Osborne *et al*, 1991; Rommens *et al*, 1992; Carroll *et al*, 1995). El primer gen clonado mediante esta estrategia fue *Cf-9* (Jones *et al*, 1994), relacionado con la resistencia a diferentes razas de *Cladosporium fulvum*. Posteriormente, se han clonado los genes *Dwarf*, que codifica para un citocromo P<sub>450</sub> (Bishop *et al*, 1996), *DCL* (*DEFECTIVE CHLOROPLASTS AND LEAVES*), que controla el desarrollo de los cloroplastos (Keddie *et al*, 1996), *FEEBLY*, relacionado con metabolismo y desarrollo (van der Biezen *et al*, 1996), *DEM* (*DEFECTIVE EMBRYO AND MERISTEMS*), requerido para la organización del tejido apical durante el desarrollo de los embriones así como para el correcto patrón de divisiones celulares y mantenimiento del meristemo en la raíz (Keddie *et al*, 1998), y *Cf-4*, relacionado con la resistencia a *Cladosporium fulvum* (Takken *et al*, 1998).

Meissner *et al* (2000) reportaron la obtención y el análisis de una colección de 2932 familias de tomate (Microtom) con el sistema *Ac/Ds*. En este trabajo, los autores describieron la identificación de 10 mutantes que exhibían un patrón de segregación 3:1, indicando que la mutación estaba ocasionada por un simple alelo recesivo. No obstante, Meissner *et al* (2000) señalaron que sólo en uno de los mutantes se producía co-segregación entre elemento *Ds* y el fenotipo mutante. Los autores discuten que el bajo número de mutantes insercionales identificados (1 a partir de 2932 familias) podría deberse a la elevada actividad del elemento *Ds*, con frecuencias de escisión del 60%. A partir de esta colección, recientemente se clonó el gen *TAP3* (homólogo del gen de *Arabidopsis AP3*), un factor de transcripción de la familia MADS-box requerido para la especificación de la identidad de pétalos y estambres.

Por otro lado, Gidoni *et al* (2003) han generado una colección de 405 líneas transgénicas de tomate con la construcción multifuncional pJasm13, que contiene un T-DNA y el elemento transponible *Ds* (modificado). A partir de esta colección se ha clonado el gen *Tm-2<sup>2</sup>*, que confiere resistencia al virus del mosaico del tomate (Lanfermeijer *et al*, 2003).

Un aspecto negativo en relación con el uso de ciertos transposones (e.g.: elemento *Ac*) es la tendencia a transponerse preferentemente en posiciones del mismo cromosoma. Este hecho se ha observado en maíz (Greenblatt, 1984; Dooner and Belachew, 1989), tabaco (Jones *et al*, 1990; Dooner *et al*, 1991) y *Arabidopsis* (Keller *et al*, 1993).

### 3.2. Mutagénesis con T-DNA

Este método, que fue aplicado por primera vez en *Drosophila melanogaster* (Ballinger y Benzer, 1989; Kaiser y Goodwin, 1990), ha sido aplicado con éxito en diferentes sistemas vegetales (Bensen *et al.*, 1995; Koes *et al.*, 1995; Mckinney *et al.*, 1995; Krysan *et al.*, 1996; Mena *et al.*, 1996; Frey *et al.*, 1998). En comparación con el sistema de mutagénesis con transposones, el T-DNA tiene la enorme ventaja de que sus inserciones son química y físicamente estables a lo largo de las generaciones (Radhamony *et al.*, 2005). Uno de los éxitos de esta estrategia para generar mutantes está relacionado con los sitios de inserción del T-DNA. Según Franzmann *et al.* (1995), la distribución del T-DNA a lo largo del genoma es aleatoria (al menos hasta cierto punto), ya que no existen puntos calientes o preferenciales de integración. En arroz se ha podido demostrar que el T-DNA es menos propenso a la integración en puntos calientes si se compara con los patrones de integración de los transposones *Tos17* y *Ds* (Miyao *et al.*, 2003, Kolesnik *et al.*, 2004; Sallaud *et al.*, 2004). Alonso *et al.* (2003) indicaron que la integración del T-DNA en *Arabidopsis* no parece exhibir preferencia por ningún grupo funcional de genes. Según An *et al.* (2005), la integración del T-DNA en arroz no parece estar ligada a ninguna clase de genes; en cambio, ciertos transposones (e.g.: *Tos17*) suelen tener preferencia por determinadas clases de genes (e.g.: proteínas kinasas). No obstante, tal y como se señaló en su día (André *et al.*, 1986; Koncz *et al.* 1989; Herman *et al.*, 1990), la idea que subyace es que el T-DNA suele integrarse preferentemente en regiones transcripcionalmente activas. El análisis de las secuencias flanqueantes al T-DNA en *Arabidopsis* parece indicar que las inserciones ocurren principalmente en regiones ricas en AT (Brunaud *et al.*, 2002; Qin *et al.*, 2003). Concretamente en tomate, el análisis de las secuencias flanqueantes a 174 insertos de T-DNA indicaron que en un 40% de los casos (69 insertos) la inserción ocurría en genes que se transcriben (Gidoni *et al.*, 2003). En relación con este aspecto, no se puede descartar que la preferencia del T-DNA por zonas ricas en genes se deba en parte al sistema de selección de las líneas transgénicas, ya que normalmente se suelen seleccionar aquellas que portan insertos funcionales. En este sentido, el propio sistema de selección (e.g.: resistencia a un antibiótico) elimina todos aquellos eventos de integración que no se expresan y que podrían estar localizados en otros sitios muy diversos del genoma de la planta.

Conviene indicar que la mayor parte de estos análisis se han efectuado en la especie modelo por excelencia (*Arabidopsis*), y por tanto los datos podrían no ser extrapolables a otras especies. Por ejemplo, se ha descrito que en *Arabidopsis* el T-DNA tiene tendencia a

integrarse en regiones intergénicas (Sessions *et al*, 2002; Alonso *et al*, 2003). En arroz, por el contrario, lo que se ha observado es que el mayor número de eventos de inserción suele ocurrir cerca del codón de inicio ATG (An *et al*, 2003; Chen *et al*, 2003; Sallaud *et al*, 2004). En cualquier caso, los análisis que se están efectuando en arroz están poniendo de manifiesto las ventajas de emplear una estrategia basada en el empleo de T-DNAs que habían sido observadas previamente en *Arabidopsis*. En este sentido, en ambas especies se ha observado una amplia distribución de los insertos a lo largo del genoma, bajas frecuencias de integración en regiones repetidas e integración preferente en zonas ricas en genes. Este tipo de ventajas convierten al T-DNA en un mutágeno insercional idóneo.

Hoy en día, existe un elevado número de líneas de T-DNA de *Arabidopsis* y arroz (tabla 9) y, aunque en menor escala, la estrategia está siendo utilizada en otras especies como *Lotus japonicus* (Webb *et al*, 2000), *Medicago truncatula* (Trieu *et al*, 2000; Scholte *et al*, 2002), tomate (Mathews *et al*, 2003; Gidoni *et al*, 2003), *Salvia miltiorrhiza* (Lee *et al*; 2008), *Brachypodium distachyon* (Vain *et al*, 2008), álamo (Harrison *et al*, 2007, Groover *et al*, 2004); *Brassica Rapa* (Lee *et al*, 2004); *Brassica napus* (Bade *et al*, 2003) Cebada (Zhao *et al*, 2006) y fresa (Oosumi *et al*, 2006).

Una de las primeras mutaciones insercionales por T-DNA se describió en *Arabidopsis* y permitió el aislamiento del gen *Dwarf* (Feldmann *et al*, 1989). Posteriormente, se han descrito mutaciones insercionales por T-DNA relacionadas con caracteres morfológicos (Feldman *et al*; 1989; Feldman, 1991; Chiang, 1995), tamaño y forma de las hojas (Ogarkova *et al*, 2001; Van Lijsebettens *et al*, 1991), estructura de la flor (Yanofsky *et al*, 1990; Komari, 1990; Jofuku *et al*, 1994), fertilidad de los gametos masculinos y femeninos (Milyaeva *et al*, 2002; Robinson-Beers *et al*, 1992; Modrusan *et al*, 1994; Glover *et al*, 1996; Klucher *et al*, 1996; Christensen *et al*, 1997, Howden *et al*, 1998), desarrollo embrionario (Meinke, 1985; Castle *et al*; 1993; Yadegari *et al*, 1994; Castle and Meinke, 1994) y resistencia a la infección con *Agrobacterium* (Gilliland *et al*, 2003; Nam *et al*, 1999; Tzfira and Citovsky, 2001; Zhu *et al*, 2003a; Zhu *et al*, 2003b), entre otras.

Conviene recordar que la mayor parte de estas mutaciones se han obtenido en *Arabidopsis*. De hecho, un elevado número de inserciones de T-DNA que han sido secuenciadas se encuentran hoy en día disponibles para su análisis *in silico* (revisado por Radhamony *et al*, 2005).

**Tabla 9.** Colecciones de líneas T-DNA en *Arabidopsis* y arroz (revisado por Radhamony *et al*, 2005 y Hirochika *et al*, 2004)

Especie	Cultivar	Grupo y/o Institución	Nº de líneas T-DNA
<i>Arabidopsis</i>	Columbia	Scheible and Somerville (ABRC website)	>145.600
<i>Arabidopsis</i>	Columbia 0	SALK (Alonso <i>et al</i> , 2003)	145.589
<i>Arabidopsis</i>	Columbia 0	GABI - Kat (Rosso <i>et al</i> , 2003)	59.455
<i>Arabidopsis</i>	Ws2 (Wassil-evskija)	Sussman and Amasino (Sussman <i>et al</i> , 2000)	37.800
<i>Arabidopsis</i>	Columbia	LeClere and Bartel (LeClere and Bartel, 2001)	33.100
<i>Arabidopsis</i>	C24	Bressan and Yokoi (ABRC website)	27.330
<i>Arabidopsis</i>	Columbia	Weigel (Weigel <i>et al</i> , 2000)	>20.000
<i>Arabidopsis</i>	Columbia	Jack (Campisi <i>et al</i> . 1999)	11.370
<i>Arabidopsis</i>	C24	Haseloff (Kiegle <i>et al</i> . 2000)	8.000
<i>Arabidopsis</i>	Ws (Wassil-evskija)	INRA-Versailles (Balzergue <i>et al</i> , 2001)	1.480
<i>Arabidopsis</i>	C-24	Syngenta (Sessions <i>et al</i> , 2002)	1.250
<i>Arabidopsis</i>	Ws (Wassil-evskija)	Feldmann (Azpiroz–Leehan and Feldmann, 1997)	4.900
Arroz	Dongjin and Hwayoung	Pohang University of Science and Technology	100.000
Arroz	Zhonghua	Hua Zhong Agr. China	70.000
Arroz	Tainung	Institute of Botany, Academia Sinica, Taiwan	60.000
Arroz	Nipponbare	CIRAD-INRA-IRD-CNRS Géno plante	46.000

Que nosotros sepamos, el único gen clonado en tomate mediante etiquetado por T-DNA ha sido *ANTI*, que codifica para un factor de transcripción tipo MYB que actúa en la ruta biosintética de antocianinas (Mathews *et al*, 2003).

### 3.3. La naturaleza de las mutaciones en las plantas transgénicas

Las alteraciones fenotípicas observadas en las plantas transgénicas no siempre están ocasionadas por la inserción del T-DNA. Los datos experimentales han permitido comprobar que sólo el 35-40% de las alteraciones visibles en plantas transgénicas de *Arabidopsis* que exhiben un fenotipo mutante se deben al T-DNA (Azpiroz-Leehan and Feldmann, 1997). Por ejemplo, entre las líneas transgénicas de *Arabidopsis* con mutaciones relacionadas con el desarrollo embriogénico, sólo en el 36% de los casos el gen marcador co-segregó con el carácter (Meinke *et al*, 1994). La ausencia de co-segregación entre el gen marcador y el fenotipo mutante se ha observado también en mutantes de *Arabidopsis* con alteraciones en la formación de cera en la cutícula de la hoja (12 de 18 mutantes; McNevin *et al*, 1993) o en la morfología foliar (4 de 5 mutantes; Van Lijsebettens *et al*, 1991). Según Negruk *et al* (1996), la integración del T-DNA puede producir un amplio espectro de las mutaciones que se han descrito en genética clásica, como por ejemplo mutaciones puntuales o micro-delecciones. Asimismo, se ha podido demostrar que la inserción del T-DNA genera distintos tipos de reordenaciones cromosómicas, como por ejemplo translocaciones y duplicaciones (Castle *et al*, 1993; Laufs *et al*, 1999; Tax and Vernon, 2001). Tales reordenaciones pueden estar provocadas por recombinación entre repeticiones de las regiones flanqueantes del T-DNA y regiones homólogas del genoma de la planta (Tax and Vernon 2001). Además, el T-DNA puede ser cortado de un sitio y reintegrado en otro junto con secuencias del genoma de la planta que flanquean ese T-DNA (Castle *et al*, 1993; Ohba *et al*, 1995; Takano *et al*, 1997; Fu *et al*, 2000). La reparación del sitio inicial en el que se había integrado el T-DNA puede generar fragmentos duplicados en el DNA de la planta que podrían ser metilados (Svitashev *et al*, 2002a; Forsbach *et al*, 2003).

Además, se ha podido demostrar la integración de secuencias del DNA de *Agrobacterium* (Peterhans *et al*, 1990; Svitashev and Somers, 2002b) y de fragmentos de DNA correspondientes al cuerpo del vector (sin incluir el T-DNA). En este sentido, se han publicado diversos trabajos en los que se describen (presuntos) mutantes de inserción generados por secuencias del vector (Herman *et al*, 1990; Tinland, 1996; Cluster *et al*, 1996; Kononov *et al*, 1997; Wolters *et al*, 1998; Fu *et al*, 2000). A título de ejemplo, Cluster *et al* (1996) comprobaron que las alteraciones en la coloración de las flores de plantas transgénicas de *Petunia hybrida* se debían a las secuencias del vector. Fu *et al* (2000) señalaron que la integración de una secuencia de tan sólo 9 pares de bases del

vector puede ocasionar diversos tipos de inversiones y translocaciones cromosómicas. En definitiva, la integración de este tipo de secuencias o las reordenaciones y reparaciones genéticas en plantas transgénicas podrían dar lugar a fenotipos mutantes que no están ocasionados, al menos de una forma directa, por el T-DNA, lo que explicaría, al menos en parte, la falta de correlación entre el fenotipo mutante y el conferido por el gen marcador.

En otros casos, las alteraciones fenotípicas pueden estar ocasionadas por la activación de transposones endógenos (Hirochika *et al*, 1996), la variación epigenética debida a una alteración en el proceso de metilación del DNA (Jain, 2001) o por otras causas relacionadas con la variación somaclonal que surge como consecuencia del cultivo *in vitro* (revisado por Moreno, 1997).

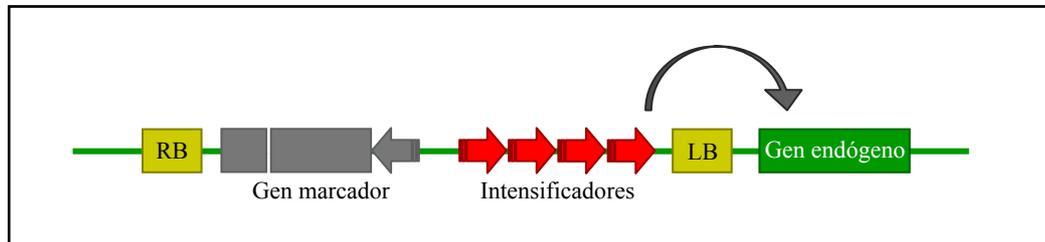
Conviene indicar que la mutagénesis insercional, al igual que ocurre con otras aproximaciones que provocan disrupción génica, tiene algunas limitaciones. En este sentido, es difícil detectar un fenotipo mutante si se produce la disrupción de un gen redundante, ya que pueden haber dos o más *loci* que desempeñen la misma función o tengan funciones compartidas. Asimismo, es difícil identificar la función de genes que son requeridos durante las primeras etapas del desarrollo gametofítico o embriogénico, es decir, genes cuya disrupción ocasiona letalidad. Por otro lado, puede ocurrir que un gen se exprese en un pequeño conjunto de células o durante un periodo de tiempo corto y el efecto que produce la pérdida de función no sea distinguible a nivel fenotípico. Adicionalmente, en los casos en los que un gen cumple más de una función, a no ser que se tenga un conocimiento suficiente de las características del material vegetal y que el fenotipado se realice de forma exhaustiva puede ser muy difícil llegar a inferir todas y cada una de las funciones del gen. En este caso, lo más normal es que sólo se llegue a identificar la función más importante, la más temprana durante el desarrollo ontogénico o, simplemente, la más espectacular o fácil de identificar a nivel fenotípico. Este tipo de problemas se podría, no obstante, solventar mediante el uso de vectores modificados.

### **3.4. Mutagénesis con vectores modificados de T-DNA**

#### **3.4.1. Etiquetado mediante activación transcripcional**

La activación transcripcional se ha postulado como una estrategia de mutagénesis insercional que genera mutantes dominantes de ganancia de función. Típicamente, se suele utilizar un T-DNA (o un elemento transponible) que contiene múltiples promotores 35S (CaMV) (Hayashi *et al*, 1992; Suzuki *et al*, 2001) u otros alternativos, como el del CVMV

(Dong y von Arnim, 2003). La integración del grupo de intensificadores en la vecindad de un gen endógeno, suficientemente cerca como para ejercer su influencia, debería aumentar el nivel de expresión de ese gen (figura 7).



**Figura 7.** Vector típico de activación transcripcional. En este caso, el vector contiene 4 intensificadores 35S. Provoca la activación transcripcional de genes cercanos, por lo que en principio debería dar mutantes dominantes de ganancia de función.

En principio, el uso de este tipo de construcciones ofrece algunas ventajas respecto al uso de construcciones simples de T-DNA. En efecto, como los mutantes son de ganancia de función, se puede analizar la función de genes redundantes. Por ejemplo, el gen *ETC1* se aisló a partir de un mutante de sobreexpresión de *Arabidopsis* que exhibía un menor desarrollo de los tricomas y un desarrollo excesivo de raíces aéreas (Kirik *et al*, 2004). Sin embargo, la anulación de función de este gen (mediante mutagénesis con T-DNA) no generó fenotipo alguno. De hecho, se han identificado varios genes mediante esta estrategia que no generan fenotipo en mutantes ‘knockout’ (*YUCCA*-Zhao *et al*, 2001; *DVLI*-Wen *et al*, 2004; *LEP* y *VAS*-Van der Graaff *et al*, 2002; *DSL1*-Chalfun-Junior *et al*, 2005). Según Bouche and Bouchez (2001) menos del 2% de los mutantes knockouts generan un fenotipo mutante claro. En este sentido, se ha reportado que 2/3 del genoma de *Arabidopsis* está duplicado y en torno a 4000 genes están repetidos en tandem (*Arabidopsis* Genome Initiative 2000). En arroz, dependiendo del cromosoma en cuestión, entre el 15,4% y el 30,4% de genes están duplicados (Goff *et al*, 2002). Este problema es mayor aún en especies poliploides (autoploides y aloploides). Por consiguiente, se ha propuesto que, a la hora de identificar mutantes etiquetados, este tipo de aproximaciones podría ser la más conveniente para las especies poliploides. Por otro lado, la sobreexpresión de un gen endógeno puede generar un fenotipo de interés para la mejora de ciertos caracteres. Conviene indicar que si la integración provoca la interrupción de un gen endógeno, entonces lo que se generaría es un mutante de anulación de función. Además, se pueden utilizar promotores específicos de tejido o inducibles para generar un incremento

de expresión de los genes etiquetados en los tejidos de interés o en un momento concreto del ciclo de vida de la planta (Weigel *et al*, 2000).

Por lo que respecta a la efectividad del sistema, Wilson *et al* (1996) identificaron 4 mutantes dominantes a partir de una colección de 1100 líneas transgénicas. Weigel *et al* (2000), tras un análisis inicial de 49000 líneas que portaban diferentes vectores de activación transcripcional, confirmaron 34 mutantes dominantes. Los autores comprobaron que la mayor parte de los genes sobreexpresados se encontraban localizados a continuación de los intensificadores. Marsh-Martinez *et al* (2002) analizaron 2900 líneas de inserción y detectaron 31 mutantes dominantes. En arroz, Jeong *et al* (2002) generaron más de 50000 líneas de etiquetado por activación. El análisis molecular de las regiones intergénicas en líneas elegidas al azar determinó que aproximadamente el 40% de las inserciones incrementaban la expresión de genes endógenos, lo que no implica que esto se traduzca siempre en una alteración fenotípica (Neff *et al*, 1999; Weigel *et al* 2000; Jeong *et al*, 2002).

La activación transcripcional ha sido predominantemente utilizada en *Arabidopsis* (revisado por Ayliffe and Pryor, 2007). No obstante, también se ha utilizado en *Craterostigma plantagineum* (Furini *et al*, 1997), *Catharanthus roseus* (Van der Fits and Memelink, 2000), petunia (Zubko *et al*, 2002), álamo (Busov *et al*, 2003), tomate (Mathews *et al*, 2003), tabaco (Ahad *et al*, 2003) y *Lotus japonica* (Imaizumi *et al*, 2005). En cereales, esta estrategia de mutagénesis se ha utilizado principalmente en arroz (Jeon *et al*, 2002). De hecho, recientemente se han publicado algunos trabajos en los que se describen mutantes insercionales de sobreexpresión obtenidos mediante el sistema de activación transcripcional (Mori *et al*, 2007; Hsing *et al*, 2007).

A través de esta estrategia se han clonado 41 genes de *Arabidopsis*, 2 de arroz, 1 de *Craterostigma plantagineum*, 1 de tabaco, 1 de *Catharanthus roseus*, 1 de álamo y 1 de tomate (revisado por Ayliffe and Pryor, 2007). Entre esos genes, son de particular interés desde una perspectiva agronómica los que incrementan la producción de metabolitos secundarios (Borevitz *et al*, 2000; Mathews *et al*, 2003; Levy *et al*, 2005), alteran el tiempo de floración (Aukerman and Sakai, 2003), promueven tolerancia a estrés hídrico (Furini *et al*, 1997) o aumentan la resistencia a enfermedades (Grant *et al*, 2003; Xia *et al*, 2004). Un aspecto interesante es el hecho de que un elevado número de los genes que se han identificado codifican para factores de transcripción (Ayliffe and Pryor, 2007). Esto quizás se deba al hecho de que la sobreexpresión de un factor de transcripción puede dar lugar a la

sobreexpresión o represión de una amplia gama de genes regulados por ese factor de transcripción, traducándose en un fenotipo fácilmente identificable.

Por lo que respecta al tomate, el único trabajo publicado es el realizado por Mathews *et al* (2003). Los autores generaron una colección de 10427 líneas transgénicas independientes con una construcción de activación transcripcional que portaba 4 copias del intensificador 35S (CaMV) (Weigel *et al*, 2000). A partir de esa colección, identificaron 1338 líneas transgénicas (12,83%) con alteraciones fenotípicas relacionadas con el desarrollo de la planta (tamaño de la planta, morfología de hojas y frutos o color hojas y frutos) en uno o más caracteres. Asimismo, identificaron algunos mutantes de pérdida de función en la descendencia de algunas plantas que no exhibían alteraciones fenotípicas. De resultas de este trabajo, los autores clonaron el gen *ANTI*, un factor de transcripción de la familia MYB que regula transcripcionalmente la biosíntesis y el transporte de antocianinas.

A pesar de todo, este tipo de aproximaciones tropieza con algunas dificultades. La más importante es que puede no quedar claro si un fenotipo refleja la función real de un gen o, por el contrario, la mutación ha sido causada por interferencia con un proceso no relacionado (Riechmann y Ratcliffe, 2000). Tales problemas pueden ser particularmente corrientes con factores de transcripción (Kubo *et al.*, 1999; Weigel *et al.*, 2000). Un problema adicional de la estrategia de activación transcripcional es que la sobreexpresión de ciertos genes (e.g. ciclo celular) puede ocasionar enormes efectos pleiotrópicos. Alternativamente, no cabe descartar que la activación transcripcional de un gen endógeno se produzca cuando el vector se inserta a una distancia considerable del mismo; en este caso, el gen no queda etiquetado y la clonación del mismo puede resultar difícil.

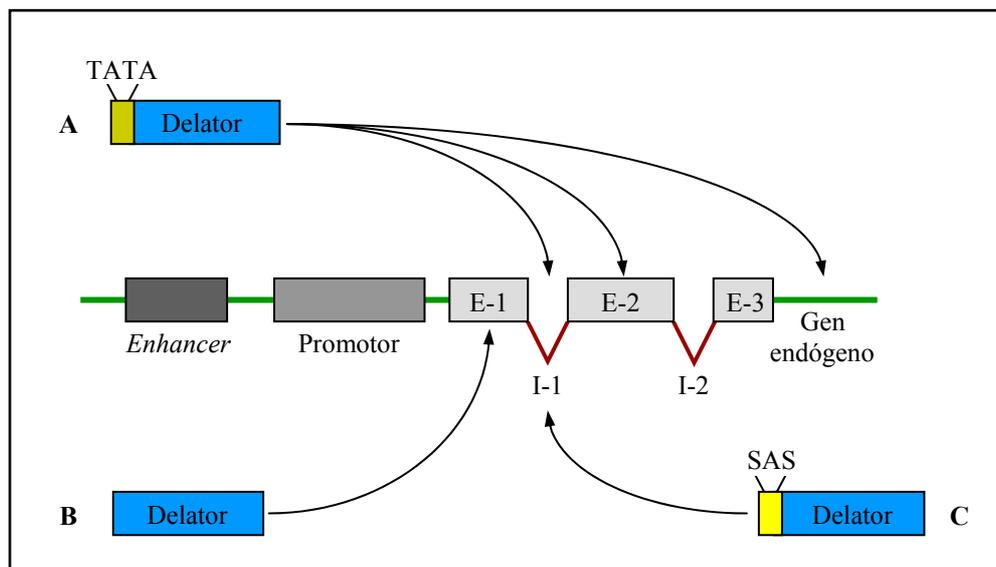
#### **3.4.2. Etiquetado mediante ‘trapping’**

Mediante esta estrategia se intenta explotar la posibilidad de obtener información sobre la función génica a partir de datos relacionados con la expresión. La técnica consiste en introducir al azar en el genoma construcciones que portan, aparte del gen marcador, un gen delator con un promotor mínimo, sin promotor o unido a un sitio aceptor de *splicing*. Por tanto, se trata de analizar las secuencias genómicas junto a las que se inserta la construcción y las propiedades de expresión que confieren éstas al gen delator. Evidentemente, tras la detección de secuencias reguladoras capaces de conferir al gen delator un patrón de interés, el conocimiento de la secuencia de la construcción insertada

permite clonar las secuencias genómicas en las que se ha insertado. La identificación del gen endógeno es aún más sencilla si se conoce la secuencia completa del genoma.

El delator más comúnmente utilizado es el gen bacteriano *uidA* que codifica para la proteína GUS. El único problema que plantea es el precio relativamente alto del sustrato que podría convertir en prohibitivo el análisis de un elevado número de plantas. Otra alternativa es el uso de la proteína fluorescente verde – *GFP* - (Haseloff *et al.*, 1997) o del gen *Lc* de maíz (Goldsbrough *et al.*, 1996). Sin embargo, por comparación, la observación microscópica de la tinción GUS es tremendamente más sensible que la de otros genes delatores (e.g.: GFP o Luc) ya que permite su detección en unas pocas células (Topping *et al.*, 1994; Sundaresan *et al.*, 1995; Campisi *et al.*, 1999; He *et al.*, 2001). Según Jefferson *et al* (1987), la detección de actividad GUS es muy sensible pudiendo detectarse la expresión en una única célula mediante técnicas histoquímicas.

Hay tres tipos de trampas génicas que usualmente se denominan como trampas de intensificadores, promotores y genes (Springer, 2000).



**Figura 10.** Esquema de las construcciones utilizadas para obtener colecciones de plantas con trampas génicas. Las flechas indican los sitios de inserción en un hipotético gen endógeno que darían lugar a la activación del gen delator. A, trampa de intensificadores. B, trampa de genes. C, trampa de promotores. TATA, promotor mínimo (caja tata). SAS, sitios de aceptación de ‘splicing’. E-1, E-2, E-3, Exones. I-1, I-2, Intrones (Hueros y Jouve, 2002)

La trampa de intensificadores consiste en un T-DNA sencillo que, aparte del gen marcador, contiene un promotor mínimo (caja TATA + inicio de transcripción) al que se encuentra fusionada la región estructural del gen *uidA* justo al lado del borde derecho. El

promotor mínimo no es capaz de promover un nivel de transcripción detectable, pero su inserción en el área de actuación de un determinado intensificador, y en la dirección correcta, activa la expresión del delator, mimetizando el patrón de expresión que dicho intensificador confiere al gen endógeno (figura 10A). Es decir, permite identificar y analizar el patrón de expresión de un gen (y por tanto llegar a una inferencia sobre su función) analizando la expresión del delator. La trampa de promotores es idéntica a la anterior, pero eliminando el promotor mínimo. Para que funcione, el T-DNA debe insertarse dentro de uno de los exones de un gen (figura 10B). La trampa de genes tiene un sitio aceptor de *splicing* justo antes de la región estructural del delator, de forma que sólo funciona cuando el T-DNA se integra dentro de un intrón (figura 10C).

Cada tipo de trampa tiene sus ventajas e inconvenientes. La ventaja de la trampa de intensificadores es que, como para que funcione basta que se inserte en el área de actuación de un intensificador, el número de genes que se detectan es mayor. Por ejemplo, los estudios realizados por Kertbundit *et al* (1991) y Topping y Lindsey (1995) revelaron que la proporción de insertos que desencadenan expresión del gen delator estaba en torno al 25% usando una trampa de promotores y 50% con una trampa de intensificadores. El inconveniente, estriba en que, como puede funcionar a una distancia considerable, a la hora de clonar el gen, el esfuerzo requerido puede ser mayor. En este sentido, puede resultar difícil determinar qué secuencia genómica es responsable de tal patrón de expresión. Por lo que respecta a las trampas de promotores y de genes, el inconveniente es que, como para que funcionen deben integrarse dentro de un exón o de un intrón, respectivamente, el número de genes que van a detectarse es menor. La ventaja es que el gen queda estrictamente etiquetado y que si se produce una fusión traduccional (producto del delator-producto total o parcial del gen endógeno) no sólo puede hacerse un análisis funcional del gen, sino que además pueden obtenerse datos de la localización intracelular del producto del gen endógeno. No obstante, otro aspecto que merece tenerse en cuenta es la versatilidad de la trampa de intensificadores, ya que puede actuar como una trampa de promotores, cuando se inserta dentro de uno de los exones del gen, o como una trampa de genes, cuando se inserta dentro de un intrón.

Con independencia del tipo de trampa elegido, el empleo de trampas tiene grandes ventajas sobre la mutagénesis insercional en *sensu stricto* (i.e. con un vector convencional) al permitir la identificación de genes: i) funcionalmente redundantes; ii) los que se expresan en múltiples estados de desarrollo y producen efectos pleiotrópicos que

generan confusión al llevar a cabo el fenotipado; iii) aquellos cuya disrupción provoca letalidad temprana; y iv) genes cuya disrupción ocasiona un fenotipo tan sutil que a veces no llega a detectarse en el fenotipado de las plantas (en este caso, la expresión del delator da una pista para identificar el fenotipo durante la evaluación). La identificación del gen es, además, independiente del nivel de expresión del mismo, evitando el peligro de descartar genes de baja expresión pero con efectos muy relevantes (e.g. *ovate*; Liu *et al.* 2002), tal y como a veces ocurre cuando se emplean otras aproximaciones, como por ejemplo las de tipo transcriptómico. Es, por último, el método ideal para detectar genes que se activan o inactivan en respuesta a un estímulo externo o situaciones de estrés abiótico.

Conviene señalar que la probabilidad de que las trampas reflejen la expresión de un gen endógeno próximo es muy alta (Bellen, 1999). Además, hasta la fecha, los genes endógenos detectados con este sistema y que, con posterioridad, se han llegado a clonar mimetizan el patrón de expresión que había sido observado previamente con la trampa (Grossniklaus *et al.*, 1989; Springer *et al.*, 1995; Gu *et al.*, 1998; Campisi *et al.*, 1999; Swaminathan *et al.*, 2000).

El interés de esta estrategia reside en la naturaleza dual de las trampas, ya que por un lado generan mutaciones de inserción de T-DNA y por otro permiten estudiar el patrón de expresión del gen etiquetado. De esta forma, no sólo se pueden hacer inferencias en torno a la función del gen etiquetado en un determinado mutante de inserción a través del fenotipado en TG1 o TG2, sino que también se puede obtener un panorama bastante preciso en torno al patrón de expresión espacio-temporal de dicho gen, ya que por el peculiar diseño de las trampas la expresión del gen delator mimetiza la expresión del gen endógeno etiquetado.

Se han utilizado con éxito dos tipos de trampas: las mediadas por T-DNA (e.g.: Kertbundit *et al.*, 1991; Topping *et al.*, 1991; Lindsey *et al.*, 1993; Campisi *et al.*, 1999) y las mediadas por transposones (e.g.: Fedoroff y Smith, 1993; Klimyuk *et al.*, 1995; Sundaresan *et al.*, 1995). En ambos sistemas, la presencia de un alto número de copias insertadas en distintas regiones del genoma complica la identificación de las secuencias de interés y, en ciertos casos, la interpretación de los patrones de expresión. Esto ha limitado la utilización de los sistemas de transposición al uso del sistema *Ac/Ds* debido al bajo número de copias que integra en el genoma.

Análisis preliminares de colecciones de plantas con sistemas de trampas génicas han conducido a la identificación de genes y secuencias reguladoras específicas, por ejemplo, de raíces laterales (Malamy and Benfey, 1997), embriones en desarrollo (Topping and Lindsey, 1997), tejidos infectados por nemátodos (Barthels *et al*, 1997), células guarda (Plesch *et al*, 2000) o células en proceso de senescencia (He *et al*, 2001). El gen *PROLIFERA* (*PRL*) de *Arabidopsis* se identificó a través de *trapping* (Springer *et al*, 1995; 2000). La expresión del gen delator *Uida* en células en división ofreció las primeras pistas sobre la posible función de *PRL* (codifica una proteína de la familia MCM relacionada con la iniciación de la replicación del DNA). De hecho, este gen habría sido difícilmente identificado mediante métodos convencionales ya que su disrupción, como pudo comprobarse en plantas con la inserción del elemento transponible *Ds* en el gen, causa letalidad en distintos estadios de desarrollo del embrión y megagametofito. Una vez aislado el gen, su secuencia resultó plenamente consistente con la función que se la había atribuido. Otros genes identificados a través de este método han sido *FRUITFULL* (*FUL*) (Gu *et al*, 1998), *POLARIS* (*PLS*) (Casson *et al*, 2002), *LATERAL ORGAN BOUNDARIES* (*LOB*) (Shuai *et al*, 2002) y *EXORDIUM* (*EXO*) (Farrar *et al*, 2003). Por otro lado, los sistemas basados en el empleo de trampas han permitido la clonación de promotores específicos de embriones (*Arabidopsis*; Topping *et al*, 1994), de la cubierta de la semilla (tabaco; Fobert *et al*, 1994), de tejidos vasculares (*Arabidopsis*; Wei *et al*, 1997), de células guarda (*Arabidopsis*; Plesch *et al*, 2000), de raíces (*Arabidopsis*, Mollier *et al*, 2000; y *Lotus japonica*, Webb *et al*, 2000), de tejidos en crecimiento y hojas jóvenes (*Arabidopsis*, De Greve *et al*, 2001) y de células meristemáticas (*Arabidopsis*, Farrar *et al*, 2003).

En la actualidad, existe una amplia colección de líneas *trapping* (es decir, generadas con trampas génicas) en *Arabidopsis* (Sundaresan *et al*, 1995; Campisi *et al*, 1999; Alvarado *et al*, 2004), arroz (Jeon *et al*, 2000; Jeong *et al*, 2002; Wu *et al*, 2003; Sallaud *et al*, 2003; Sallaud *et al*, 2004; Yang *et al*, 2004; Peng *et al*, 2005), tomate Microtom (Meissner *et al*, 2000) y álamo (Groover *et al*, 2004).

Conviene señalar que, aunque los genes y promotores identificados en estos análisis no se hayan caracterizado en detalle, la información obtenida puede ser utilizada para el estudio de patrones de desarrollo en los que es crucial disponer de marcadores específicos de células y tejidos (Hueros y Jouve, 2000). Aunque aún queda mucho camino por recorrer, los trabajos realizados hasta la fecha ilustran el potencial de esta tecnología en genómica funcional.



## II. OBJETIVOS

A pesar de los avances en el conocimiento de algunos procesos del desarrollo en especies modelo, éstos son enormemente desconocidos en otras especies como el tomate (*Solanum lycopersicum* L.). En esta hortícola, caracteres como la arquitectura de la planta, precocidad, androesterilidad, tamaño y forma del fruto, partenocarpia, maduración y conservación post-cosecha del fruto, tienen una gran importancia agronómica y dependen del establecimiento de patrones de desarrollo adecuados que, a su vez, están finamente regulados por distintos genes capaces de responder a señales endógenas y otras de naturaleza ambiental.

Desde un punto de vista metodológico, el estudio de estos procesos se puede abordar por diferentes vías, y en este sentido, el análisis genético y molecular de mutantes del desarrollo es una de las aproximaciones más exitosas a la hora de identificar la función de los genes alterados. A pesar de que existe una gran colección de mutantes espontáneos (<http://tgrc.ucdavis.edu>) o inducidos con EMS (Menda *et al*, 2004; Watanabe *et al*, 2007), irradiación gamma (Matsukura *et al*, 2007) y neutrones rápidos (Menda *et al*, 2004), la clonación de genes a partir de este tipo de mutantes implica el uso de una estrategia de genes candidatos, no siempre fáciles de identificar, o, alternativamente, de otra basada en el mapeo posicional, que resulta técnicamente complicada, requiere mucho esfuerzo y, peor aún, un largo periodo de tiempo.

Por fortuna, actualmente hay una gama de herramientas genómicas que permiten la identificación y etiquetado de genes que actúan sobre determinados procesos. Entre ellas, la mutagénesis insercional con T-DNA o transposones es, sin duda, una de las estrategias más prometedoras para la identificación y caracterización funcional de los genes que regulan dichos procesos (Emmanuel y Levy, 2002). Además, si en lugar de T-DNAs convencionales se emplean trampas génicas (Springer, 2000) se pueden generar mutaciones de inserción de T-DNA y al mismo tiempo estudiar el patrón de expresión del gen etiquetado.

Habida cuenta de las consideraciones anteriormente expuestas y con el fin de identificar genes relevantes en el proceso del desarrollo de tomate, en nuestro laboratorio estamos abordando un proyecto en colaboración con los grupos de los Dres. Rafael Lozano y Trinidad Angosto (Universidad de Almería) y de la Dra. M<sup>a</sup> Carmen Bolarín (CEBAS, CSIC, Murcia) en el que estamos utilizando dos herramientas genómicas (mutagénesis

insercional y *trapping*) en tomate (cvs. ‘P73’ y ‘Moneymaker’) y una especie silvestre relacionada (*Solanum pennellii*) para identificar secuencias codificantes o elementos de regulación de genes implicados en procesos del desarrollo vegetativo (arquitectura de la planta) y reproductivo (flor y fruto), así como en dos tipos de estrés abiótico (salinidad y estrés hídrico).

En este contexto, los objetivos planteados para esta Tesis Doctoral han sido los siguientes:

1. Obtención de una colección de líneas T-DNA con vectores convencionales (*nptII* – delator) y con una trampa de intensificadores (vector pD991, que contiene un promotor mínimo fusionado a la región estructural del gen delator *uidA*) en el cultivar de tomate p73 para la identificación y etiquetado de mutantes insercionales.
2. Análisis de la expresión del gen delator en líneas T-DNA obtenidas con el vector pD991 (trampa de intensificadores) con el fin de:
  - 2.1. Detectar promotores de genes que se expresan en condiciones de cultivo *in vitro*.
  - 2.2. Detectar promotores de genes que se expresan en plantas cultivadas en invernadero.
3. Evaluación de los transformantes primarios (TG1) para la identificación de mutaciones de tipo dominante, semidominante o aditivo.
4. Obtención y evaluación de la descendencia (TG2) para la identificación de mutaciones de naturaleza recesiva.

## **1. MATERIAL VEGETAL**

Como material vegetal de partida se ha empleado la línea de tomate p73. Se trata de una línea de tomate para consumo fresco, de crecimiento indeterminado, cedida amablemente por la Dra. M<sup>a</sup> José Díez.

## **2. TÉCNICAS BÁSICAS DE CULTIVO *IN VITRO***

### **2. 1. Esterilización de semillas**

Las plántulas axénicas se obtienen a partir de semillas que, previamente, han pasado por un proceso de esterilización. Las semillas se esterilizan superficialmente por inmersión, durante 30 minutos, en una solución de lejía comercial diluida al 50% (5% de hipoclorito de sodio) equivalente a 50 g de cloro activo por litro, a la cual se añaden 2 gotas de detergente 7X-0-matic (*Flow Laboratories*) que ayuda a romper la tensión superficial de los tejidos, mejorando el contacto entre el tejido y el esterilizante. A continuación, se elimina la solución desinfectante mediante tres lavados sucesivos (5, 10 y 15 minutos, respectivamente) con agua destilada estéril.

### **2. 2. Obtención de plántulas axénicas y extracción de explantes de cotiledón**

Tras la desinfección, las semillas se siembran en recipientes de vidrio (105 mm de altura x 95 mm de diámetro) que contienen 50 ml de medio de germinación (MG). El medio se gelifica con agar industrial (Pronadisa) al 0.9% (4.5 g/l). Los botes se tapan con tapón de plástico translúcido. La incubación se lleva a cabo en oscuridad durante las primeras 48 horas, y posteriormente se pasa a condiciones de luz, temperatura y humedad controladas (fotoperiodo de 16 horas luz con una intensidad luminosa de 2000 luxes - equivalente a  $34 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  - suministrada por una fuente de luz fría y una temperatura de  $26 \pm 2^\circ \text{C}$  y 70% de HR durante el periodo oscuro-40% durante el periodo luminoso). A los 7-10 días del inicio de la germinación se procede a la extracción de los explantes de cotiledón. Una vez separados los dos cotiledones de la plántula se eliminan los extremos para incrementar la superficie de corte obteniéndose 2 explantes por genotipo individual.

### **2. 3. Cultivo de explantes primarios**

Una vez cortados, los explantes (tanto de cotiledón como de hoja) se cultivan con el envés en contacto con el medio de cultivo. Para el cultivo de explantes se utilizan placas

petri (90 mm de diámetro x 30 mm de altura) con 30 ml de medio de cultivo que se sellan con parafilm. Las condiciones de incubación son las descritas en el apartado 2. 2.

## **2. 4. Regeneración de plantas a partir de explantes primarios**

### *Inducción de organogénesis*

El medio de cultivo empleado para la inducción de organogénesis en los explantes de tomate es el IKZ 4.0/4.0/1.0. Esta combinación de reguladores (4.0 mg/l de ácido indolacético + 4.0 mg/l de quinetina + 1.0 mg/l zeatina) en el medio de cultivo da lugar a la formación de callos que presentan zonas compactas de color verde en las que se desarrollan yemas, yemas-ápice y brotes. Los callos se subcultivan cada 21 días para favorecer el desarrollo de las estructuras organogénicas. Una vez formado el callo, se elimina la zeatina del medio para favorecer la elongación de los brotes.

### *Enraizamiento de los brotes*

Los brotes elongados se separan del callo organogénico y se siembran en medio de enraizamiento (ver apartado 4), con 0.1 mg/l de ácido indolacético para favorecer la emisión de raíces. Las primeras raíces aparecen aproximadamente a los 7 días de la siembra. A los 30 días la planta tiene un sistema radicular bien desarrollado, y la parte aérea presenta una yema caulinar y varias yemas axilares, a partir de las cuales se pueden obtener nuevas plantas mediante propagación por vía axilar. El tipo de bote que utilizamos para el enraizamiento (150 mm de altura x 60 mm de diámetro) favorece la elongación de entrenudos lo que facilita la posterior clonación de la planta.

## **2. 5. Propagación clonal de plantas**

La propagación clonal tiene por objeto la obtención de genotipos idénticos al original a través de la multiplicación vegetativa a partir de las yemas axilares o del meristemo caulinar. El subcultivo de este tipo de estructuras se realiza en el medio utilizado para el enraizamiento de ápices (ver apartado 4). Los recipientes empleados son botes de 60 mm de diámetro x 150 mm de altura.

## **3 DETERMINACIÓN DEL NIVEL DE PLOIDÍA EN LAS PLANTAS REGENERADAS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO**

El nivel de ploidía de las plantas se determina en fragmentos de hoja joven. El análisis se realiza mediante la cuantificación del contenido de ADN nuclear de las células según el método de Smulders *et al.* (1994). El tejido vegetal (un fragmento de cotiledón u

hoja de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>) se trocea finamente con una cuchilla en una placa petri de 50 mm de diámetro. Se añaden 2 gotas de tampón de extracción de núcleos (Partec, Münster, Germany) y 800 µl de una solución que contiene 1 mg/l de fluorocromo DAPI (4,6-diamino-2phenyl-indole) (DAPI staining solution, Partec) cuya función es teñir el ADN. Tras resuspender la mezcla, se filtra a través de una malla de nylon de 50 µm. La suspensión de núcleos se hace circular por el circuito de microtubos de un analizador de ploidía (Partec PA-II Ploidy Analyser), equipado con una lámpara de mercurio que emite luz ultravioleta de 366 nm. La corriente de núcleos en suspensión pasa por una cámara de cuarzo (conducto de 10 µm que no permite el paso simultáneo de dos unidades), donde es iluminada por una fuente de luz ultravioleta. Como consecuencia, el fluorocromo DAPI fijado al ADN emite una fluorescencia proporcional a la cantidad de ADN del núcleo, que es reconocida y captada por un fotorreceptor. El sistema informático que lleva incorporado el citómetro convierte cada señal fluorescente en un punto sobre la pantalla que se sitúa en distintas posiciones de acuerdo con su intensidad. El gráfico resultante ordena los datos según el contenido nuclear de ADN en el eje de abscisas y contabiliza el número de núcleos de cada tipo en el eje de ordenadas.

El sistema se calibra previamente situando el pico correspondiente a un contenido de ADN igual a 2C (diploide) sobre el valor que se desee (50 ò 100) de la escala de abscisas. El patrón de mixoploidía se determina según el área relativa (en porcentaje) de los picos correspondientes a las distintas poblaciones celulares (2C, 4C, 8C, etc.)

#### **4. ACLIMATACIÓN Y TRASPLANTE**

A los 15-20 días de la siembra en medio de enraizamiento, las plantas se encuentran en el estadio adecuado para realizar la aclimatación. Al extraer la planta del bote, se aplica un lavado a la raíz para eliminar los restos de agar, procurando no dañarla. A continuación se trasplanta a una maceta que contiene fibra de coco estéril y se cubre con un vaso de plástico.

La aclimatación se realiza en el invernadero en las siguientes condiciones:

Fotoperiodo	16 horas luz / 8 horas oscuridad
Temperatura	24° C ± 2° C día 20° C ± 2° C noche
Intensidad lumínica	3550 luxes, suministrada por lámparas fluorescentes de luz fría de 15 W.

A los 7-10 días, la planta se puede trasplantar con el cepellón a una maceta que contiene fibra de coco. El vaso de plástico transparente se mantiene durante los primeros 10-15 días de cultivo. Una vez transcurrido este periodo, se elimina el vaso, dándose por concluida la etapa de aclimatación.

## 5. NOMENCLATURA DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

En esta memoria se ha empleado la nomenclatura utilizada en publicaciones previas (Moreno *et al.*, 1985 y publicaciones posteriores). La nomenclatura alude al tipo y concentración de reguladores de crecimiento del medio.

Las primeras letras del medio refieren los reguladores empleados, en general una auxina y una citoquinina: (I) = ácido indolacético (IAA), K = quinina (K), Z = Zeatina (Z). A las letras le siguen una serie de dígitos separados por una barra que indican la concentración del regulador en mg/l.

## 6. SOLUCIONES MINERALES, SOLUCIONES VITAMÍNICAS Y MEDIOS DE CULTIVO

### 6.1. Solución mineral MS de Murashige y Skoog (1962)

<b>Macronutrientes</b>	(mg/l)
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
KNO <sub>3</sub>	1900
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170

<b>Micronutrientes</b>	(mg/l)
KI	0.83
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.20
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	22.3
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8.60
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025

<b>FeNa·EDTA</b>	(mg/l)
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.8
Na <sub>2</sub> ·EDTA	37.3

## 6.2. Solución vitamínica SH

<b>Vitaminas</b>	<b>(mg/l)</b>
Rivoflavinas	0.25
Ácido nicotínico	2.5
Tiamina ClH	10
Piridoxina ClH	1
Ácido fólico	0.5
Biotina	0.05
D-Pantotenato cálcico	0.5
Colina Clh	0.1
Glicina	0.5
L-Cisteína	1
Ácido málico	10
Ácido ascórbico	0.5

## 6.3. Medio de germinación

<b>MG</b>	<b>(g/l)</b>
Solución mineral	MS
Sacarosa	10
Agar	8

## 6.4. Medio de inducción de organogénesis

<b>IKZ (4.0/4.0/1.0)</b>	<b>(g/l)</b>
Solución mineral	MS
Sacarosa	30
Myo-inositol	0,1
Tiamina·HCl	0.001
Vitaminas	SH
IAA	0.004
K	0.004
Z	0.001
Agar	8

## 6.5. Medio de enraizamiento

<b>I 0.1</b>	<b>(g/l)</b>
Solución mineral	MS
Sacarosa	20
Myo-inositol	0,1
Tiamina-HCl	0.001
IAA	0,0001
Agar	8

*Notas.-*

El pH del medio se ajusta a 5.7 con KOH y HCl antes de añadir el agente gelificante.

Los medios de cultivo se esterilizan por calor húmedo en autoclave, a 115° C durante 30 minutos.

Las vitaminas se preparan en soluciones stock concentradas 100X, se almacenan a -20° C y se añaden al medio antes de ajustar el pH.

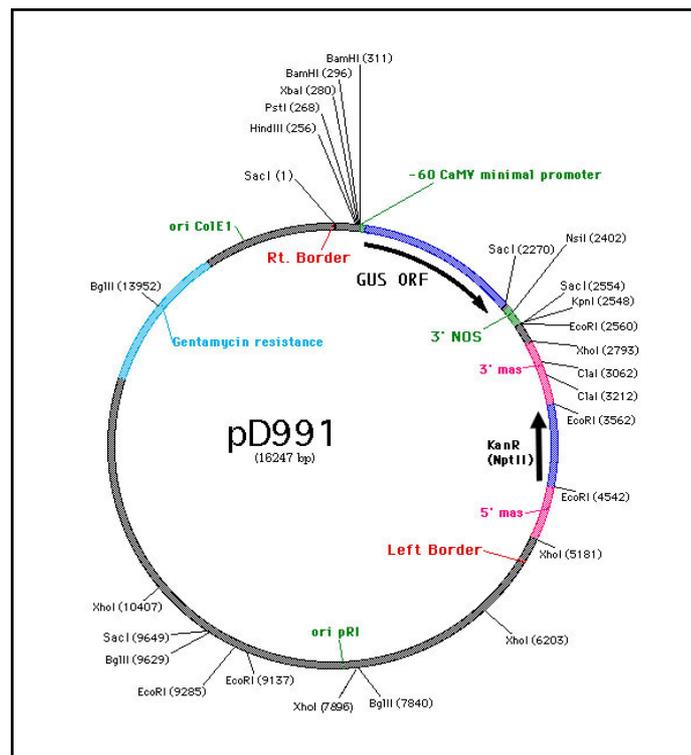
## 7. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA VÍA *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

### 7.1. Fuente de material vegetal

Como fuente de material vegetal se emplearon cotiledones procedentes de plántulas de tomate de 7-10 días germinadas *in vitro* de la línea p73.

### 7.2. *Agrobacterium tumefaciens*: cepa bacteriana, plásmido y genes incluidos en el T-DNA

Para llevar a cabo la transformación genética se ha utilizado la cepa desarmada de *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 con tres vectores. Dos de estos vectores, que hemos denominado convencionales (plásmidos pBin19sgfp, pBin19GUS), portan un gen marcador (*nptII*) bajo el control del promotor nos con el terminador nos y un gen delator (*sGFP* o *GUS*) bajo el control del promotor 35S con el terminador nos. El tercer vector utilizado ha sido el pD991, que contiene un promotor mínimo (caja TATA + inicio de transcripción) al que se encuentra fusionada la región estructural del gen *uidA* (figura 1).



**Figura 1.** Esquema del vector pD991 cedido amablemente por el Dr. Tomas Jack (Dpto. Ciencias Biológicas, Universidad de Dartmouth)

### 7.3. Crecimiento bacteriano

*Agrobacterium tumefaciens* se cultiva a partir de un inóculo glicerinado (mantenido en congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$ ) en medio sólido selectivo LB (Maniatis *et al.*, 1982) suplementado con 100 mg/l de kanamicina para comprobar la presencia del plásmido binario en las bacterias. Las colonias que crecen en este medio se utilizan de inóculo para el cultivo en medio líquido de la misma composición que se realiza en matraces adecuados para el cultivo de bacterias. Los matraces se tapan con algodón graso (o hidrofóbico) para favorecer la aireación y se incuban en oscuridad a  $28^{\circ}\text{C}$  en agitador orbital a 230 r.p.m. En todos los subcultivos, al ‘caldo nutritivo’ utilizado para el crecimiento bacteriano se le añaden 100 mg/l de kanamicina, para evitar así el crecimiento de bacterias que no contengan el plásmido.

### 7.4. Preparación del cultivo bacteriano para la transformación

Las bacterias se cultivan en medio líquido LB suplementado con 200  $\mu\text{M}$  de acetosyringona en agitador orbital a 230 r.p.m., en condiciones de oscuridad, hasta alcanzar la densidad óptica deseada para realizar la transformación. La inoculación de los explantes se realiza ajustando el cultivo bacteriano a una densidad óptica de 0.1. La densidad óptica se mide en espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm.

### 7.5. Método de transformación: selección y regeneración de plantas transgénicas

Los explantes de cotiledón de plántulas axénicas de 12 días se transfieren a placas petri que contienen medio IK 4.0/4.0 (24 explantes/placa) en el que permanecen 48 horas en estufa de oscuridad a  $28^{\circ}\text{C}$ . A las 48 horas, los explantes se sumergen durante 10 minutos en el cultivo de *Agrobacterium tumefaciens*. Tras la inoculación, los explantes se secan sobre papel de filtro estéril para eliminar el exceso de bacterias y, a continuación, se colocan sobre un medio de cocultivo con el envés en contacto con el medio. El medio de cocultivo es el IK 4.0/4.0 al que se le añade acetosyringona (3'5'-dimethoxy-4'-hydroxyacetophenone) esterilizada por microfiltración (Millipore 0,45  $\mu\text{m}$ ) a una concentración final de 200  $\mu\text{M}$ . La acetosyringona es una sustancia inductora de los genes *vir* en cepas productoras de octopina de *Agrobacterium tumefaciens* (Stachel *et al.*, 1985). Las bacterias se incuban con los tejidos durante 24 horas, y se mantienen en estufa de oscuridad a  $28^{\circ}\text{C}$ , periodo durante el cual se va a producir la transferencia del T-DNA.

Para la eliminación de la bacteria los explantes se tratan durante 10-12 minutos con una solución que contiene 500 mg/l de cefotaxima. Tras el lavado, los explantes se secan sobre papel de filtro y se colocan sobre el medio IK 4.0/4.0 + cefotaxima (400 mg/l), permaneciendo 2-3 días en la cámara de cultivo. Finalmente, los explantes se transfieren al medio selectivo IKZ (4.0/4.0/1.0) que contiene 100 mg/l de kanamicina y 300 mg/l de cefotaxima. Los explantes se cultivan en cámara bajo condiciones estándar de incubación.

Se precisan varias transferencias al mismo medio selectivo para conseguir el desarrollo de ápices individualizables. Estas transferencias se realizan cada 2-3 semanas. A los 4-5 subcultivos en medio selectivo conviene eliminar la zeatina para favorecer la elongación de los brotes, que ulteriormente se separan y siembran en medio de enraizamiento. Los brotes enraizados se multiplican por vía axilar (ver apartado 2.5.), con el fin de disponer de varias copias del mismo genotipo. Durante la etapa de propagación clonal, una de las copias se utiliza para realizar el test de enraizamiento en medio selectivo (medio IA 0.1 con 100mg/l de kanamicina), lo que nos aporta una información muy fiable sobre la expresión del gen marcador seleccionable *npt II* en la planta.

La determinación del nivel de ploidía en las plantas transgénicas, la aclimatación y el trasplante se realizan tal y como se indica en los apartados 2.6. y 2. 7.

## **7.6. Medios de cultivo específicos para la transformación**

<b>Medio LB (Luria-Bertani)</b>	(g/l)
Bactotripton	10
Bacto yeast extract	5
NaCl	10

<b>Medio de lavado MB2</b>	(g/l)
Solución mineral	MS
Sacarosa	20
Tiamina.HCL	0.001
Myo-inositol	0.1

*Medios de cultivo estándar utilizados en la transformación genética*

Etapa del proceso	Medio de cultivo	Antibiótico (mg/l)	
		Kanamicina	Cefotaxima
Precultivo	IK (4.0/4.0)		
Cocultivo	IK (4.0/4.0)*		
Lavado	MB2		
Cultivo no selectivo	IK (4.0/4.0)		500
Cultivo selectivo	IKZ (4.0/4.0/1.0)	100	400
Enraizamiento	I (0.1)		300
Test de enraizamiento	I (0.1)	100	

Notas.-

\* En la etapa de cocultivo el medio IK se suplementa con 200  $\mu$ M de acetosyringona.

Los antibióticos, al igual que la zeatina, inestables al calor, se esterilizan por microfiltración (Millipore 0.45  $\mu$ m) y se añaden a los medios de cultivo en condiciones de esterilidad.

### 7.7. Evaluación del nivel de resistencia a la kanamicina en transformantes primarios

El gen bacteriano *nptII* de *Escherichia coli* codifica el enzima neomicina fosfotransferasa que inactiva por fosforilación antibióticos aminoglicósidos como kanamicina, neomicina y geneticina. La expresión de este gen confiere resistencia a estos antibióticos que son tóxicos para las células de las plantas y, al transferirse con el gen deseado, ofrece un eficaz método de selección del material vegetal transformado.

La evaluación del grado de inhibición del enraizamiento de los brotes transgénicos se realizó a una concentración de 100 mg.l<sup>-1</sup> de kanamicina en el medio de enraizamiento AIA 0,1 (medio basal enriquecido con 0,1 mg.l<sup>-1</sup> de ácido indolacético).

### 7.8. Análisis de la expresión del gen delator *Uida*

El ensayo histoquímico con X-Gluc (Jefferson *et al.*, 1987) se realizó en plantas que habían sido capaces de crecer en el medio de enraizamiento selectivo. Para ello, la sección de cada explante se incubó durante 24 horas a 37°C en solución tamponada con X-Gluc. La clorofila de los explantes se eliminó posteriormente con etanol (70%).

## 8. CULTIVO DE LAS PLANTAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES DOMINANTES, SEMIDOMINANTES O ADITIVAS Y MUTACIONES RECESIVAS

Para la identificación de mutaciones dominantes, semidominantes o aditivas, tras la aclimatación y trasplante de los transformantes primarios (ver apartado 2. 7), las plantas se cultivaron en invernaderos de cristal tipo capilla con iluminación artificial en contenedores de 30 x 30 cm de base y 29 cm de altura utilizando como soporte de cultivo fibra de coco.

Los invernaderos en los que se cultivaron las plantas están dotados con un sistema de fertirrigación que aporta 8 riegos diarios de aproximadamente 125 ml (de solución de riego) por maceta. Los riegos se realizaron cada dos horas entre las 8 y las 22 horas. Las características más relevantes de los dos invernaderos en los que se cultivaron las plantas se detallan en el apartado correspondiente de resultados en el caso de que se observaran diferencias fenotípicas dependientes de ambiente. Las plantas se fenotiparon observando en ellas los caracteres básicos relacionados con el desarrollo vegetativo (i.e.: morfología y grado de disección de las hojas, longitud de los internodos, tamaño de las estructuras vegetativas etc.) y con el desarrollo reproductivo (i.e.: tamaño de la flor, número de órganos por verticilo, número de flores, aspecto de la flor, tamaño del fruto, color del fruto etc.). Por lo que respecta a la identificación de mutaciones de naturaleza recesiva, se cultivan 12 plantas TG2 en el invernadero. Si consideramos que la mutación originada como consecuencia de la integración de un inserto<sup>1</sup> se produce en un gen cuando el T-DNA se encuentra en una configuración homocigótica, el tamaño de familia para que, al menos, una de las plantas cultivadas tenga esa configuración con una probabilidad de fallo ( $P_F$ ) menor del 5% se deduce a partir de la siguiente fórmula:

$$N > \frac{\lg P_F}{\lg (1 - p)}$$

Donde p es igual a 1/4

---

<sup>1</sup>Esto es así con independencia del número de copias del T-DNA de las plantas transgénicas ya que el fenotipo mutante de resulta de la alteración del nivel de expresión de un gen se deberá a la integración de una de las copias insertadas. Conviene indicar que con este sistema de cultivo, mutaciones ocasionadas por la integración de más de un T-DNA, poco probable desde un punto de vista probabilístico aunque no imposible, podrían no ser detectadas.

## 1. GENERACIÓN DE UNA COLECCIÓN DE LÍNEAS T-DNA DE TOMATE

La integración de un T-DNA dentro de la secuencia estructural o los elementos de regulación de un gen endógeno puede ocasionar su interrupción y la subsiguiente anulación de función. De forma alternativa, la integración del T-DNA corriente arriba o abajo del gen puede alterar su nivel de expresión. De esta forma, tras la detección de los efectos que produce la anulación de función del gen o un cambio en su nivel de expresión en las plantas TG1 (mutaciones con efectos dominantes, semidominantes o aditivos) o en las progenies TG2 (mutaciones con efectos recesivos), como el gen está etiquetado por el T-DNA, se puede abordar la clonación del mismo. Este método de generación de mutantes ha llegado a convertirse en una herramienta importante en el campo de la genómica funcional y se ha denominado mutagénesis insercional dado el efecto fenotípico que provoca. Una aproximación mucho más potente se basa en el empleo de trampas génicas (Springer, 2000). El interés de esta estrategia reside en la naturaleza dual de las trampas, ya que por un lado generan mutaciones de inserción de T-DNA y por otro permiten estudiar el patrón de expresión del gen etiquetado. De esta forma, no sólo se pueden hacer inferencias en torno a la función del gen etiquetado en un determinado mutante de inserción a través del fenotipado en TG1 o TG2, sino que también se puede obtener un panorama bastante preciso en torno al patrón de expresión espacio-temporal de dicho gen, ya que, por el peculiar diseño de las trampas, la expresión del gen delator mimetiza la expresión del gen endógeno etiquetado.

Un punto crucial de esta estrategia radica en la necesidad de obtener un elevado número de líneas para que haya una cierta probabilidad de obtener mutantes, y para ello, es preciso disponer de un método eficaz de transformación. Por fortuna, en nuestro laboratorio disponemos de un método de transformación de tomate vía *Agrobacterium tumefaciens* que nos proporciona una eficacia útil del 20-25%, lo que supone obtener 20-25 plantas transgénicas diploides independientes (es decir, procedentes de eventos independientes de transformación) por cada 100 explantes inoculados.

Empleando este método de transformación, decidimos abordar un programa de genómica funcional en tomate basado en la mutagénesis insercional con T-DNA. Por lo que respecta a esta Tesis Doctoral, se decidió iniciar el proyecto generando una colección de líneas T-DNA de tomate (cv P73) con vectores convencionales que sólo portaban un gen marcador (*nptII*) y un gen delator (*GFP* o *uidA*). No obstante, teniendo en cuenta las ventajas que

proporciona el empleo de trampas génicas, solicitamos al Dr. Jack (Department of Biological Sciences; Dartmouth College, USA) una trampa de intensificadores (vector pD991) que su grupo estaba empleando en *Arabidopsis* (Campisi *et al.*, 1999). El Dr. Jack nos cedió amablemente el vector y, a partir de ese momento, centramos nuestros esfuerzos en la generación de líneas de inserción de tomate con la trampa de intensificadores.

En la tabla 1 se muestra el número total de líneas T-DNA que se han obtenido en el contexto de esta Tesis Doctoral. Empleando vectores convencionales (i.e. cuyo T-DNA porta un gen marcador y un gen delator) se obtuvieron 434 plantas transgénicas, de las que, tras el análisis por citometría de flujo, se seleccionaron 262 líneas T-DNA diploides. Empleando la trampa de intensificadores (vector pD991) se generaron 1800 plantas transgénicas, de las que se seleccionaron 960 líneas T-DNA diploides.

**Tabla 1.** Número de plantas generadas con diferentes vectores

Vector	Número de plantas generadas	Número de plantas diploides
Vector convencional (nptII-delator)	434	262 (60,37%)
Vector pD991 (trampa de intensificadores)	1800	960 (53,33%)
<b>Total</b>	<b>2234</b>	<b>1252 (56,04%)</b>



**Figura 1.** Cultivo de las plantas transgénicas en la cámara de nuestro laboratorio y en el invernadero

Así pues, a lo largo de este proyecto de investigación **se han obtenido 2.234 plantas transgénicas**, de las cuales 1.252 son diploides. En definitiva, considerando como líneas T-DNA aquellas que tienen el nivel de ploidía correcto, **se ha generado una colección de 1.252 líneas T-DNA.**

Las líneas T-DNA obtenidas con vectores convencionales se han utilizado para la identificación de mutantes en TG1 (mutaciones con efectos dominantes, semidominantes o aditivos) o TG2 (mutaciones con efectos recesivos). En el caso de las líneas T-DNA generadas con la trampa de intensificadores, no sólo se llevó a cabo un fenotipado exhaustivo en TG1 o TG2 para la identificación de mutantes de inserción, sino que también se realizó un análisis de la expresión del delator para detectar elementos de regulación de genes implicados en procesos del desarrollo. Por lo que respecta a la detección de mutantes, conviene resaltar que en esta Tesis nos centramos en el fenotipado de plantas TG1 para la detección de mutantes dominantes, semidominantes o aditivos. Debido a la falta de espacio en el invernadero, sólo pudimos abordar la detección de mutantes recesivos en una pequeña muestra de progenies TG2. No obstante, al tiempo que se realizaba el cultivo y el fenotipado de las TG1, se obtuvieron las progenies TG2 de todas las líneas T-DNA (salvo, claro está, en el caso de que exhibieran problemas de infertilidad), a fin de que los dos grupos con los que colaboramos en este proyecto de mutagénesis insercional en tomate (el grupo de los Dres. Lozano y Angosto de la Universidad de Almería y el grupo de la Dra. Bolarín del CEBAS de Murcia) puedan realizar el fenotipado de estas progenies en sus invernaderos.

## **2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DELATOR EN LÍNEAS T-DNA OBTENIDAS CON LA TRAMPA DE INTENSIFICADORES (VECTOR pD991)**

Los análisis de expresión del delator en líneas T-DNA con trampas génicas permiten detectar señales de regulación de genes implicados en una amplia gama de procesos. Como se ha comentado en el apartado anterior, nosotros hemos empleado una trampa de intensificadores (vector pD991) que contiene un promotor mínimo (caja TATA + inicio de transcripción) al que se encuentra fusionada la región estructural del gen *uidA*. El promotor mínimo no es capaz de promover un nivel de transcripción detectable, pero su integración en el área de actuación de un determinado intensificador debería activar la expresión del delator, mimetizando el patrón de expresión que dicho intensificador confiere al gen endógeno.

En este contexto, nos planteamos analizar la expresión del delator en diferentes tejidos de plantas cultivadas *in vitro*, así como en distintos órganos de plantas cultivadas en invernadero. Los resultados de estos experimentos se presentan a continuación.

### **2. 1. Análisis de la expresión del gen delator en plantas cultivadas *in vitro***

El ensayo histoquímico se realizó en un total de 768 plantas transgénicas. Las plantas se evaluaron en un estado fisiológico determinado (plantas bien desarrolladas, pero no envejecidas, de unos 15 cm de longitud). La expresión del gen delator (*uidA*) se evaluó en 4 tipos de tejidos u órganos vegetativos:

- 1) Limbo de hoja: se utilizó un segmento de foliolo de una hoja adulta verde que incluía el nervio central, tratando de evitar hojas con algún síntoma de senescencia.
- 2) Pecíolo: se utilizó una porción de pecíolo del foliolo evaluado.
- 3) Tallo: se utilizó un segmento de tallo próximo a la hoja de la que se obtuvo la muestra para el análisis de la expresión del delator en foliolo y pecíolo.
- 4) Raíz: se utilizó un segmento de raíz intermedia, procedente de una zona equidistante entre la base del tallo y el ápice radicular. La muestra de raíz contenía un segmento de raíz pivotante así como raíces laterales.

El resumen de los resultados del análisis se presenta en las tablas 2, 3 y 4.

**Tabla 2.** Número de plantas con expresión del gen delator distribuidas en función del número de explantes que exhibían tinción GUS.

Nº total de plantas analizadas	768
Nº de genotipos con expresión GUS en 1 explante	91 (11,8%)
Nº de genotipos con expresión GUS en 2 explantes	59 (7,7%)
Nº de genotipos con expresión GUS en 3 explantes	48 (6,3%)
Nº de genotipos con expresión GUS en 4 explantes	40 (5,2%)
Nº total de genotipos con expresión GUS	238 (31,0%)

**Tabla 3.** Número de plantas con expresión del gen delator distribuidas en función del tipo de explante que exhibía tinción GUS.

Nº total de plantas analizadas	768
Nº de genotipos con expresión GUS en limbo	91 (11,8%)
Nº de genotipos con expresión GUS en peciolo	96 (12,5%)
Nº de genotipos con expresión GUS en tallo	192 (25,0%)
Nº de genotipos con expresión GUS en raíz	134 (17,4%)

**Tabla 4.** Número de plantas con expresión del gen delator en tan sólo un explante, de las cuatro analizadas.

Nº total de plantas analizadas	768
Nº de genotipos con expresión GUS sólo en limbo	2 (0,3%)
Nº de genotipos con expresión GUS sólo en peciolo	7 (0,9%)
Nº de genotipos con expresión GUS sólo en tallo	54 (7,0%)
Nº de genotipos con expresión GUS sólo en raíz	28 (3,6%)

De las 768 plantas evaluadas, 238 (31%) mostraron expresión GUS en, al menos, uno de los explantes evaluados. La mayor parte de las plantas (91; ~ 12%) exhibía la tinción GUS en sólo uno de los tejidos evaluados. Sin embargo, en un elevado porcentaje de plantas se producía la expresión del delator en más de un explante. De hecho, en un porcentaje considerablemente elevado de plantas detectamos expresión del delator en dos, tres, e incluso en los cuatro explantes evaluados (tabla 2).

En líneas generales, estos resultados son muy similares a los que se obtuvieron en nuestro laboratorio tras analizar la expresión del gen delator en líneas T-DNA de tabaco con la misma trampa de intensificadores (Antón, 2004). Aunque en aquel caso no se evaluó el peciolo de la hoja, el porcentaje de líneas T-DNA de tabaco que exhibía expresión GUS

en alguno de los explantes evaluados fue muy similar al que nosotros hemos detectado en líneas T-DNA de tomate.

En concreto, el porcentaje de plantas transgénicas de tabaco con expresión GUS en, al menos, uno de los explantes evaluados estaba en torno al 25%. Por otro lado, la mayor parte de las plantas exhibía expresión del delator en sólo uno de los explantes evaluados. Sin embargo, a diferencia de los resultados que nosotros hemos obtenido en tomate, en el trabajo que se realizó en tabaco sólo un 0,84% de los genotipos exhibió expresión del delator en todos los explantes que se evaluaron, mientras que nosotros hemos detectado expresión del delator en los cuatro explantes en un porcentaje netamente mayor (5,2%).

Por otro lado, la mayor parte de los eventos de expresión positiva se detectaron en tallo (tabla 3). Los análisis realizados en líneas T-DNA de tabaco dieron resultados similares (Antón, 2004). Groover *et al.* (2004) analizaron la expresión del delator en una colección de 674 plantas transgénicas de álamo con una trampa de intensificadores, observando que el mayor porcentaje de eventos positivos de expresión del delator ocurría en tallo (58%). El elevado número de eventos positivos podría deberse a la diversidad de tipos celulares presentes en este órgano y a la variedad de funciones que cumplen estos tipos celulares como, por ejemplo, todas las relacionadas con el proceso de transporte raíz-parte aérea.

Además, los resultados conjuntos obtenidos con tabaco y tomate sugieren que, al menos en plantas cultivadas *in vitro*, la tasa de eventos positivos es mayor en tejidos adultos que en tejidos más jóvenes. Por ejemplo, en el trabajo que se realizó en tabaco, el mayor número de eventos de expresión del gen delator se dio en hoja adulta (~ 15% de las plantas), mientras que en hoja joven se detectaron muchos menos eventos de expresión (~ 5% de las plantas). En el experimento realizado con líneas T-DNA de tomate cultivadas *in vitro* no se realizaron ensayos con hojas en diferentes estados ontogénicos; sin embargo, como se comentará en un apartado posterior, en los ensayos realizados con estas mismas líneas T-DNA cultivadas *in vivo* (i.e. en invernadero) sí se realizaron este tipo de análisis y los resultados fueron totalmente concordantes con lo observado en tabaco.

Un aspecto interesante es que se han identificado líneas T-DNA de tomate que sólo expresan el delator en una de las cuatro estructuras vegetativas analizadas. En efecto, 2 líneas expresan el delator sólo en hoja, 7 lo expresan solamente en peciolo, 54 lo expresan sólo en tallo y 28 lo expresan solamente en raíz. Esto podría indicar que, en algún caso

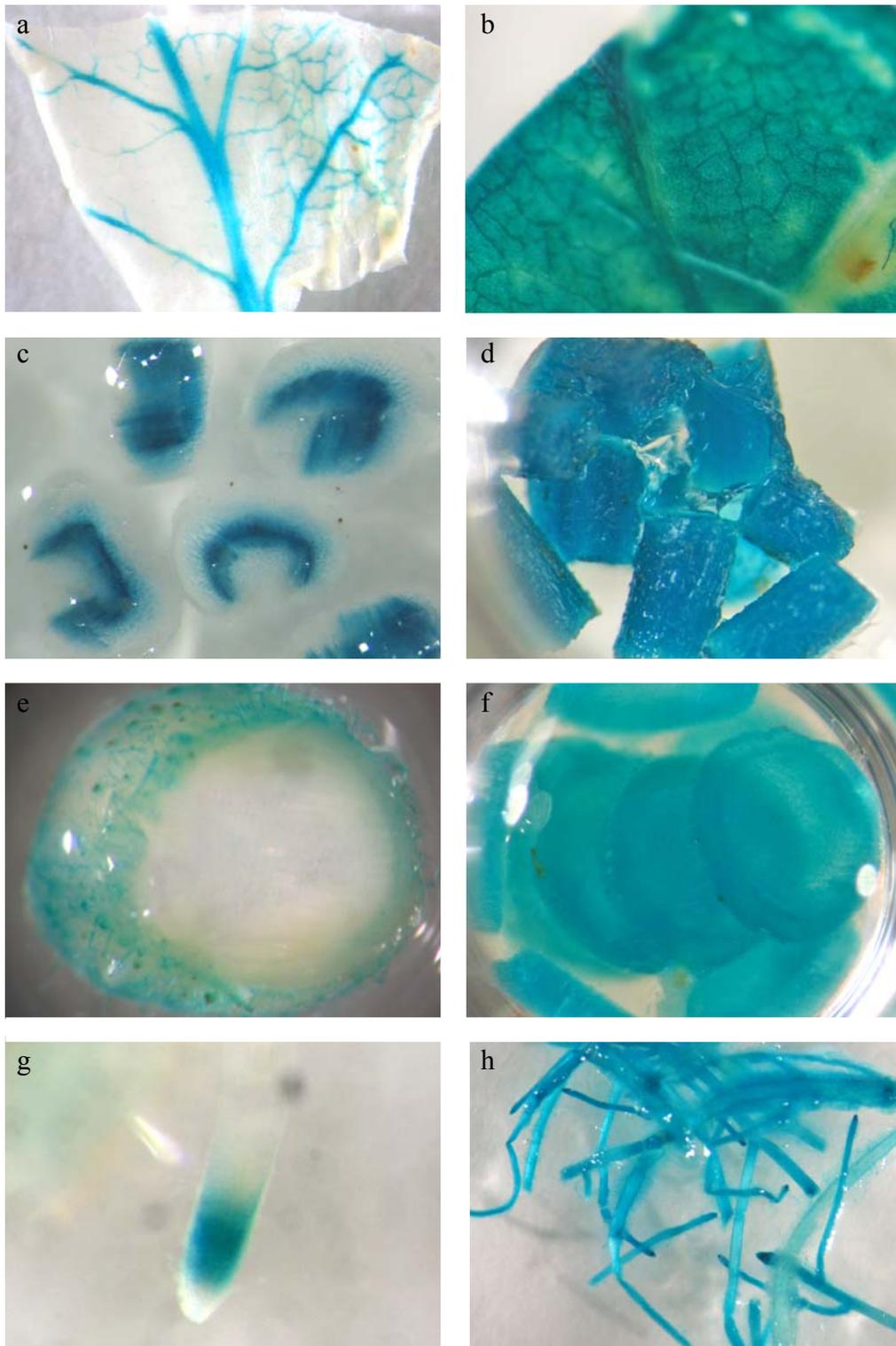
concreto, se ha etiquetado un elemento regulador específico de un cierto órgano o un tipo celular de un determinado órgano. En todo caso, de momento no se pueden extraer conclusiones porque para ello haría falta un estudio más exhaustivo y, además, no se puede excluir que *in vitro* se expresen ciertos genes que no lo hacen *in vivo*, y a la inversa.

Además de que pueda haber una expresión diferencial de ciertos genes *in vitro* – *in vivo*, es bastante probable que en ciertas formas (o técnicas) de cultivo *in vitro* se expresen ciertos genes que sólo lo hacen *in vivo* ante ciertas situaciones de estrés. Esto no tiene porqué ocurrir en plantas cultivadas *in vitro* obtenidas a partir de cultivo de ápices meristemáticos y/o yemas axilares (i.e. mediante propagación clonal). Sin embargo, sí es bastante probable que ocurra en las plantas que se han obtenido a partir de explantes primarios o de protoplastos y más aún en los callos procedentes de explantes o de protoplastos. De hecho, el cultivo *in vitro* es una situación excepcional para las células vegetales y el estrés al que las células se ven sometidas puede hacer que se expresen genes de respuesta a estrés.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, cabe pensar que el porcentaje de eventos positivos debería ser notablemente mayor si en lugar de analizar tejidos de plantas se hubieran analizado inóculos de callo. De hecho, Wu *et al* (2003) analizaron la expresión del delator (*uidA*) en callos de una colección de plantas de arroz transformadas con una trampa de intensificadores y detectaron un 84% de eventos positivos.

Siguiendo con la misma línea de argumentación, cabría esperar que en ciertos tipos celulares o estructuras que a lo largo del desarrollo ontogénico sufren un proceso de desecación extremo (e.g. polen, embriones) se detectara también expresión en un gran número de genes ya que en este tipo de células o estructuras se produce la expresión de una cascada de genes relacionados con el estrés. Las observaciones de Ko & Kamada (2002) son coherentes con esta hipótesis, ya que los autores detectaron un 64% de eventos de expresión positiva en embriones somáticos de zanahoria transformados con una trampa de intensificadores.

Para terminar con los comentarios en torno a nuestros análisis con líneas T-DNA de tomate cultivadas *in vitro*, conviene resaltar que hemos detectado una extensa variedad de patrones de tinción GUS en las líneas evaluadas. Algunos eran específicos de tejido mientras que otros exhibían un patrón de tinción ubicuo (figura 2).



**Figura 2.** Expresión del delator (*uidA*) en diferentes estructuras vegetativas de plantas cultivadas *in vitro*: a) expresión en haces conductores del limbo; b) expresión ubicua en limbo; c) expresión en haces conductores del peciolo; d) expresión ubicua en peciolo; e) expresión en la epidermis del tallo; f) expresión ubicua en tallo; g) expresión en la cofia radicular, h) expresión ubicua del delator en raíz.

## 2. 2. Análisis de la expresión del gen delator en plantas cultivadas *in vivo*

El ensayo histoquímico con X-Gluc se llevó a cabo en estructuras vegetativas y reproductivas de plantas cultivadas en el invernadero.

Por lo que respecta al análisis de las estructuras vegetativas, se tomaron muestras de plantas jóvenes en el momento en el que habían desarrollado la tercera inflorescencia y la expresión del delator se evaluó en 836 genotipos utilizando los siguientes explantes:

- 1) Limbo: se utilizó un segmento de foliolo de una hoja adulta verde que incluía el nervio central, tratando de evitar hojas con algún síntoma de senescencia.
- 2) Pecíolo: se utilizó una porción del pecíolo de la hoja evaluada.
- 3) Raquis: se utilizó una porción del raquis del foliolo evaluado.
- 4) Tallo: se utilizó un segmento de tallo próximo a la hoja de la que se obtuvo la muestra para el análisis de la expresión del delator en raquis, foliolo y pecíolo.

Asimismo, se analizó la expresión del delator en la raíz de 114 genotipos. Para ello, se utilizaron segmentos de raíces laterales de plantas adultas justo antes de que se retiraran del invernadero.

Además, en algunos genotipos quisimos comparar la expresión del delator en diferentes fases del desarrollo de la hoja. Este experimento se realizó en dos campañas: la primera correspondió a la cosecha de primavera-verano y se evaluaron 131 genotipos; la segunda campaña correspondió a la cosecha de invierno-primavera y se evaluaron 194 genotipos. En ambos experimentos, los análisis se realizaron en plantas adultas y las muestras se cogieron de las siguientes partes de la planta:

- 1) Parte apical de la planta: se tomaron muestras de hojas jóvenes.
- 2) Parte intermedia de la planta: se tomaron muestras de hojas adultas
- 3) Parte basal de la planta: se tomaron muestras de hojas con síntomas visibles de senescencia.

De las tres partes de la planta se analizó la expresión del delator en muestras de limbo, pecíolo y tallo.

En cuanto al análisis de la expresión del delator en estructuras reproductivas, se evaluaron flores en tres estadios de desarrollo, así como frutos recién cuajados.

El análisis de expresión GUS en flor se llevó a cabo en 818 genotipos evaluando los siguientes estadios de desarrollo de la flor (figura 3):

- 1) Botón floral de ~1 cm
- 2) Flor en pre-antesis.
- 3) Flor en antesis.



**Figura 3.** Estadios de la flor en los que se llevó a cabo el análisis del delator. En la parte inferior de la foto se muestra el corte longitudinal que se realizaba en la flor para identificar el órgano o tejido en el que se expresaba el delator.

En los tres estadios del desarrollo de la flor, se analizó la expresión del delator en los cuatro verticilos de la flor.

El análisis en fruto se llevó a cabo en 717 genotipos. En cada genotipo se analizó la expresión del delator en frutos recién cuajados.

### 2.2.1. Expresión del gen delator en estructuras vegetativas

El resumen de los resultados del análisis se presenta en las tablas 5, 6 y 7.

**Tabla 5.** Número de plantas con expresión del gen delator en función del número de estructuras con tinción GUS.

Nº total de plantas	836
Nº de genotipos con expresión GUS en 1 explante	45 (5,4%)
Nº de genotipos con expresión GUS en 2 explantes	36 (4,3%)
Nº de genotipos con expresión GUS en 3 explantes	44 (5,3%)
Nº de genotipos con expresión GUS en 4 explantes	81 (9,7%)
Nº total de genotipos con expresión GUS	206 (24,6%)

**Tabla 6.** Número de plantas con expresión del gen delator en función del tipo de explante con tinción GUS.

Nº total de plantas	836
Nº de genotipos con expresión GUS en limbo	164 (19,6%)
Nº de genotipos con expresión GUS en peciolo	151 (18,1%)
Nº de genotipos con expresión GUS en raquis	117 (14,0%)
Nº de genotipos con expresión GUS en tallo	141 (16,9%)
Nº de genotipos con expresión GUS en raíz *	16 (14,0%)

**Tabla 7.** Número de plantas con expresión específica del gen delator.

Nº total de plantas	836
Nº de genotipos con expresión GUS sólo en limbo	14 (1,7%)
Nº de genotipos con expresión GUS sólo en peciolo	4 (0,5%)
Nº de genotipos con expresión GUS sólo en raquis	4 (0,5%)
Nº de genotipos con expresión GUS sólo en tallo	23 (2,8%)
Nº de genotipos con expresión GUS sólo en raíz *	4 (3,5%)

Como puede verse en la tabla 5, en torno al 25% de los genotipos exhibieron expresión del delator en alguno de los explantes analizados. Conviene indicar este porcentaje es muy similar al obtenido con las líneas T-DNA cultivadas *in vitro* (31%). De hecho, la mayor parte de las plantas que expresaron el delator *in vitro* también lo hacían *in vivo* (83%).

En la mayor parte de los casos, los patrones de expresión del delator fueron muy similares en ambos tipos de análisis (*in vitro* – *in vivo*). A título de ejemplo, el genotipo

\* Sólo se evaluaron 114 genotipos

779 ET73 exhibió una expresión alta del delator en peciolo, limbo y tallo, tanto *in vitro* como *in vivo*. En el genotipo 129 ET73 se detectó una expresión tenue del delator en tallo, y esto ocurría tanto *in vitro* como *in vivo*. En el genotipo 297 ET73 se observó la expresión del delator en los haces vasculares del tallo *in vitro* e *in vivo*. Otro ejemplo lo constituye el genotipo 331ET73, en el que se detectó que, tanto *in vitro* como *in vivo*, la expresión del delator era de tipo constitutivo. Lo curioso en este caso es que la expresión en los haces vasculares era más intensa que en el resto de las células (*in vitro* e *in vivo*). En el genotipo 785 ET73 se observó que la expresión del delator se producía en los haces vasculares del peciolo y del tallo, así como en los nervios de las muestras de limbo que se utilizaron para llevar a cabo los análisis *in vitro* e *in vivo*.

En definitiva, en la mayor parte de los genotipos existió correlación entre los resultados obtenidos *in vitro* e *in vivo*, tanto en el tipo de estructura que exhibía tinción GUS como en el patrón y la intensidad de expresión del delator.

En algunos casos lo que ocurría es que la intensidad de la expresión del gen delator era diferente. Por ejemplo, en el genotipo 172 ET73 se observó una expresión tenue del delator en limbo, peciolo y tallo *in vitro* y una expresión intensa *in vivo*. En el genotipo 254ET73 ocurrió lo contrario, ya que el nivel de expresión del delator *in vitro* fue intenso en limbo, peciolo y tallo, mientras que *in vivo* la expresión del delator en estas mismas estructuras era tenue. En estos casos, el diferente nivel de expresión del gen *UidA* podría deberse a distintos grados de expresión del gen endógeno como consecuencia de las diferentes condiciones medioambientales en las que se encuentra cultivada la planta (*in vitro* e *in vivo*).

No obstante, como era de esperar, en unos pocos genotipos se observaron discrepancias entre los resultados obtenidos *in vitro* e *in vivo*. En los casos más extremos, lo que se observó fue la expresión en una o varias estructuras vegetativas en uno solo de los dos análisis, *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, en el genotipo 489 ET73 se observó expresión del delator en los haces vasculares del raquis y del tallo en el análisis realizado con plantas cultivadas *in vivo*; sin embargo, en el análisis previo que se había llevado a cabo *in vitro* no se había observado expresión del delator en los elementos conductores de estos explantes. El genotipo 220 ET73 exhibió un elevado nivel de expresión del delator en limbo, peciolo y tallo pero sólo *in vitro*, ya que *in vivo* no se detectó expresión del delator.

En los casos concretos en los que se observaron discrepancias (*in vitro* e *in vivo*), podría haber ocurrido algún problema relacionado con la prueba histoquímica en las muestras que no dieron expresión del delator. En todo caso, no cabe descartar la posibilidad de que se haya etiquetado el elemento de regulación de algún gen cuya expresión es dependiente de las condiciones medioambientales (*in vitro* o *in vivo*) en las que se cultivaron las plantas.

Con independencia de la causa subyacente de la discrepancia en ciertos casos, lo que resulta notable es que el grado de concordancia entre los resultados obtenidos *in vitro* e *in vivo* es mayor que el número de discrepancias.

Anteriormente, al comentar los resultados que habíamos obtenido con las línea T-DNA de tomate cultivadas *in vitro* hacíamos énfasis en la cautela que hay que tener a la hora de interpretar estos datos, por la posibilidad de que *in vitro* se expresen ciertos genes que no lo hacen *in vivo*, o a la inversa. De hecho, es bastante probable que los resultados hubieran sido diferentes si los análisis *in vitro* se hubieran hecho con muestras de las plantas transgénicas recién obtenidas en lugar de con plantas TG1 propagadas clonalmente por cultivo de ápices meristemáticos y/o yemas axilares. Sea como sea, lo cierto es que en general los resultados que hemos obtenido *in vitro* son concordantes con los obtenidos *in vivo*. Así pues, si se toman las debidas precauciones, parece claro que los análisis con estructuras de tipo vegetativo de plantas crecidas *in vitro* pueden dar una cierta idea de lo que va a obtenerse con plantas cultivadas *in vivo*: es decir, los resultados obtenidos *in vitro* no parecen ser artefactos, sino que derivan de la expresión de genes que también lo hacen *in vivo*.

Por otro lado y siguiendo con los resultados que se obtuvieron con las plantas cultivadas *in vivo*, el porcentaje de plantas con tinción GUS en limbo, peciolo, raquis, tallo o raíz fue similar (tabla 6).

En lo que respecta a genotipos que exhibieron expresión específica del delator, es decir, que sólo expresaron el delator en uno de los explantes evaluados, el mayor porcentaje de eventos de tinción GUS se dio en raíz (3,5%) y tallo (2,8%), mientras que en raquis (0,5%) y peciolo (0,5%) se detectaron menos eventos de expresión (tabla 7). En estos casos es bastante probable que se haya etiquetado algún elemento de regulación específico de tejido.

De forma similar a lo que se ha observado en trabajos con otras especies, nuestros resultados indican que el uso de una trampa de intensificadores genera una alta frecuencia de eventos positivos de expresión GUS (en torno al 25% de los genotipos muestran expresión del delator en alguno de los explantes analizados).

Por ejemplo, Wu *et al* (2003) detectaron que entre un 25 y 59% (en función del tipo del órgano evaluado) de líneas T-DNA de arroz generadas con una trampa de intensificadores expresaban el delator. Además, detectaron que el 15% de las plantas expresaba el delator en un sólo tejido, el 9% en sólo dos tejidos y más del 45% de las plantas lo expresaban en 3 o más tejidos. Yang *et al* (2004) evaluaron una colección de plantas transgénicas de arroz con otra trampa de intensificadores y observaron que la frecuencia de expresión GUS tanto en hoja como en raíz estaba en torno al 24%. En el trabajo de Johnson *et al* (2005), en el que evalúan una colección de plantas de arroz transformadas con una trampa de intensificadores (sistema GAL4), los autores detectaron una frecuencia de activación del delator del 32%, muy similar, según indican, a la que se detectó en *Arabidopsis* empleando la misma trampa (<http://enhancertraps.bio.upenn.edu>).

En definitiva, es bastante habitual detectar un elevado número de eventos de expresión del delator cuando se emplea esta estrategia. En este sentido, se ha sugerido que el empleo de una trampa de intensificadores hace que una mayor proporción de insertos desencadene la expresión del gen delator y por tanto resulta más efectivo para la identificación de funciones génicas en estudios de genética inversa (Greco *et al*, 2001).

Por el contrario, el uso de trampas de promotores o de genes genera un menor porcentaje de eventos de expresión, debido a que la activación del gen delator viene determinada no sólo por la orientación sino también por el punto de inserción (exón o intrón).

Por ejemplo, empleando una trampa de genes, Chin *et al* (1999) detectaron que tan sólo un 8% de las líneas de arroz expresaban GUS en distintos tejidos de la panícula. De forma similar, en el trabajo de Jeon *et al*. (2000) los autores sólo detectaron el 1,6-2,0% de líneas de arroz que mostraban actividad GUS en hoja, raíz, flores maduras y semillas en desarrollo. Por otro lado, Muthukalianan *et al* (2003) evaluaron una colección de plantas transgénicas de arroz con una trampa de promotores y observaron que el porcentaje de plantas que expresaban el delator en alguno de los órganos evaluados rondaba el 10%.

Por otro lado, en nuestras líneas T-DNA de tomate se han detectado muchos patrones diferenciales de expresión en relación con el lugar concreto en el que se identificaba dicha expresión. Es decir, algunos tejidos exhibían una intensa expresión del gen delator mientras que en otros la expresión era muy tenue, lo que sugiere diferencias en lo que respecta al nivel de expresión que promueve el elemento de regulación etiquetado.

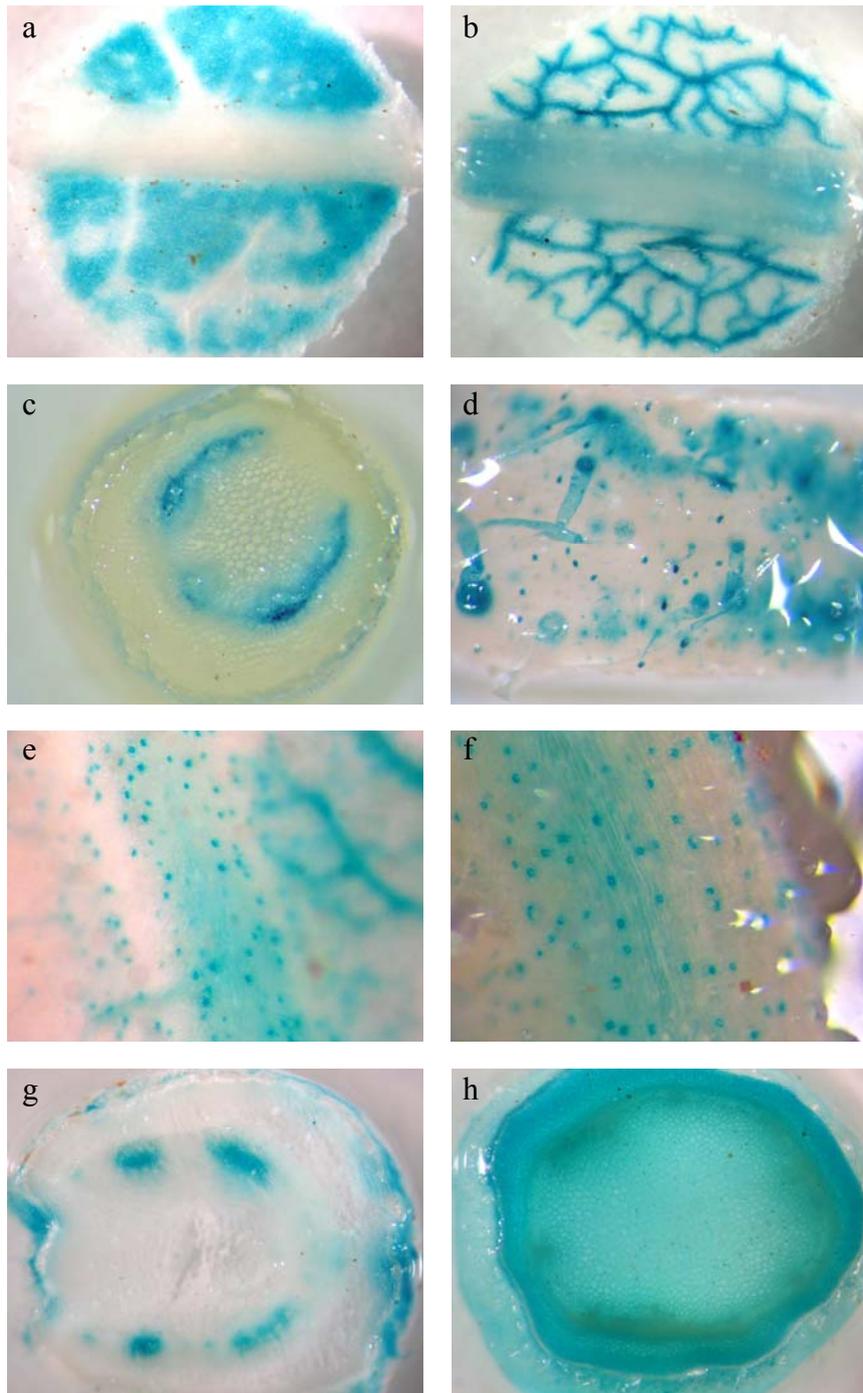
En otros casos, las diferencias no se debían solamente a la intensidad de expresión del gen delator, sino que estaban relacionadas con el lugar específico en el que verificaba la expresión. Por ejemplo, en ciertas hojas de algunos genotipos había expresión en toda la superficie analizada, incluyendo limbo, nervio central y nervios laterales; en cambio, en otros genotipos la expresión se detectó sólo en el nervio central o en el limbo del foliolo. En ocasiones, la expresión se detectaba sólo en ciertas células del limbo o en las células más cercanas al nervio central, mientras que en otros casos lo que se observaba era la expresión del gen delator en un determinado sector. Esta especificidad en el patrón de expresión, en lo que se refiere a la intensidad y localización ocurrió en todos los explantes evaluados.

En algunos casos, la tinción GUS era más intensa en las zonas de corte, lo que podría indicar la detección de un gen que se activa como respuesta a una herida.

Asimismo, en ciertos genotipos se ha podido detectar la expresión del delator en tricomas o en estomas (ver ejemplos en figura 4).

En lo que se refiere a las células específicas en las que se detecta la expresión del delator conviene señalar que, en comparación, la observación microscópica de la tinción GUS es tremendamente más sensible que la de otros genes delatores (e.g.: *GFP* o *Luc*) ya que permite su detección en una o pocas células (Topping *et al*, 1994; Sundaresan *et al*, 1995; Campisi *et al*, 1999; He *et al*, 2001).

En definitiva, el sistema que hemos empleado permite determinar el patrón espacial de expresión de elementos de regulación de genes muy diversos mediante la expresión del gen delator. Así pues, disponemos de una enorme colección de genes que se expresan en diferentes células, tejidos u órganos de tomate que pueden ser estudiados en un futuro con mayor detalle.

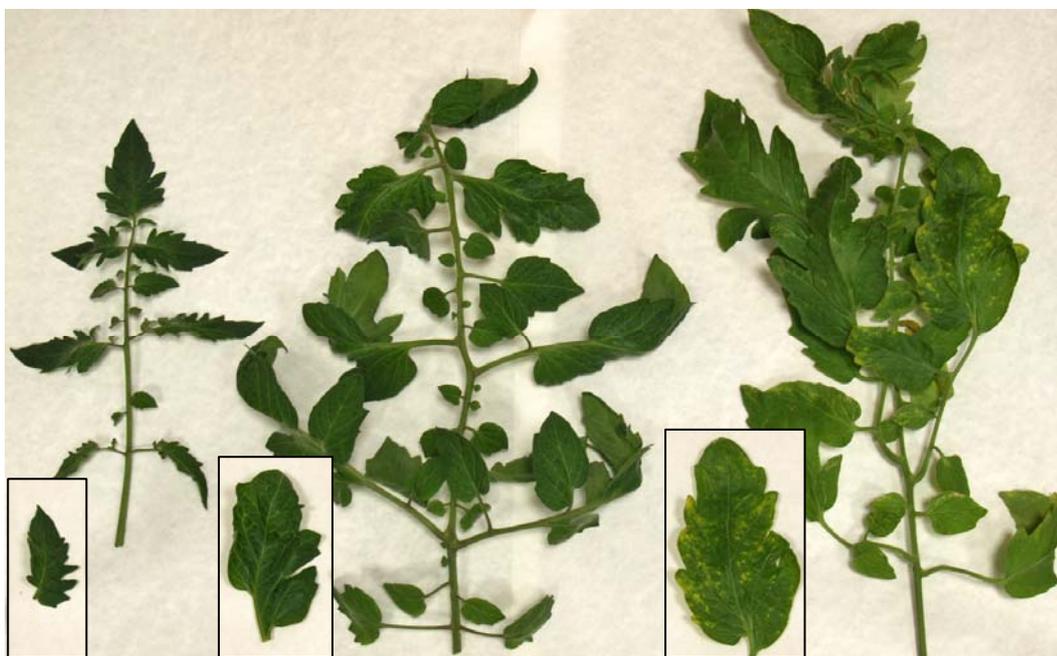


**Figura 4.** Expresión del delator en diferentes estructuras vegetativas: a) expresión en células del mesófilo del foliolo; b) expresión en haces conductores del foliolo; c) expresión en haces vasculares y epidermis del raquis de la hoja; d) expresión en tricomas del tallo; e y f) expresión del delator en células guarda de limbo y peciolo respectivamente (mismo genotipo); g) expresión en haces vasculares y epidermis del peciolo; i) expresión ubicua del delator en tallo.

### 2.2.2. Expresión del delator en diferentes fases del desarrollo de la hoja

La última fase del desarrollo de la hoja implica un proceso de senescencia foliar. La senescencia foliar es un tipo de muerte celular programada caracterizada por la pérdida de clorofila, lípidos, proteínas totales y RNA (Smart, 1994; Gan y Amasino, 1997) y va acompañada de una serie de cambios en la expresión génica (He *et al*, 2001). Una gran parte de los genes que se están expresando en hojas no senescentes, como por ejemplo los que están relacionados con la fotosíntesis, dejan de hacerlo durante la senescencia mientras que otros genes suelen inducirse en estas condiciones.

Nosotros quisimos realizar un estudio preliminar para ver si éramos capaces de identificar secuencias reguladoras de genes que se activen o inactiven en función de la fase de desarrollo de la hoja. Utilizando plantas que ya habían desarrollado la séptima inflorescencia, pudimos recoger muestras de hoja de las zonas más jóvenes de la planta (la región más apical de la misma), de las zonas intermedias de la planta (donde se encontraban las hojas adultas que ya habían alcanzado su tamaño máximo) y de las zonas de la base de la planta (donde se encontraban hojas con notables síntomas de senescencia). Además, se tomaron muestras de tallo próximo a la hoja seleccionada.



**Figura 5.** Detalle de las hojas empleadas para el análisis del delator. De izquierda a derecha, hoja joven, adulta y con síntomas de senescencia.

El análisis se llevó a cabo con 131 plantas cosechadas en la campaña de primavera-verano 2004 (experimento 1) y con 194 plantas que se cosecharon en la campaña de invierno-primavera 2005 (experimento 2). Los resultados pueden verse en la tabla 8.

**Tabla 8.** Número de plantas con expresión del gen delator en función de la fase del desarrollo de la hoja (o del tallo próximo a la hoja en cuestión)

		Experimento 1	Experimento 2
Nº de plantas analizadas		131	194
Tejido joven	Nº de plantas con expresión en limbo	16 (12,2%)	6 (3,1%)
	Nº de plantas con expresión en peciolo	14 (10,7%)	7 (3,6%)
	Nº de plantas con expresión en tallo	15 (11,5%)	6 (3,1%)
Tejido adulto	Nº de plantas con expresión en limbo	28 (21,4%)	16 (8,2%)
	Nº de plantas con expresión en peciolo	18 (13,7%)	13 (6,7%)
	Nº de plantas con expresión en tallo	36 (27,5%)	15 (7,7%)
Tejido senescente	Nº de plantas con expresión en limbo	34 (26,0%)	22 (11,3%)
	Nº de plantas con expresión en peciolo	18 (13,7%)	17 (8,8%)
	Nº de plantas con expresión en tallo	50 (38,2%)	27 (13,9%)

Tal y como puede verse en la tabla 8, en general el porcentaje de eventos de expresión del delator va aumentando con el estado de desarrollo del tejido evaluado. Es decir, en los tejidos más adultos (principalmente, tejidos senescentes) hay un mayor porcentaje de eventos positivos. En nuestras condiciones de cultivo y con nuestras plantas, este hecho ocurre tanto en el análisis realizado con las plantas cultivadas en la campaña otoño-invierno como en las cultivadas en la campaña primavera-verano.

Algunas de las plantas evaluadas expresaron el delator de forma constitutiva, es decir, en los tejidos de las tres zonas evaluadas, lo que parece indicar que el delator se activó bajo la influencia de un elemento de regulación que promueve una expresión ubicua. En otros casos, la expresión del delator se produjo principalmente en tejidos más jóvenes mientras que no se detectó expresión en los tejidos adultos. Este tipo de resultados podría indicar que el delator se encuentra en el área de actuación de un elemento de regulación que se inactiva en las zonas más adultas o senescentes. No obstante, lo que se detectó en un elevado número de casos fue la expresión del delator en zonas adultas y, en especial, senescentes, lo que sugiere que la trampa se ha insertado en el área de actuación de un elemento de regulación que promueve la expresión de genes en tejidos adultos o en proceso de senescencia.

Tras la obtención de una colección de más de 1000 plantas transgénicas de tabaco con el vector pD991, en nuestro laboratorio se realizó un estudio preliminar con 132 plantas para tratar de detectar elementos de regulación relacionados con la senescencia de las hojas (Antón, 2004). Para ello se diseñó un experimento en el que cada genotipo se cultivó en fotoperiodo o, alternativamente, en oscuridad continua (unas condiciones inductoras de senescencia). Los análisis de expresión permitieron detectar un genotipo que mostraba la expresión del gen delator sólo en condiciones de senescencia.

Campisi *et al* (1999) generaron una colección de plantas transgénicas de *Arabidopsis* con la misma trampa de intensificadores que nosotros hemos empleado en este trabajo. Comprobaron que, aproximadamente, el 16% de las líneas transgénicas expresaba el delator durante la senescencia floral. Posteriormente, He *et al* (2001) analizaron 1300 de las líneas generadas por Campisi *et al* (1999) con el fin de identificar genes que se expresaran específicamente en hojas senescentes. Los autores detectaron que el 11% de las líneas expresaba el delator sólo en hojas senescentes y clonaron tres genes relacionados con senescencia. En definitiva, esta estrategia puede resultar muy útil para identificar elementos de regulación de genes asociados a procesos de senescencia.

Por otro lado, los resultados que hemos obtenido con líneas T-DNA de tomate indican que las plantas cultivadas durante la campaña de primavera-verano (los análisis se realizaron en julio) muestran un mayor porcentaje de eventos de expresión del delator que las que se cultivaron durante la campaña de invierno-primavera (los análisis se realizaron en marzo). Conviene indicar que las plantas que se cultivaron durante la campaña primavera-verano se encontraban expuestas a diferentes tipos de estrés abiótico (térmico) y biótico (plagas y virus) debido a las altas temperaturas que se alcanzan en nuestros invernaderos durante este periodo. En estas condiciones medioambientales se activa un elevado número de genes de respuesta a estrés, y por tanto, la probabilidad de detectar eventos de expresión positiva es mayor. Es más, no se puede descartar la posibilidad de haber etiquetado algún elemento de regulación que se active en condiciones específicas de estrés. En cualquier caso, conviene ser cautos ya que el número de genotipos analizado fue limitado (131 en el primer experimento y 194 en el segundo) y los genotipos que se analizaron no fueron los mismos en ambas campañas.

### 2.2.3. Expresión del gen delator en flores

Los análisis de expresión del delator en flores se llevaron a cabo en tres estadios de desarrollo de la flor: botón floral, preantesis y antesis. La tabla 9 resume el número de flores que exhibió expresión del delator en los tres estadios de desarrollo.

**Tabla 9.** Número de plantas con expresión del gen delator en flores.

Nº total de plantas analizadas	818
Nº de genotipos con expresión GUS en flor en estadio de botón floral	251 (30,6%)
Nº de genotipos con expresión GUS en flor en estadio de preantesis	236 (28,8%)
Nº de genotipos con expresión GUS en flor en estadio de antesis	298 (36,4%)

En conjunto, los resultados indican que el número de plantas que expresan el delator en las flores de líneas T-DNA de tomate es muy elevado. No obstante, nuestros resultados no son muy diferentes a los observados en líneas T-DNA de *Arabidopsis* (Sundaresan *et al*, 1995; Campisi *et al*, 1999). En concreto, en el trabajo realizado por Campisi y colaboradores (emplean la misma trampa de intensificadores que nosotros), el porcentaje de plantas con expresión del delator es del 31%, mientras que en el realizado por Sundaresan y colaboradores (las plantas transgénicas portan una trampa de intensificadores diferente a la anterior), un 48% de plantas exhibía expresión del delator en inflorescencias.

Uno de los resultados que nos interesaba conocer era el número de plantas que mostraba expresión del delator asociado a un determinado estadio del desarrollo de la flor. Pudimos comprobar que en algunos genotipos la expresión del delator sólo se detectaba en botón floral, en otros sólo había expresión en preantesis y en otros sólo en antesis (tabla 10a). En total, el 15% de los genotipos analizados expresan el delator en un sólo estadio de desarrollo de la flor. Estos resultados podrían indicar que se han etiquetado elementos reguladores de algunos genes que se expresan en estadios muy concretos del desarrollo floral.

Por otro lado, pudimos comprobar que algunos genotipos expresaban el delator en dos de los tres estadios de desarrollo de la flor que analizamos. En concreto, esto ocurría en el 18% de los genotipos (tabla 10b). Algunos de los datos que hemos obtenido requieren una ulterior verificación y un estudio más riguroso. Por ejemplo, en un 5% de los genotipos hemos detectado expresión del delator en botón floral y antesis, pero no en preantesis. En estos casos la ausencia de expresión del delator en preantesis podría deberse a algún problema relacionado con el ensayo histoquímico, pero no cabe descartar que se

haya detectado un elemento regulador de un gen que se active en fases tempranas y tardías del desarrollo de la flor. Si así fuera, se trataría de genes que tienen un modo de acción complejo, ya que se activarían en una fase temprana del desarrollo de la flor, se inactivarían en una fase intermedia, y volverían a activarse en una fase más tardía.

Además, en otros genotipos (en torno al 15%; tabla 10c) se detectó la expresión del delator en los tres estadios del desarrollo de la flor que se analizaron. En este caso, cabe la posibilidad de que el delator se haya activado por elementos reguladores que rigen la expresión de genes implicados en las diferentes etapas del desarrollo de la flor.

**Tabla 10.** Número de plantas con expresión del gen delator en flores.

a. Expresión del delator en un solo estadio del desarrollo de la flor	
Estadio en el que se detecta expresión del delator	Nº genotipos
Botón floral	64 (7,8%)
Preantesis	11 (1,3%)
Antesis	51 (6,2%)
Total	126 (15,4%)
b. Expresión del delator en dos estadios del desarrollo de la flor	
Estadios en los que se detecta expresión del delator	Nº genotipos
Botón floral y preantesis	22 (2,7%)
Botón floral y antesis	44 (5,3%)
Preantesis y antesis	82 (10,0%)
Total	148 (18,1%)
c. Expresión del delator en los tres estadios del desarrollo de la flor	
Estadios en los que se detecta expresión del delator	Nº genotipos
Botón floral, preantesis y antesis	110 (14,7%)

Nota: se evaluaron 818 genotipos.

Conviene indicar que el patrón de expresión del delator fue característico en cada genotipo y la forma de representar los datos en las tablas anteriores (tablas 9 y 10) no permite hacerse una idea de los órganos o tejidos en los que se detectó la expresión del delator (ver figura 5). En este sentido, algunos genotipos pueden tener un enorme interés, no tanto por el estadio de desarrollo en el que se detecta la expresión sino más bien por el tipo de órgano o tejido en el que se detecta dicha expresión. Por esa razón, a la hora de seleccionar líneas concretas, se analizó el tipo de tejido u órgano de la flor que mostraba expresión. El resumen de los resultados del análisis se presenta en las tablas 11, 12, 13 y 14.

**Tabla 11.** Número de plantas con expresión del gen delator en los distintos verticilos de la flor.

Nº total de plantas analizadas	818
Nº de genotipos con expresión GUS en sépalo	56 (6,8%)
Nº de genotipos con expresión GUS en pétalo	48 (5,8%)
Nº de genotipos con expresión GUS en estambre	359 (43,9%)
Nº de genotipos con expresión GUS en pistilo	158 (19,3%)
Nº de genotipos con expresión GUS en flores	395 (48,3%)

**Tabla 12.** Número de plantas con expresión del gen delator en sólo uno de los verticilos de la flor

Nº total de plantas analizadas	818
Nº de genotipos con expresión GUS sólo en sépalo	1 (0,1%)
Nº de genotipos con expresión GUS sólo en pétalo	3 (0,4%)
Nº de genotipos con expresión GUS sólo en estambre	219 (26,8%)
Nº de genotipos con expresión GUS sólo en pistilo	24 (2,9%)

**Tabla 13.** Número de plantas con expresión del gen delator en diferentes partes del pistilo.

Nº total de plantas analizadas	818
Nº de genotipos con expresión GUS en estigma	38 (4,6%)
Nº de genotipos con expresión GUS en estilo	43 (5,2%)
Nº de genotipos con expresión GUS en ovario	56 (6,8%)
Nº de genotipos con expresión GUS en óvulos	25 (3,1%)

**Tabla 14.** Número de plantas con expresión del gen delator en sólo una de las diferentes partes del pistilo.

Nº total de plantas analizadas	818
Nº de genotipos con expresión GUS en estigma	4 (0,5%)
Nº de genotipos con expresión GUS en estilo	9 (1,1%)
Nº de genotipos con expresión GUS en ovario	7 (0,9%)
Nº de genotipos con expresión GUS en óvulos	2 (0,2%)

La primera conclusión que se puede extraer de los resultados es que el número de eventos positivos de expresión del delator en estambres es extraordinariamente alto (~44%, tabla 11). De hecho, más extraño resulta que en el 27% de las plantas sólo se exprese el delator en estambres (tabla 12).

Campisi *et al* (1999) tan sólo detectaron el 2,6% de eventos de expresión en anteras al evaluar la colección de 11.370 plantas transgénicas de *Arabidopsis* que portaba la misma trampa de intensificadores que nosotros hemos empleado. En el trabajo de Johnson *et al.* (2005) realizado con plantas transgénicas de arroz obtenidas con una trampa de intensificadores (basada en el sistema GAL4), los autores observaron un 3% de eventos de expresión positiva en estambres. En cambio, Wu *et al* (2003) observaron un 25% de eventos de expresión del delator en estambres/pistilo en otra colección de arroz transgénico con una trampa de intensificadores.

Con relación a la expresión en estambres, nosotros pensamos que muchos de los eventos de expresión que hemos observado podrían ser falsos positivos, especialmente aquellos en los que se detectó un patrón de expresión tenue. En este sentido, haciendo análisis más detallados, nos dimos cuenta que algunas flores del testigo emitían una tinción residual de color azul tenue (no conocemos exactamente la causa) que se parecía mucho a tinciones que habíamos considerado positivas en estambres de plantas transgénicas. Esto nos llevó a analizar, de nuevo, todos los verticilos de flores de plantas del cultivar original (no transgénico) para verificar que estas tinciones no aparecían en otros tejidos y que sólo se producían eventualmente en estambres. Afortunadamente, pudimos comprobar que, en efecto, la expresión residual sólo ocurría en estambres y, por tanto, los datos que aparecen en las tablas anteriores (con la excepción, claro esta, de los correspondientes a estambres) son correctos.

El problema de las tinciones en estambres se pudo solucionar con la adición de una determinada concentración de metanol al sustrato. Haciendo el análisis de esta forma, ya no aparece la tinción residual en estambres. El problema es que, cuando fuimos capaces de solventar el problema, la colección estaba ya evaluada y no teníamos espacio en el invernadero para cultivar de nuevo todos los genotipos y repetir la evaluación en estambres. Por ello, a la hora de seleccionar genotipos concretos que puedan resultar interesantes porque (en principio) expresan el delator en estambres, lo que convendría es seleccionar aquellos que exhiban una expresión intensa y verificar el resultado usando el sustrato modificado.

Por otro lado, se han identificado algunos genotipos en los que sólo se ha detectado la expresión del delator en un determinado verticilo (tabla 12). En este sentido, conviene resaltar que sólo se detectó 1 línea T-DNA con expresión en sépalo y 3 con expresión en pétalo.

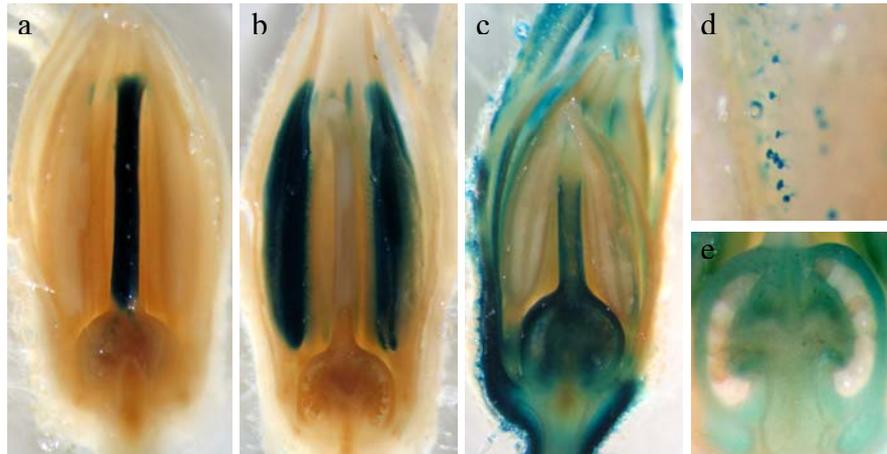
Otro dato que tiene un gran interés es que en torno al 2,9% de los genotipos sólo expresaba el delator en pistilo (tabla 12). Teniendo en cuenta las múltiples aplicaciones que puede tener la identificación de elementos de regulación de genes específicos de ovario, decidimos analizar la parte del pistilo en la que se producía el evento de expresión.

Así pues, se evaluaron de forma más detallada los genotipos que mostraban expresión GUS en el pistilo (tabla 13). En este sentido, se han identificado 4 genotipos que sólo expresan el delator en estigma, 9 que sólo lo expresan en estilo, 7 que sólo lo expresan en ovario y 2 que expresan el delator únicamente en óvulos (tabla 14). Como consecuencia, es posible que se hayan detectado elementos de genes que se expresan específicamente en este tipo de órganos.

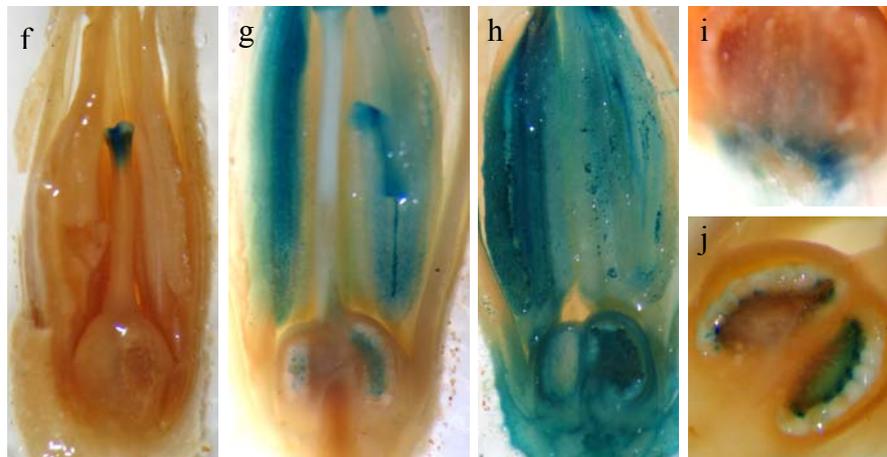
Por último, hemos procesado los datos basándonos por un lado en el estadio de desarrollo en el que se detecta algún patrón de expresión del delator, y por otro en el tipo de órgano en el que observamos dicho patrón de expresión. La combinación de estos resultados nos ha permitido seleccionar algunas líneas interesantes sobre la base tanto del patrón temporal de expresión del delator (e.g. expresión en uno o varios estadios del desarrollo floral) como de su patrón de expresión espacial (e.g. expresión en polen).

Por ejemplo, el genotipo 495ET73 exhibe un intenso nivel de expresión del delator en estambres sólo en el estadio de botón floral (figura 5b). Si esto es así, es posible que se haya etiquetado un elemento de regulación de un gen implicado en los primeros estadios de desarrollo de las anteras. En el genotipo 788ET73 se detecta un nivel tenue de expresión del delator en anteras en el estadio de botón floral y un nivel de expresión más intenso en los estadios de preantesis y, sobre todo, en antesis (figura 5k y 5n). En este caso, quizá se haya etiquetado un elemento regulador de un gen relacionado con la maduración del grano de polen. En el genotipo 90ET73 observamos que la expresión del delator sólo ocurría en el estigma de la flor y, concretamente, en los estadios de preantesis y antesis (figura 5f). En este genotipo, podríamos haber etiquetado un gen que regula el proceso de polinización de la flor. Desde luego, esto no son más que hipótesis, porque los genes etiquetados pueden cumplir funciones diferentes a lo que inicialmente pueda parecer. Aún así, se han identificado más de 20 líneas T-DNA que muestran una especificidad en relación con el órgano (u órganos) y el estadio (o estadios) de desarrollo en los que se detectó la expresión del delator. Estos genotipos son buenos candidatos para, en un futuro próximo, llevar a cabo análisis más detallados y, sobre la base de estos nuevos datos, decidir si conviene proceder a la clonación de los genes etiquetados en las líneas más interesantes.

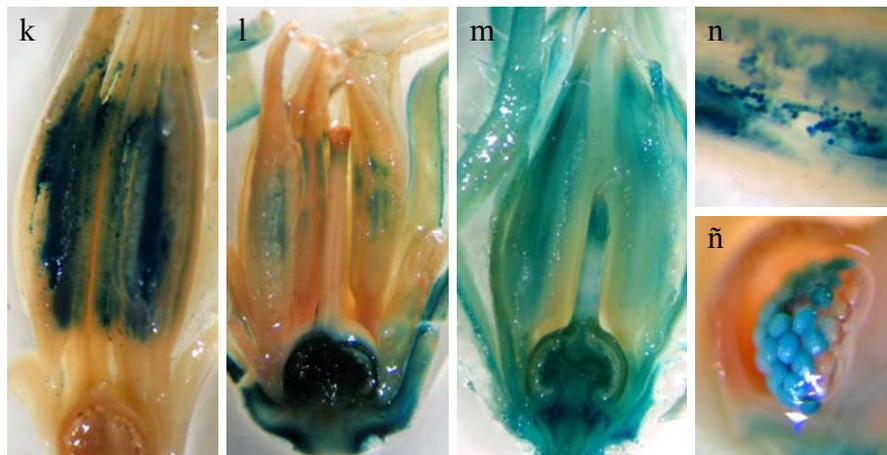
## Botón floral



## Preantesis



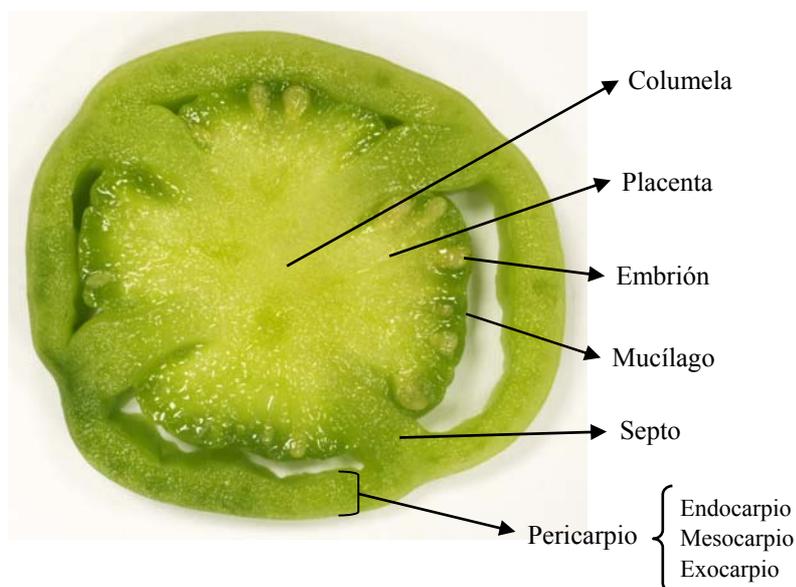
## Antesis



**Figura 5.** Patrones característicos de expresión del gen delator en los tres estadios de desarrollo de la flor. Expresión del delator en el estadio de botón floral en: (a) estilo; (b) estambres; (c) todos los verticilos excepto estambres; (d) tricomas del sépalo; (e) ovario. Expresión en el estadio de preantesis en: (f) estigma; (g); funículo, antera, estilo (tenue) y estigma; (h) ubicua; (i) zona que une la flor con el pedúnculo; (j) funículo y placenta. Expresión en el estadio de antesis en: (k) anteras; (l) sépalos, ovario y óvulos (intensa); (m) ubicua; (n) polen; y (ñ) óvulos.

### 2.2.4. Expresión del gen delator en frutos

Los análisis de expresión del delator se llevaron a cabo con frutos recién cuajados. Se analizó la expresión del delator en pericarpio (sin diferenciar si la expresión se producía en exocarpio, mesocarpio o endocarpio), placenta (considerando tanto la placenta propiamente dicha, como la columela y el septo), lóculo (considerando sólo la expresión en mucílago) y embriones en desarrollo o semillas inmaduras (ver figura 6). La tabla 15 resume los resultados obtenidos.



**Figura 6.** Algunas partes relevantes del fruto

**Tabla 15.** Número de plantas con expresión del gen delator en función de la parte del fruto que exhibía tinción GUS.

Nº total de plantas analizadas	717
Nº de genotipos con expresión GUS en pericarpio	227 (31,6%)
Nº de genotipos con expresión GUS en placenta	103 (14,3%)
Nº de genotipos con expresión GUS en mucílago	49 (6,8%)
Nº de genotipos con expresión GUS en embrión	199 (27,7%)
Nº total de genotipos con expresión GUS en fruto	358 (49,9%)

Como puede verse en la tabla 15, el 50% de las líneas T-DNA de tomate expresaron el delator en alguna zona del fruto. Las zonas del fruto en las que se detectaron mayores frecuencias de expresión del delator fueron pericarpio (~ 30%) y embrión o semilla inmadura (~ 28%). No hemos encontrado en la bibliografía datos comparables a los obtenidos por nosotros en frutos inmaduros. No obstante, en arroz, Peng *et al* (2005)

detectaron que en torno al 40% de las líneas transgénicas con una trampa de intensificadores expresaban el delator en embriones de semillas maduras.

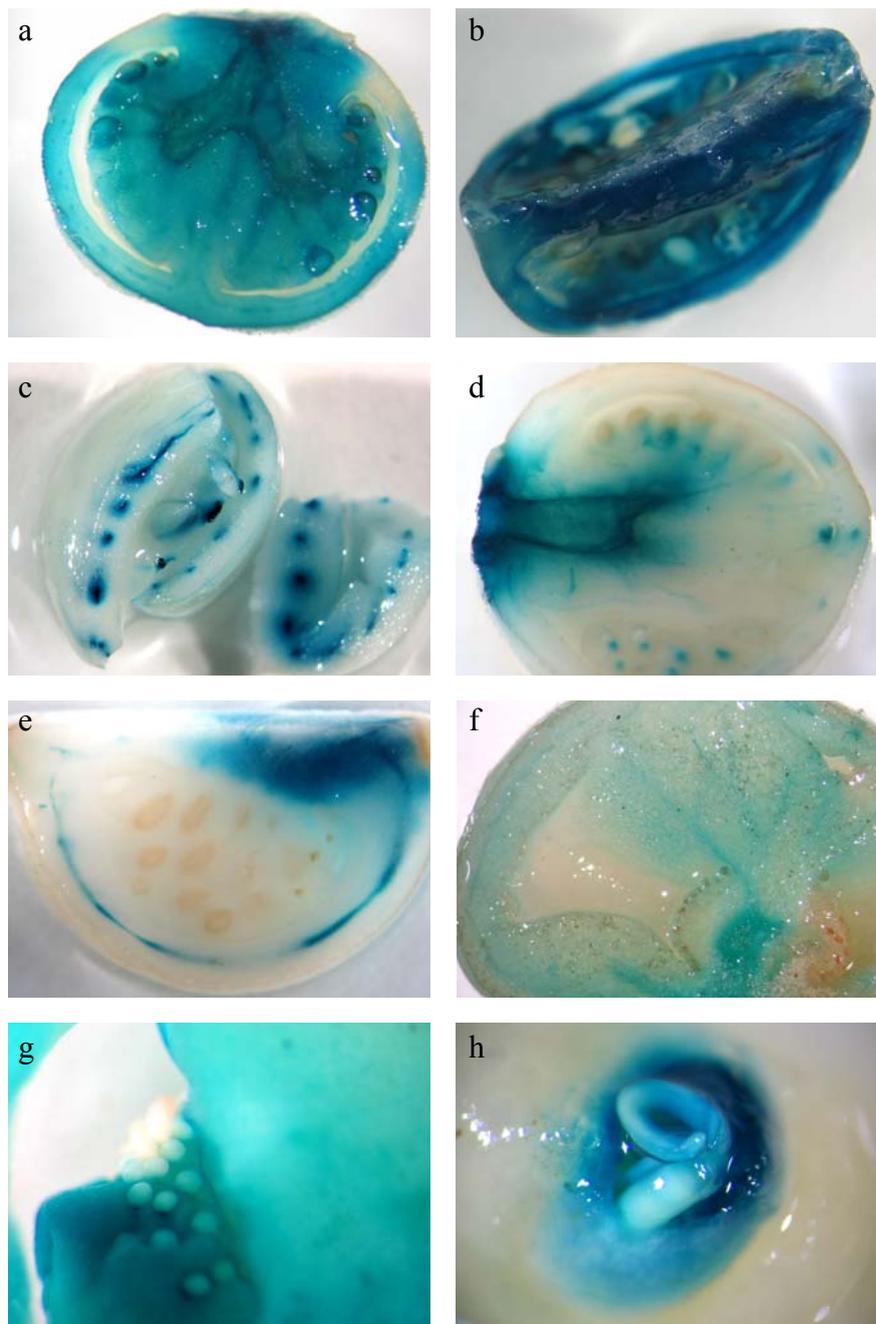
En lo que respecta a los niveles de expresión del delator, lo que observamos en la mayor parte de los genotipos fue una tinción tenue en el pericarpio, mientras que la tónica habitual en embriones fue una tinción intensa.

**Tabla 16.** Número de plantas con expresión del gen delator en una sola zona del fruto.

Nº total de plantas analizadas	717
Nº de genotipos con expresión GUS sólo en pericarpio	78 (10,9%)
Nº de genotipos con expresión GUS sólo en placenta	13 (1,8%)
Nº de genotipos con expresión GUS sólo en mucílago	6 (0,8%)
Nº de genotipos con expresión GUS sólo en embrión	92 (12,8%)

Por otro lado, se han detectado eventos de expresión exclusivos en una zona concreta del fruto (tabla 16). En este sentido, 78 genotipos expresaron el delator sólo en el pericarpio, 13 lo hacían sólo en la placenta, 6 sólo en mucílago y 92 expresaban el delator sólo en embriones o semillas inmaduras.

Evidentemente, cada genotipo dio un patrón característico de expresión en cada una de esas zonas del fruto, y a la hora de seleccionar genotipos concretos, se debe llevar a cabo un análisis más detallado para determinar la zona exacta en la que se expresa el delator en lo que se refiere a las diferentes etapas del desarrollo del fruto, o dicho de otra forma en un contexto espacio-temporal (ver algunos ejemplos en la figura 7). De momento, lo único que se puede decir es que los análisis efectuados parecen indicar que se han etiquetado elementos de regulación de genes que se expresan en zonas específicas del fruto.



**Figura 7.** Diferentes patrones de expresión del gen delator en fruto: a) expresión ubicua moderada en fruto, b) expresión ubicua intensa; c) expresión en haces conductores a nivel del pericarpio; d) elevado nivel de expresión en la zona de unión del fruto con el pedúnculo; e) expresión en células del mesocarpio y placenta; f) expresión en la columela y en ciertas células del septo, lóbulo y pericarpio; g) ausencia de expresión en embriones inmaduros de un fruto que exhibe un patrón casi ubicuo; h) expresión específica del delator en embriones.

### 2.3. Consideraciones adicionales en torno a los análisis de expresión del delator

En lo que respecta a caracteres relacionados con el crecimiento vegetativo, se ha evaluado la expresión del delator en 768 plantas transgénicas cultivadas *in vitro* y 836 plantas transgénicas cultivadas *in vivo* (invernadero).

Por lo que se refiere a caracteres reproductivos, en flores se ha evaluado la expresión del delator en 818 plantas transgénicas, mientras que en fruto el análisis se ha realizado en 717 plantas transgénicas.

A la hora de seleccionar genotipos concretos sobre la base de los análisis de la expresión del gen delator, un aspecto interesante es conocer el patrón de expresión espacial de las plantas que han exhibido eventos positivos. Del total de plantas analizadas en los diferentes experimentos, 713 se han evaluado para todos los caracteres. Esto nos ha permitido seleccionar genotipos relevantes sobre la base de la expresión espacial del delator. La tabla 17 resume el número de genotipos que exhibieron expresión del delator en función de la estructura de la planta en la que se produjo el evento positivo.

**Tabla 17.** Número de plantas con expresión del gen delator en función del tipo de estructura que exhibía tinción GUS.

Nº total de plantas analizadas	713
Nº de genotipos con expresión GUS sólo en estructuras vegetativas	40 (5,6%)
Nº de genotipos con expresión GUS sólo en flores	77 (10,8%)
Nº de genotipos con expresión GUS sólo en frutos	78 (10,9%)
Nº de genotipos con expresión GUS en una sola estructura	195 (27,3%)
Nº de genotipos con expresión GUS en estructuras vegetativas y en flores	35 (4,9%)
Nº de genotipos con expresión GUS en estructuras vegetativas y en frutos	44 (6,2%)
Nº de genotipos con expresión GUS en flores y en frutos	92 (12,9%)
Nº de genotipos con expresión GUS en dos tipos de estructuras	171 (23,9%)
Nº de genotipos con expresión GUS en estructuras vegetativas, flores y frutos	135 (18,9%)
Nº de genotipos con un patrón de expresión GUS ubicuo	9 (1,3%)
Nº de de genotipos con expresión GUS en las tres estructuras	144 (20,2%)

En torno al 27% de los genotipos analizados exhiben expresión del delator en una sola estructura. En este sentido, 40 líneas T-DNA sólo expresaron el delator en estructuras de tipo vegetativo y casi el doble lo hicieron sólo en flores (77 líneas) o sólo en frutos (78

líneas). El mayor porcentaje de eventos de expresión en estructuras de tipo reproductivo sugiere una mayor actividad génica durante el desarrollo de este tipo de órganos.

Por otro lado, casi el 24% de los genotipos expresó el delator en dos de los tres tipos de estructuras analizadas. La mayor parte de los genotipos expresaban el delator en flores y fruto (en torno al 13%).

Además, un 20% de los genotipos tenían expresión del delator en todas las estructuras analizadas y el 1,3% (9 genotipos) exhibía un patrón de expresión ubicuo o, como se denomina habitualmente, constitutivo (es decir, en estas líneas el delator se expresó en todas y cada una de las células de los tejidos u órganos que se utilizaron para llevar a cabo el análisis). En conjunto, los resultados parecen indicar el etiquetado de elementos de regulación de genes que pueden estar relacionados con determinados procesos del desarrollo de órganos o tejidos concretos. Asimismo, es bastante probable que se haya etiquetado algún elemento de regulación que se expresa de forma ubicua a lo largo del desarrollo de la planta.

Por lo que se refiere a las plantas con expresión del delator en un solo tejido u órgano, el análisis de los datos permitió seleccionar genotipos que expresaron el delator en tejidos u órganos muy concretos de la planta. Los genotipos seleccionados se pueden ver en la tabla 18.

Como puede verse en la tabla 18A, por lo que se refiere a estructuras de tipo vegetativo, se detectaron 7 genotipos que sólo expresaron el delator en tallo. En la mayor parte de estos genotipos la expresión se localizaba en los vasos conductores, lo que podría estar relacionado con genes implicados en los mecanismos de transporte a través del tallo. Además, tres genotipos expresaron específicamente el delator en raquis, peciolo u hoja.

Por lo que respecta a estructuras de tipo reproductivo, se detectaron genotipos que sólo expresaban el delator en partes muy concretas de la flor. En este sentido, detectamos un elevado número de genotipos que expresaban el delator específicamente en anteras. A pesar de los problemas que tuvimos en relación con la tinción GUS en anteras (ver apartado “Expresión del gen delator en flores”) es bastante probable que se haya identificado algún elemento de regulación relacionado con el desarrollo y/o maduración del polen, lo que podría tener un gran interés desde un punto de vista de mejora por las posibilidades que ofrece el uso de promotores de genes específicos de anteras con relación

a la obtención de plantas androestériles mediante el sistema Barnasa / BarStar u otros sistemas similares.

También se han identificado genotipos que expresan específicamente el delator en pétalos, estigma y ovario (tabla 18B). Al respecto, conviene señalar que sólo se ha encontrado una línea T-DNA con expresión específica en ovario (312 ET73).

**Tabla 18.** Número de plantas con expresión del gen delator en estructuras u órganos muy concretos de la planta

Nº total de plantas analizadas	713
<b>A) Genotipos que sólo expresan el delator en tejidos vegetativos</b>	
Nº de genotipos con expresión sólo en tallo	7 (0,9%)
Nº de genotipos con expresión GUS sólo en raquis	1 (0,1%)
Nº de genotipos con expresión GUS sólo en peciolo	1 (0,1%)
Nº de genotipos con expresión GUS sólo en limbo	1 (0,1%)
<b>B) Genotipos que sólo expresan el delator en flores</b>	
Nº de genotipos con expresión sólo en pétalo	1 (0,1%)
Nº de genotipos con expresión sólo en estambre	54 (7,6%)
Nº de genotipos con expresión sólo en estigma	5 (0,7%)
Nº de genotipos con expresión sólo en ovario	1 (0,1%)
<b>C) Genotipos que sólo expresan el delator en frutos inmaduros</b>	
Nº de genotipos con expresión sólo en exocarpio	5 (0,7%)
Nº de genotipos con expresión sólo en mesocarpio	2 (0,3%)
Nº de genotipos con expresión sólo en mucílago	1 (0,1%)
Nº de genotipos con expresión sólo en embrión	23 (3,2%)

Por lo que se refiere a fruto, se han identificado 7 genotipos que expresan el delator específicamente en pericarpio, cinco de los cuales lo hacen en el exocarpio y dos en el mesocarpio. En estos genotipos se podrían haber etiquetado elementos de regulación de genes relacionados con las primeras etapas del desarrollo del fruto (los análisis se realizaron con frutos recién cuajados). Además, se detectó un genotipo con expresión específica del delator en mucílago y 23 con expresión específica en embriones inmaduros (tabla 18C).

Por consiguiente, se ha identificado un buen número de genotipos que pueden tener un notable interés por el patrón de expresión que exhiben. Estas líneas T-DNA (tabla 18.2)

pueden ser el material de partida para el aislamiento de secuencias de regulación de genes que se expresan específicamente en un determinado tejido u órgano de la planta de tomate.

**Tabla 18.2.** Código de plantas con expresión del gen delator en estructuras u órganos muy concretos de la planta

A) Códigos de los genotipos que sólo expresan el delator en tejidos vegetativos	
Expresión sólo en tallo	158 ET73, 192 ET73, 321 ET73, 500 ET73, 513 ET73, 567 ET73, 654 ET73
Expresión sólo en raquis	489 ET73
Expresión sólo en peciolo	481 ET73
Expresión sólo en limbo	215 ET73
B) Códigos de los genotipos que sólo expresan el delator en flores	
Expresión sólo en pétalo	860 ET73
Expresión sólo en estambre	25 ET73, 42 ET73, 145 ET73, 157 ET73, 223 ET73, 260 ET73, 266 ET73, 267 ET73, 268 ET73, 295 ET73, 314 ET73, 330 ET73, 336 ET73, 351 ET73, 352 ET73, 357 ET73, 365 ET73, 393 ET73, 396 ET73, 403 ET73, 404 ET73, 414 ET73, 423 ET73, 433 ET73, 495 ET73, 498 ET73, 506 ET73, 510 ET73, 515 ET73, 523 ET73, 545 ET73, 547 ET73, 561 ET73, 580 ET73, 595 ET73, 606 ET73, 620 ET73, 627 ET73, 631 ET73, 632 ET73, 634 ET73, 635 ET73, 651 ET73, 656 ET73, 701 ET73, 707 ET73, 709 ET73, 762 ET73, 788 ET73, 795 ET73, 895 ET73, 902 ET73, 927 ET73, 947 ET73
Expresión sólo en estigma	90 ET73, 163 ET73, 202 ET73, 604 ET73, 614 ET73
Expresión sólo en ovario	312 ET73
C) Códigos de los genotipos que sólo expresan el delator en frutos inmaduros	
Expresión sólo en exocarpio	89 ET73, 126 ET73, 641 ET73, 643 ET73, 794 ET73
Expresión en mesocarpio	94 ET73, 121 ET73
Expresión sólo en mucílago	590 ET73
Expresión sólo en embrión	71 ET73, 134 ET73, 210 ET73, 213 ET73, 232 ET73, 333 ET73, 335 ET73, 340 ET73, 367 ET73, 368 ET73, 542 ET73, 571 ET73, 584 ET73, 639 ET73, 647 ET73, 663 ET73, 684 ET73, 685 ET73, 692 ET73, 738 ET73, 756 ET73, 767 ET73, 769 ET73

De hecho, la identificación de promotores que permitan modular la expresión génica haciendo que los genes se expresen adecuadamente en un contexto espaciotemporal cobra cada día mayor interés en el campo de la mejora por transformación o ‘mejora molecular’ (*molecular breeding*). En estos últimos años se han realizado intensos esfuerzos encaminados a la identificación y caracterización de promotores apropiados para controlar la expresión de genes candidatos. Esto se debe a los problemas que suelen ocasionar los promotores de tipo constitutivo como, por ejemplo, efectos pleiotrópicos indeseables, un coste energético excesivo que redundaría en un descenso de la producción, etc. Con todo, lo

cierto es que probablemente el 90% (o más) de los experimentos de transformación se han realizado con genes bajo el control del promotor 35S.

Aunque en la actualidad existe un amplio abanico de promotores que han sido caracterizados (con mayor o menor detalle) a nivel funcional para tratar de modular la expresión de los transgenes, no siempre son útiles cuando se utilizan en especies distintas a la especie de la que procede el promotor en cuestión.

A título de ejemplo, el promotor *EPSPS* de petunia promueve un elevado nivel de expresión en los pétalos de las flores de petunia (Gasser *et al*, 1988), pero genera un débil nivel de expresión en los pétalos de las flores de tabaco, pese a que ambas especies pertenecen a la misma familia (Benfey y Chua, 1989).

Lo ideal sería disponer de secuencias reguladoras específicas para cada especie. En este sentido, nosotros disponemos de un material potencialmente muy interesante para el aislamiento de secuencias de regulación específicas de tomate que podrían ser empleadas en un futuro para dirigir la expresión de genes candidatos en experimentos de transformación genética en esta especie.

Otro aspecto que queríamos conocer era si las progenies de las plantas transgénicas exhibirían los patrones de expresión característicos de sus progenitores. Nosotros realizamos los análisis de expresión del delator en transformantes primarios (TG1) y podría darse la circunstancia de que, debido a cambios de tipo epigenético o a cualquier otro tipo de efectos, los patrones de expresión que se habían observado en estas plantas no se manifestaran de igual forma en la progenie. Por esta razón, decidimos realizar algunos análisis de expresión del delator con un grupo de descendencias TG2 procedentes de plantas TG1 que habían exhibido un patrón característico. Los resultados obtenidos en estas líneas se pueden ver en la tabla 19.

**Tabla 19.** Análisis de la expresión del gen delator en plantas TG1 y en sus correspondientes progenies TG2

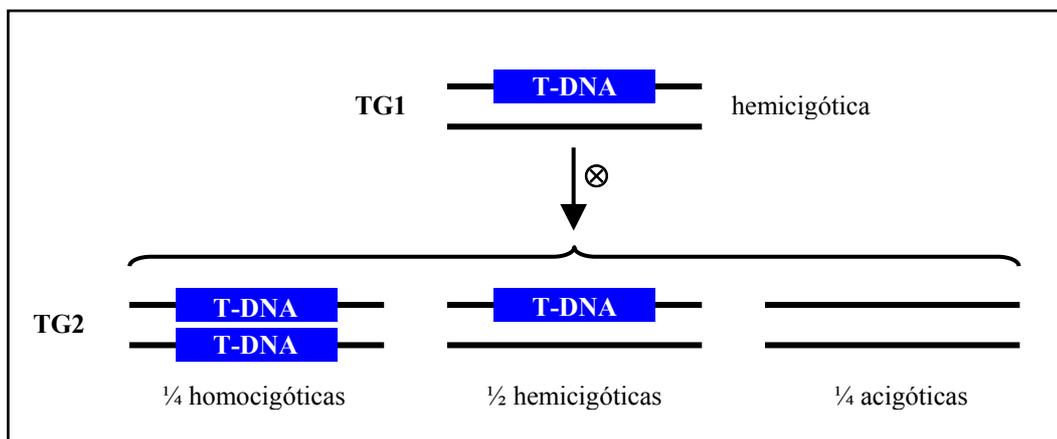
Análisis en TG1				Análisis en TG2					
Línea T-DNA	Patrón espacial tinción GUS			Plantas analizadas	Segreg. GUS	Patrón espacial tinción GUS			Segreg. Kan <sup>R/S</sup>
	Veget.	Flor	Fruto			Veget.	Flor	Fruto	
7 ET73				10	9				3R : 1S
					1				
52 ET73				10	8				3R : 1S
					2				
56 ET73				10	9				3R : 1S
					1				
84 ET73				10	8				3R : 1S
					2				
131 ET73				10	6				3R : 1S
					4				
195 ET73				10	6				3R : 1S
					4				

En la mayor parte de las líneas evaluadas, los resultados obtenidos en TG2 coinciden con los observados en TG1.

Por ejemplo, en la TG1 de la línea 7 ET73 se observó expresión del delator en los estambres y óvulos de las flores y en los embriones del fruto. En TG2, se analizaron 10 plantas y en 9 de ellas la expresión se detectó de nuevo en estambres y óvulos de las flores, así como en los embriones del fruto. En el genotipo 52 ET73 (TG1) la expresión se observó en los estambres, ovario y óvulos de la flor y en los embriones del fruto. En la TG2, 8 plantas mostraron el mismo patrón de expresión. En el genotipo 56 ET73 (TG1) la expresión se observó en hojas, en los estambres y el estilo de la flor y en los embriones del fruto. En la TG2, 8 plantas mostraron el mismo patrón de expresión. En el genotipo 84 ET73 (TG1) la expresión se observó en hojas adultas (pero no en las hojas jóvenes), en los sépalos, pétalos, estambres, estilo, ovario y óvulos de la flor y en el mucílago, placenta y los embriones del fruto. En la TG2, 8 plantas mostraron el mismo patrón de expresión. En el genotipo 131 ET73 (TG1) la expresión se observó sólo en hojas. En la TG2, 6 plantas mostraron el mismo patrón de expresión. En el genotipo 219 ET73 (TG1) la expresión se observó sólo en los embriones del fruto. En la TG2, 6 plantas mostraron el mismo patrón de expresión.

Se analizaron más de 20 progenies TG2 y en la mayor parte de las líneas evaluadas el patrón de expresión del delator en las plantas TG2 era idéntico al que se había visto previamente en la TG1. Las plantas que no dieron expresión del delator eran supuestamente plantas acigóticas que, tras la segregación del T-DNA, no portaban la trampa de intensificadores (ver figura 8).

De hecho, se pudo comprobar que en la mayor parte de las líneas donde observamos correlación en el patrón de expresión GUS en TG1 y TG2, la TG2 tenía un patrón de segregación 3:1 en un medio basal con kanamicina (habitualmente, se sembraban en torno a 50 semillas TG2 en un medio base suplementado con kanamicina y se anotaba la segregación sobre la base de la capacidad para crecer en este medio selectivo).



**Figura 8.** Segregación del T-DNA en la descendencia para el caso de una sola inserción

El único aspecto que no fuimos capaces de valorar en el análisis de las plantas que segregaban para una sola copia del T-DNA fue la correspondencia de la intensidad de tinción GUS entre las plantas TG1 y las TG2 (positivas). En este sentido, cabe la posibilidad de que, si la expresión es dependiente del número de copias, las plantas homocigóticas de la TG2 muestren mayor nivel de expresión del delator que las hemicigóticas (y que la TG1, también hemicigótica). En nuestro caso, no observamos, al menos aparentemente, diferencias en lo que se refiere a la intensidad de la tinción del delator en las diferentes plantas TG2.

Lo que sí observamos en unas pocas líneas fue que el patrón de expresión del delator no era exactamente igual en la TG1 y en las plantas (positivas) de la TG2. A título de ejemplo, en el genotipo 29 ET73 (TG1) la expresión se observó en las hojas, en los sépalos, pétalos, estambres, ovario y óvulos de la flor y en todos los tejidos del fruto. En la TG2, 8 plantas mostraron el mismo patrón de expresión que la TG1, pero en 2 plantas sólo se vio la expresión en las hojas, en los estambres de la flor y en el pericarpio, placenta y embriones del fruto. En el genotipo 128 ET73 la expresión se observó en los estambres de la flor y en el pericarpio, mucílago y embriones del fruto. En la TG2, 3 plantas mostraron el mismo patrón de expresión que la TG1, pero en 7 plantas la expresión del delator se vio

en los sépalos, estambres y estigma de la flor y en el pericarpio, mucílago, placenta y embriones del fruto.

Conviene señalar que en los casos en los que no había concordancia, los patrones de expresión de las plantas TG1 y TG2 no fueron diametralmente opuestos. Es decir, en algunas plantas TG2, el delator se expresaba en algunas zonas que no se habían teñido en la TG1, o viceversa.

Una de las posibles explicaciones es que la ausencia de tinción GUS en algunos tejidos o células se deba a un problema relacionado con la reacción histoquímica en esos tejidos o células durante la incubación de las muestras. No obstante, en algún caso concreto lo que podría ocurrir es que las diferencias observadas en plantas TG1 y TG2 se deban a la inserción de más de una copia del T-DNA. Por ejemplo, si se insertan 2 copias, el gen delator de cada una de ellas podría activarse por un elemento de regulación diferente, dando no uno, sino dos patrones de expresión diferentes. En este caso, la TG1 exhibiría el patrón de expresión conferido por la suma de los dos elementos de regulación etiquetados y en la TG2 se detectarían tres patrones de expresión del delator diferentes: uno idéntico a la TG1, que se produciría en las plantas TG2 con dos copias, y dos diferentes y complementarios, que se verían cuando se expresen cada una de las copias por separado.

De hecho, en alguna de las líneas en las que no se observaba correlación estricta, el análisis de la segregación en medio con kanamicina indicaba la presencia de más de una copia (en algunos casos, los datos sugerían una segregación 15:1). En estos casos, habrá que realizar análisis Southern y evaluaciones más exhaustivas tanto en la TG2 como, sobre todo, en las descendencias TG3, a fin de contrastar estas hipótesis con las líneas seleccionadas.

### **3. IDENTIFICACIÓN DE MUTANTES EN LA COLECCIÓN DE LÍNEAS T-DNA**

#### **3.1. Caracterización fenotípica del cultivar de tomate p73**

Habida cuenta de que para llevar a cabo la identificación y la posterior caracterización fenotípica de un presunto mutante hay que partir de un conocimiento adecuado en torno a los caracteres del desarrollo vegetativo y reproductivo de las plantas de fenotipo silvestre, a medida que se iba generando la colección de plantas transgénicas decidimos realizar una caracterización fenotípica de las plantas del cultivar p73 de tomate.

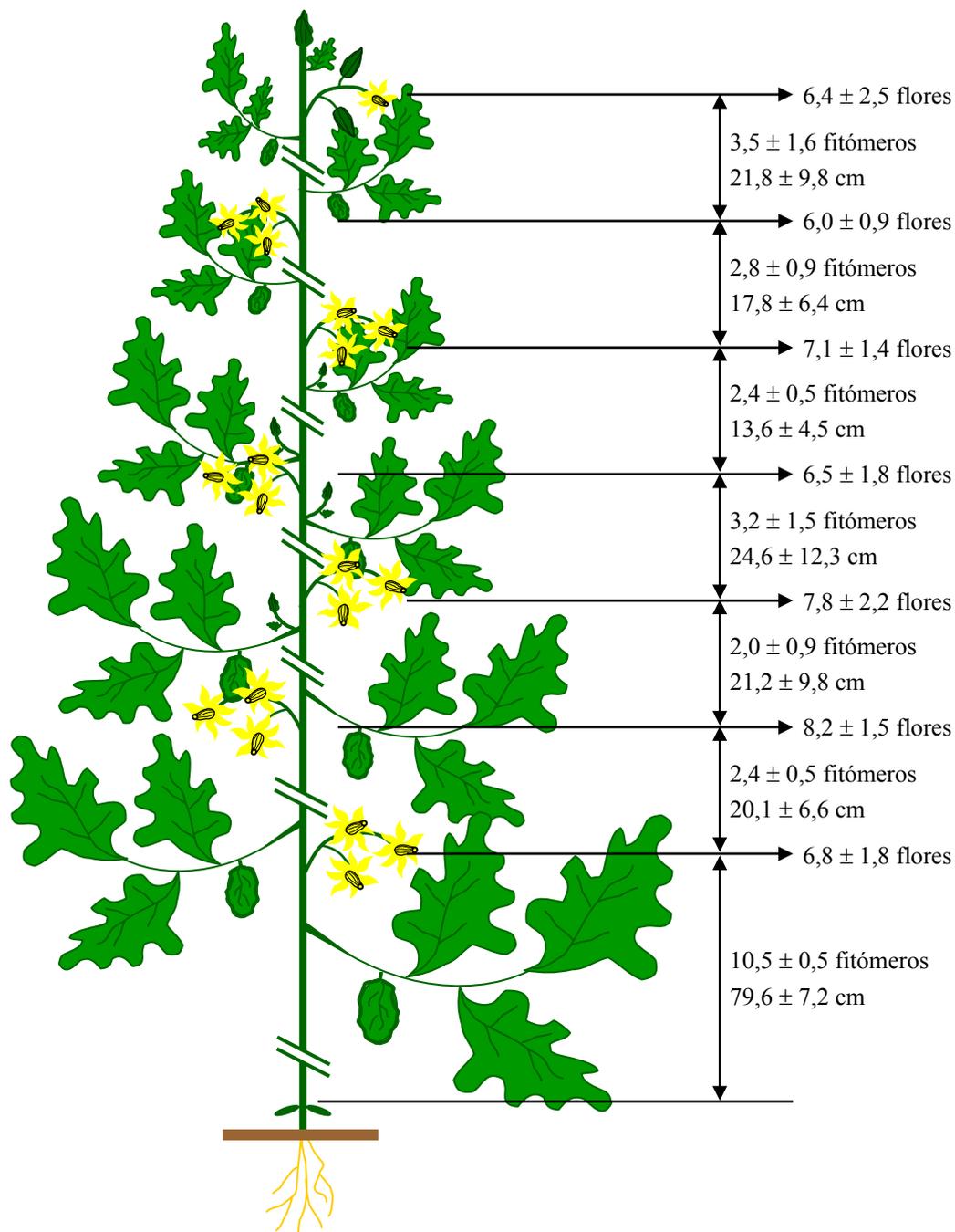
El crecimiento simpodial en este cultivar se caracteriza por el desarrollo de 10 a 11 hojas antes de que el meristemo apical experimente un cambio de identidad, generando una inflorescencia. En este estado, la planta tiene una altura aproximada de 80 cm. El crecimiento subsiguiente se produce a partir de la yema axilar de la última hoja, la cual desarrolla un tallo secundario que crece como una prolongación del tallo primario, desplazando lateralmente a la inflorescencia. Los siguientes segmentos del tallo se desarrollan de forma similar, produciendo una inflorescencia cada dos, tres o cuatro hojas, lo que equivale a 18-25 cm de distancia entre inflorescencias (figura 9).

Las hojas son pinnadocompuestas, tienen un foliolo terminal y en torno a ocho foliolos laterales que a su vez son compuestos. Los foliolos compuestos se unen al eje central (denominado raquis) a través de las raquillas. Estos foliolos compuestos están formados por foliolos simples que son peciolados y lobulados irregularmente con bordes dentados (figura 10a). Las hojas compuestas se insertan sobre los diversos nudos en forma alterna.

Las flores se agrupan en inflorescencias de tipo racimoso. Frecuentemente, el eje principal se ramifica por debajo de la primera flor que se ha desarrollado, dando lugar a una inflorescencia compuesta. La primera flor se forma en la yema apical y las demás se desarrollan lateralmente por debajo de la primera alrededor de un eje principal. En una misma inflorescencia se pueden observar los diferentes estadios del desarrollo floral (figura 10b).

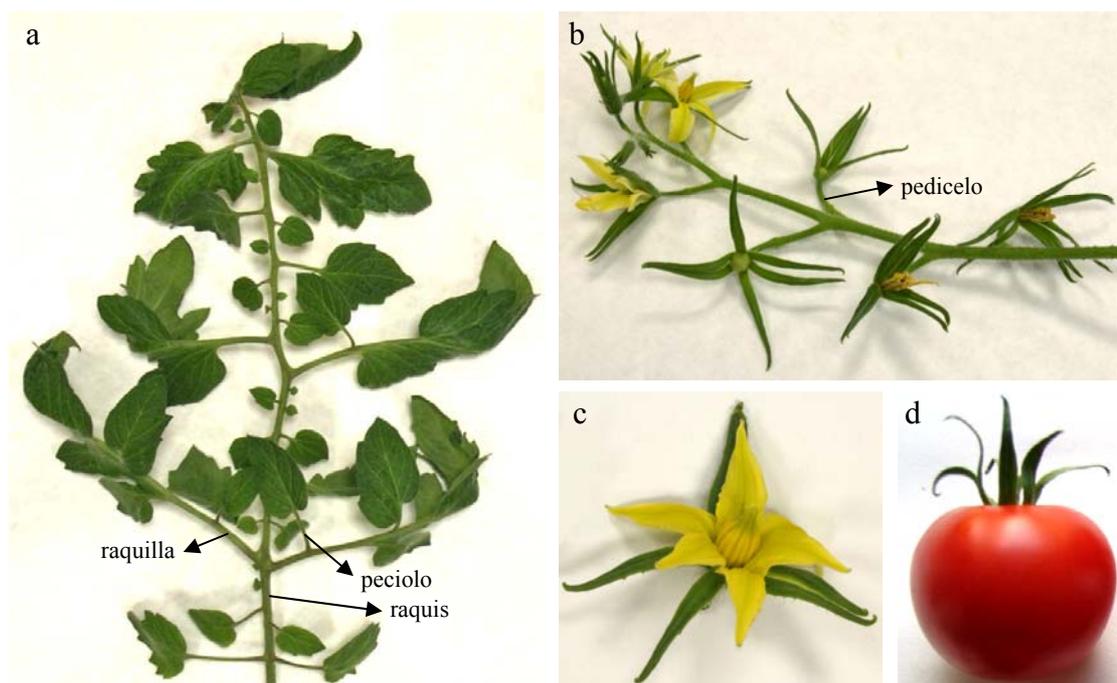
En este cultivar se desarrollan de 6 a 8 flores por inflorescencia, siendo la segunda y tercera inflorescencias las que más flores generan (figura 9). En las siete primeras inflorescencias, las plantas de cultivar p73 tienen por término medio unas 50 flores, es decir, 7 flores por inflorescencia (tabla 20).

La flor, unida al eje de la inflorescencia por un pedicelo que contiene la zona de abscisión, es hipogina con 6 sépalos, 6 pétalos y 6 estambres dispuestos de forma helicoidal que envuelven al pistilo (figura 10c).



**Figura 9.** Esquema representativo del patrón de crecimiento de las plantas del cultivar p73 de tomate. Número y longitud (cm) de fitómeros hasta la primera inflorescencia y entre inflorescencias, y número medio flores en las primeras 7 inflorescencias.

La caracterización fenotípica se llevó a cabo con 10 plantas.



**Figura 10.** Diferentes estructuras de una planta de tomate del cultivar p73: a) hoja; b) inflorescencia; c) flor; d) fruto.

**Tabla 20.** Número de flores y frutos desarrollados en las 7 primeras inflorescencias de tomate p73.

Planta	Nº inflor.	Nº flores	Flores/inflor.	Nº frutos	Frutos/inflor.
Planta 1	7	50	7,1	13	1,9
Planta 2	7	43	6,1	15	2,1
Planta 3	7	59	8,4	21	3,0
Planta 4	7	57	8,1	20	2,9
Planta 5	7	48	6,9	16	2,3
Planta 6	7	41	5,9	19	2,7
Planta 7	7	40	5,7	16	2,3
Planta 8	7	52	7,4	18	2,6
Planta 9	6	44	7,3	20	3,3
Planta 10	7	48	6,9	20	2,9
<b>Media ± desv.</b>	<b>6,9 ± 0,3</b>	<b>48,2 ± 6,5</b>	<b>7,0 ± 0,9</b>	<b>17,8 ± 2,7</b>	<b>2,6 ± 0,4</b>

Los frutos constituyen una baya globosa y redondeada, de color rojo en su maduración (figura 10d). En nuestros invernaderos, las plantas de p73 desarrollaron en torno a 2-3 frutos por inflorescencia (tabla 20). En su interior se encuentran las semillas, localizadas en los lóculos, embebidas en el mucílago y unidas a la placenta a través del funículo. Las semillas tienen forma lenticular, con un diámetro de 3 a 5 mm, y están constituidas por el embrión, el endospermo y la testa. El embrión, a su vez, contiene la yema apical, dos cotiledones, el hipocotilo y la radícula.

Tras el estudio del desarrollo vegetativo y reproductivo de las plantas de fenotipo silvestre, decidimos definir los caracteres que íbamos a tener en cuenta a la hora de evaluar las líneas T-DNA de fenotipo mutante. En la tabla 21 se pueden ver los caracteres que se evaluaron en las plantas TG1 o TG2 que mostraban alteraciones en aspectos relacionados con el desarrollo vegetativo y reproductivo.

**Tabla 21.** Caracteres del desarrollo que hemos considerado para el fenotipado de las líneas T-DNA.

Categoría	Carácter
Morfología de la hoja	Tamaño de la hoja Complejidad de la hoja Textura de la hoja Otros
Color de la hoja	Clorosis Jaspeados Color verde más intenso Otros
Tamaño de la planta	Planta pequeña Planta muy pequeña
Hábito de crecimiento	Ritmo de crecimiento Ramificación lateral Otros
Floración	Tiempo de floración
Inflorescencia	Arquitectura de la inflorescencia Número de flores por inflorescencia
Morfología de la flor	Cambio homeótico Tamaño Número de órganos por verticilo Otros
Color de la flor	Tonalidades más claras Tonalidades más oscuras
Esterilidad	Esterilidad masculina y/o femenina
Tamaño del fruto	Mayor o menor tamaño
Morfología del fruto	Morfología distinta al WT
Color del fruto	Color distinto al WT
Maduración del fruto	Maduración acelerada o retardada
Partenocarpia	Desarrollo de frutos sin semilla
Semillas	Germinación Otros

Por lo que respecta a la exposición de los resultados, el capítulo de mutagénesis insercional se ha dividido en dos secciones, en función de las alteraciones fenotípicas observadas. En la primera se describen los mutantes alterados en caracteres relacionados con el desarrollo vegetativo y en la segunda los mutantes alterados en caracteres relacionados con el desarrollo reproductivo. A su vez, cada una de estas secciones está compuesta por dos apartados: en el primero se describen los mutantes con efectos

dominantes, semidominantes o aditivos identificados en TG1 y en el segundo los mutantes identificados en TG2, es decir, aquellos con efectos de tipo recesivo. Por último, dentro de cada uno de estos apartados, en primer lugar se describen los mutantes que se han identificado en la colección de plantas transgénicas que portan construcciones convencionales (i.e. con un gen marcador y un gen delator) y, a continuación, se describen los mutantes que se han identificado en la colección de plantas transgénicas con la trampa de intensificadores.

Por lo que respecta a estos últimos, con independencia de la denominación que recibe cada mutante (que, de una u otra forma, alude al aspecto o aspectos que más llamaron la atención al identificar el mutante en cuestión), se ha utilizado un código que permita diferenciarlos de los que se han obtenido con vectores convencionales. En concreto, el código de los mutantes obtenidos con la trampa de intensificadores (por ejemplo, 127 ET 73) incluye un número (que alude al orden con que se han ido generando las líneas T-DNA) las letras ET (que aluden a que se han obtenido con la trampa de intensificadores; *enhancer trapping*) y la parte final (73) que alude al cultivar (p73).

Por otro lado, para hacer la exposición lo más sucinta posible, hemos optado por describir sólo aquellos mutantes en los que se ha realizado una caracterización fenotípica exhaustiva o aquellos que nos han parecido más interesantes. Aún así, en la mayor parte de los casos se ha optado por hacer una descripción breve de dichos mutantes. No obstante, al final de algunos apartados, se describen las alteraciones fenotípicas más relevantes que hemos observado en el resto de mutantes que se han identificado.

Conviene indicar también que algunos de los mutantes (en realidad, una buena parte de los mismos) muestran efectos pleiotrópicos y, en este sentido, se podrían haber descrito en el apartado de mutantes del desarrollo vegetativo (por las alteraciones observadas en este tipo caracteres) o en el de mutantes del desarrollo reproductivo (por las alteraciones también observadas en caracteres de tipo reproductivo). Para que estos mutantes no aparecieran en dos apartados diferentes, se han descrito en el apartado correspondiente al carácter que de manera más notable contribuyó a su identificación.

## 3.2. Mutantes alterados en el desarrollo vegetativo

### 3.2.1. Mutantes con efectos dominantes, semidominantes o aditivos

#### 3.2.1.a. Mutantes de la colección de plantas transgénicas con construcciones convencionales

Se caracterizaron 262 líneas T-DNA en TG1 y se detectaron 26 con alteraciones en el desarrollo vegetativo. Los mutantes de mayor relevancia se describen a continuación.

#### ***vitro blooming* (código 10b P4)**

Este mutante procede de una transformación realizada con una construcción que porta el gen marcador *nptII* y el gen delator *Uida*.

Fenotipo de las plantas en cultivo *in vitro*. Las primeras alteraciones fenotípicas se observaron *in vitro*. En estas condiciones, las réplicas clonales iniciales de la TG1 desarrollaban flores (figura 11a) y de ahí su nombre. Conviene señalar que las plantas de tomate p73 cultivadas *in vitro* nunca desarrollan estructuras reproductivas en cultivo *in vitro* (figura 11d)

Al principio, era habitual la formación de un callo de tipo friable en la base del tallo, lo que dificultaba el enraizamiento de la planta en un medio diseñado para tal fin (figura 11a y b). La formación del callo se normalizó con el tiempo. En las réplicas clonales de la TG1 con un sistema radicular desarrollado, el porte de las plantas era débil, con un tallo delgado, menor longitud internodal y hojas más pequeñas (figura 11c).

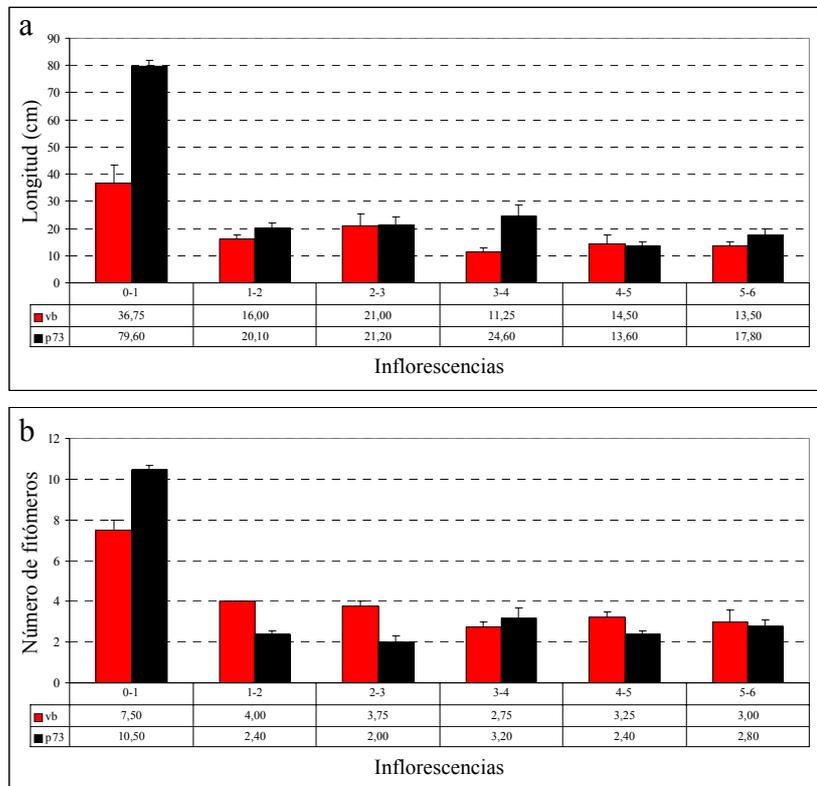


**Figura 11.** Detalles del crecimiento de *vitro blooming* respecto al WT en cultivo *in vitro*: a) aparición de flores en una réplica clonal de *vitro blooming*; b) formación de un callo en la base del tallo de *vitro blooming*; c) desarrollo vegetativo característico de *vitro blooming*; d) fenotipo característico de una planta de tomate p73 en cultivo *in vitro*.

Morfología y color de la hoja: En el invernadero, tanto las hojas como los folíolos del mutante eran de menor tamaño y de morfología diferente (figuras 12b y 12c). Las hojas tenían un color verde más claro (figura 12a).



**Figura 12.** Detalles del crecimiento de *vitro blooming* respecto al WT en condiciones de cultivo *in vivo*: a) aspecto de la planta de *vitro blooming* (izda.) y de p73 (dcha.) en el invernadero; b) hoja de *vitro blooming* (izda.) y de p73 (dcha.); c) foliolo de una hoja de *vitro blooming* (izda.) y de p73 (dcha.).



**Figura 13.** Caracteres relacionados con el desarrollo vegetativo del mutante *vitro blooming* con respecto a p73: a) longitud hasta la primera inflorescencia (0-1) y entre inflorescencias (1-2, 2-3, etc.); b) número de fitómeros hasta la primera inflorescencia (0-1) y entre inflorescencias (1-2, 2-3, etc.)

Tamaño y hábito de crecimiento del mutante: se trata de una planta de menor tamaño que exhibía, tal y como se había visto previamente *in vitro*, un porte más débil. El tallo del mutante era más delgado que el de p73 (figura 12a).

Respecto a las plantas de fenotipo silvestre (p73), se vio que *vitro blooming* poseía una menor longitud hasta la primera inflorescencia. Entre inflorescencias ocurría algo similar aunque las diferencias no eran significativas (figura 13a).

Por otro lado, *vitro blooming* desarrolló un menor número de fitómeros hasta la primera inflorescencia y, en cambio, un mayor número de fitómeros entre inflorescencias (figura 13b).

Tiempo de floración: Teniendo los resultados obtenidos en torno a la longitud del primer fitómero (mucho menor en el mutante que en el WT) y al número de fitómeros hasta la primera inflorescencia (menor en el mutante que el WT) podría parecer que *vitro blooming* es un mutante de floración temprana. En realidad, no es así. El mutante *vitro blooming* exhibió un adelanto de la floración en el espacio (figura 13a y 13b) pero no en el tiempo, ya que tenía un ritmo de crecimiento muy lento. En este sentido, las plantas de fenotipo mutante desarrollaron la primera inflorescencia cuando las de fenotipo silvestre ya habían desarrollado 2 o 3 inflorescencias.

Viviparidad: Uno de los aspectos más espectaculares de este mutante fue la elevada viviparidad en las hojas (figura 14). Aunque en las plantas de fenotipo silvestre hemos observado ocasionalmente el desarrollo de estructuras vivíparas, nunca habíamos visto una proliferación tan exagerada como la que exhibía *vitro blooming*.

En cualquier caso, el aspecto más interesante fue el desarrollo de flores en estas estructuras de naturaleza vivípara. Como puede verse en la figura 14c, algunas de estas flores, exhibían severas alteraciones del desarrollo, principalmente mayor número de órganos por verticilo. Este tipo de alteraciones es probable que se deba a la fusión de varias estructuras florales que se forman directamente a partir del raquis de la hoja.

Inflorescencia: la arquitectura de la inflorescencia de *vitro blooming* fue similar a la de p73, pero el número de flores que se formaban en cada inflorescencia era menor. Por término medio, el número de flores por inflorescencia en *vitro blooming* era  $4,29 \pm 0,82$ , mientras que en p73 es  $6,97 \pm 0,73$  cm.



**Figura 14.** Detalle de la viviparidad en hojas de *vitro blooming*: a) inicio de la formación de estructuras vivíparas en el raquis de la hoja; b) desarrollo extremo de las estructuras vivíparas; c) formación de flores en las estructuras vivíparas; d) detalle de las flores que aparecen por viviparidad.



**Figura 15.** Detalle de las flores del mutante *vitro blooming* (izda.) respecto a las de p73 (dcha.).

Tamaño, morfología y color de la flor: las flores de *vitro blooming* eran más grandes, debido principalmente al mayor tamaño de los pétalos, y presentaban un cono estaminal no fusionado compuesto por un mayor número de estambres (figura 15). No obstante, el número de sépalos y pétalos fue similar al de las flores de p73. Asimismo, los carpelos no exhibían alteraciones aparentes en los distintos estadios florales.

Caracteres relacionados con el fruto: *vitro blooming* exhibió un escaso porcentaje de cuajado. Los pocos frutos que cuajaron eran partenocárpicos y exhibían importantes alteraciones morfológicas. En este sentido, se formaban frutos tipo nável o con mamelones en la zona por la que se desprende el estilo (figuras 16a y 16b).

Pese a los intentos para obtener descendencia mediante polinización manual, no pudimos obtener la TG2. En cambio, sí fuimos capaces de obtener unas 80 semillas en un retrocruce utilizando el mutante como receptor de polen. Esto parece apuntar hacia problemas de fertilidad masculina.



**Figura 16.** Fructificación de *vitro blooming*. a) Detalle de un fruto de *vitro blooming* en estadio verde maduro, b) frutos de *vitro blooming* (izda.) respecto a los de p73 (dcha.).

El número de semillas obtenido en el retrocruce *vitro blooming* x p73 es escaso, pero estas semillas pueden tener un gran valor. En efecto, el análisis Southern realizado en el laboratorio de los Dres. Lozano y Angosto en la UAL indica que *vitro blooming* tiene múltiples inserciones del T-DNA. Por ello, antes de abordar la clonación del gen (o genes) cuya alteración provoca el fenotipo característico del mutante es necesario separar la copia (o copias) que generan el fenotipo en cuestión. Teniendo en cuenta que la mutación tiene efectos de tipo dominante, semidominante o aditivo, en trabajos futuros abordaremos la

separación de la copia (o copias) con efecto insercional a partir de las semillas de retrocruce.

### ***sharp pointed leaf 9* (código 9a Sp)**

Este mutante procede de una transformación genética realizada con una construcción que porta el gen marcador *nptII* y el gen delator *GFP*.

Morfología y color de la hoja: las hojas del mutante eran jaspeadas y de un tono verde más claro. La longitud de la hoja era similar a la del testigo. Los folíolos eran más estrechos, de mayor longitud y con lóbulos más marcados que los de p73 (ver figura 17 y 18)

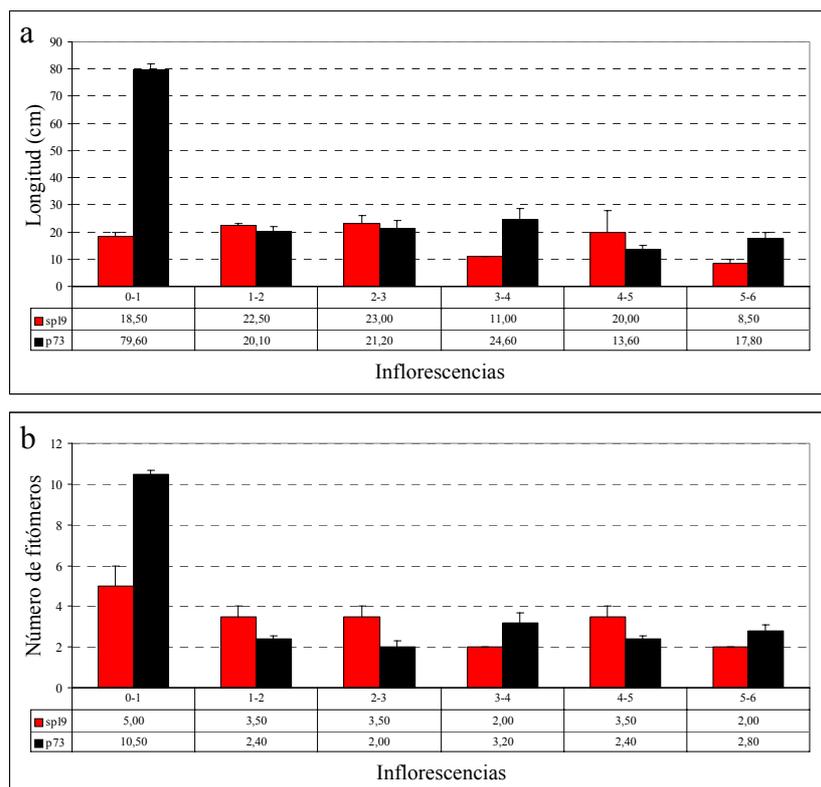


**Figura 17.** Morfología de la hoja de *Sharp pointed leaf 9* (izda.) respecto a p73 (dcha.): a) hojas jóvenes, b) hojas maduras.

Tamaño y hábito de crecimiento del mutante: el mutante exhibió menor tamaño que p73, de forma que a los dos meses la planta sólo tenía unos 80 cm de altura (figura 18b).



**Figura 18.** Crecimiento de *Sharp pointed leaf 9* en invernadero: a) detalle del color y morfología de las hojas jóvenes; b) planta de dos meses y unos 80 cm de altura.



**Figura 19.** Caracteres relacionados con el desarrollo vegetativo de *sharp pointed leaf 9*. a) Longitud hasta la primera inflorescencia (0-1) y entre inflorescencias (1-2, 2-3...), b) número de fitómeros hasta la primera inflorescencia (0-1) y entre inflorescencias (1-2, 2-3...).

En *sharp pointed leaf 9*, la longitud hasta la primera inflorescencia fue menor que en p73. Entre inflorescencias no se observaron diferencias claras en uno u otro sentido (figura 19a). En general, la longitud internodal en *sharp pointed leaf 9* fue ligeramente menor que en p73.

Por otro lado, *sharp pointed leaf 9* desarrolló un menor número de fitómeros hasta la primera inflorescencia (figura 19b). Entre inflorescencias, el número de fitómeros fue más o menos similar.

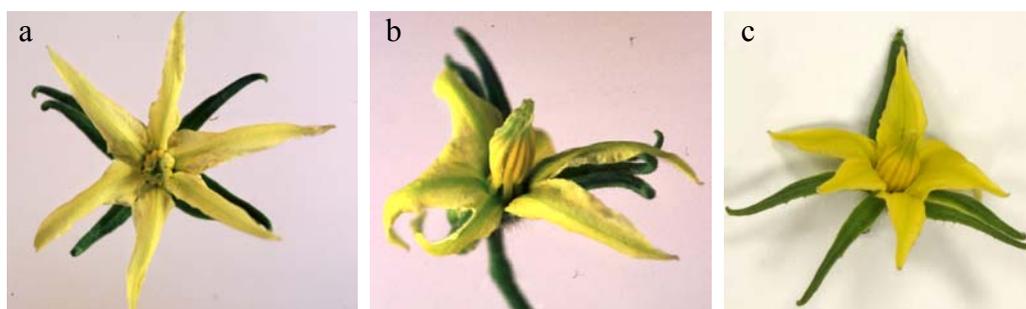
Tiempo de floración: *sharp pointed leaf 9* exhibió un adelanto de la floración en el espacio (figura 19a y 19b) pero no en el tiempo, ya que este mutante mostró un ritmo de crecimiento muy lento. Las plantas de fenotipo mutante desarrollaron la primera inflorescencia cuando las de fenotipo silvestre ya habían desarrollado más de 2 o 3 inflorescencias.

Inflorescencia: la arquitectura de la inflorescencia fue similar a la de p73 pero el número de flores por inflorescencia fue menor. Por término medio, el número de flores por

inflorescencia en *sharp pointed leaf 9* era  $4,08 \pm 0,80$  mientras que en p73 es  $6,97 \pm 0,73$  cm.

Tamaño, morfología y color de la flor: el tamaño de la flor era similar al de p73 pero los pétalos eran más estrechos y en ocasiones exhibían tonos verdes en algunas zonas (figura 20a y 20b). Las flores desarrollaron un cono estaminal no fusionado con estambres curvados (figura 20b).

El número de sépalos y pétalos fue similar al del p73. Asimismo, los carpelos no exhibían alteraciones aparentes en los distintos estadios florales.



**Figura 20.** Detalle de la flor del mutante *Sharp pointed leaf 9* (a y b) respecto a la de p73 (c).

Caracteres relacionados con el fruto: *sharp pointed leaf 9* exhibió un escaso porcentaje de cuajado. Los pocos frutos que cuajaron eran similares a los del cultivar original (p73) y tenían semillas. De hecho, en este caso sí se pudo obtener la TG2 (aunque el número de semillas fue escaso) y además se consiguieron algunas semillas del retrocruce *spl9* (♀) x p73 (♂).

***necrotic leaf* (código 120b P4)**

Este mutante procede de una transformación genética realizada con una construcción que porta el gen marcador *nptII* y el gen delator *Uida*.



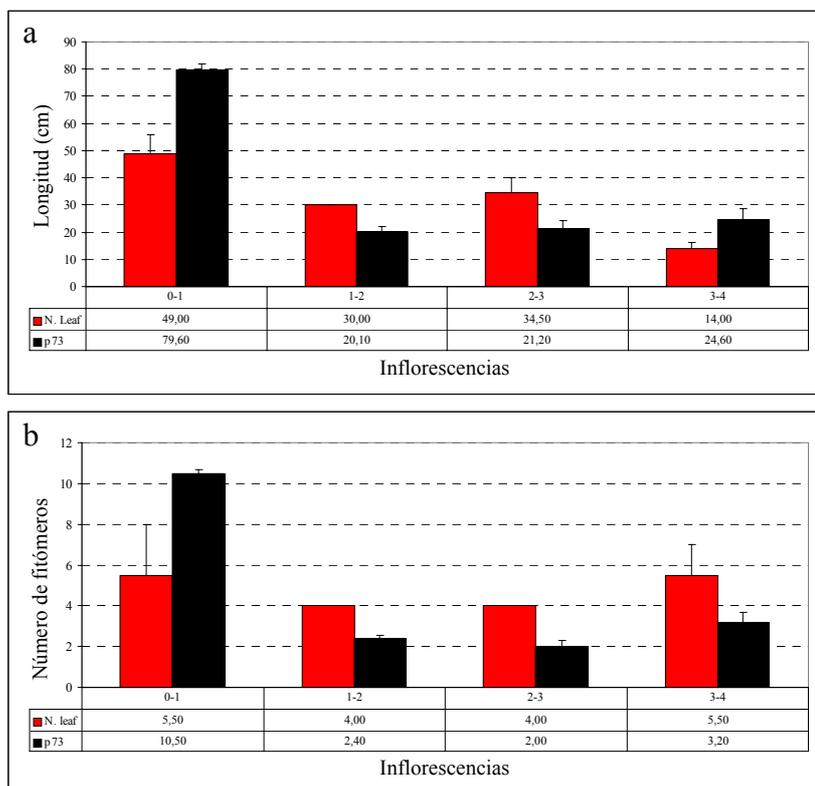
**Figura 21.** Hoja de *necrotic leaf*: a) morfología de la hoja y síntomas de senescencia temprana en los bordes del foliolo en una planta cultivada en el invernadero; b) tamaño de la hoja del mutante (izda.) respecto a la de p73 (dcha.); c) detalle de un foliolo de la planta mutante.

Morfología y color de la hoja: las hojas del mutante fueron de menor tamaño que las de p73. Las hojas exhiben un ligero jaspeado, por lo que parecen tener un color verde algo menos intenso que las del WT.

Necrosis en el borde de las hojas. El carácter que inicialmente nos llamó más la atención fue la aparición síntomas prematuros de necrosis en los bordes de los foliolos (figura 21). Conviene resaltar que la necrosis precoz se observa incluso en hojas jóvenes.

**Tamaño y hábito de crecimiento del mutante:** la planta del mutante tenía un tamaño similar a la de p73. La longitud hasta la primera inflorescencia fue menor que en p73, pero entre las restantes inflorescencias no se observó una tendencia clara (figura 22a).

Hasta la primera inflorescencia, *necrotic leaf* desarrolló menos fitómeros que p73. En cambio, entre inflorescencias, el número de fitómeros fue mayor (figura 22b).



**Figura 22.** Caracteres relacionados con el desarrollo vegetativo de *mottled leaf 120*. a) Longitud hasta la primera inflorescencia (0-1) y entre inflorescencias (1-2, 2-3...), b) número de fitómeros hasta la primera inflorescencia (0-1) y entre inflorescencias (1-2, 2-3...).

**Tiempo de floración:** Conviene resaltar que el mutante *necrotic leaf* exhibió un adelanto de la floración en el espacio (figura 22a y 22b) pero no en el tiempo, con un ritmo de crecimiento similar al de p73.

Hasta la fecha no se ha realizado el Southern y por tanto no sabemos el número de inserciones. Si tuviera varias inserciones puede que las diversas alteraciones observadas en *necrotic leaf* se deban no a una, sino a dos o más inserciones, en cuyo caso sería factible separar los efectos que produce cada inserción empleando semillas de un retrocruce.

**Inflorescencia:** la arquitectura de la inflorescencia fue similar a la de p73 pero el número de flores por inflorescencia fue menor. Por término medio, el número de flores por inflorescencia en *necrotic leaf* fue  $4,33 \pm 0,81$  mientras que en p73 es  $6,97 \pm 0,73$  cm.

Tamaño, morfología y color de la flor: No se apreciaron diferencias respecto al WT.

Caracteres relacionados con el fruto: *necrotic leaf* exhibió un escaso porcentaje de cuajado. Los frutos que cuajaron eran similares a los de p73, aunque tenían poca semilla y ésta presentó problemas de germinación.

Conviene resaltar que se dispone de semillas de *nl* (♀) x p73 (♂).

### ***Dwarf 17 (código 17a Tm)***

Este mutante procede de una transformación genética realizada con una construcción que consta del gen marcador *nptII* y del gen delator *GFP*.

Morfología y color de la hoja: las hojas del mutante eran de menor tamaño (tanto la longitud de la hoja como el calibre de los folíolos) y de un tono verde más claro (ver figura 23).

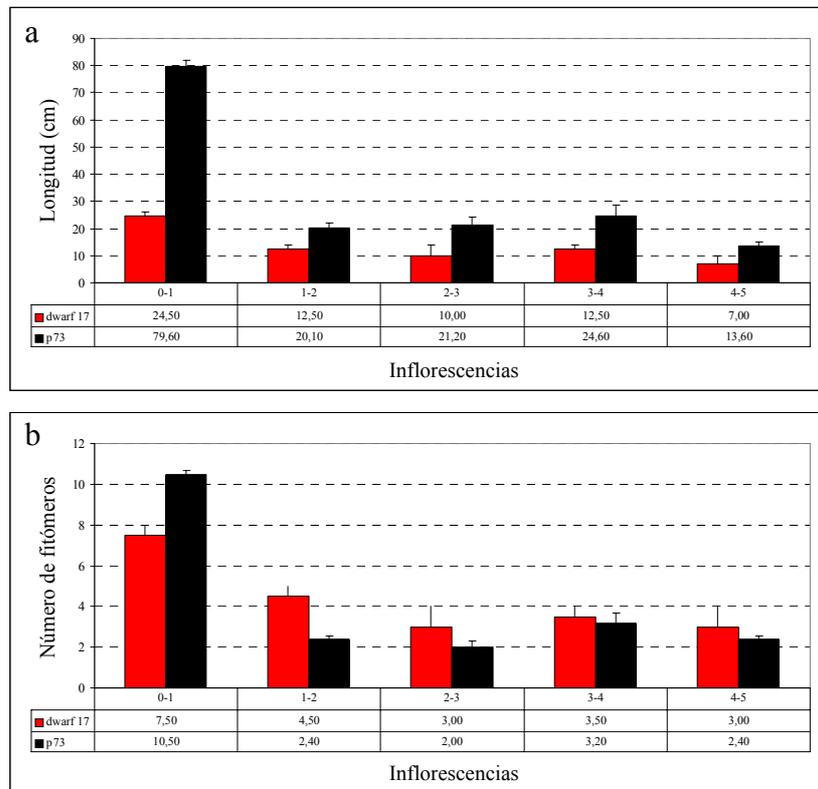


**Figura 23.** Detalle de la hoja de *dwarf 17* (izda.) respecto a la de p73 (dcha.).

Tamaño y hábito de crecimiento del mutante: el mutante tenía menor tamaño que p73. A los dos meses y medio, las plantas del mutante tenían 1/3 de la longitud de las de p73 (figura 24).



**Figura 24.** Crecimiento de dos réplicas clonales de la TG1 de *dwarf 17*. Obsérvese que las dos réplicas clonales miden unos 60 cm tras dos meses y medio de cultivo. En ese mismo periodo, las plantas de p73 alcanzan una altura aproximada de 180 cm.



**Figura 25.** Caracteres relacionados con el desarrollo vegetativo de *dwarf 17*: a) Longitud hasta la primera inflorescencia (0-1) y entre inflorescencias (1-2, 2-3...); b) número de fitómeros hasta la primera inflorescencia (0-1) y entre inflorescencias (1-2, 2-3...).

La longitud hasta la primera inflorescencia en el mutante fue mucho menor que en p73. Entre inflorescencias ocurría básicamente lo mismo (figura 25a).

Por otro lado, *dwarf 17* desarrolló menos fitómeros hasta la primera inflorescencia pero más fitómeros entre inflorescencias (figura 25b).

Tiempo de floración: El mutante exhibió un adelanto de la floración en el espacio (figura 25a y 25b) pero no en el tiempo. Al igual que en otros mutantes, el ritmo de crecimiento era muy lento. Las plantas de fenotipo mutante desarrollaron la primera inflorescencia cuando las de fenotipo silvestre ya tenían en torno a 3 inflorescencias.

Inflorescencia: la arquitectura de la inflorescencia fue similar a la de p73, pero el número de flores que aparecían en cada inflorescencia era menor. Por término medio, el número de flores por inflorescencia en *dwarf 17* fue  $4,8 \pm 0,3$  mientras que en p73 es  $7,1 \pm 0,33$  cm.

Tamaño, morfología y color de la flor: No se apreciaron diferencias respecto al WT.

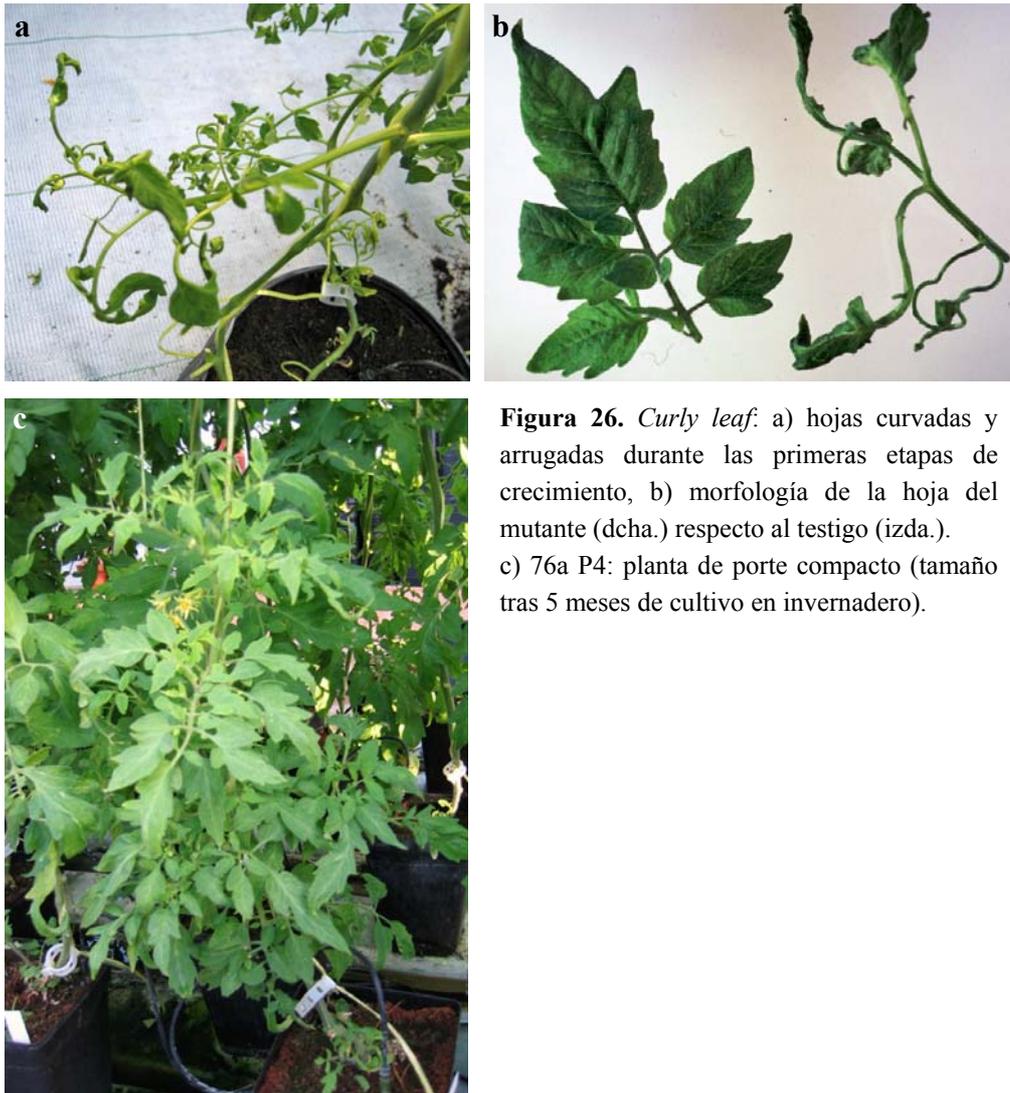
Caracteres relacionados con el fruto: las plantas de *dwarf 17* tenían menos frutos que las de p73, pero los frutos eran similares a los del testigo.

***Otros mutantes con efectos dominantes, semidominantes o aditivos de la colección de plantas transgénicas con construcciones convencionales***

De forma muy resumida, en la tabla 22 se pueden ver otros mutantes que se detectaron en la colección de líneas T-DNA obtenidas con construcciones estándar.

**Tabla 22.** Otros mutantes para caracteres vegetativos detectados en TG1

Genotipos	Fenotipos observados
<i>curly leaf</i> (22a Cf) (figura 26a y 26b) y <i>reversible spiral branching</i> (40d P4)	Hojas arrugadas durante las primeras etapas de crecimiento que revertían tras un periodo prolongado de cultivo en el invernadero.
53a Cf, 71a P8, 10a P3 y 63a P4	Plantas que exhibieron un ritmo de crecimiento lento y un porte débil. Estas plantas no cuajaron frutos.
62c Cf y 270a Cf	Plantas que exhibieron un ritmo de crecimiento lento y desarrollaron hojas jaspeadas. Estas plantas cuajaron pocos frutos.
2b P3	Plantas que exhibieron un ritmo de crecimiento lento y desarrollaron hojas jaspeadas. En esta planta no cuajó ningún fruto.
<i>Sharp pointed leaf</i> 78 (78a Cf)	Planta de porte débil y hojas jaspeadas.
71a P9	Planta enana que no llegó a desarrollar flores.
<i>Dwarf 16</i> (16a P2), <i>dwarf 64</i> (64a P4), 21c P6 y 76a P4 (figura 26c)	Plantas muy compactas que desarrollaron pocos frutos.
18a P9	Planta de porte enano y hojas de tonalidad verde claro. No desarrolló flores.
58a P8	Planta de porte compacto con algunas alteraciones en las flores.
63 a P8	Planta de porte compacto. Flores aparentemente normales. En estas plantas no cuajaron frutos.
<i>Waxy leaf</i> (51a Sp)	Planta con hojas pequeñas y ceras. No cuajaron frutos.
<i>Mottled leaf</i> 150 (150b Sp)	Planta con hojas jaspeadas.
<i>Wrinkled leaf</i> (185b Sp)	Planta con las hojas arrugadas. Cuajaron pocos frutos con pocas semillas
68a P4	Planta son síntomas similares a los provocados por una infección vírica y flores muy pequeñas.



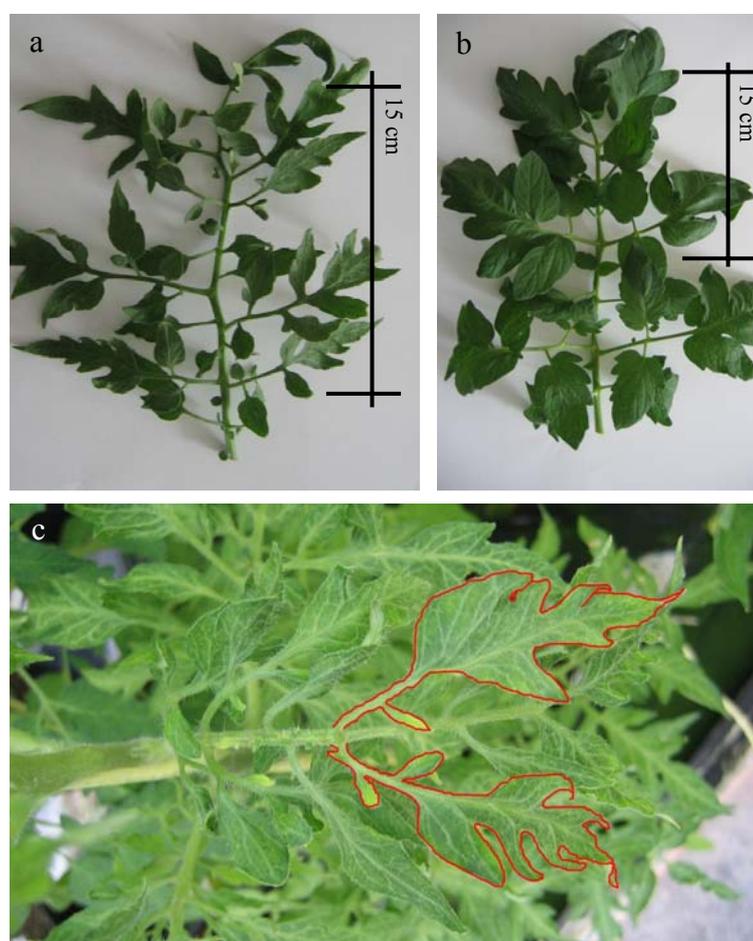
**Figura 26.** *Curly leaf*: a) hojas curvadas y arrugadas durante las primeras etapas de crecimiento, b) morfología de la hoja del mutante (dcha.) respecto al testigo (izda.). c) 76a P4: planta de porte compacto (tamaño tras 5 meses de cultivo en invernadero).

### 3.2.1.b. Mutantes de la colección de plantas transgénicas con la trampa de intensificadores

De la colección de líneas T-DNA con la trampa de intensificadores, se evaluaron 948 plantas TG1 (todas ellas diploides) y se detectaron 137 genotipos con alteraciones en el desarrollo vegetativo. Los mutantes de mayor relevancia se describen a continuación.

#### 14 ET73 (*compact 1b*)

Morfología y color de la hoja: las hojas del mutante eran de menor tamaño que las del testigo. Los folíolos eran más estrechos y lobulados (figura 27a), y el color de un tono verde más claro. Los folíolos exhibían nervios muy pronunciados (figura 27c)

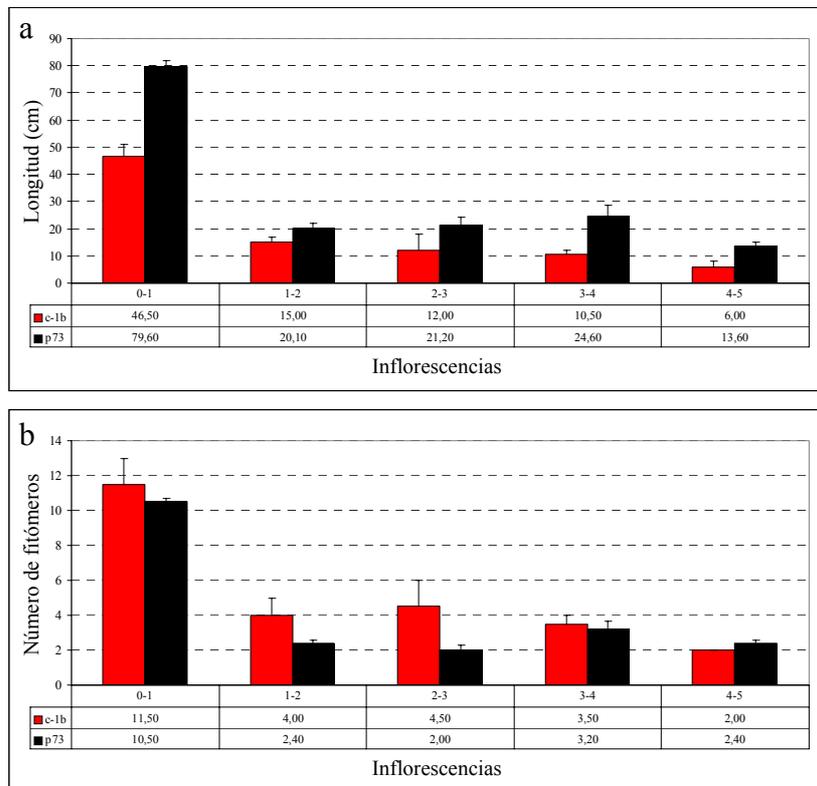


**Figura 27.** Características de la hoja de *compact 1b* (a y c) respecto a la del testigo (b).

Tamaño y hábito de crecimiento del mutante: el mutante exhibió un porte compacto que, junto al menor tamaño y color más claro de la hoja, le daba un aspecto muy peculiar (figura 28).



**Figura 28.** Aspecto de *compact 1b* tras 4 meses de cultivo en el invernadero (a). Comparación del tamaño del mutante (izda.) respecto a una planta de fenotipo silvestre (dcha.) (b).



**Figura 29.** Caracteres relacionados con el desarrollo vegetativo de *compact 1b*. a) Longitud hasta la primera inflorescencia (0-1) y entre inflorescencias (1-2, 2-3...), b) número de fitómeros hasta la primera inflorescencia (0-1) y entre inflorescencias (1-2, 2-3...).

En este mutante, la longitud hasta la primera inflorescencia fue menor que en p73. Entre inflorescencias ocurría básicamente lo mismo (figura 29a).

El número de fitómeros hasta la primera inflorescencia fue similar al de p73, pero entre inflorescencias ( $1^a - 2^a$ ;  $2^a - 3^a$ ) el número de fitómeros fue algo mayor que en p73 (figura 29b).

Tiempo de floración: el mutante exhibió un adelanto de la floración en el espacio (figura 29a) pero no en el tiempo. Además, en las primeras inflorescencias se formaron pseudoflores y no flores verdaderas. Asimismo, y al igual que en otros mutantes de este tipo, se pudo comprobar que el ritmo de crecimiento era muy lento.

Inflorescencia: la arquitectura de la inflorescencia fue similar a la de p73 pero el número de flores que se formaban en cada inflorescencia era menor. El número medio de flores por inflorescencia en *compact 1b* fue de  $2,9 \pm 0,3$  mientras que en p73 fue de  $7,1 \pm 0,3$  cm.



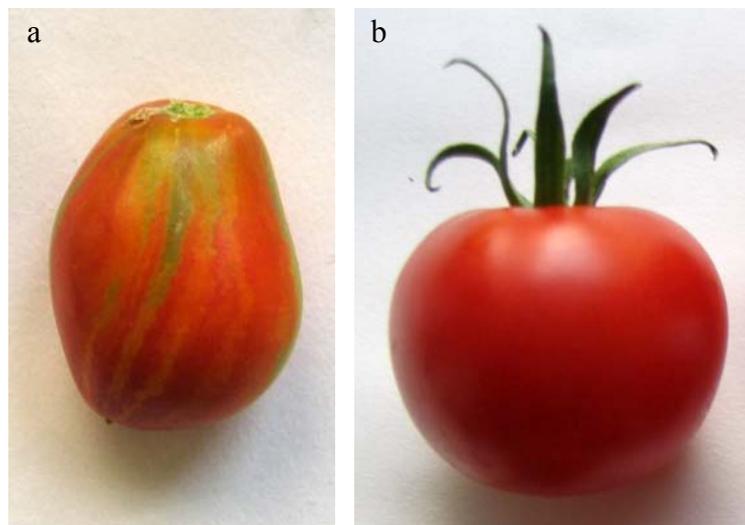
**Figura 30.** Flores de *compact 1b*: a) Desarrollo anómalo de las flores del mutante; b) Detalle del pistilo de una flor en estadio de botón floral

Tamaño, morfología y color de la flor: Tal y como se ha comentado anteriormente, en las primeras inflorescencias se formaron pseudoflores y no flores verdaderas. No obstante, a partir de los 6 meses de cultivo, las plantas del mutante empezaron a desarrollar flores propiamente dichas, aunque en general las flores eran de menor tamaño que las de p73 y exhibían alteraciones importantes. Los sépalos eran de menor tamaño que el resto de los verticilos, lo que permitía visualizar los pétalos en estadios anteriores a antesis (figura 30a). La mayor parte de las flores se desprendía de la inflorescencia sin llegar a cuajar frutos, quizá debido a problemas de esterilidad masculina y/o femenina. El análisis histológico de flores cortadas longitudinalmente permitió que pudiéramos ver algunas de

las alteraciones en los verticilos internos, como por ejemplo, estilo aberrante y muy pequeño, pocos óvulos, morfología del ovario muy diferente a la del ovario de p73, o cono estaminal no fusionado (figura 30b).

Caracteres relacionados con el fruto: los pocos frutos que se desarrollaron en el mutante eran diferentes a los del testigo, entre oblongo-alargados y piriformes, con manchas longitudinales de tonalidad naranja y verde (según sectores) en la piel (figura 31).

Los frutos se desarrollaron en plantas envejecidas, contenían muy poca semilla y ésta no era viable.



**Figura 31.** Detalle de la morfología y variegación en la piel de los frutos que se desarrollaron en las plantas del mutante *compact 1b* (a) respecto a los frutos de p73 (b).

Patrón de expresión del delator: El gen delator se expresó en el raquis de la hoja y el peciolo del foliolo. En flores, se detectó expresión en anteras (antesis) y en algunos tricomas del sépalo (figura 30b). En fruto el delator se expresó en el pericarpio. De momento, no se ha encontrado ninguna asociación entre el fenotipo de *compact1b* (entendido como el conjunto de alteraciones que presenta el mutante) y el patrón de expresión del delator.

Número de insertos: El análisis Southern realizado en el laboratorio de los Dres. Lozano y Angosto indica que el mutante tiene una sola inserción.

## 343 ET73

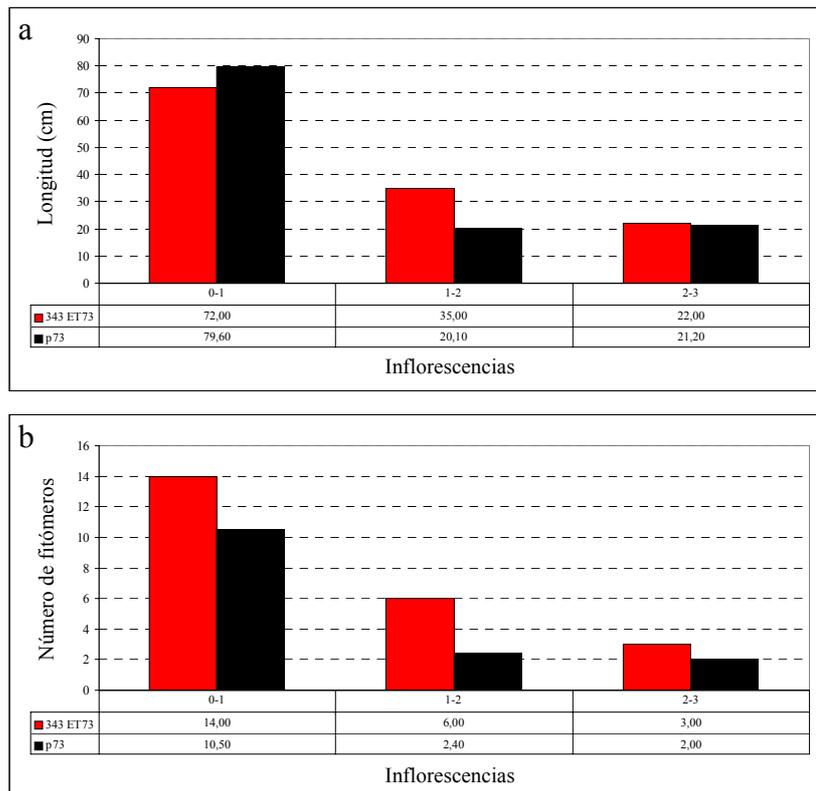
Morfología y color de la hoja. Las hojas del mutante eran de menor tamaño que las del testigo, jaspeadas y de un tono verde más claro.

Tamaño y hábito de crecimiento del mutante. El mutante exhibió un porte más compacto que p73, pero su fenotipo no se parecía en nada al del mutante *compact1b* (figura 33a; comparar con la figura 28).

En este mutante, la longitud hasta la primera inflorescencia fue algo menor que en p73, mientras que de la primera a la segunda inflorescencia la distancia fue mayor (figura 32a).

El número de fitómeros hasta la primera inflorescencia, así como entre inflorescencias, fue mayor en el mutante 343 ET73 que en p73 (figura 32b).

El mutante exhibió un ritmo de crecimiento muy lento.

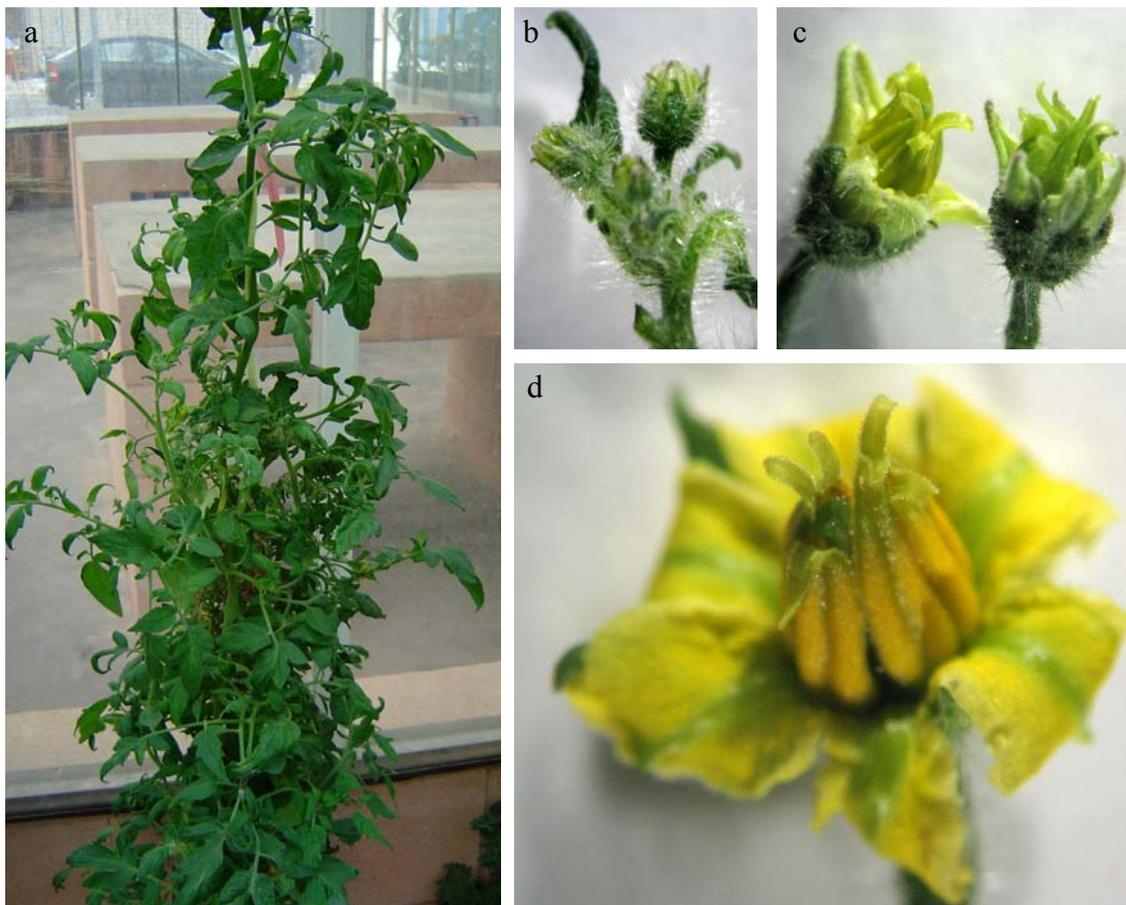


**Figura 32.** Caracteres relacionados con el desarrollo vegetativo de 343 ET73. a) Longitud hasta la primera inflorescencia (0-1) y entre inflorescencias (1-2, 2-3...), b) número de fitómeros hasta la primera inflorescencia (0-1) y entre inflorescencias (1-2, 2-3...).

Tiempo de floración: el mutante exhibió un claro retraso de la floración a nivel temporal, ya que se pudo comprobar que el ritmo de crecimiento era muy lento.

Inflorescencia: la arquitectura de la inflorescencia fue similar a la de p73.

Tamaño, morfología y color de la flor: las flores del mutante eran de menor tamaño que las de p73. Un aspecto notable, era la elevada densidad, y la exagerada longitud, de los tricomas presentes en las flores, lo que era especialmente patente en los estadios anteriores a antesis (ver figura 33b y 33c).



**Figura 33.** Detalles relacionados con el desarrollo vegetativo y reproductivo del mutante 343 ET73: a) Crecimiento compacto del mutante después de 7 meses b) Elevada densidad de tricomas en las flores; c) Curvatura de los estambres y sépalos en estadios previos a antesis; d) Flor en estadio de antesis. Obsérvese la falta de fusión en el cono estaminal

Los pétalos eran de color amarillo pálido, con tonalidades verdes. Los extremos de los estambres se encontraban curvados hacia el exterior y no estaban perfectamente fusionados (figura 33c y 33d).

Caracteres relacionados con el fruto: Tras 7 meses de cultivo en el invernadero, el mutante desarrolló frutos de morfología idéntica a la del testigo aunque de menor tamaño. Los

frutos contenían muy pocas semillas. Aún así, las pocas semillas que se pudieron obtener eran viables, lo que permitió hacer la evaluación de una pequeña muestra de la descendencia TG2.

Patrón de expresión del delator. No se observó expresión del gen delator en las estructuras vegetativas analizadas; en cambio sí se detectó expresión en flores.

En concreto, en el estadio de botón floral, se observó una expresión tenue en sépalos. Esto podría ser interesante porque puede darse el caso de que esa expresión “tenue” se localice en las células precursoras de los tricomas. De ser así, habría una asociación entre el patrón de expresión del delator y este aspecto fenotípico particular. No obstante, antes de poder llegar a tal conclusión, hay que hacer un análisis más detallado a nivel histológico, estudiando el patrón de expresión GUS en las etapas más tempranas del desarrollo de la flor.

También se observó expresión GUS en anteras, tanto de flores en preantesis (nivel de expresión moderado) como de flores en anthesis (nivel de expresión alto). En este caso, sí puede haber correspondencia entre la expresión GUS en anteras y el fenotipo relacionado con la falta de fusión del cono estaminal.

Número de insertos: El análisis Southern realizado en la UAL indica que el mutante tiene dos inserciones.

Análisis fenotípico en la descendencia TG2. Debido al escaso número de semillas en los frutos de las plantas TG1 (debido, probablemente, a que la falta de fusión del cono estaminal dificulta la autofecundación natural) sólo se pudieron cultivar 12 plantas TG2 en el invernadero.

Lo primero que se observó fue un retraso en el desarrollo de las plántulas de la TG2, respecto a p73. Las plántulas TG2 tenían cotiledones pequeños y con algunas malformaciones (figura 34a). Este hecho se observó en todas las plántulas que germinaron. Más tarde, se pudo ver que todas las plantas TG2 exhibían un ritmo de crecimiento muy lento. A los tres meses de cultivo en el invernadero se observó que todas las plantas TG2 tenían hojas jaspeadas y de color más claro, un fenotipo similar al que exhibía la TG1 (figura 34c y 34d).

Entre las 12 plantas de la TG2, no encontramos ninguna de fenotipo WT. Es más, algunas TG2 tenían un fenotipo más extremo que las restantes y que la propia TG1 (figura

34c). En realidad, esto no resulta nada extraño si considera que la TG1 tenía dos inserciones.



**Figura 34.** Detalles relacionados con el desarrollo vegetativo de la descendencia (plantas TG2) del mutante 343 ET73: a) Plántulas TG2 de 343 ET73 en estadio cotiledonario (izda.) TG2 en comparación con las de p73 (dcha.); b) Plantas de p73 tras tres meses de cultivo en invernadero. c) Plantas TG2 del mutante tras tres meses de cultivo en invernadero. Obsérvese que todas las plantas tienen menor crecimiento, pero algunas son de fenotipo más extremo; d) Detalle del jaspeado de las hojas, similar a lo observado en la TG1.

En efecto, si denominamos como A y B las dos inserciones (siendo a y b, los alelos nulos de los correspondientes *loci*), el fenotipo de la TG1 sería di-hemicigótico (Aa Bb) y la segregación en la TG2 sería:  $1/16$  (AA BB) +  $2/16$  (AA Bb) +  $2/16$  (Aa BB) +  $4/16$  (Aa Bb) +  $1/16$  (AA bb) +  $2/16$  (Aa bb) +  $1/16$  (aa BB) +  $2/16$  (aa Bb) +  $1/16$  (aa bb).

Si el fenotipo se debe al efecto combinado de las dos inserciones, como la frecuencia de plantas acigóticas para ambas (aa bb) es  $1/16$ , al cultivar sólo 12 plantas de la TG2 es

muy probable que no se llegue a detectar ninguna de esta clase (acigótica y, por tanto, con fenotipo WT). Si, en cambio, el fenotipo mutante estuviera causado por el efecto de una sola inserción (con lo cual, la otra tendría un efecto nulo), en la TG2 las plantas de fenotipo mutante deberían ser (AA BB + AA bb) o, alternativamente (AA BB + AA Bb). Sea cual sea la copia que causa la mutación insercional, la distribución de fenotipos en la TG2 sería:  $\frac{3}{4}$  mutantes +  $\frac{1}{4}$  WT. En términos de probabilidad, no cabe admitir esta hipótesis porque al cultivar 12 plantas de la TG2 deberíamos haber encontrado al menos una de fenotipo WT con una probabilidad de fallo menor del 5 %.

Así pues, en principio, la hipótesis que parece más probable es que el fenotipo mutante esté causado por ambas inserciones. De ser así, las dos copias tienen un efecto pleiotrópico porque lo que denominamos como fenotipo mutante es un conjunto de caracteres fenotípicos.

Por otro lado, la existencia de plantas TG2 de fenotipo más extremo que la TG1 (y que las restantes plantas de la TG2) se podría explicar por un efecto de dosis. Es decir, podría ser que las plantas homocigóticas para ambas inserciones (AA BB) o para una de ellas combinada con la otra (AA Bb + Aa BB) tengan un fenotipo más extremo. Una hipótesis alternativa es que exista algún tipo de interacción entre ambas copias, por ejemplo algún tipo de epistasia.

De momento, no podemos inclinarnos por una u otra de las hipótesis anteriores porque la muestra de plantas TG2 que se han cultivado es demasiado escasa. No obstante, conviene resaltar que se ha obtenido semilla TG3 de estas plantas TG2. Así pues, en trabajos ulteriores, obtendremos más semillas TG2 (mediante polinización manual, a fin de evitar el problema que ocasiona la falta de fusión del cono estaminal) y cultivaremos una muestra suficientemente grande de la TG2, junto con las progenies TG3 que hemos obtenido, a fin de llegar a una conclusión clara.

## 605 ET73

Morfología y color de la hoja: las hojas del mutante eran de menor tamaño que las del testigo, pero sus folíolos eran más estrechos y con lóbulos más pronunciados. La hoja tenía una tonalidad verde clara (figura 35).

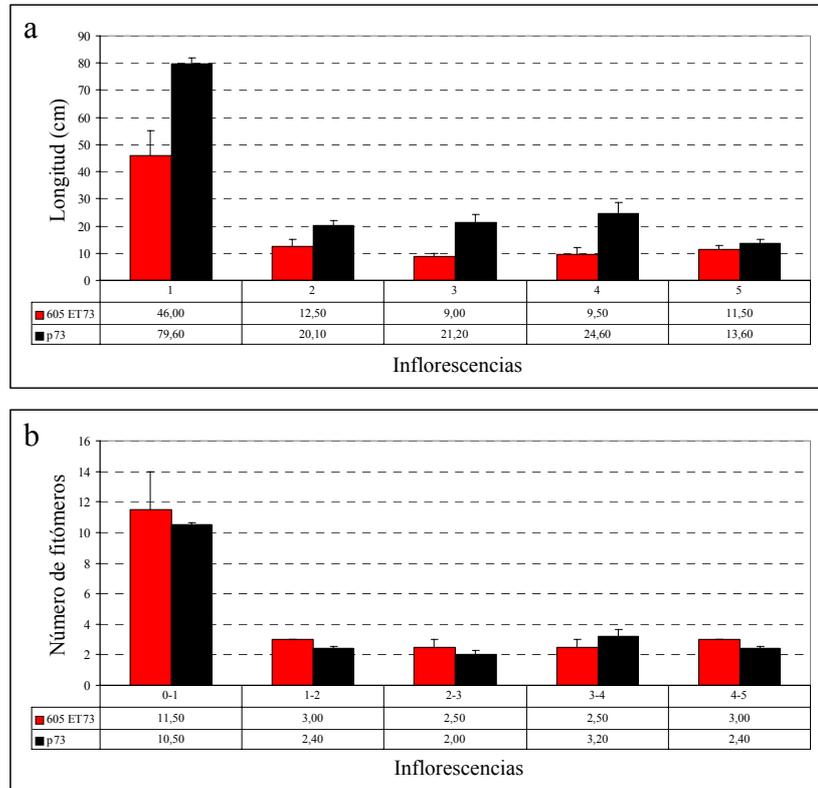


**Figura 35.** Planta de fenotipo mutante a los tres meses de cultivo (a) en la que se puede ver la morfología característica de la hoja (b). Tamaño, color y morfología de la hoja del mutante 605 ET73 (c) respecto a la del testigo (d).

Tamaño y hábito de crecimiento del mutante: el mutante exhibió un patrón de crecimiento diferente en función de las condiciones medioambientales del invernadero.

Cuando el cultivo de la TG1 se llevó a cabo en un invernadero con una humedad relativamente baja y con una luz más natural durante el periodo diurno (invernadero 1) la planta tenía un porte más compacto ver (figura 38a). En este caso, la longitud hasta la

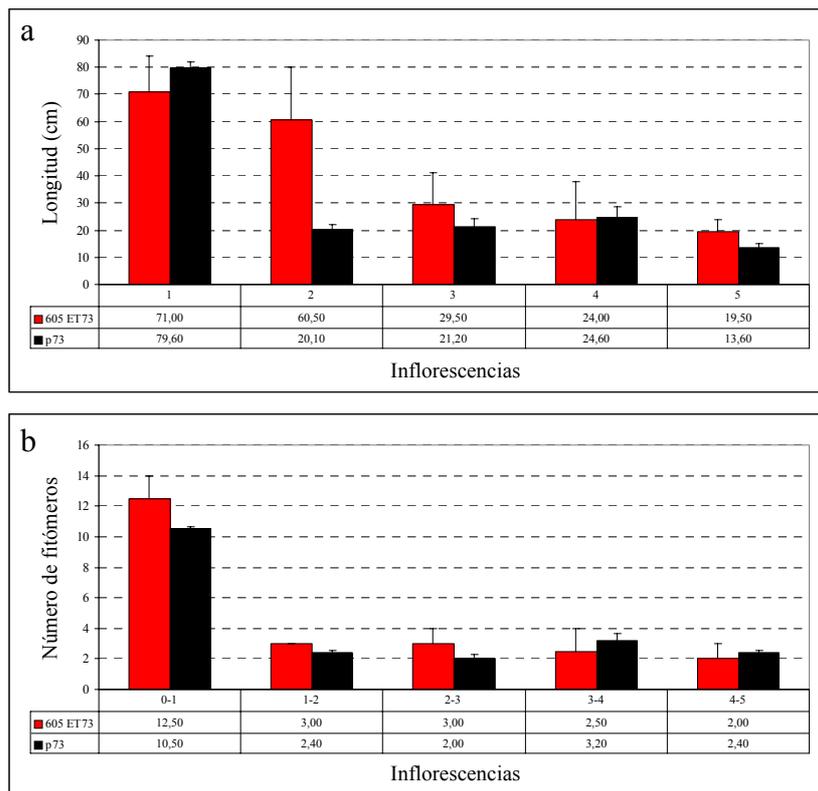
primera inflorescencia fue menor que en p73. Entre inflorescencias ocurría básicamente lo mismo (figura 36a). En cambio, el número de fitómeros entre inflorescencias no fue diferente respecto a p73 (figura 36b). La longitud internodal de 605 ET73 fue mucho menor que en p73.



**Figura 36.** Caracteres relacionados con el desarrollo vegetativo de 605 ET73 (Invernadero 1) a) Longitud hasta la primera inflorescencia (0-1) y entre inflorescencias (1-2, 2-3...), b) número de fitómeros hasta la primera inflorescencia (0-1) y entre inflorescencias (1-2, 2-3...).

Sorprendentemente, al cultivar la planta en un invernadero con una elevada humedad relativa y en el que las plantas se encuentran más bien expuestas a una iluminación de tipo artificial (invernadero 2), el porte de la planta fue similar al p73 (figura 38b). En estas condiciones, la longitud hasta la primera inflorescencia era similar a la de p73. En cambio, la longitud entre la 1ª y 2ª inflorescencias era notablemente mayor (figura 37a). El número de fitómeros entre inflorescencias fue similar al de p73 (figura 37b).

A pesar de las diferencias que ocasiona el ambiente en el patrón de crecimiento de 605 ET73, el resto de alteraciones en el desarrollo típicas de este mutante (e.g.: morfología y color de la hoja) se manifestaron con la misma intensidad en los dos invernaderos.



**Figura 37.** Caracteres relacionados con el desarrollo vegetativo de 605 ET73 (Invernadero 2) a) Longitud hasta la primera inflorescencia (0-1) y entre inflorescencias (1-2, 2-3...), b) número de fitómeros hasta la primera inflorescencia (0-1) y entre inflorescencias (1-2, 2-3...).

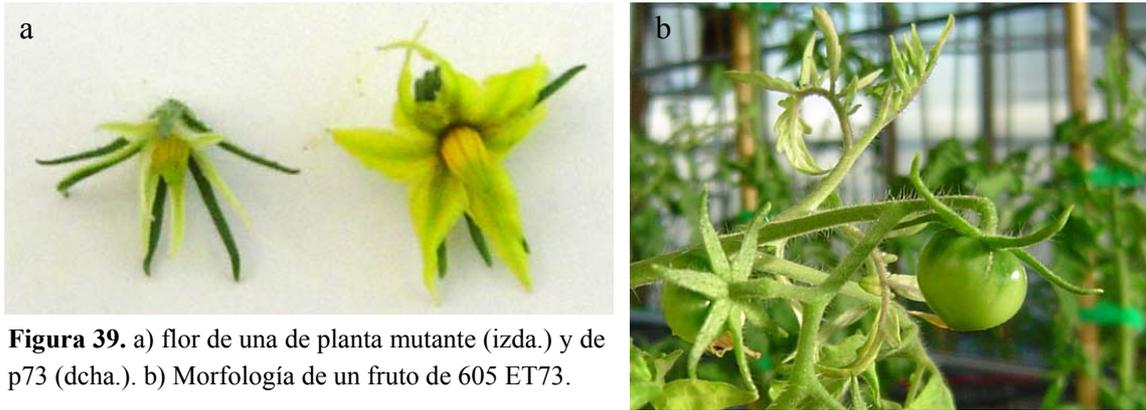


**Figura 38.** Detalle del crecimiento del mutante 605 ET73 en el invernadero 1, en el que la planta exhibió un porte más compacto (a) y en el invernadero 2 donde el porte era similar al de p73 (b)

Tiempo de floración: El mutante exhibió un adelanto en la floración en el espacio (figuras 36 y 37) pero no en el tiempo ya que su ritmo de crecimiento fue más lento que el de p73. Además, las primeras inflorescencias no generaron flores verdaderas, sino pseudoflores. A partir de los 4 meses de cultivo empezaron a desarrollarse flores normales.

Inflorescencia: la arquitectura de la inflorescencia, al menos desde el momento a partir del cual se empezaron a visualizar flores verdaderas, fue similar a la de p73. No obstante, las inflorescencias del mutante contenían menos flores. El número medio de flores por inflorescencia en las plantas cultivadas en el invernadero 1 fue de  $3,0 \pm 0,2$  y en el invernadero 2 fue de  $2,1 \pm 0,6$  mientras que en p73 fue de  $7,1 \pm 0,3$  cm.

Tamaño, morfología y color de la flor: la flor se caracterizaba por tener pétalos mucho más estrechos que los de las flores de p73 y de color amarillo pálido (figura 39a). Los restantes verticilos eran aparentemente normales.



**Figura 39.** a) flor de una de planta mutante (izda.) y de p73 (dcha.). b) Morfología de un fruto de 605 ET73.

Caracteres relacionados con el fruto: Tras 6 meses de cultivo en el invernadero, el mutante desarrolló frutos de morfología idéntica a la del testigo (figura 39b), aunque **de menor tamaño y partenocárpico**.

Número de insertos: el análisis Southern realizado en la UAL indica que la TG1 tiene múltiples insertos.

Patrón de expresión del delator: en estructuras vegetativas, se detectó expresión GUS en el raquis de la hoja, peciolo y limbo del foliolo, así como en el tallo. En estructuras reproductivas la expresión se observó principalmente en sépalos (figura 40).



**Figura 40.** Expresión del delator en la flor de una planta mutante

## 744 ET73

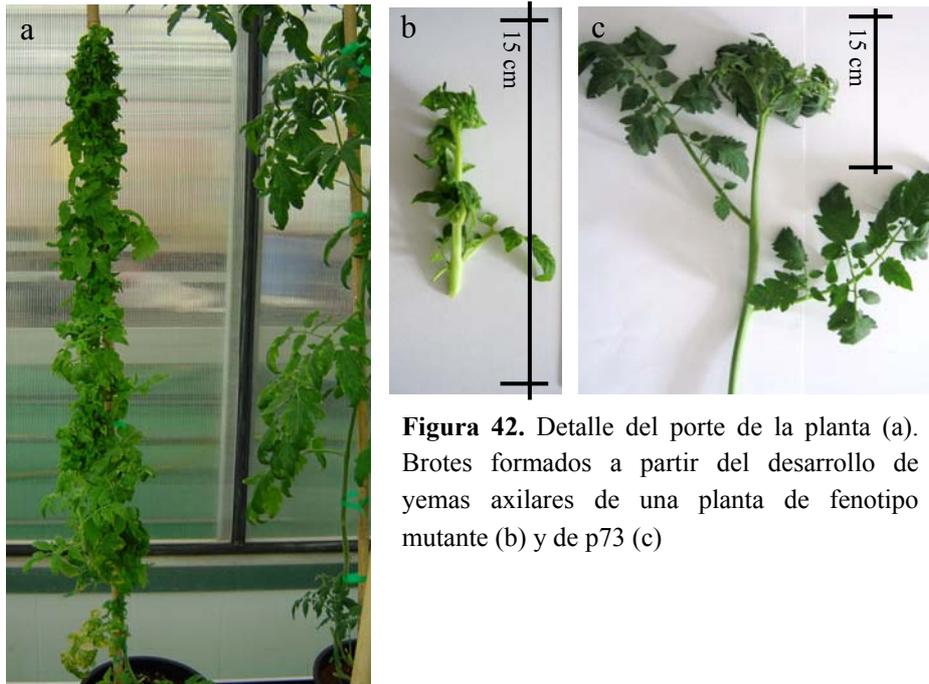
Morfología y color de la hoja: las hojas del mutante eran de menor tamaño que las del testigo. Además, una característica relevante de este mutante es que las hojas crecían enrolladas (figura 41a), probablemente como consecuencia de un mayor crecimiento de la zona abaxial respecto a la zona adaxial de la hoja. El verde de la hoja, y sobre todo del raquis, era más claro.



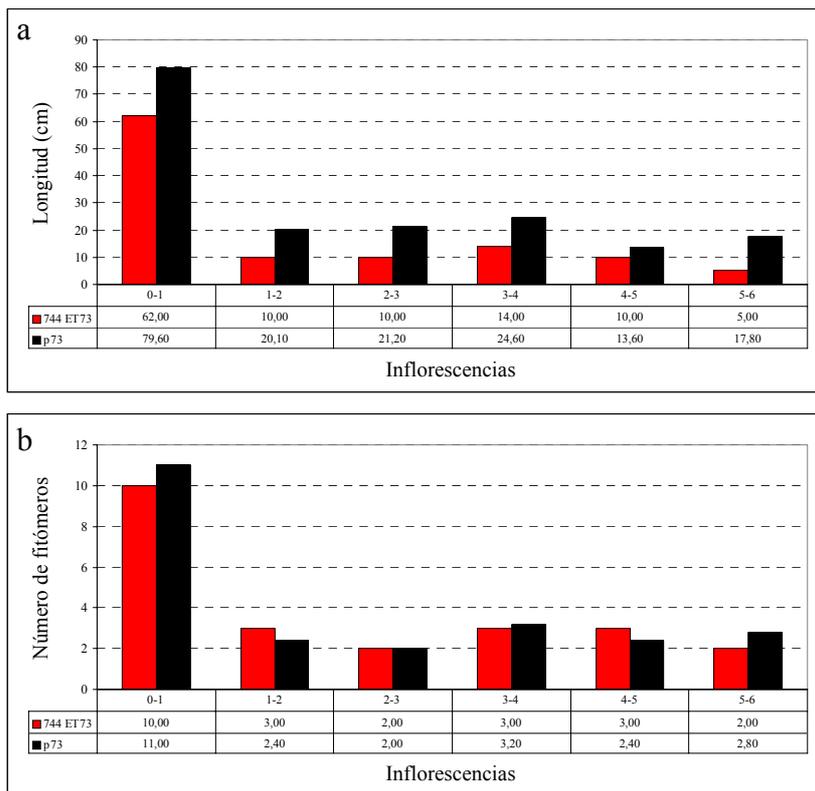
**Figura 41.** Tamaño, color y morfología de la hoja del mutante 744 ET73 (a) respecto a la del testigo (b).

Tamaño y hábito de crecimiento del mutante: Los brotes laterales que se desarrollan a partir del crecimiento de las yemas axilares (comúnmente conocidos como chupones) eran de un tamaño reducido en comparación con los de p73. Este hecho, sumado al desarrollo característico de las hojas (enrolladas sobre sí mismas), influye de forma muy peculiar sobre el porte de la planta (figura 42a). La mayor parte de mutantes compactos que hemos detectado lo son en sentido vertical, es decir, para un momento del desarrollo dado, la planta mutante alcanza una menor altura que el testigo, o dicho de otra forma, es más “achaparrada”. En cambio este mutante es más compacto en sentido horizontal: la planta alcanza la misma altura que el testigo pero parece como si se enrollara en el tutor, lo que le da un aspecto realmente curioso (figura 42a).

Al igual que el raquis de la hoja, el color verde del tallo era más claro que el de p73 (figura 42b)



**Figura 42.** Detalle del porte de la planta (a). Brotes formados a partir del desarrollo de yemas axilares de una planta de fenotipo mutante (b) y de p73 (c)



**Figura 43.** Caracteres relacionados con el desarrollo vegetativo del mutante 744 ET73. a) Longitud hasta la primera inflorescencia (0-1) y entre inflorescencias (1-2, 2-3...), b) número de fitómeros hasta la primera inflorescencia (0-1) y entre inflorescencias (1-2, 2-3...).

La longitud hasta la primera inflorescencia era menor en el mutante que en p73. Entre inflorescencias ocurría básicamente lo mismo (figura 43a).

Respecto al número de fitómeros hasta la primera inflorescencia y entre inflorescencias, no se encontraron diferencias entre el mutante y p73 (figura 43b).

La longitud internodal era menor en el mutante que en p73.

Tiempo de floración: el mutante exhibió un retraso de la floración en el tiempo debido a que tenía un ritmo de crecimiento muy lento.

Inflorescencia: la arquitectura de la inflorescencia era similar a la de p73 aunque de un tamaño pequeño. Por otro lado, el número de flores que se formaban en cada inflorescencia era menor (en torno a 2-3 flores/inflorescencia). Muchas inflorescencias, especialmente las primeras, desarrollaron pseudoflores.



**Figura 44.** Detalle del desarrollo de un fruto en una planta ya senescente (cultivada durante más de 6 meses) de fenotipo mutante.

Tamaño, morfología y color de la flor: las flores de las primeras inflorescencias no se podían considerar como tales, sino que eran meramente pseudoflores. No obstante, en las

inflorescencias siguientes aparecían flores, aunque de menor tamaño que las de p73 y con alteraciones en los sépalos (sépalos tipo foliolo).

Caracteres relacionados con el fruto: el mutante desarrolló unos pocos frutos en plantas ya senescentes (figura 44) que se habían mantenido en el invernadero durante un largo periodo de tiempo (> 6 meses). Los frutos eran pequeños, comparados con los de p73, y no contenían semilla.

Número de insertos: El análisis Southern realizado en la UAL indica que el mutante tiene 2 inserciones.

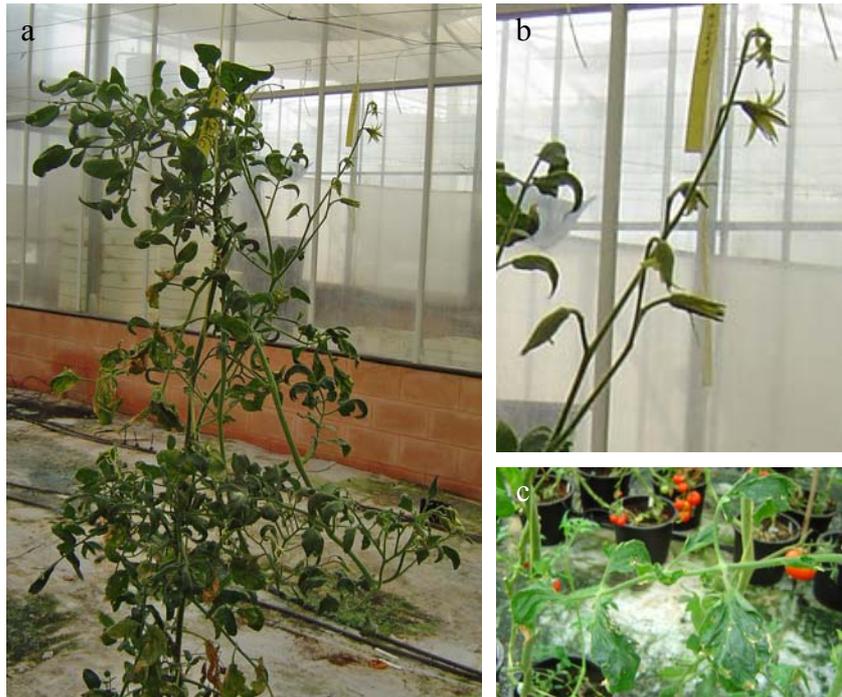
Patrón de expresión del delator: No se detectó expresión del delator en las partes vegetativas y reproductivas evaluadas.

### 816 ET73

Morfología y color de la hoja: las hojas del mutante eran de menor tamaño que las de p73. No obstante, lo más notable es que del raquis surgían folíolos simples y no compuestos como en p73. Los bordes del folíolo exhibieron síntomas prematuros de marchitamiento o necrosis (figura 45a). El color de la hoja era de un verde más intenso.



**Figura 45.** Tamaño, color y morfología de la hoja del mutante 816 ET73 (a) respecto a la del testigo (b).



**Figura 46.** Detalles del mutante 816 ET73: a) planta de 4 meses en el invernadero, b) inflorescencia (obsérvese la enorme longitud del eje de la inflorescencia) y c) hoja con los bordes marchitados.



**Figura 47.** Fruto procedente del retrocruzamiento del mutante (♀) con p73 (♂).

Tamaño y hábito de crecimiento del mutante: la planta exhibió un porte débil y un ritmo de crecimiento muy lento.

Tiempo de floración: se observó un retraso de la floración en el tiempo.

Inflorescencia: la arquitectura de la inflorescencia era distinta a la de p73, con un eje central de una longitud mucho mayor que la del testigo (figura 46b).

Tamaño, morfología y color de la flor: las flores eran de mayor tamaño que las de p73, en especial sépalos, pétalos y ovario.

Caracteres relacionados con el fruto: No se pudo conseguir la TG2. Sólo se pudieron obtener frutos en retrocruzamiento con p73 empleando el mutante como hembra. La característica más relevante de estos frutos fue su morfología de tipo cordiforme con algunas semillas (figura 47).

### 860 ET73

Morfología y color de la hoja: las hojas del mutante eran de similar tamaño que las de p73 pero con un mayor grado de complejidad (mayor número de folíolos de tamaño pequeño). Las hojas desarrollaban mayor número de raquillas que las del testigo y eran de un color verde más claro (figura 48a).



**Figura 48.** Tamaño, color y morfología de la hoja del mutante 860 ET73 (a) respecto a la del testigo (b).

Tamaño y hábito de crecimiento del mutante: la planta exhibió un porte débil y un ritmo de crecimiento muy lento.

Tiempo de floración: el mutante exhibió un retraso de la floración en el tiempo.

Inflorescencia: similar a la de p73.

Tamaño, morfología y color de la flor: los sépalos y pétalos del mutante eran más estrechos que los de p73. Los estambres exhibían algunas alteraciones en el desarrollo y algunas anteras tenían mayor longitud que otras, lo que ocasionaba la inclinación del cono estaminal.

Caracteres relacionados con el fruto: desafortunadamente, no había cuajado de fruto en el mutante. El retrocruce con el testigo tampoco generó resultados satisfactorios.

***Otros mutantes con efectos dominantes, semidominantes o aditivos de la colección de líneas T-DNA con la trampa de intensificadores***

De forma muy resumida, en la tabla 23 se pueden ver otros variantes que se detectaron en la colección de líneas T-DNA con la trampa de intensificadores.

**Tabla 23.** Otros fenotipos variantes para caracteres vegetativos detectados en TG1

Genotipos	Fenotipos observados
108 ET73, 117 ET73 y 167 ET73	Ritmo de crecimiento muy lento en condiciones de cultivo <i>in vitro</i> .
7 ET73, 215 ET73, 218 ET73, 228 ET73, 426 ET73, 536 ET73, 549 ET73, 573 ET73, 619 ET73, 674 ET73, 676 ET73, 777 ET73, 846 ET73, 897 ET73, 902 ET73, 953 ET73 y 962 ET73	Ritmo de crecimiento muy lento en condiciones de cultivo <i>in vivo</i> .
463 ET73, 537 ET73 y 599 ET73	Ritmo de crecimiento lento con alteraciones en el desarrollo vegetativo y reproductivo.
582 ET73	Problemas de enraizamiento y color verde más claro de las hojas en plantas cultivadas <i>in vitro</i> . <i>In vivo</i> la planta desarrolló hojas con folíolos de menor tamaño. Las flores tenían poco polen y no se observó cuajado de fruto.
409 ET73, 415 ET73, 687 ET73 (figura 49b) y 759 ET73	Fenotipos compactos (figura 48)
248 ET73, 484 ET73, 615 ET73 y 677 ET73	Fenotipos compactos con alteraciones en el desarrollo vegetativo.
285 ET73, 342 ET73, 375 ET7, 670 ET73, 723 ET73 y 751 ET73	Fenotipos compactos con alteraciones en el desarrollo reproductivo.
46 ET73, 66 ET73, 67 ET73, 100 ET73, 122 ET73, 129 ET73, 136 ET73, 329 ET73, 411 ET73, 413 ET73 y 578 ET73	Fenotipos compactos con alteraciones en el desarrollo vegetativo y reproductivo.
43 ET73, 332 ET73 y 868 ET73	Enanas, con un desarrollo de tipo arbustivo.
344 ET73, 448 ET73 y 913 ET73	Menor tamaño que p73 (~75%) y con alteraciones en el desarrollo vegetativo.
643 ET73, 846 ET73 y 924 ET73	Menor tamaño que p73 (~75%) y con alteraciones en el desarrollo vegetativo y reproductivo.
30 ET73, 48 ET73, 247 ET73, 309 ET73 y 443 ET73	Plantas de porte débil y lento crecimiento con alteraciones en el desarrollo vegetativo.
36 ET73, 62 ET73, 71 ET73, 141 ET73, 153 ET73, 194 ET73, 231 ET73, 241 ET73, 466 ET73, 477 ET73, 495 ET73, 519 ET73, 550 ET73, 583 ET73, 621 ET73, 623 ET73 (figura 49c), 663 ET73 y 932 ET73	Plantas de porte débil y crecimiento lento con alteraciones en el desarrollo reproductivo.
76 ET73, 190 ET73, 270 ET73, 388 ET73, 389 ET73, 400 ET73, 432 ET73 445 ET73 y 603 ET73	Plantas de porte débil y crecimiento lento con alteraciones en el desarrollo vegetativo y reproductivo.

**Tabla 23.** Otros fenotipos variantes para caracteres vegetativos detectados en TG1 (cont.)

Genotipos	Fenotipos observados
158 ET73, 257 ET73, 450 ET73, 530 ET73, 553 ET73, 561 ET73, 711 ET73, 808 ET73, 863 ET73, 891 ET73 y 908 ET73	Porte débil con alteraciones en el desarrollo vegetativo.
297 ET73, 665 ET73, 706 ET73, 843 ET73 y 926 ET73	Porte débil con alteraciones en el desarrollo vegetativo y reproductivo
53 ET73, 79 ET73, 622 ET73, 911 ET73 y 522 ET73	Alteraciones diversas en el desarrollo vegetativo.
64 ET73, 171 ET73, 177 ET73, 209 ET73, 210 ET73, 226 ET73, 407 ET73, 598 ET73, 682 ET73, 775 ET73, 912 ET73 y 959 ET73	Alteraciones diversas en el desarrollo vegetativo y reproductivo.
479 ET73 (figura 49a) y 564 ET73	Clorosis.
653 ET73	Variegación y alteraciones en el desarrollo reproductivo.
13 ET73 y 196 ET73	Excesiva viviparidad
770 ET73	Excesiva brotación axilar



**Figura 49.** Detalle de algunos variantes. a) genotipo con síntomas de clorosis (479 ET73), b) genotipo de porte compacto (687 ET73) y c) genotipo de porte débil (623 ET73)

### 3.2.2. Mutantes con efectos recesivos

#### 3.2.2.a. Mutantes de la colección de plantas transgénicas con construcciones convencionales

Tras la caracterización de 17 progenies TG2, se identificó un mutante al que denominamos, por su pequeño tamaño, *nanotom*. Sus alteraciones fenotípicas más relevantes se describen a continuación.

#### *nanotom* (código 16a P8)

Este mutante procede de una transformación genética realizada con una construcción que porta el gen marcador *nptII* y el gen delator *GFP*.



**Figura 50.** El mutante *nanotom* y plantas de fenotipo silvestre tras dos meses de cultivo en el invernadero. Las fotos corresponden a diferentes tandas de cultivo: a) momento en el que se identificó el mutante y b) cultivo de la TG2 en maceta individual (las plantas con fenotipo *nanotom* están señaladas con una flecha).

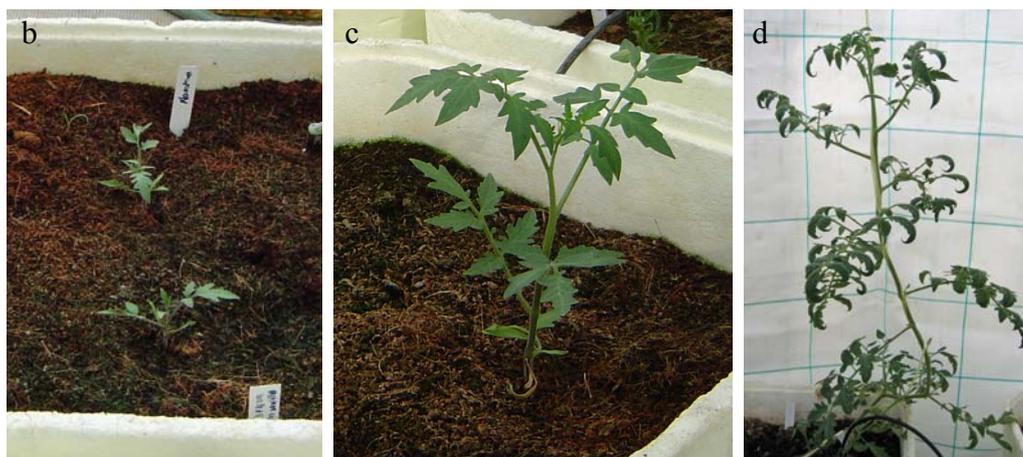
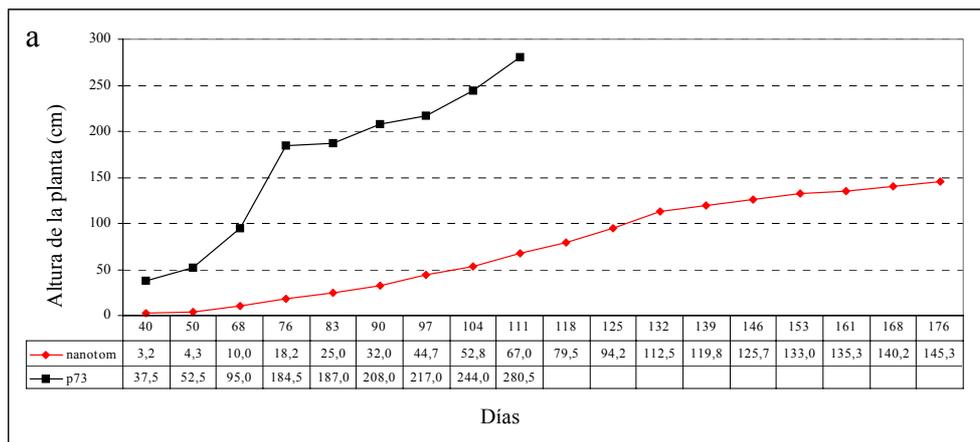
La TG1 tenía un fenotipo indistinguible de p73. En cambio, cuando se cultivó la TG2 se observó que algunas plantas exhibían un ritmo de crecimiento extremadamente lento. Por su fenotipo característico, a estas plantas las denominamos *nanotom*.

Tras la nascencia, las plántulas *nanotom* se desarrollan de forma aparentemente normal. No obstante, después de la aparición de las primeras hojas verdaderas, el crecimiento de las plantas *nanotom* se detiene. Mientras que las plantas WT procedentes de la misma TG2, así como las plantas del cultivar original (p73) se desarrollan normalmente, las *nanotom* mantienen su fenotipo enano durante unos dos meses. En concreto, a los dos

meses de cultivo en el invernadero, las plantas *nanotom* tenían una altura aproximada de  $10,0 \pm 1,1$  cm mientras que las de fenotipo WT alcanzaban los  $95,0 \pm 15$  cm (figura 50).

Lo curioso es que durante este periodo de crecimiento detenido (en realidad, de no crecimiento), las plantas *nanotom* no parecen tener síntomas de senescencia en sus hojas, sino que simplemente se mantienen en una especie de fase “de latencia”.

Sorprendentemente, a partir de los dos meses o dos meses y medio las plantas *nanotom* retoman el crecimiento, aunque, eso sí, a un ritmo extraordinariamente lento. A los tres meses de cultivo las plantas de fenotipo *nanotom* medían  $32,0 \pm 5$  cm (las WT alcanzaban en ese momento una altura de  $208 \pm 48$  cm); a los cuatro meses  $79,5 \pm 13$  cm (las WT ya habían alcanzado la máxima altura que en nuestras condiciones podíamos medir:  $280,5 \pm 2,5$  cm); a los cinco meses  $133,0 \pm 14,5$  cm; y a los 6 meses la altura de las plantas *nanotom* era de  $145,0 \pm 16,4$  cm.



**Figura 51.** Ritmo de crecimiento de *nanotom* respecto a p73 (a). Plantas *nanotom* tras 40 días (b), 90 días (c) y 150 días (d) de cultivo en el invernadero.

En la figura 51a se puede ver el ritmo de crecimiento de *nanotom* y de p73 a lo largo del tiempo (expresado como número de días en la figura). En las figuras 51b, c y d se pueden ver las distintas etapas de *nanotom* durante su largo periodo de cultivo en el invernadero.

#### Número de insertos y segregación en la TG2.

El análisis Southern realizado en la UAL indica que, por desgracia, la TG1 de la que procede *nanotom*, tiene 5 inserciones. Esto es un problema porque dificulta cualquier tipo de análisis genético que se realice con las progenies de esta planta, así como el análisis de la co-segregación entre el fenotipo mutante y la resistencia a la kanamicina conferida por el gen marcador (en este caso concreto, el problema es, si cabe, aún mayor, porque, debido a la detención del crecimiento que se produce en *nanotom*, es muy difícil distinguir entre plantas *nanotom* Kan<sup>R</sup> y Kan<sup>S</sup>). Además, en el supuesto de que el fenotipo se deba a una inserción del T-DNA, o a más de una, y se pretenda clonar el gen (o genes) etiquetado(s), no habrá más remedio que separar la(s) copia(s) responsable(s) del fenotipo mutante.

Para la detección de mutantes recesivos normalmente sembramos 12 plantas de la TG2 (11 plantas es el tamaño de familia necesario para identificar un mutante recesivo con una probabilidad de fallo menor del 5 %). Evidentemente, no se puede hacer un ajuste de segregación con una muestra de 12 plantas. Por ello, tras la detección de un mutante recesivo, lo ideal sería sembrar una muestra suficientemente grande de la TG2 para hacer el ajuste de segregación propiamente dicho. Esto no es posible, al menos en primera instancia, porque debido al gran número de plantas que cultivamos en cada campaña y al enorme número de semillas que hay que conseguir (estimamos que el 20 – 25 % del tiempo se tiene que dedicar a esta tarea al final de cada campaña), “sólo” obtenemos unas 300 semillas de cada TG2. Desde luego, no podemos “desperdiciar” todas estas semillas para el ajuste de segregación porque luego las podemos necesitar para los distintos ensayos que van a realizarse con cada mutante.

Así pues, en este caso concreto el ajuste de segregación se realizó con dos muestras: la primera de tan solo 12 plantas (que es la muestra en la que detectamos el mutante) y la segunda de 24 plantas. La distribución de fenotipos (WT – *nanotom*), su grado de ajuste a las segregaciones 3:1 y 15:1, así como las correspondientes  $\chi^2$  de homogeneidad se muestran en la tabla siguiente:

En principio, la hipótesis más sencilla es que el fenotipo *nanotom* esté causado por una copia en homocigosis, en cuyo caso la segregación debería ajustarse a  $\frac{3}{4}$  WT :  $\frac{1}{4}$  *nanotom*. En este caso lo más probable es que el fenotipo *nanotom* se deba a la pérdida de función de un determinado gen. Para esta hipótesis (3:1), el análisis de homogeneidad indica que no hay motivo para dudar de que las muestras sean homogéneas ( $\chi^2$  de homogeneidad = 0,30; P > 50%; ver tabla 24). El análisis de datos acumulados revela que tampoco hay motivos para dudar de la hipótesis de partida, aunque el valor de la  $\chi^2$  (3,70) está muy próximo al del nivel de significación ( $\chi^2_{1\text{ g.l.}}(5\%) = 3,84$ ).

**Tabla 24.** Segregación fenotípica WT – *nanotom* en dos muestras de la progenie TG2

Ajuste de la segregación a 3:1			Ajuste de la segregación a 3:1		
M1 (3:1)	WT	<i>nanotom</i>	M2 (3:1)	WT	<i>Nanotom</i>
O	10	2	O	22	2
E (3:1)	9	3	E (3:1)	18	6
$\chi^2$ M1 <sub>1gl</sub> =	0,44	NS	$\chi^2$ M2 <sub>1gl</sub> =	3,56	NS

$\chi^2$ H <sub>1gl</sub> =0,30 (NS)
--------------------------------------

DA (3:1)	WT	<i>Nanotom</i>
O	32	4
E (3:1)	27	9
$\chi^2$ DA <sub>1gl</sub> =	3,70	NS

Ajuste de la segregación a 9:7			Ajuste de la segregación a 9:7		
M1 (9:7)	WT	<i>Nanotom</i>	M2 (9:7)	WT	<i>Nanotom</i>
O	10	2	O	22	2
E (9:7)	6,75	5,25	E (9:7)	13,5	10,5
$\chi^2$ M1 <sub>1gl</sub> =	3,58	NS	$\chi^2$ M2 <sub>1gl</sub> =	12,23	*

$\chi^2$ H <sub>1gl</sub> =0,23 (NS)
--------------------------------------

DA (9:7)	WT	<i>Nanotom</i>
O	32	4
E (9:7)	20,25	15,75
$\chi^2$ DA <sub>1gl</sub> =	15,58	*

**Tabla 24.** Segregación fenotípica WT – *nanotom* en dos muestras de la progenie TG2 (cont.)

Ajuste de la segregación a 13:3			Ajuste de la segregación a 13:3		
M1 (13:3)	WT	<i>Nanotom</i>	M2 (13:3)	WT	<i>nanotom</i>
O	10	2	O	22	2
E (13:3)	9,75	2,25	E (13:3)	19,5	4,5
$\chi^2$ M1 <sub>1gl</sub> ≠	0,03	NS	$\chi^2$ M2 <sub>1gl</sub> ≠	1,71	NS

$\chi^2$ H <sub>1gl</sub> ≠0,36 (NS)
--------------------------------------

DA (13:3)	WT	<i>Nanotom</i>
O	32	4
E (13:3)	29,25	6,75
$\chi^2$ DA <sub>1gl</sub> ≠	1,38	NS

Ajuste de la segregación a 15:1			Ajuste de la segregación a 15:1		
M1 (15:1)	WT	<i>Nanotom</i>	M2 (15:1)	WT	<i>nanotom</i>
O	10	2	O	22	2
E (15:1)	11,25	0,75	E (15:1)	22,5	1,5
$\chi^2$ M1 <sub>1gl</sub> ≠	2,22	NS	$\chi^2$ M2 <sub>1gl</sub> ≠	0,18	NS

$\chi^2$ H <sub>1gl</sub> ≠0,95 (NS)
--------------------------------------

DA (15:1)	WT	<i>Nanotom</i>
O	32	4
E (15:1)	33,75	2,25
$\chi^2$ DA <sub>1gl</sub> ≠	1,45	NS

Los datos observados se ajustan mejor a una segregación 15:1 (epistasia doble dominante). El análisis de homogeneidad para la hipótesis 15:1 indica que no hay problema para hacer el análisis con los datos acumulados de ambas muestras y la  $\chi^2$  de datos acumulados tiene una probabilidad asociada mayor ( $\chi^2$  de datos acumulados = 1,45; 10% < P < 25%). Si ésta hipótesis fuera cierta, el fenotipo *nanotom* estaría causado no por una, sino por dos inserciones en homocigosis y, de nuevo, lo más probable es que se trata de un fenotipo de pérdida de función, pero no debido a la anulación de un gen, sino de dos al mismo tiempo. En este caso, si asumimos que hay tres inserciones sin efecto mutagénico (que por tanto podemos dejar de lado) y denominamos como ‘a’ y ‘b’ las dos inserciones

con efecto recesivo (A y B serían los alelos de tipo salvaje para cada uno de los *loci*), el fenotipo de la TG1 sería di-hemicigótico (Aa Bb) y la segregación en la TG2 sería: 1/16 (AA BB) + 2/16 (AA Bb) + 2/16 (Aa BB) + 4/16 (Aa Bb) + 1/16 (AA bb) + 2/16 (Aa bb) + 1/16 (aa BB) + 2/16 (aa Bb) + 1/16 (aa bb). Bajo este supuesto, el genotipo de las plantas *nanotom* sería aa bb. Es decir, la presencia de uno de los alelos silvestres de cualquiera de los dos loci (A y/o B) bastaría para que se produjera la función normal (i.e. crecimiento radicular).

Como era obvio por la simple observación de los datos, el análisis estadístico permite descartar una segregación 9:7 (epistasia doble recesiva). La que no se puede descartar en términos estadísticos es la segregación 13:3 (epistasia doble dominante-recesiva). Es más, el grado de ajuste a 13:3 es igual de bueno que para 15:1. El problema de esta segregación es que obliga a una hipótesis un tanto rebuscada: el fenotipo *nanotom* estaría causado por el efecto combinado de dos inserciones en homocigosis, pero de forma que una tendría un efecto recesivo y la otra un efecto dominante. Es decir, en este caso, asumiendo que denominamos como 'a' la mutación insercional con efecto recesivo y 'B' la que tiene efecto dominante, los genotipos de las plantas *nanotom* serían aa BB y aa Bb. En principio, parece lógico que la mutación recesiva sea de pérdida de función y la dominante de ganancia de función. Lo primero ocurre con frecuencia y lo segundo es factible (de hecho, ya hemos detectado algún mutante insercional de ganancia de función), pero lo difícil es que ocurran ambas cosas a la vez. Con todo, el que algo sea improbable no significa que no pueda ocurrir.

Las hipótesis 15:1 y 13:3 son sugerentes, pero el que tengan una mayor probabilidad asociada no significa que sean ciertas. La hipótesis 3:1 es la más simple y, en términos estadísticos, no hay motivos para dudar de la hipótesis. Por tanto, hasta no encontrar ninguna evidencia en contra, de momento aceptamos esta hipótesis.

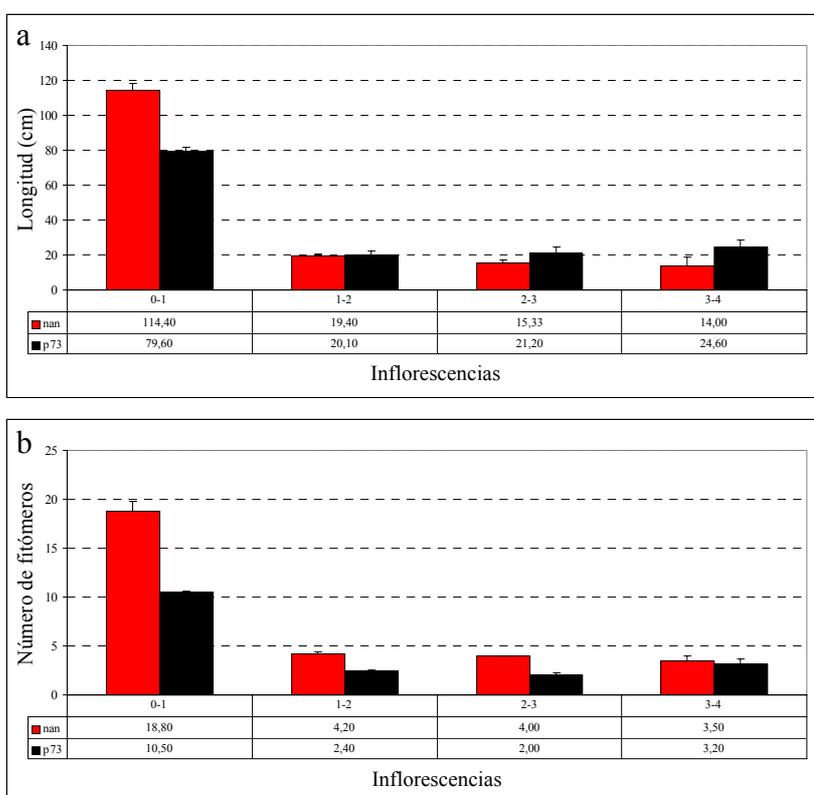
Con independencia de la base genética que provoca el fenotipo *nanotom*, lo cierto es que se trata de un mutante peculiar. Por ello, a los seis meses de cultivo (conviene recordar que se trata de un mutante con un crecimiento extremadamente lento) se llevó a cabo la evaluación fenotípica de los caracteres más relevantes de las plantas *nanotom*.

Morfología y color de la hoja: similar a la de p73

**Tamaño y hábito de crecimiento del mutante:** las diferencias con el testigo se debían principalmente al ritmo de crecimiento (e.g.: una planta mutante de 90 días era prácticamente indistinguible a una de p73 de 30 días).

Respecto a las plantas de fenotipo silvestre (p73), se pudo comprobar que las *nanotom* tenían una mayor longitud hasta la primera inflorescencia. Sin embargo, entre inflorescencias no ocurría lo mismo (figura 52a).

Por otro lado, las plantas *nanotom* desarrollaban más fitómeros hasta la primera inflorescencia y entre inflorescencias que p73 (figura 52b).



**Figura 52.** Caracteres relacionados con el desarrollo vegetativo de *nanotom*. a) Longitud hasta la primera inflorescencia (0-1) y entre inflorescencias (1-2, 2-3...), b) número de fitómeros hasta la primera inflorescencia (0-1) y entre inflorescencias (1-2, 2-3...).

**Tiempo de floración:** *nanotom* exhibió un retraso de la floración tanto en el espacio (figura 52a y 52b) como en el tiempo (debido a su ritmo de crecimiento tan lento).

**Inflorescencia:** la arquitectura de la inflorescencia era similar a la de p73, pero el número de flores por inflorescencia fue menor. En concreto, *nanotom* desarrolló  $4,4 \pm 0,3$  flores en las primeras cuatro inflorescencias, mientras que las plantas p-73 habían desarrollado  $7,1 \pm 0,4$  flores en las primeras seis inflorescencias.

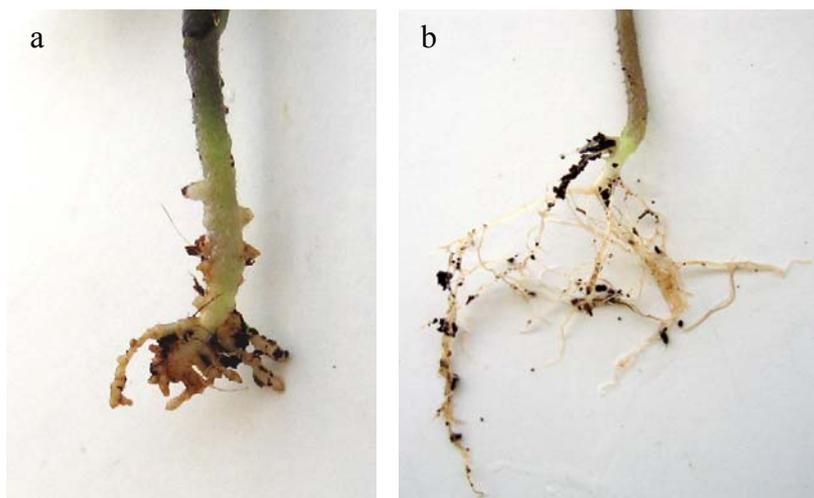
Tamaño, morfología y color de la flor: No se vieron diferencias respecto al WT.

Caracteres relacionados con el fruto: Lo sorprendente es que las plantas *nanotom* cuajan frutos. El número de frutos cuajados era escaso (figura 53) y los que lo hicieron tenían poca semilla. A pesar de ello se pudo obtener la progenie TG3 de algunas plantas TG2 con fenotipo *nanotom*.



**Figura 53.** Detalle de los frutos cuajados en una de las plantas de fenotipo mutante.

Para tratar de averiguar el motivo por el cual las plantas de fenotipo mutante exhibían un ritmo de crecimiento tan lento, decidimos observar el desarrollo radicular del mutante y compararlo con el de plantas de fenotipo silvestre. Cultivamos algunas plantas TG2 y en el momento en el que identificamos los dos fenotipos (mutante y silvestre) extrajimos las plantas de la maceta para ver si existía alguna anomalía en el desarrollo radicular del mutante.



**Figura 54.** Sistema radicular de *nanotom* (a) respecto al de p73 (b) en plántulas de 15-20 días.

Pudimos ver que *nanotom* exhibía importantes alteraciones en el desarrollo radicular que parecían estar relacionadas con una parada o detención del crecimiento de los meristemas radiculares (figura 54a). Tal y como puede verse en la figura, más que raíces las plantas de *nanotom* tienen pequeños muñones en la base del tallo.

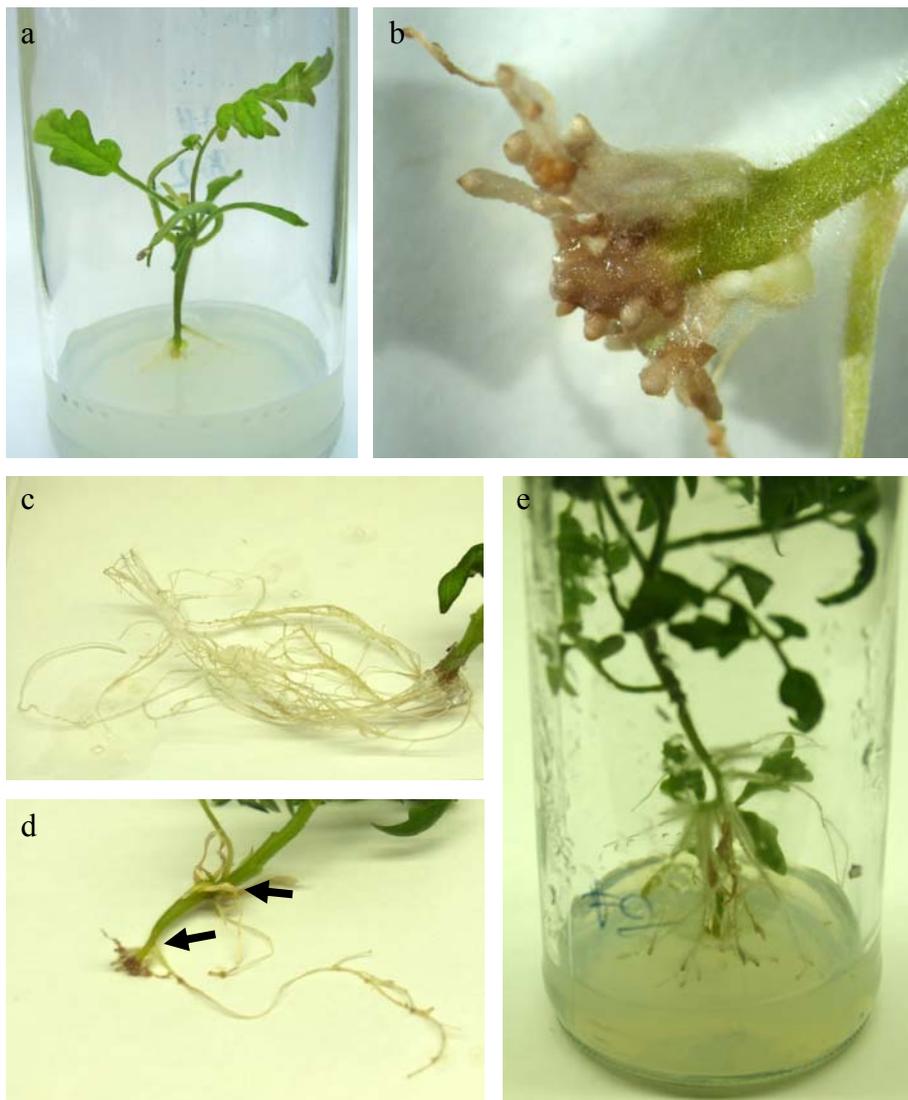
Como no disponemos de un sistema de cultivo hidropónico en el invernadero, para llevar a cabo un seguimiento del crecimiento radicular a lo largo del tiempo (en definitiva, para “ver” las raíces), decidimos cultivar plantas *nanotom* y plantas WT *in vitro*. De esa forma, quizás nos podríamos hacer una idea de cómo y por qué las plantas *nanotom* eran capaces de recuperarse y seguir creciendo con tales alteraciones en su sistema radicular (conviene recordar que en el invernadero las plantas llegaron a producir frutos).

Las plantas WT empiezan a formar raíces a los 7 días de cultivo *in vitro* y a los 30 días de cultivo, exhiben un desarrollo radicular profuso (figura 55c). En cambio, las plantas *nanotom* “se toman su tiempo”: el crecimiento se detiene hasta que transcurren varios meses (lo que resulta inaudito en cultivo *in vitro*) y, a partir de los tres-cuatro meses empiezan a crecer lentamente (de hecho, es factible mantener una planta *nanotom* durante 9 meses en el recipiente donde se lleva a cabo la incubación).

Pudimos comprobar que, al igual que ocurría *in vivo*, las plantas *nanotom* exhibían graves alteraciones en el desarrollo radicular cuando se cultivaban *in vitro*. Durante la primera fase de cultivo (en la que se detiene el crecimiento) en las plantas mutantes el sistema radicular no se desarrollaba normalmente. En lugar de raíces propiamente dichas, lo que se forma es una especie de muñones idénticos a los que observamos en plantas

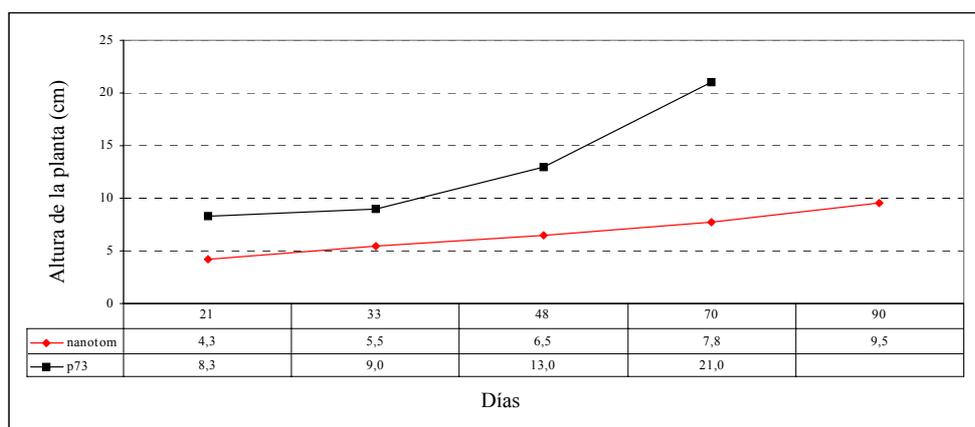
cultivadas en invernadero (figura 55b). No obstante, a partir de un cierto momento, empiezan a aparecer raíces en la base del tallo (figura 55d) que llegan a alcanzar una longitud similar a la de las raíces propiamente dichas. El crecimiento de *nanotom* se debía, pues, al desarrollo de raíces adventicias que surgían del tallo (figura 55e).

Es decir, las plantas *nanotom* no crecen inicialmente porque se paraliza el desarrollo de los meristemos radiculares. No obstante, a partir de un cierto momento, las plantas mutantes se recuperan y empiezan a crecer gracias a la formación de raíces adventicias.



**Figura 55.** Crecimiento y desarrollo radicular de *nanotom in vitro*: a) planta de *nanotom* de aproximadamente 1 mes; b) detalle de su sistema radicular (obsérvese la detención del crecimiento de los meristemos radiculares); c). Desarrollo radicular en una planta testigo tras un mes de cultivo; d y e) Desarrollo de raíces adventicias a partir del tallo en *nanotom*.

A pesar de que el cultivo se llevó a cabo en un medio adecuado para el desarrollo de la planta, observamos las serias dificultades que tenía *nanotom* para continuar su crecimiento. Respecto al crecimiento de las plantas de fenotipo silvestre, el ritmo de crecimiento de las plantas de fenotipo mutante *in vitro* fue similar al que exhibió *in vivo* (figura 56). A los tres meses de cultivo *in vitro* las plantas de fenotipo *nanotom* medían  $9,5 \pm 1,5$  cm, mientras que las WT alcanzaban en ese momento una altura de  $21 \pm 0$  cm (que es la máxima altura que pueden alcanzar debido a la limitación que impone el recipiente de cultivo).



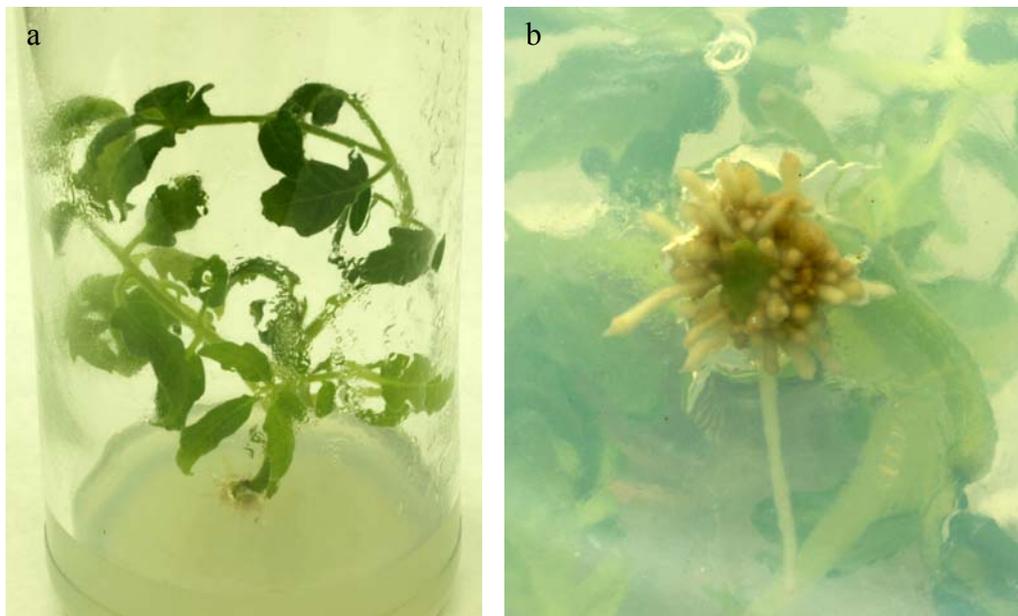
**Figura 56.** Ritmo de crecimiento de *nanotom* respecto a p73 *in vitro*.

Los resultados parecían indicar que las alteraciones fenotípicas de *nanotom* estaban relacionadas con el desarrollo de la raíz pivotante a dos niveles. Por un lado, la raíz pivotante quedaba reducida a una especie de muñón (figuras 54a y 55b), pero lo que es más importante, a partir de esta estructura no se desarrollaban con normalidad las raíces laterales. Sin embargo, la planta era capaz de continuar su crecimiento gracias al desarrollo de raíces adventicias que surgían del tallo (aunque estas raíces tardaban mucho tiempo en aparecer).

Teniendo en cuenta esto, cuando las plantas mutantes alcanzaron una altura de unos 10 cm (90 días de cultivo) decidimos realizar una clonación por cultivo de yemas axilares, incubando las yemas en un medio diseñado para el enraizamiento de las plantas WT (un medio básico con una pequeña concentración de auxina). Conviene recordar que las raíces de plantas WT clonadas *in vitro* surgen a partir de las zonas de corte del tallo. Lo que queríamos saber es si las raíces que se desarrollan a partir del tallo en un proceso típico de clonación *in vitro* permitirían revertir el fenotipo mutante. Si esto fuese así, las alteraciones de *nanotom* estarían más bien relacionadas con el desarrollo de raíces laterales a partir de

raíz principal o pivotante que sólo tienen las plantas procedentes de semilla y de la cual carecen las plantas clonadas *in vitro*.

Lo que observamos fue que las réplicas clonales de *nanotom* presentaban el mismo problema de enraizamiento que las plantas procedentes de semilla (figura 57).



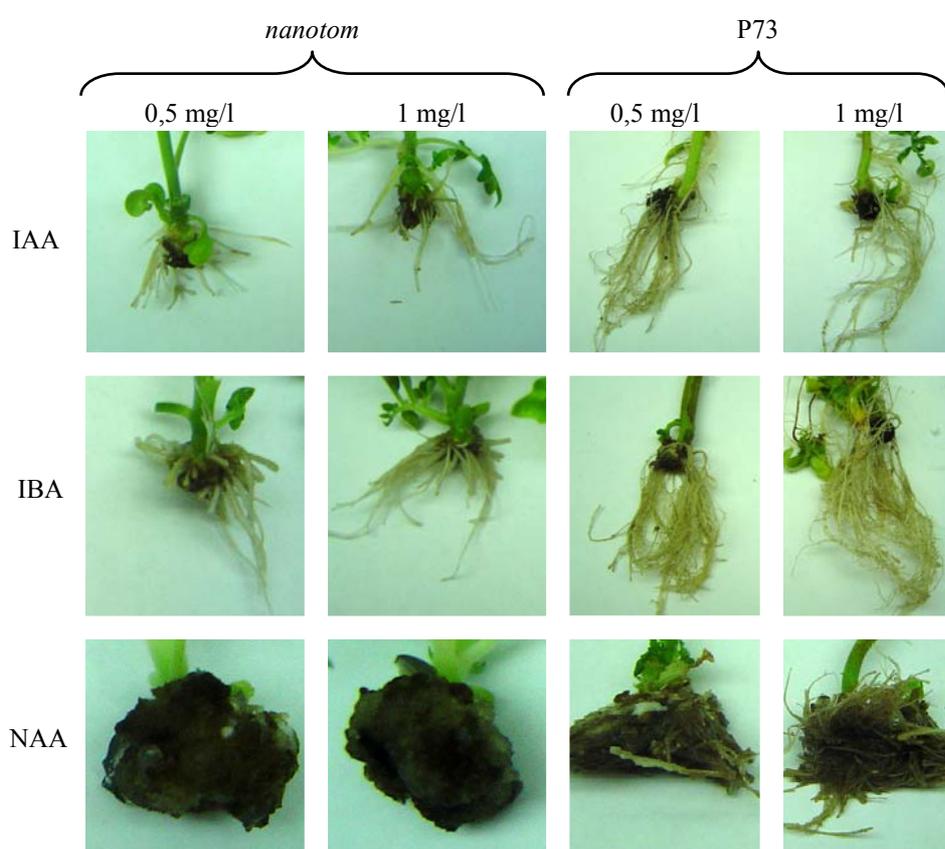
**Figura 57.** Planta mutante clonada *in vitro* (a) y detalle de su sistema radicular tras tres meses de cultivo (b).

El nivel endógeno de fitohormonas influye en el crecimiento y desarrollo radicular. Entre las diferentes fitohormonas, se ha descrito que las auxinas desempeñan un papel principal en la regulación del desarrollo de la raíz y su gravitropismo positivo. Además, otras hormonas, como por ejemplo el ácido abscísico y el ácido giberélico, también desempeñan un papel importante.

Para determinar si el fenotipo *nanotom* se debía a la alteración o inhibición de un gen implicado en la síntesis endógena de hormonas, se decidió analizar el crecimiento radicular del mutante en medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de hormonas.

En un primer experimento, se analizó el desarrollo radicular de *nanotom* en un medio básico suplementado con dos concentraciones (0,5 y 1 mg/l) de ácido abscísico (ABA) o diferentes tipos de auxina: ácido indolacético (IAA), ácido indolbutírico (IBA), ácido naftalenacético (NAA) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4 D). Queríamos comprobar si el suplemento exógeno de algún tipo de auxina, o de ácido abscísico, podría restaurar, al menos parcialmente, el fenotipo silvestre.

Sin embargo, tras varios meses de cultivo *in vitro* en estos medios, observamos que nuestro mutante continuaba exhibiendo las mismas alteraciones en el desarrollo radicular. En los medios suplementados con 2,4D o ácido abscísico no se produjo enraizamiento ni en el mutante ni en las plantas de fenotipo silvestre. En los medios suplementados con ácido indolacético o ácido indolbutírico, las plantas de p73 exhibieron un profuso desarrollo radicular mientras que *nanotom* mantenía el mismo fenotipo (figura 58). En medio suplementado con ácido naftalenacético, las plantas de p73 desarrollaron raíces tras la formación de un callo y en el mutante se formó este callo pero no se desarrollaron raíces (figura 58).



**Figura 58.** Desarrollo radicular del mutante y de p73 en medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de auxinas en condiciones de cultivo *in vitro*.

En un segundo experimento, se analizó el desarrollo radicular de *nanotom* suplementando el medio básico con una mayor concentración de ácido indolacético (5 mg/l) y diferentes citoquininas (kinetina = K, a 0,5 mg/l y 1 mg/l; 6-benciladenina = 6BA, a 1mg/l; y zeatina = Z, a 0,5 mg/l).

Al igual que en el experimento anterior, en ningún medio se produjo la restauración total o parcial del fenotipo silvestre a partir de las plantas de fenotipo mutante (figura 59).

En el medio con 5 mg/l de ácido indolacético los resultados fueron similares a los que se observaron en el experimento previo en el que se utilizaron menores concentraciones (0,5 y 1 mg/l). En los medios con citoquininas los resultados fueron diferentes en función del tipo de citoquinina ensayada. En los medios con kinetina, las plantas de p73 fueron capaces de emitir raíces tras formar un pequeño callo en la base del tallo (no se observaron diferencias significativas en las concentraciones ensayadas). Las plantas *nanotom*, tras desarrollar también un pequeño callo en la base del tallo, sólo desarrollaron unas pocas raíces a partir del tallo que no proliferaron. Algo similar se observó en el medio suplementado con 6-benciladenina, es decir, las plantas de p73 emitieron raíces tras formar un pequeño callo en la base del tallo y las del mutante sólo emitieron unas pocas raíces en el tallo tras desarrollar un callo en la base.



**Figura 59.** Desarrollo radicular del mutante y de p73 en medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de citoquininas en condiciones de cultivo *in vitro*.

El resultado más espectacular se observó en el medio suplementado con zeatina. En este medio, las plantas de p73 desarrollaron un callo en la base del tallo pero no hubo formación de raíces. Las plantas del mutante perdieron la dominancia apical y en la base

del tallo también se desarrolló un callo, pero en este caso se produjo una extraordinaria proliferación de brotes adventicios.

Hasta llevar a cabo un análisis más detallado de este mutante, nuestra hipótesis es que las alteraciones en el sistema radicular que manifiesta *nanotom* podrían estar relacionadas con el correcto desarrollo de los meristemas radiculares. No obstante, a tenor de los resultados obtenidos en el medio suplementado con zeatina, no se puede descartar que se haya producido la alteración del nivel de expresión de algún gen implicado en la síntesis endógena de citoquininas.

Si fuera esto último lo que ocurre en la realidad, parece difícil mantener la hipótesis de que el fenotipo característico de *nanotom* está causado por una simple inserción con efecto recesivo (lo que conduciría a una segregación 3:1 en la TG2). Más difícil todavía es que el fenotipo se deba a dos mutaciones insercionales independientes con efectos recesivos (lo que daría una segregación 15:1).

Si realmente hay una mutación insercional que genera la sobreexpresión de un gen implicado en la síntesis de citoquininas, lo más probable es que tenga un efecto dominante. De ser así, la hipótesis que antes parecía un tanto rebuscada (una epistasia doble dominante-recesiva que da una segregación 13:3 en la TG2 y que se debe a dos mutaciones, una recesiva y otra dominante) se ajustaría mejor a lo que hemos observado en este último experimento porque implica una mutación de tipo dominante.

Por desgracia, de momento no podemos llegar a ninguna conclusión pero sí podemos afirmar que el mutante *nanotom* merece un estudio más exhaustivo.

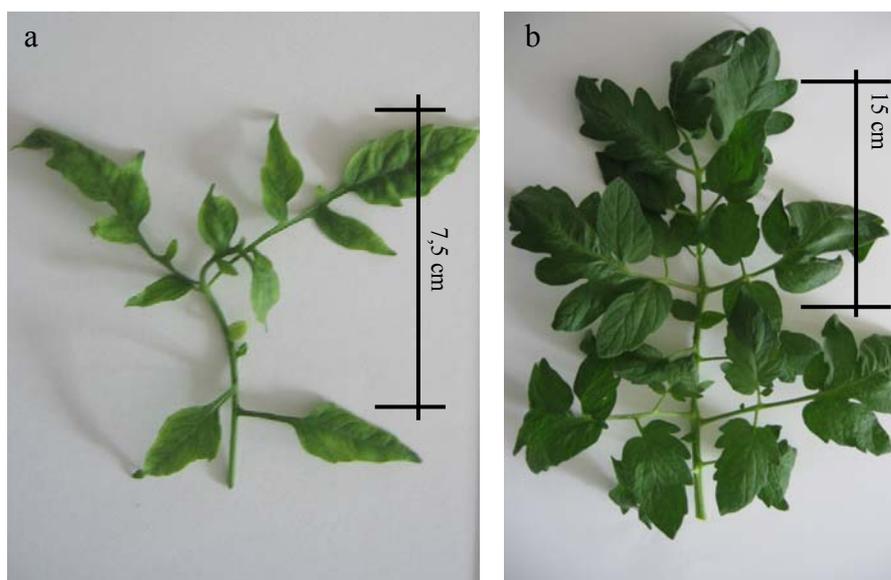
### 3.2.2.b. Mutantes de la colección de plantas transgénicas con la trampa de intensificadores

Tras caracterizar 20 progenies TG2, se detectaron 3 mutantes recesivos con alteraciones en el desarrollo vegetativo. Estos mutantes se describen a continuación.

#### 57 ET73

Detección del mutante: Se cultivaron 14 plantas de la TG2 y 3 de ellas exhibieron el fenotipo mutante. A falta de posteriores ensayos, en principio no hay motivo para dudar de una simple mutación con efectos recesivos.

Morfología y color de la hoja: las hojas del mutante, de un color más claro que las de p73, eran de menor tamaño y con menor número de folíolos compuestos que las del testigo (figura 60a).



**Figura 60.** Tamaño, color y morfología de la hoja del mutante 57 ET73 (a) respecto a la del testigo (b).

Tamaño y hábito de crecimiento del mutante: las plantas de fenotipo mutante exhibieron enanismo (figura 61). A los 3 meses de cultivo en el invernadero, la altura de estas plantas fue de 20 cm y a los 6 meses sólo alcanzaron una altura de 60 cm, mientras que las de p73 medían 200 cm a los 4 meses de cultivo. Las plantas mutantes exhibían un porte débil y un ritmo de crecimiento muy lento.

Tiempo de floración: Tras más de 6 meses de cultivo en el invernadero, las plantas mutantes no llegaron a desarrollar flores.

Infloriscencia, flor y fruto: Durante el periodo de cultivo en el que las plantas se mantuvieron en el invernadero (> 6 meses) no se desarrollaron infloriscencias. Tampoco se observaron flores ni, por supuesto, frutos.



**Figura 61.** Crecimiento de una planta de fenotipo mutante respecto al de una planta de fenotipo silvestre a los 2 meses (a) y 4 meses (b) de cultivo en invernadero.

## 140 ET73

Detección del mutante: Se cultivaron 10 plantas de la progenie TG2 y 2 de ellas exhibieron el fenotipo mutante.

Morfología y color de la hoja: las hojas del mutante fueron similares a las de p73, pero tras 4 meses de cultivo exhibieron importantes síntomas de senescencia (figura 62).



**Figura 62.** Mutante 140 ET73. a) Aspecto de una planta TG2 de fenotipo mutante tras 4 meses de cultivo; b) Detalle del estado de senescencia de una de sus hojas

Tamaño y hábito de crecimiento del mutante: las plantas de fenotipo mutante exhibieron un ritmo de crecimiento lento y un porte débil.

Tiempo de floración: el mutante exhibió un retraso de la floración en el tiempo debido a su lento ritmo de crecimiento.

Inflorescencia: la arquitectura de la inflorescencia fue similar a la de p73 pero el número de flores por cada inflorescencia fue menor.

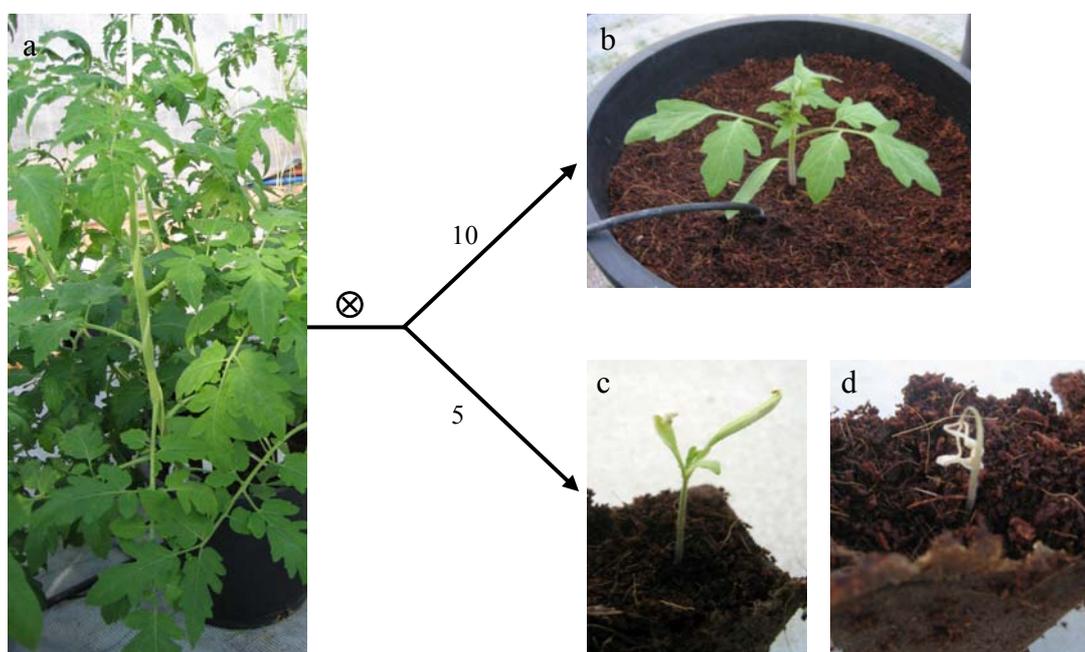
Tamaño, morfología y color de la flor: No se detectaron diferencias respecto al WT.

Caracteres relacionados con el fruto: las plantas de fenotipo mutante desarrollaron menos frutos que p73. La morfología y el tamaño de los frutos fueron similares a los del testigo.

### *Seedling lethal 111*

Detección del mutante: Se cultivaron 15 plantas de la TG2 y 5 de ellas exhibieron el fenotipo mutante (figura 63c y 63d).

Descripción del fenotipo mutante: A diferencia de lo que ocurre con los otros mutantes que hemos identificado, en este caso no se pudo llevar a cabo una caracterización fenotípica porque la mutación tiene efectos letales (de ahí el nombre: *seedling lethal*). Tras la nascencia, el desarrollo inicial de la plántula parece normal; no obstante, a medida que se produce la elongación del hipocotilo y la apertura de los cotiledones, la plántula adquiere un color verde claro (figura 63c) con síntomas de deficiencia en clorofila. Poco más tarde, tras la aparición de la primera hoja verdadera (que no llega a expandirse), la plántula se torna albina, colapsa y muere (figura 63c).



**Figura 63.** Identificación del mutante recesivo *seedling lethal* 111. La TG1 no exhibió diferencias respecto al fenotipo de p73 (a). Tras obtener la progenie, se cultivaron 15 plantas TG2 en el invernadero, 10 de las cuales exhibieron fenotipo silvestre (b) y 5 fenotipo mutante (c). Detalle del colapso de la planta de fenotipo mutante en un estadio de desarrollo muy temprano (d).

Análisis genético y de expresión del delator: el mutante no se pudo fenotipar debido a que moría antes de desarrollar la primera hoja verdadera. Por tanto, decidimos llevar a cabo un análisis genético de segregación utilizando un mayor número de semillas de partida.

Aparte del ensayo inicial en el que se detectó el mutante (ensayo 1; tabla 25a), se realizó otro (ensayo 2; tabla 25b) en el que se cultivaron 36 plantas TG2, 25 de las cuales

exhibieron fenotipo WT mientras que las otras 11 tenían fenotipo mutante (figura 64 y tabla 25b).



**Figura 64.** Análisis de segregación realizado con una muestra de la TG2: a) en estadio cotiledonario ya se podían identificar las plantas de fenotipo mutante (circulo rojo). b y c) las plantas de fenotipo mutante no eran capaces de desarrollar hojas verdaderas, y a los 10-15 días de la siembra comenzaban a colapsar. d) detalle de una plántula de fenotipo mutante.

**Tabla 25.** Análisis  $\chi^2$  de las segregaciones observadas con la descendencia TG2 del genotipo 111 ET73,  $\chi^2$  de homogeneidad y análisis  $\chi^2$  de los datos acumulados.

a) Ensayo 1			b) Ensayo 2		
E1 (3:1)	WT	M	E2 (3:1)	WT	M
O	10	5	O	25	11
E (3:1)	11,25	3,75	E (3:1)	27	9
$\chi^2$ E1 (1 gl) = 0,56 (NS)			$\chi^2$ E2 (1 gl) = 0,59 (NS)		

$\chi^2$ H (1 gl) = 0,04 (NS)
-------------------------------

E1 (3:1)	WT	M
O	35	16
E (3:1)	38,25	12,75
$\chi^2$ DA (1 gl) = 1,10 (NS)		

El análisis genético ( $\chi^2$  de las segregaciones observadas en cada una de las muestras,  $\chi^2$  de homogeneidad y  $\chi^2$  de los datos acumulados, tabla 25) indicó que no había motivo para dudar de que la segregación fenotípica *in vivo* era acorde con una distribución 3 WT : 1 M.

Por otro lado, se decidió evaluar la segregación fenotípica en condiciones de cultivo *in vitro*. Para ello, se llevaron a cabo dos ensayos. En el primero se sembraron semillas

TG2 en medio MG\*. En el segundo se sembraron semillas TG2 en medios MG\*, IAA\* e IAA + Kan\*. Los resultados se pueden ver en la tabla 26.

**Tabla 26.** Análisis  $\chi^2$  de las segregaciones observadas *in vitro* con la descendencia TG2 del genotipo 111 ET73 en los dos ensayos efectuados,  $\chi^2$  de homogeneidad y análisis  $\chi^2$  de los datos acumulados.

Ensayo 1		
MG		
M1 (3:1)	WT	M
O	17	5
E (3:1)	16,5	5,5
$\chi^2$ M1 (1 gl) = 0,06 (NS)		

Ensayo 2								
MG			IAA			IAA + kan		
M2 (3:1)	WT	M	M3 (3:1)	WT	M	M4 (3:1)	WT	M
O	7	3	O	8	2	O	10	6
E (3:1)	7,5	2,5	E (3:1)	7,5	2,5	E (3:1)	12	4
$\chi^2$ M2 (1 gl) = 0,13 (NS)			$\chi^2$ M3 (1 gl) = 0,13 (NS)			$\chi^2$ M4 (1 gl) = 1,33 (NS)		

$\chi^2$ H (1 gl) = 1,45 (NS) <sup>†</sup>		
--	--	--

E1 (3:1)	WT	M
O	42	16
E (3:1)	43,5	14,5
$\chi^2$ DA (1 gl) = 0,21 (NS)		

Lo que pudimos comprobar en los ensayos realizados *in vitro* fue que las plántulas de fenotipo mutante se podían identificar claramente. También observamos que el colapso de las plantas mutante no se debía a un problema relacionado con el desarrollo de la raíz ya que las plantas mutantes desarrollaban un sistema radicular aparentemente normal (figura 65).

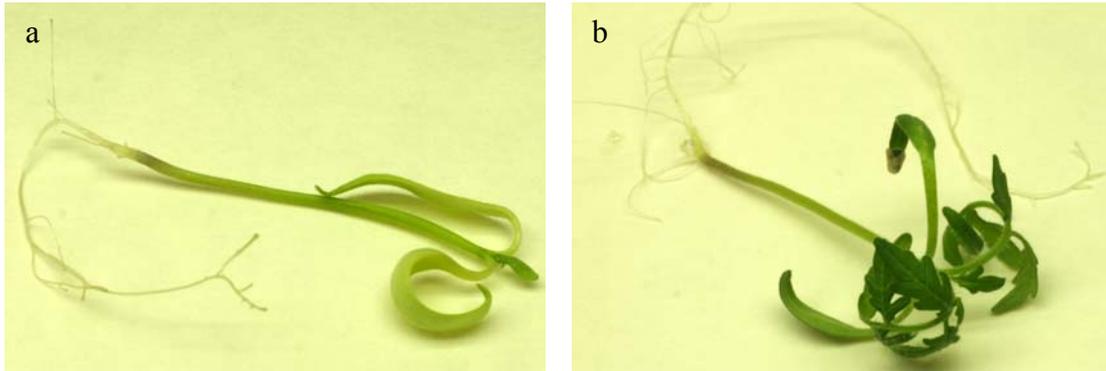
\* MG es el medio que habitualmente empleamos en el laboratorio para la germinación de las semillas.

IAA es el medio que empleamos en tomate para el enraizamiento de las plantas.

IAA + Kan es el medio que empleamos en tomate para verificar si los brotes individualizados expresan el gen *nptII* (es decir, si son transgénicos) Para ello, el medio se suplementa con 100 mg/l de kanamicina.

La composición de los medios se puede consultar en el apartado correspondiente de Material y Métodos

<sup>†</sup> La  $\chi^2$  de homogeneidad se realiza con los datos de las segregaciones de los dos ensayos (ensayo 1 y ensayo 2).



**Figura 65.** Detalle del crecimiento y sistema radicular de una planta de fenotipo mutante (a) y una planta de fenotipo silvestre (b) en condiciones de cultivo *in vitro*.

El experimento en el que las semillas TG2 se sembraron en el medio selectivo (IAA + kan) se realizó para comprobar si las plántulas de fenotipo mutante exhibían resistencia a la kanamicina. Como el análisis genético indica que se trata de un mutante recesivo, si la mutación era insercional el fenotipo aparecería en plantas homocigóticas para el T-DNA (1/4 de semillas mutantes). Por consiguiente, todas las plántulas de fenotipo mutante debían ser resistentes a la kanamicina.

En la tabla 27 se puede ver el número de plantas de fenotipo silvestre y mutante sensibles y resistentes a la kanamicina. Como puede verse, entre 10 las plantas WT, hay 7 Kan<sup>R</sup> y 3 Kan<sup>S</sup>. Esto es fácil de explicar asumiendo que las Kan<sup>S</sup> son acigóticas y las Kan<sup>R</sup> son hemicigóticas para el inserto. El problema es que entre las 6 plantas de fenotipo mutante, hay 4 Kan<sup>R</sup> y 2 que colapsaron rápidamente por lo que no queda claro si son Kan<sup>R</sup> o Kan<sup>S</sup>.

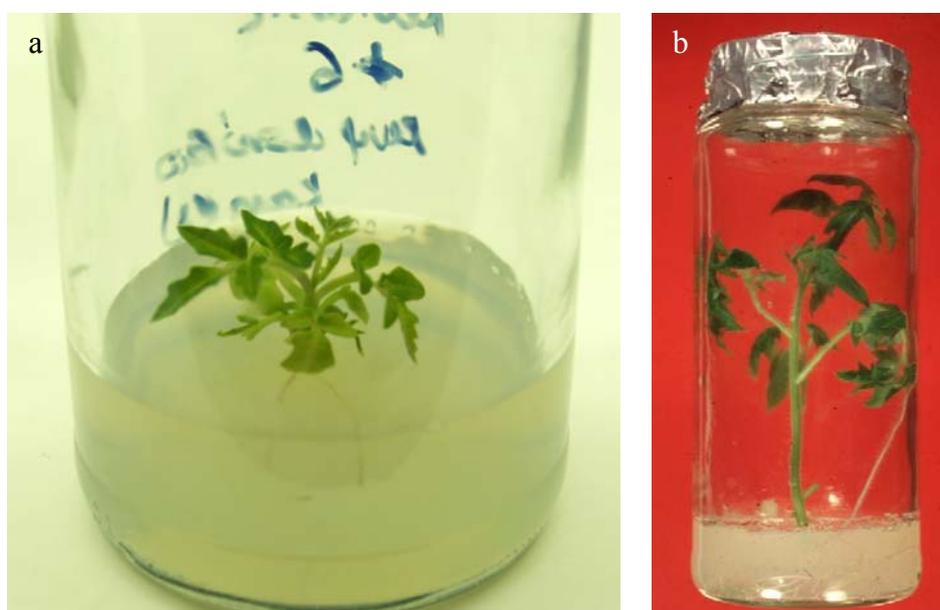
**Tabla 27.** Experimento de segregación en el medio selectivo. Plántulas resistentes y sensibles a la kanamicina.

IAA + kan						
EI (3:1)	WT			M		
O	10	kan <sup>R</sup>	7	6	kan <sup>R</sup>	4
E (3:1)		kan <sup>S</sup>	3		kan <sup>S</sup>	2?

El resultado del experimento no permite llegar a ninguna conclusión porque, para distinguir entre plántulas Kan<sup>R</sup> y Kan<sup>S</sup> en medio selectivo, hace falta que ambas sean capaces de crecer normalmente en medio no selectivo. Nosotros pensábamos que, al realizar la incubación *in vitro*, las plantas de fenotipo mutante sobrevivirían en medios no selectivos (MG o IAA). Por desgracia, algunas de las plantas mutantes (aunque no todas) también colapsaban *in vitro* en medios sin presión de selección (tanto en MG como en

IAA). En definitiva, no podemos saber si las plantas que murieron en el medio selectivo (IAA + kan) lo hicieron porque eran sensibles a la kanamicina o porque colapsaron por cualquier razón, igual que ocurre con alguna de las plantas mutantes cultivadas en medio no selectivo. El experimento revela simplemente las dificultades que encontramos a veces para hacer análisis de co-segregación fenotipo-resistencia a la kanamicina.

Aunque algunas morían, otras plantas de fenotipo mutante siguieron creciendo tras cultivar los ápices meristemáticos en medio IAA, aunque, eso sí, exhibían un crecimiento muy lento (figura 66). Del total de plantas de fenotipo mutante que se identificaron en el segundo ensayo *in vitro* (11 en total), sólo 2 continuaron creciendo en condiciones de cultivo *in vitro*; el resto murió.



**Figura 66.** Detalle del crecimiento de una planta de fenotipo *seedling lethal* (a) y una planta de fenotipo silvestre (b) en condiciones de cultivo *in vitro*.

En lo que respecta a la homogeneidad de las segregaciones observadas en los ensayos *in vivo* e *in vitro* (tabla 28), los resultados del análisis indican que:

- 1) No hay motivo para dudar de que la segregación fenotípica *in vitro* e *in vivo* es acorde con una distribución 3 WT : 1 M.
- 2) No hay ningún indicio de subletalidad o letalidad a nivel gamético, zigótico o durante el desarrollo embrional que origine una distorsión en la frecuencia de semillas que van a dar plantas de fenotipo mutante.

- 3) La letalidad asociada al fenotipo mutante se produce *a posteriori* (i.e. tras la germinación y aparición de los cotiledones en las plántulas)

**Tabla 28.** Análisis de homogeneidad entre las segregaciones observadas *in vivo* e *in vitro* y análisis  $\chi^2$  de los datos acumulados.

Ensayos <i>in vivo</i>			Ensayos <i>in vitro</i>		
	WT	M		WT	M
O	35	16	O	42	16
E (3:1)	38,25	12,75	E (3:1)	43,5	14,5
$\chi^2$ (1 gl) = 1,10 (NS)			$\chi^2$ (1 gl) = 0,21 (NS)		

$\chi^2$ H (1 gl) = 0,21 (NS)		
-------------------------------	--	--

E1 (3:1)	WT	M
O	77	32
E (3:1)	81,75	27,25
$\chi^2$ DA (1 gl) = 1,10 (NS)		

Análisis de expresión del delator: En la TG1 se había detectado la expresión del delator en los estambres y el estilo de la flor, así como en partes del pericarpio del fruto y una expresión muy intensa en los embriones de semillas maduras.

Por lo que respecta a la TG2, en algunas plántulas WT se detectó expresión en algunas estructuras vegetativas (cotiledones o hipocotilo). En los análisis efectuados en plántulas mutantes no detectamos expresión del delator, pero esto quizá fuera debido a que en esta fase la plántula ya ha iniciado el proceso que conduce a la muerte en pocos días.

Como las plántulas mutantes morían antes de que desarrollaran hojas verdaderas y se había detectado la expresión del delator en los embriones de los frutos de la TG1 original, decidimos evaluar la expresión del delator en embriones de semillas inmaduras y maduras de frutos procedentes de réplicas clonales de la TG1 (es decir, se trata de embriones y semillas de lo que va a ser la TG2) o de plantas TG2 supuestamente hemicigóticas (cuya TG3 es equivalente a una TG2).

Los embriones inmaduros procedían de un fruto verde de 3 cm de la planta TG2-9 (supuestamente hemicigótica) del que se extrajeron todas las semillas inmaduras. Estos embriones inmaduros se incubaron en el sustrato (X-Gluc) durante el periodo preestablecido (24 horas a 37°C).

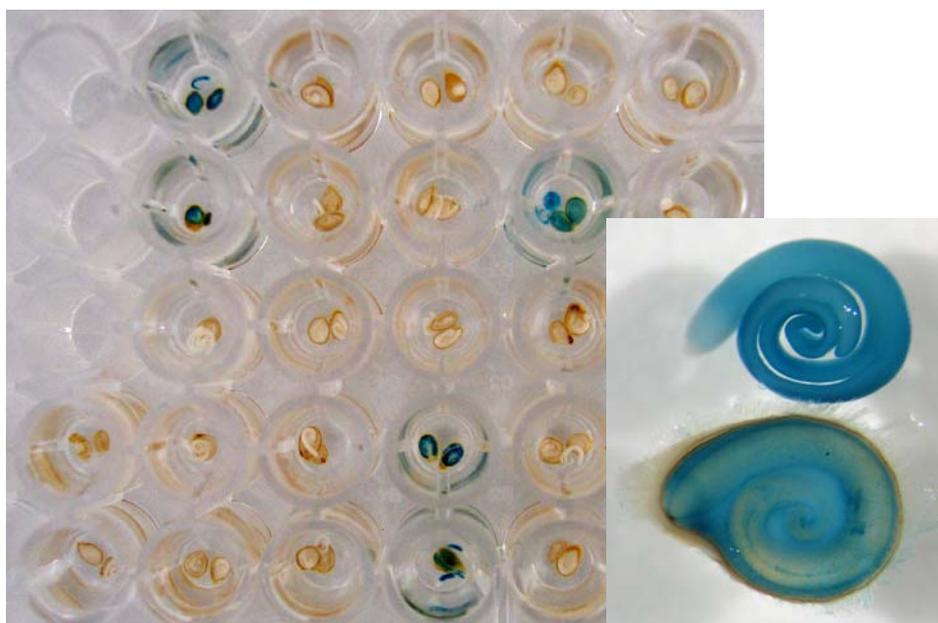
Las semillas maduras, tomadas de forma aleatoria de diferentes frutos, se embebían en agua para reblandecer la testa de la semilla y, a continuación, se les practicaba un corte longitudinal para permitir el contacto del sustrato con el embrión durante el periodo de incubación establecido (figura 67). Se realizaron dos ensayos con diferentes lotes de semillas maduras: el primero (ensayo 1) procedía de la TG2-9 (supuestamente hemicigótica) y el segundo (ensayo 2) del lote obtenido de semillas procedente de la TG1 original. Los resultados se pueden ver en la tabla 29.

**Tabla 29.** Expresión del delator en embriones inmaduros y embriones de semillas maduras.

Embriones inmaduros		
CH (3:1)	GUS +	GUS -
O	65	31
E (3:1)	72	24
$\chi^2$ (1 gl) = 2,72 (NS)		

Embriones maduros (ensayo 1)		
CH (3:1)	GUS +	GUS -
O	25	23
E (3:1)	36	12
$\chi^2$ (1 gl) = 13,44 (**)		

Embriones maduros (ensayo 2)		
CH (3:1)	GUS +	GUS -
O	6	21
E (3:1)	20,25	6,75
$\chi^2$ M4 (1 gl) = 40,11 (**)		



**Figura 67.** Detalle de la expresión del delator en embriones de semillas maduras.

La segregación esperada 3 GUS + (que, en teoría, incluirían los embriones homocigóticos para la inserción y hemicigóticos): 1 GUS – (los embriones acigóticos) se cumple en embriones inmaduros pero no en embriones maduros (tabla 29).

La distorsión de la segregación en estos últimos podría deberse a un problema de subletalidad (en los embriones que portan el inserto en homocigosis o hemicigosis), pero no parece que ésta sea la causa porque los análisis de segregación fenotípica (WT : mutantes) no revelan ningún problema de subletalidad a nivel del embrión. El fenotipo mutante es letal, pero la letalidad aparece *a posteriori*, es decir tras la germinación de las semillas.

Una hipótesis alternativa es que haya un silenciamiento del gen delator en la fase de semillas maduras, pero no en la de semillas inmaduras (puesto que en esta etapa no se observa una distorsión de la segregación). De ser así, lo lógico es que el silenciamiento se produjera como consecuencia de un efecto de dosis y, por tanto, ocurriera en los embriones homocigóticos para la inserción del T-DNA. Bajo este supuesto, los embriones homocigóticos (que van a dar el fenotipo mutante) no tendrían expresión del delator, a diferencia de los hemicigóticos (con fenotipo WT) que sí tendrían expresión del delator. Los datos del ensayo 1 se ajustan perfectamente a esta hipótesis (ya que la segregación esperada sería  $\frac{1}{2}$  GUS + :  $\frac{1}{2}$  GUS -), pero los del ensayo 2 no se ajustan en absoluto.

Hay otras tres hipótesis alternativas: cambios en la expresión del gen etiquetado debido a efectos ambientales (lo que explicaría las diferencias observadas en los ensayos 1 y 2 con embriones maduros, pero no los diferentes resultados obtenidos con embriones inmaduros y maduros), la ausencia de co-segregación fenotipo – GUS, o, simplemente fallos en el ensayo histoquímico con embriones maduros.

Desde luego puede que no haya co-segregación fenotipo – GUS (en cuyo caso la expresión del delator en embriones no tendría nada que ver con la letalidad a nivel de plántula), pero no se puede excluir algún fallo en el ensayo histoquímico con embriones maduros. Por un lado, el ensayo con embriones inmaduros se ajusta perfectamente a la hipótesis de partida (lo que apunta a la existencia de co-segregación GUS – fenotipo), y además este ensayo se realizó con una muestra relativamente grande (96 embriones inmaduros). Por otro lado, puede que la expresión del delator en embriones no tenga nada que ver con la letalidad a nivel de plántula, pero el hecho de que la expresión del delator se produzca precisamente en la etapa de desarrollo embrional llama poderosamente la

atención y sugiere que el gen mutado podría desempeñar una función importante en los estadios embrionarios. Convendría añadir que los ensayos efectuados con embriones maduros se han llevado a cabo con muestras relativamente pequeñas (48 y 27 semillas, respectivamente).

En definitiva, antes de llegar a cualquier conclusión, hace falta un análisis más exhaustivo en la etapa de embrión inmaduro y, sobre todo, maduro.

### 3.3. Mutantes alterados en el desarrollo reproductivo

#### 3.3.1. Mutantes con efectos dominantes, semidominantes o aditivos

##### 3.3.1.a. Mutantes de la colección de plantas transgénicas con construcciones convencionales

Se caracterizaron 262 plantas transgénicas diploides y se detectaron 26 mutantes con alteraciones en el desarrollo reproductivo. Los mutantes de mayor relevancia se describen a continuación.

##### **pat 76 (código 76b Cf)**

Este mutante procede de una transformación genética realizada con una construcción que porta el gen marcador *nptII* y el gen delator *GFP*.

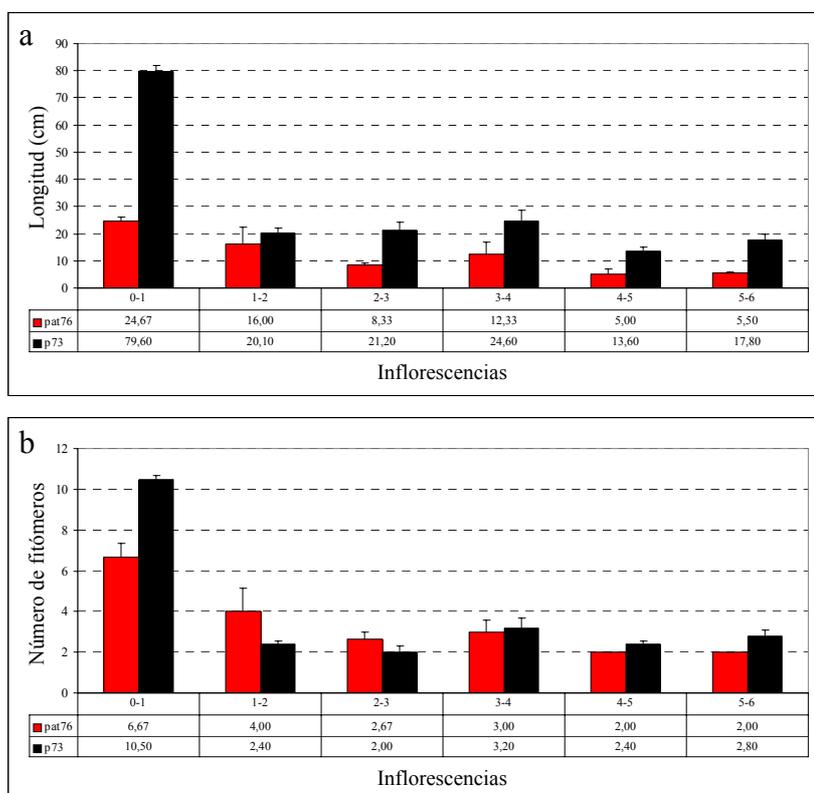
Número de insertos: El análisis Southern efectuado en la UAL indica que la TG1 tiene 2 inserciones del T-DNA

Morfología y color de la hoja: las hojas de *pat 76* eran de menor tamaño que las del testigo. Los folíolos eran también de menor tamaño, mayor grosor, un verde más intenso y una morfología distinta. La longitud de las raquillas es mayor en el mutante (figura 68a).



**Figura 68.** Tamaño, color y morfología de la hoja de *pat 76* (a) respecto a la del testigo (b).

Tamaño y hábito de crecimiento del mutante: el tamaño de *pat 76* fue menor que el de *p73*, probablemente debido a que el ritmo de crecimiento del mutante era más lento.



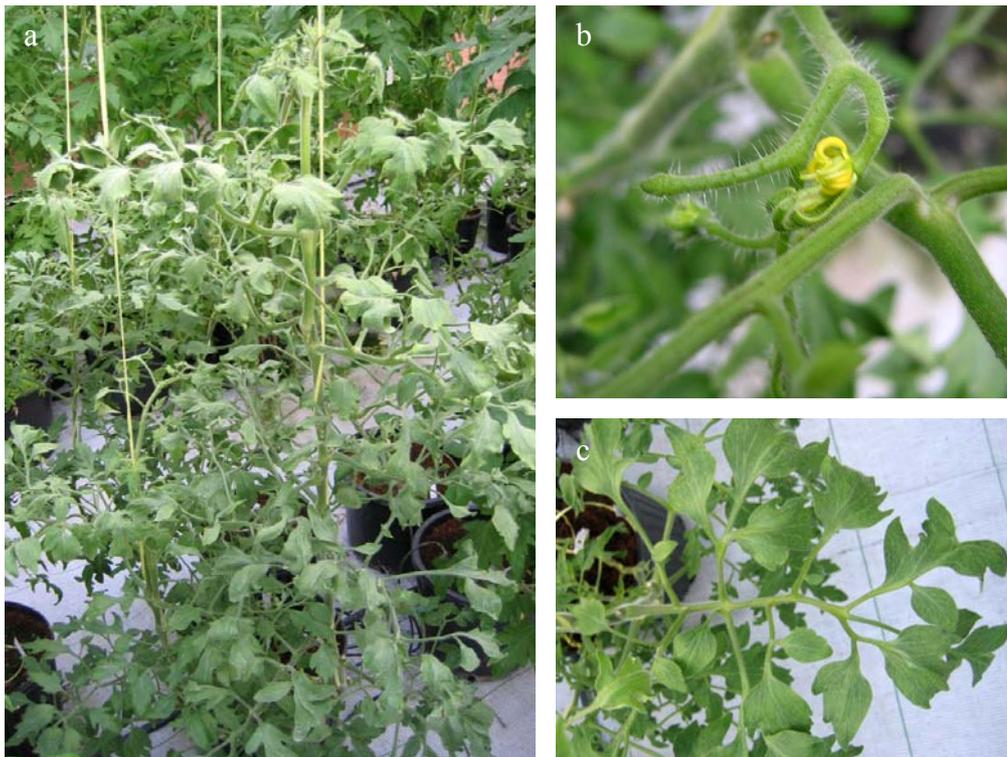
**Figura 69.** Caracteres relacionados con el desarrollo vegetativo de *pat 76*. a) Longitud hasta la primera inflorescencia (0-1) y entre inflorescencias (1-2, 2-3...), b) número de fitómeros hasta la primera inflorescencia (0-1) y entre inflorescencias (1-2, 2-3...).

En el mutante *pat 76*, la longitud hasta la primera inflorescencia fue mucho menor que en *p73*. Entre inflorescencias ocurría algo similar (figura 69a).

Asimismo, el número de fitómeros hasta la primera inflorescencia fue menor en el mutante (figura 69b). Entre las primeras inflorescencias ( $1^a - 2^a$  y  $2^a - 3^a$ ), el número de fitómeros era algo mayor, pero en las restantes fue similar al de *p73*.

Tiempo de floración: *pat 76* exhibió un adelanto de la floración en el espacio (figura 69a y 69b) pero no en el tiempo ya que este mutante mostró un ritmo de crecimiento lento.

Inflorescencia: con relación a la arquitectura de la inflorescencia y el número de flores por inflorescencia no se detectaron diferencias respecto a *p73*. Conviene indicar, no obstante, que en las primeras 3-4 inflorescencias sólo se desarrollaron pseudoflores



**Figura 70.** Aspecto de *pat 76* tras 4 meses de cultivo en el invernadero (a). Detalle de las alteraciones en flores (b) y hojas (c).

Tamaño, morfología y color de la flor: las flores que aparecieron a partir de la cuarta o quinta inflorescencia eran de menor tamaño que las de p73 y además exhibían alteraciones morfológicas. En concreto, se desarrollaban sépalos petaloides, pétalos de pequeño tamaño (figura 70b), en ocasiones ausentes, y cono estaminal no fusionado, con estambres sin polen, de menor tamaño y curvados hacia el ovario. Los estambres, más pequeños y encorvados, dejaban entrever un estilo más pequeño que el de p73 (figura 71). El ovario era, sin embargo, de mayor tamaño que el de las flores de p73.

A diferencia de lo que ocurre en p73, las flores no desarrollaban el mismo número de órganos por verticilo en los tres primeros verticilos. Además, no existía un patrón repetitivo en el número de órganos desarrollados por verticilo entre distintas flores. En definitiva, las flores exhibían importantes alteraciones.



**Figura 71.** Detalle de las flores del mutante *pat 76* (izda.) respecto a las de *p73* (dcha.)

Caracteres relacionados con el fruto: el mutante exhibió un escaso porcentaje de cuajado a lo largo de los primeros estadios de desarrollo, entre otras razones porque las primeras inflorescencias desarrollaron falsas flores (pseudoflores). Los primeros frutos se desarrollaron tras 7-8 meses de cultivo. A partir de ese momento, casi todas las flores cuajaron en frutos completamente partenocárpicos de morfología cordiforme (figura 72). A pesar de los intentos realizados no fue factible obtener el retrocruce con *p73*.



**Figura 72.** Detalle de los frutos del mutante *pat 76*. a) frutos de la cosecha de primavera de 2004 y b) frutos de la cosecha de primavera de 2006.

### ***small seedles tomato (código 79b Tm)***

Este variante procede de una transformación genética realizada con una construcción que porta el gen marcador *nptII* y el gen delator *GFP*.

Morfología y color de la hoja: las hojas de *small seedles tomato* eran de un tamaño un poco menor que las del testigo. Los folíolos eran de similar longitud aunque más estrechos y con lóbulos más pronunciados. El verde de la hoja era de un tono más claro (figura 73).

Tamaño y hábito de crecimiento del mutante: el mutante mostró un ritmo de crecimiento lento, pero su arquitectura era similar a la de p73. No se encontraron diferencias respecto a p73 en lo que se refiere al número y longitud de fitómeros hasta la primera inflorescencia y entre inflorescencias (datos no mostrados).

Tiempo de floración: el mutante exhibió un retraso de la floración en el tiempo debido a su ritmo de crecimiento, más lento que el de p73.

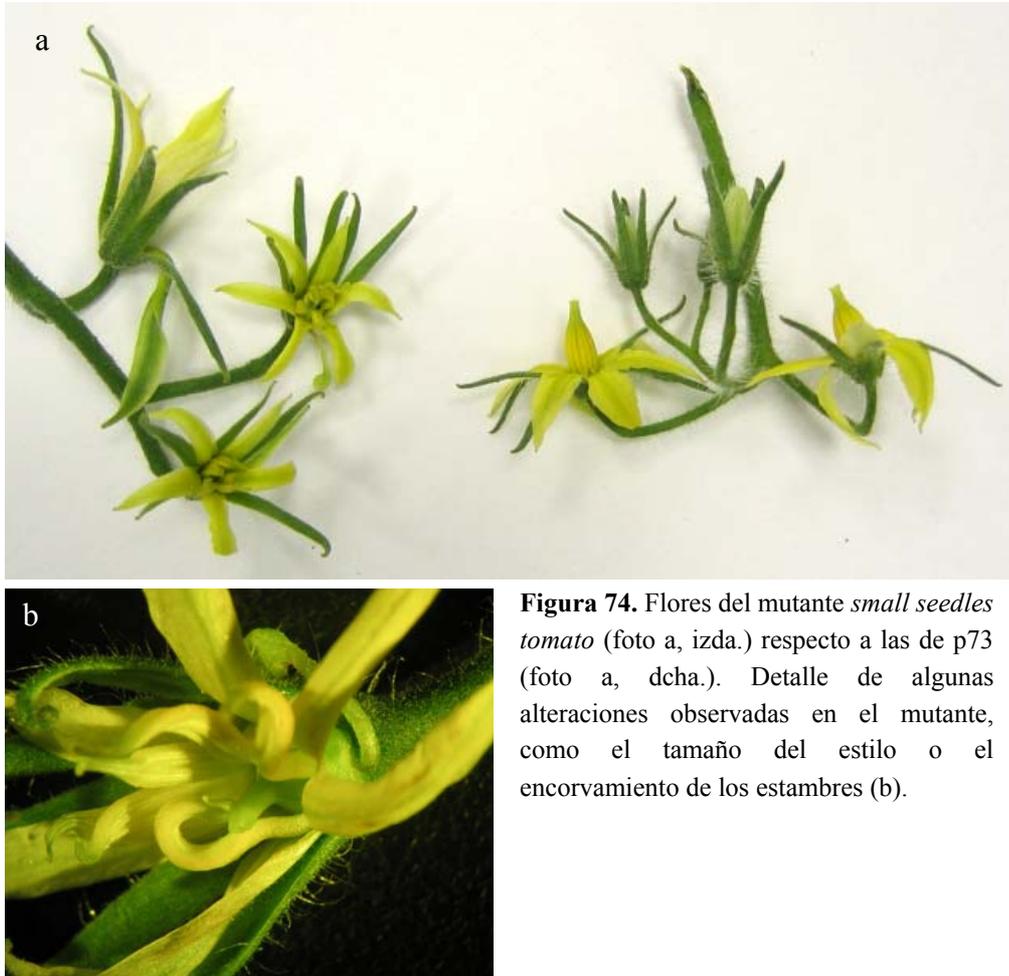


**Figura 73.** Tamaño, color y morfología de la hoja de *small seedles tomato* (izda.) respecto a la del testigo (dcha.).

Inflorescencia: tanto la arquitectura de la inflorescencia como el número de flores por inflorescencia eran similares a los de p73.

Tamaño, morfología y color de la flor: aunque de tamaño similar a la de p73, la flor exhibía importantes alteraciones morfológicas. Los sépalos, en ocasiones de naturaleza petaloide, eran de mayor longitud, los pétalos tenían una longitud similar pero eran más estrechos, el cono estaminal no estaba fusionado y los estambres carecían de polen, eran de menor tamaño y estaban curvados hacia el ovario. El tamaño de los estambres y su

encorvamiento dejaban entrever un estilo de menor longitud que el de p73 (figura 74). El ovario era aparentemente similar al de p73.



**Figura 74.** Flores del mutante *small seedles* tomato (foto a, izda.) respecto a las de p73 (foto a, dcha.). Detalle de algunas alteraciones observadas en el mutante, como el tamaño del estilo o el encorvamiento de los estambres (b).

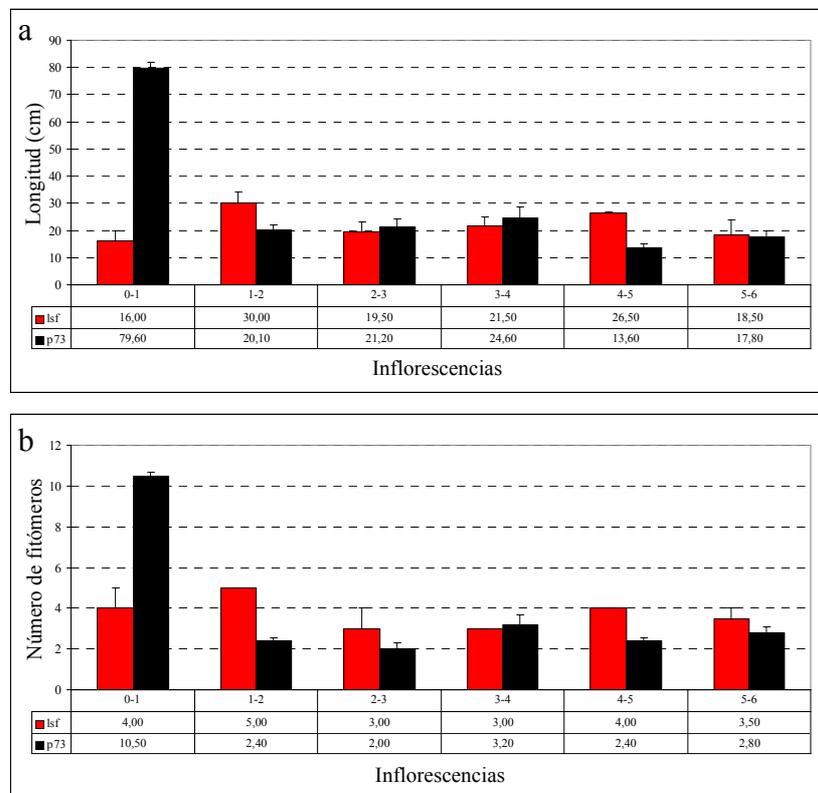
Caracteres relacionados con el fruto: el mutante desarrolló frutos pequeños y de tipo partenocárpico durante la primera cosecha. En la siguiente cosecha se volvió a cultivar el mutante (exhibía las mismas alteraciones fenotípicas en hojas y flores) pero no se obtuvieron frutos de las primeras inflorescencias. No obstante las plantas envejecidas cuajaron frutos (con semilla) similares a los de las plantas testigo. La descendencia aún no se ha evaluado.

***long shoot and flower* (código 134f P4)**

Este mutante procede de una transformación genética realizada con una construcción que porta el gen marcador *nptII* y el gen delator *Uida*.

Morfología y color de la hoja: las hojas del mutante eran similares a las de p73.

Tamaño y hábito de crecimiento del mutante: el mutante exhibía un porte débil. La longitud y el número de fitómeros hasta la primera inflorescencia fue menor que en p73 (figuras 75a y 75b). Entre inflorescencias ocurría lo contrario, y tanto la longitud como el número de fitómeros fueron mayores.



**Figura 75.** Caracteres relacionados con el desarrollo vegetativo de *long shoot and flower* a) Longitud hasta la primera inflorescencia (0-1) y entre inflorescencias (1-2, 2-3...), b) número de fitómeros hasta la primera inflorescencia (0-1) y entre inflorescencias (1-2, 2-3...).

Tiempo de floración: *long shoot and flower* exhibió un adelanto de la floración en el espacio (figuras 75a y 75b) pero no en el tiempo debido a su lento ritmo de crecimiento.

Inflorescencia: la arquitectura fue similar a la de p73 pero el mutante tenía menor número de flores por inflorescencia (el número de flores por inflorescencia en *long shoot and flower* era  $4,9 \pm 0,3$  mientras que en p73 es  $7,1 \pm 0,3$  cm).

Tamaño, morfología y color de la flor: los sépalos y el cono estaminal tenían un tamaño similar al de p73. Los pétalos, sin embargo, duplicaban en longitud a los de p73. El pistilo se caracterizó por un ovario de gran tamaño y un estilo de menor longitud. Debido al tamaño del ovario, el cono estaminal no estaba completamente fusionado en la base (figura 76). El número de órganos por verticilo era mayor en algunas flores del mutante.



**Figura 76.** Flores del mutante *long shoot and flower* (foto a, izda.) respecto a las de p73 (foto a, dcha.). Inflorescencia del mutante durante su cultivo en el invernadero (b).

Caracteres relacionados con el fruto: el mutante desarrolló pocos frutos de tipo partenocárpico. Los retrocruces generaron semillas vanas.

***Otros mutantes de la colección de plantas transgénicas con construcciones estándar***

De forma muy resumida, en la tabla 30 se pueden ver otros mutantes que se detectaron en la colección de líneas T-DNA con construcciones estándar.

**Tabla 30.** Otros fenotipos variantes para caracteres reproductivos detectados en TG1

Genotipos	Fenotipos observados
26a P8 y 69a P4	Alteraciones relacionadas con el desarrollo de la flor: sépalos petaloideos, cono estaminal no fusionado, flores con mayor número de órganos por verticilo.
52b Tm	Alteraciones relacionadas con el desarrollo de la flor: flores de mayor tamaño y con mayor número de órganos por verticilo. Cono estaminal no fusionado
11a Tm, 10a P8, 85a P8, 65b P8, 3c P2, 5b P6, 22a P6, 6d P4, 44b P4, 85a P4 y 86a P4	Alteraciones relacionadas con la formación del fruto: esterilidad masculina y/o femenina (no cuajó ningún fruto)
52b P8 y 20a P4	Alteraciones relacionadas con la formación del fruto: cuajado de muy pocos frutos.
81a P8, 22b P9 y 45a P4	Alteraciones relacionadas con la formación del fruto: cuajado de frutos pequeños sin semilla en plantas envejecidas.
6a P3 y 15a P9	Alteraciones relacionadas con la formación del fruto: cuajado de frutos pequeños con poca semilla en plantas envejecidas.
103c P4	Alteraciones relacionadas con el desarrollo de la semilla: cuajado de frutos con muy poca semilla.
Early flowering (101a P4)	Alteraciones relacionadas con el desarrollo de la semilla: cuajado de frutos con un porcentaje considerable de semilla oscura.

### 3.3.1.b. Mutantes de la colección de plantas transgénicas con la trampa de intensificadores

Se caracterizaron 948 plantas transgénicas diploides y se detectaron 67 genotipos afectados en caracteres relacionados con el desarrollo reproductivo. Los mutantes de mayor relevancia se describen a continuación.

#### 282 ET73

Número de insertos: El análisis Southern efectuado en la UAL indica que la TG1 tiene una sola inserción.

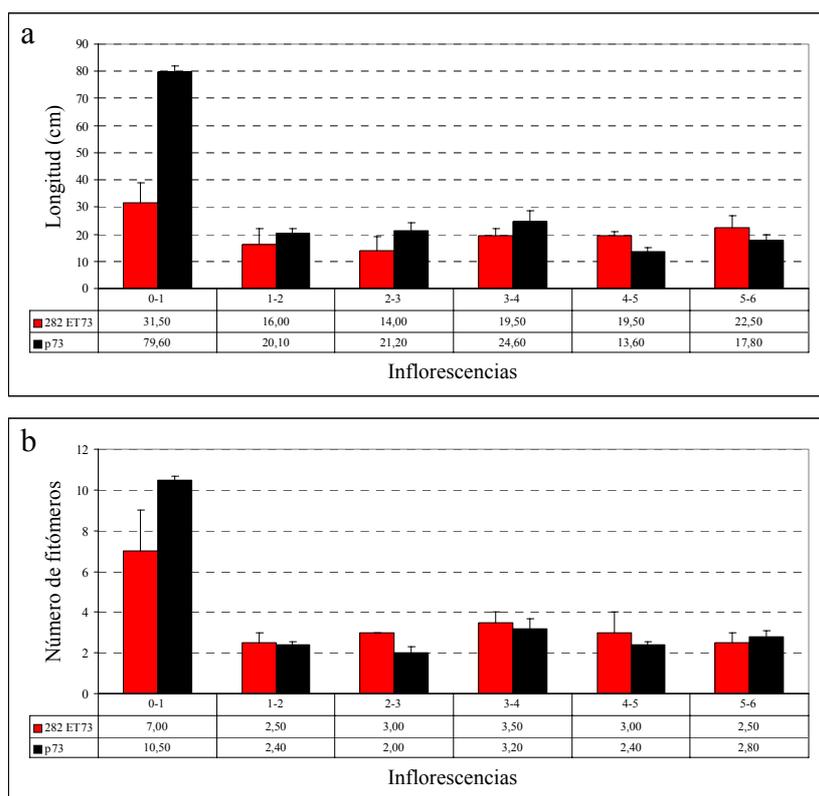
Morfología y color de la hoja: las hojas y folíolos del mutante eran de menor tamaño y de un tono verde más claro que los de p73 (figura 77).



**Figura 77.** Tamaño, color y morfología de la hoja del mutante 282 ET73 (a) respecto a la del testigo (b).

Tamaño y hábito de crecimiento del mutante: el mutante exhibió un porte débil. La longitud hasta la primera inflorescencia fue menor que en p73. Entre inflorescencias, la longitud fue similar a la de p73 (figura 78a).

El número de fitómeros hasta la primera inflorescencia fue también menor en el mutante. Entre inflorescencias, el número de fitómeros fue similar al de p73 (figura 78b).



**Figura 78.** Caracteres relacionados con el desarrollo vegetativo de 282 ET73. a) Longitud hasta la primera inflorescencia (0-1) y entre inflorescencias (1-2, 2-3...), b) número de fitómeros hasta la primera inflorescencia (0-1) y entre inflorescencias (1-2, 2-3...).

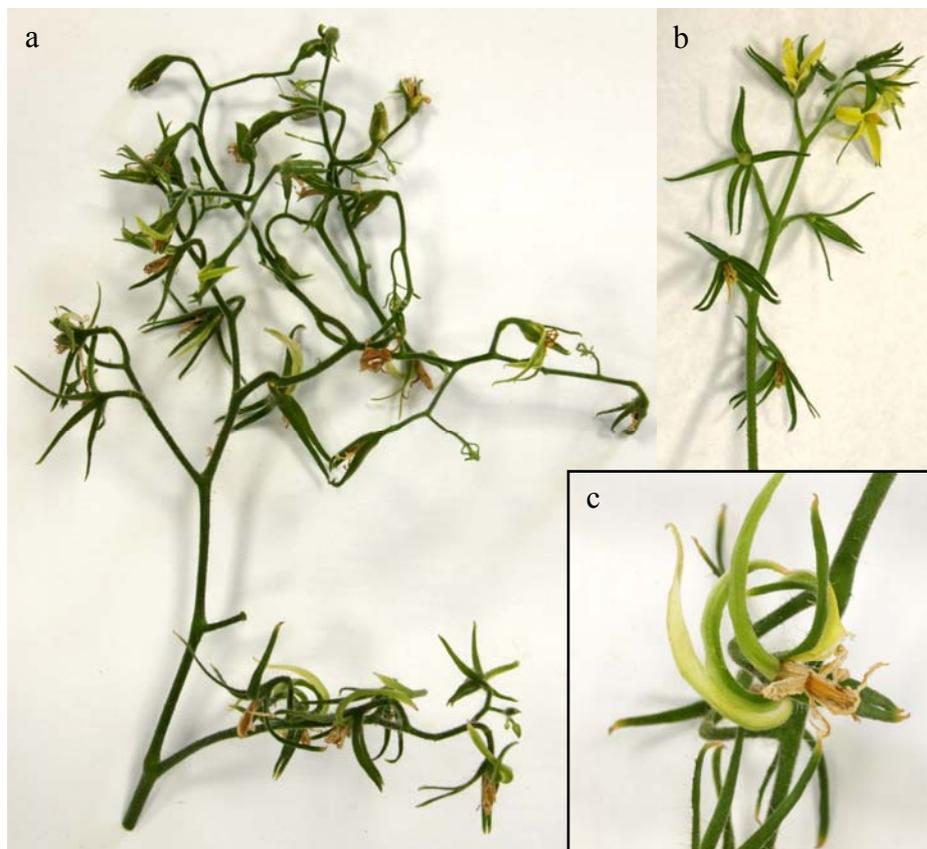
Tiempo de floración: el mutante exhibió un adelanto de la floración en el espacio (figura 78a y 78b) pero no en el tiempo ya que, además de un porte débil, tenía un ritmo de crecimiento lento.

Flores. Aunque de tamaño similar a las de p73, las flores del mutante exhibían importantes alteraciones morfológicas. Se desarrollaban sépalos petaloides de gran longitud (figura 79c), los pétalos eran más estrechos y el cono estaminal, con estambres aparentemente sin polen, no se encontraba fusionado. A diferencia de lo que ocurre en p73, las flores no desarrollaban el mismo número de órganos por verticilo en los tres primeros verticilos. En general, las flores del mutante tenían 6 sépalos, 4 pétalos y 7 estambres.

Inflorescencias y frutos. La arquitectura de la inflorescencia así como el tipo y origen de los frutos dependían del estado ontogénico de la planta (posición de la inflorescencia en la planta y edad de la misma) y de las condiciones ambientales. La existencia de efectos ambientales sobre el desarrollo se pudo analizar ya que se hicieron dos ciclos de cultivo con distintas réplicas clonales de la TG1. En el primer ciclo las plantas se cultivaron en el

invernadero de la ETSIA durante más de 6 meses (periodo invierno 2005- verano 2006) y en el segundo las plantas se cultivaron tanto en el invernadero del IBMCP durante 6 meses (periodo otoño – invierno 2006) como en el de la ETSIA durante 8 – 9 meses (periodo invierno – verano 2007).

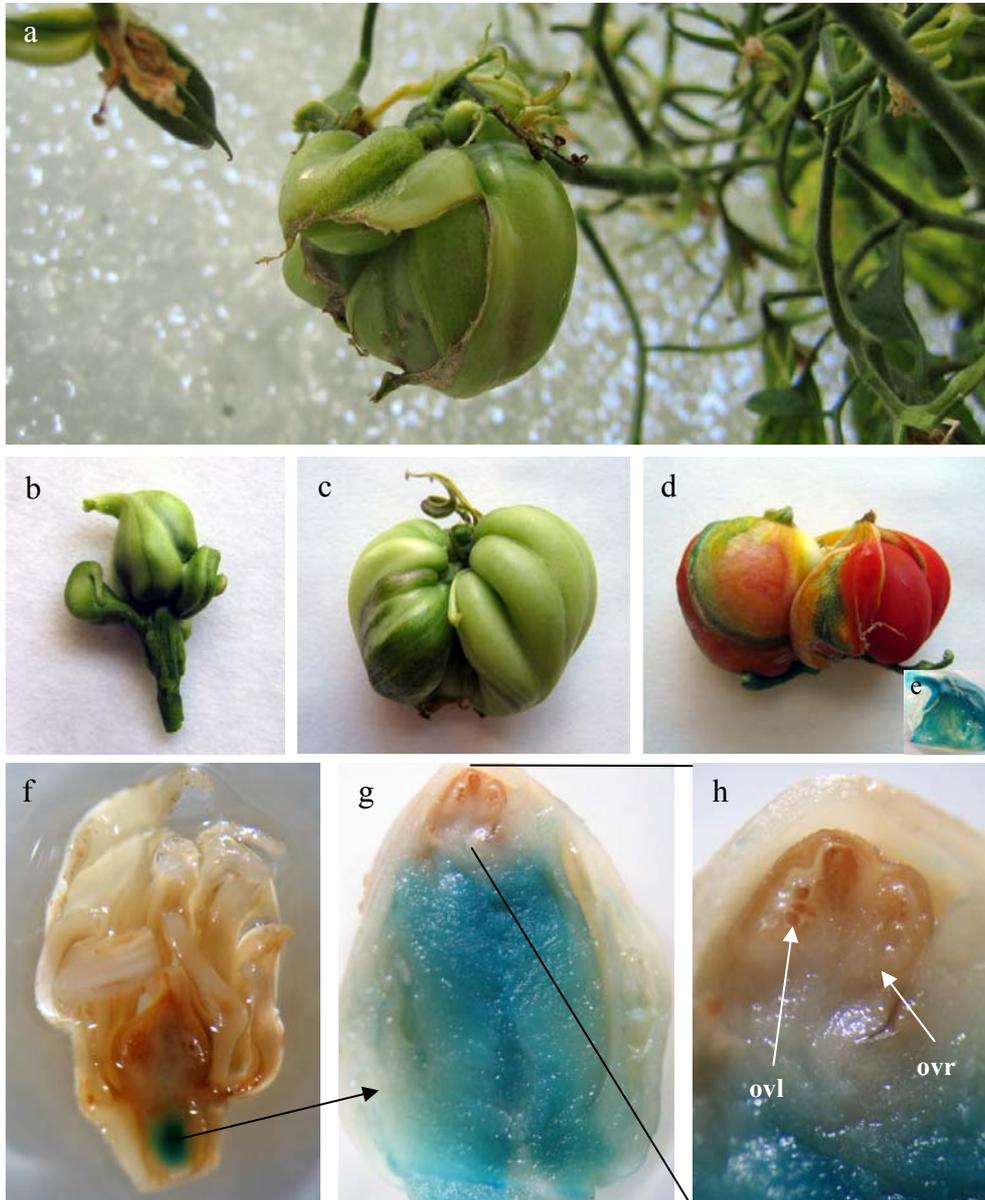
Por lo que respecta a las cuatro primeras inflorescencias, la arquitectura y el número de flores por inflorescencia fueron similares a los de p73. En cambio, a partir de la quinta inflorescencia el número de flores era mucho mayor. En algún caso concreto se llegaron a contabilizar hasta 30 flores en una inflorescencia, y en todos los casos, el número de flores superaba la docena (figura 79a).



**Figura 79.** Inflorescencias del mutante 282 ET73 (a) y de p73 (b). Detalle de una de las flores mutantes (c).

En estas primeras inflorescencias no se observó cuajado de frutos. Sin embargo, a los 6 meses de cultivo en el invernadero de la ETSIA (primer ciclo de cultivo) las plantas se cambiaron a una cabina aneja al invernadero y, a partir de ese momento, empezaron a aparecer frutos partenocárpicos de morfología aberrante (figuras 80a, 80b, 80c y 80d). Para nuestra sorpresa, lo que observamos al analizar frutos recién cuajados en la lupa fue que estos frutos no se formaban a partir del ovario, sino como consecuencia del engrosamiento

de la zona de unión de la flor con el pedicelo (justo en la zona en la que, como se describirá más adelante, se detectó la expresión del delator en flores). En efecto, en frutos verdes de pequeño calibre (recién cuajados) quedaban resquicios del ovario en el que incluso se podían apreciar los óvulos (figuras 80g y 80h).



**Figura 80.** Cuajado de los primeros frutos en el invernadero (a) y detalle de la morfología de los frutos en diferentes estadios de desarrollo (b, c y d). Expresión del delator en fruto (e). Expresión del delator en flor en estadio de antesis (f) y en fruto recién cuajado. Detalle de un ovario intacto en la parte superior del fruto (g y h).  
ovr: ovario, ovl: óvulos.

En el segundo ciclo de cultivo, en plantas de más de seis meses (tanto en el invernadero de la ETSIA como en el IBMCP) aparecieron frutos completamente diferentes a los anteriores. Estos frutos eran de pequeño calibre, partenocárpicos y de color

anaranjado, no alcanzando nunca la pigmentación roja (figura 81a y 81b). Cuando las plantas del invernadero de la ETSIA se cambiaron a otro invernadero, al cabo de un tiempo (cuando las plantas tenían 8-9 meses) empezaron a desarrollarse inflorescencias enormes con multitud de flores y hojas (figura 81a) que seguían dando frutos de color anaranjado. En estas inflorescencias se pudo observar el desarrollo de estructuras aberrantes de origen probablemente carpelar (figura 82).



**Figura 81.** Inflorescencias de plantas envejecidas (a). Detalle de uno de los frutos (b) y patrón de tinción GUS de estos frutos (c).

La barra representa 1 cm.



**Figura 82.** Estructuras de origen carpelar que se desarrollaban en zonas meristemáticas de inflorescencias de plantas mantenidas en el invernadero durante un periodo de 7-8 meses

Patrón de expresión del delator. En este mutante se observó expresión del delator en los sépalos, pétalos y estambres de la flor. Es decir, la expresión del delator se localizó en los verticilos de la flor dónde se habían observado diferencias con respecto al WT.

Además, cuando se analizó la expresión del delator en flores de las plantas del primer ciclo que habían dado frutos procedentes de la zona de unión del pedicelo con el ovario se observó que la expresión del delator aparecía precisamente en esta zona (figura 80f). La expresión del delator se mantuvo a lo largo del desarrollo de estos frutos anómalos (figuras 80f, 80g y 80h) así como en frutos totalmente desarrollados (figura 80e).

De forma similar, en las plantas cultivadas durante el segundo ciclo (que daban frutos pequeños, partenocárpicos y de color naranja) el delator se expresaba de forma ubicua en estos frutos (figura 81c). Conviene mencionar que en algunos botones florales de estas plantas también se detectó expresión del delator en la zona de unión del pedicelo con el ovario.

Es decir, en este mutante la expresión del delator parece estar relacionada con el fenotipo de la planta. Así pues, teniendo en cuenta la espectacularidad del fenotipo, la asociación entre las alteraciones fenotípicas del mutante y la expresión delator y, sobre todo, el hecho de que sólo tiene una inserción, parece claro que este mutante es un firme candidato para proceder a la clonación del gen etiquetado por la trampa de intensificadores.

### 630 ET73

Número de insertos: El análisis Southern efectuado en la UAL indica que la TG1 tiene múltiples inserciones.

Morfología y color de la hoja: las hojas y folíolos del mutante eran de menor tamaño y de un tono verde más claro que las de p73 (figura 83).



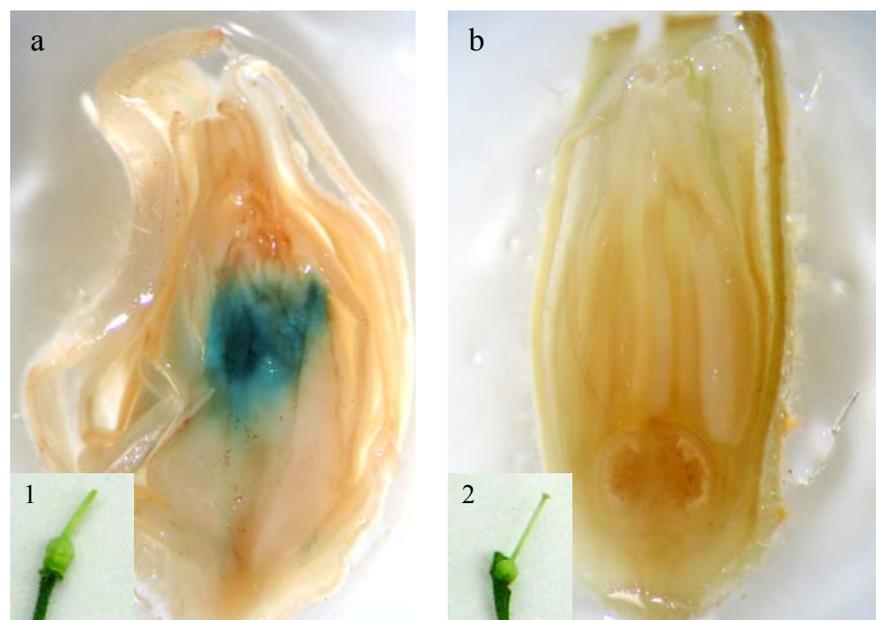
**Figura 83.** Tamaño, color y morfología de la hoja del mutante 630 ET73 (a) respecto a la del testigo (b).

Tamaño y hábito de crecimiento del mutante: el mutante exhibió un porte débil y un ritmo de crecimiento más lento que p73, sin que ello afectara finalmente a su tamaño, que fue similar al de las plantas de fenotipo silvestre. La longitud y número de fitómeros hasta la primera inflorescencia y entre inflorescencias fueron similares en el mutante y en p73.

Tiempo de floración: el mutante exhibió un retraso de la floración en el tiempo debido a su retraso en el crecimiento respecto a p73.

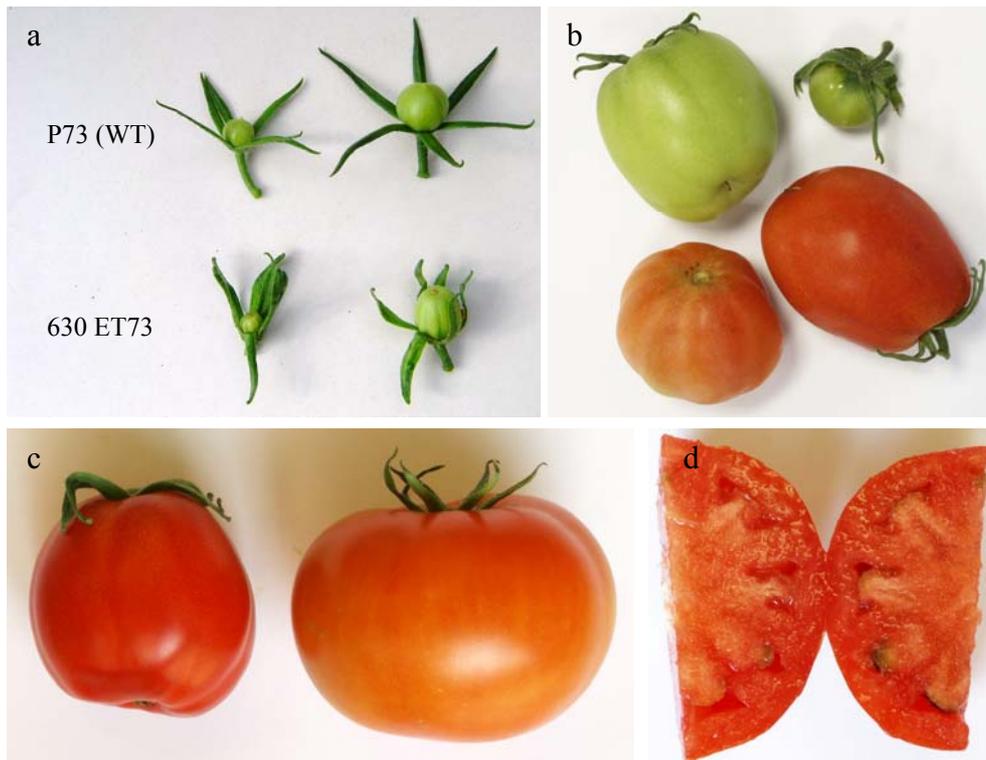
Inflorescencia: no se detectaron diferencias entre el mutante y p73 en lo que respecta a la arquitectura de la inflorescencia y el número de flores por inflorescencia

Tamaño, morfología y color de la flor: la flor, de tamaño similar a la de p73, sólo exhibía alteraciones en el ovario, que ya desde los primeros estadios del desarrollo exhibía una morfología redondo-alargada. Conviene resaltar que el análisis histoquímico del delator reveló la expresión GUS en el ovario (figura 84a).



**Figura 84.** Flor del mutante 630 ET73 y región en la se expresa el delator (a) respecto al testigo (b). Detalle de la morfología del ovario del mutante (1) y del testigo (2).

Caracteres relacionados con el fruto: la forma del fruto en las plantas mutantes era similar a la del ovario, es decir, los frutos son redondo-alargados (figura 85). En algunos frutos se observó el desarrollo ectópico de estructuras anómalas en la zona estilar del fruto. En el mutante cuajaron aproximadamente el mismo número de frutos que en p73.



**Figura 85.** a) Morfología de frutos recién cuajados del mutante y de p73. b) Frutos del mutante en distintos estadios de desarrollo. c) Fruto maduro del mutante (izda.) y de p73 (dcha.). d) Ausencia de semillas en los frutos del mutante.

### 740 ET73

Número de insertos: El análisis Southern efectuado en la UAL indica que la TG1 tiene una sola inserción.

Morfología y color de la hoja: las hojas del mutante eran de menor tamaño y con menor número de folíolos. Lo más notable es que los folíolos del mutante no son compuestos, sino que en cada raquilla sólo se desarrolla un folíolo. Además, los folíolos del mutante carecían de lóbulos (figura 86).



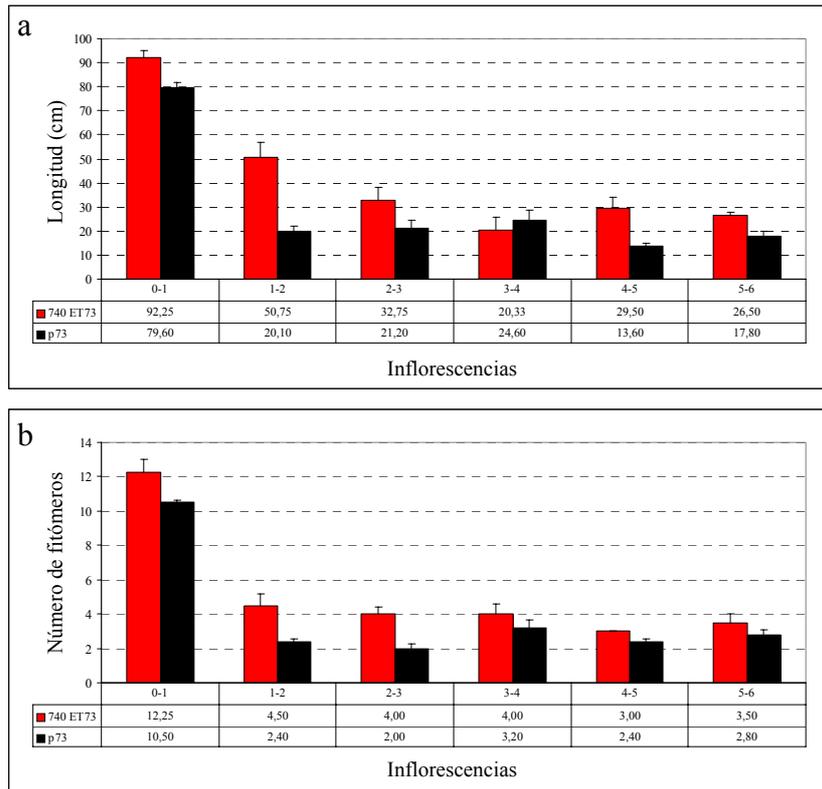
**Figura 86.** Tamaño, color y morfología de la hoja del mutante 740 ET73 (a) respecto a la del testigo (b).

Tamaño y hábito de crecimiento del mutante: La longitud hasta la primera inflorescencia y entre inflorescencias fue mayor que en p73 (figura 87a).

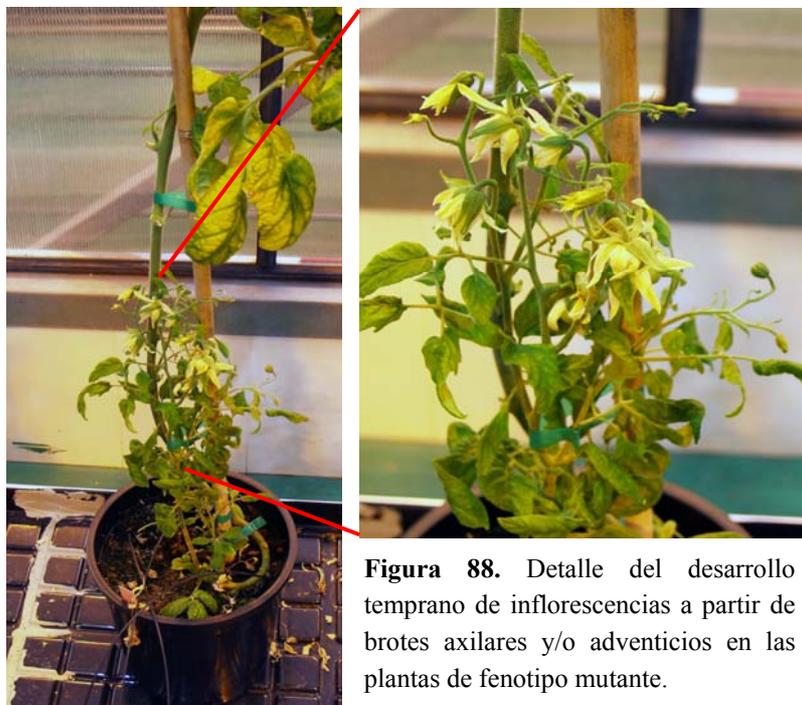
El número de fitómeros hasta la primera inflorescencia fue similar en el mutante y en el testigo. Entre inflorescencias, sin embargo, el mutante desarrolló mayor número de fitómeros (figura 87b). La distancia internodal en el mutante era un poco mayor que en p73.

Tiempo de floración: el mutante exhibió un retraso de la floración a nivel espacio-temporal, ya que, además de que la primera inflorescencia se desarrollaba más tarde a nivel espacial (figura 87b), el ritmo de crecimiento fue muy lento.

No obstante, cuando se desarrollaban brotes adventicios en la base de la planta ocurría un fenómeno curioso en relación con la floración (figura 88). En estas estructuras, las primeras inflorescencias se desarrollaban mucho antes (tras el 3<sup>er</sup> o 4<sup>o</sup> fitómero) que en p73 (11<sup>o</sup> o 12<sup>o</sup> fitómero).

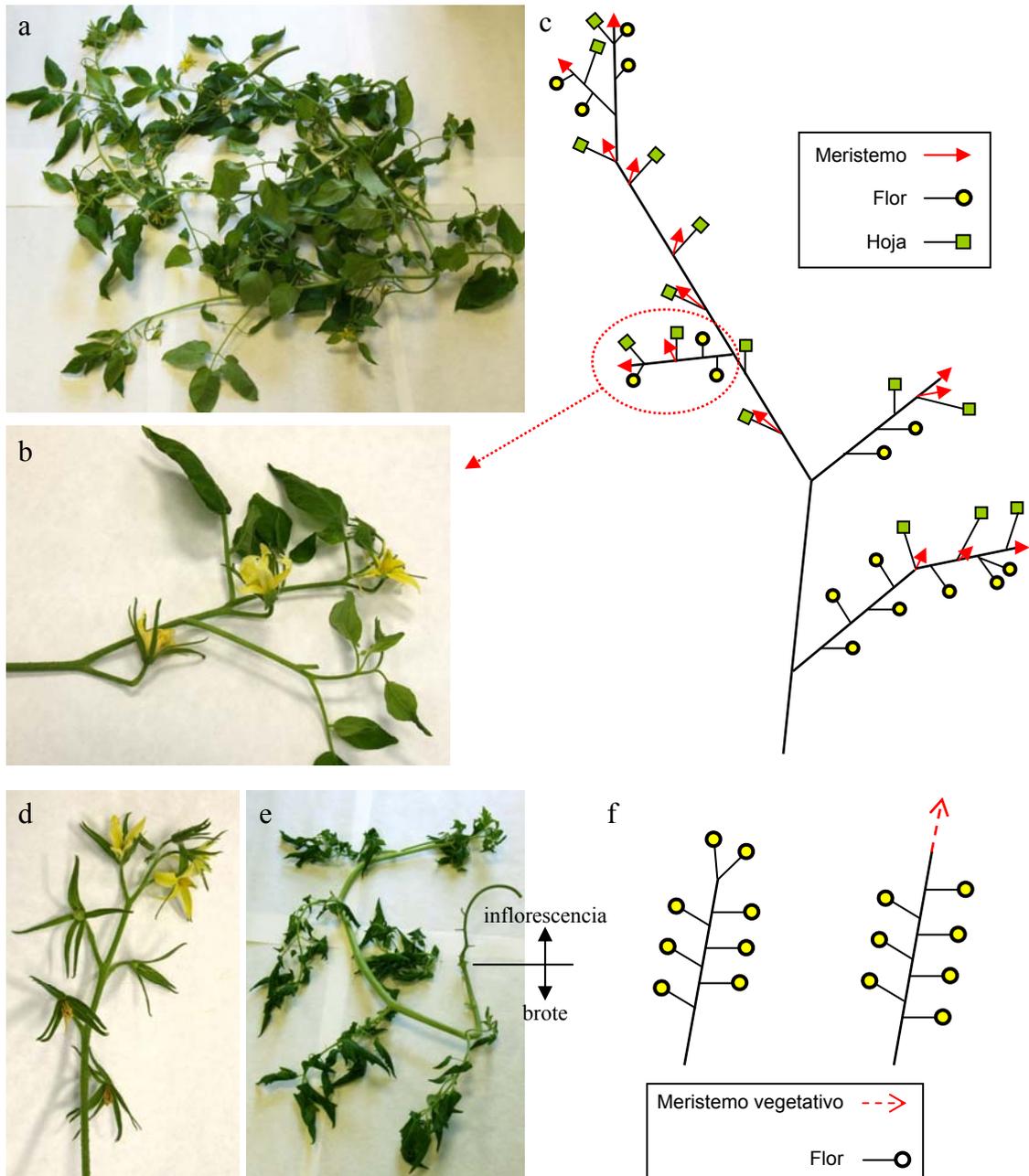


**Figura 87.** Caracteres relacionados con el desarrollo vegetativo de 740 ET73. a) Longitud hasta la primera inflorescencia (0-1) y entre inflorescencias (1-2, 2-3...), b) número de fitómeros hasta la primera inflorescencia (0-1) y entre inflorescencias (1-2, 2-3...).



**Figura 88.** Detalle del desarrollo temprano de inflorescencias a partir de brotes axilares y/o adventicios en las plantas de fenotipo mutante.

**Inflorescencia:** fue una de las partes de la planta en la que más alteraciones se observaron. La inflorescencia del mutante, que no era determinada sino indeterminada, desarrollaba flores, meristemos y hojas. Estos meristemos (que se encontraban en las zonas terminales de la inflorescencia y en las axilas de las hojas) diversifican la inflorescencia dando lugar a nuevas estructuras similares que, de nuevo contenían flores, meristemos y hojas. Además, en plantas envejecidas, se producía una conversión de estos meristemos en estructuras de tipo multicarpelar (ver apartado de fructificación).



**Figura 89.** Inflorescencia del mutante 740 ET73 (a), parte de la inflorescencia (b) y arquitectura de la misma (c). Inflorescencias de p73 determinada (d) e indeterminada (e) y arquitectura (f).

Conviene indicar que p73 desarrolla a veces inflorescencias de tipo indeterminado (figura 89e). En este tipo de inflorescencias se desarrollan brotes en el extremo de la inflorescencia. Estos brotes, similares a los que surgen de las axilas de las hojas (comúnmente denominados chupones), tienen una arquitectura similar a la de una planta, y no se parecen al tipo de indeterminación que ocurría en las inflorescencias de las plantas mutantes (ver esquema 89c).

Tamaño, morfología y color de la flor: de mayor tamaño que la de p73 (figura 90), la flor del mutante tenía mayor número de pétalos y estambres (entre 7 y 12), un estilo de menor longitud y un ovario de mayor calibre.



**Figura 90.** a) flores en tres estadios de desarrollo de una planta mutante (arriba) respecto a flores en los mismos estadios de p73 (abajo). b) dos flores de una inflorescencia mutante, una de ella con un elevado número de órganos por verticilo. c) comparación de una flor mutante (izda) respecto a una de p73 (dcha.).

La barra representa 1 cm.

Caracteres relacionados con el fruto: las flores de las primeras inflorescencias no dieron fruto. Después de 4-5 meses de cultivo en el invernadero, las plantas empezaron a cuajar frutos partenocárpicos, de pequeño calibre, pigmentación anaranjada (una vez alcanzan la madurez) y con una cicatriz en la zona estilar (figuras 91b y 91c).

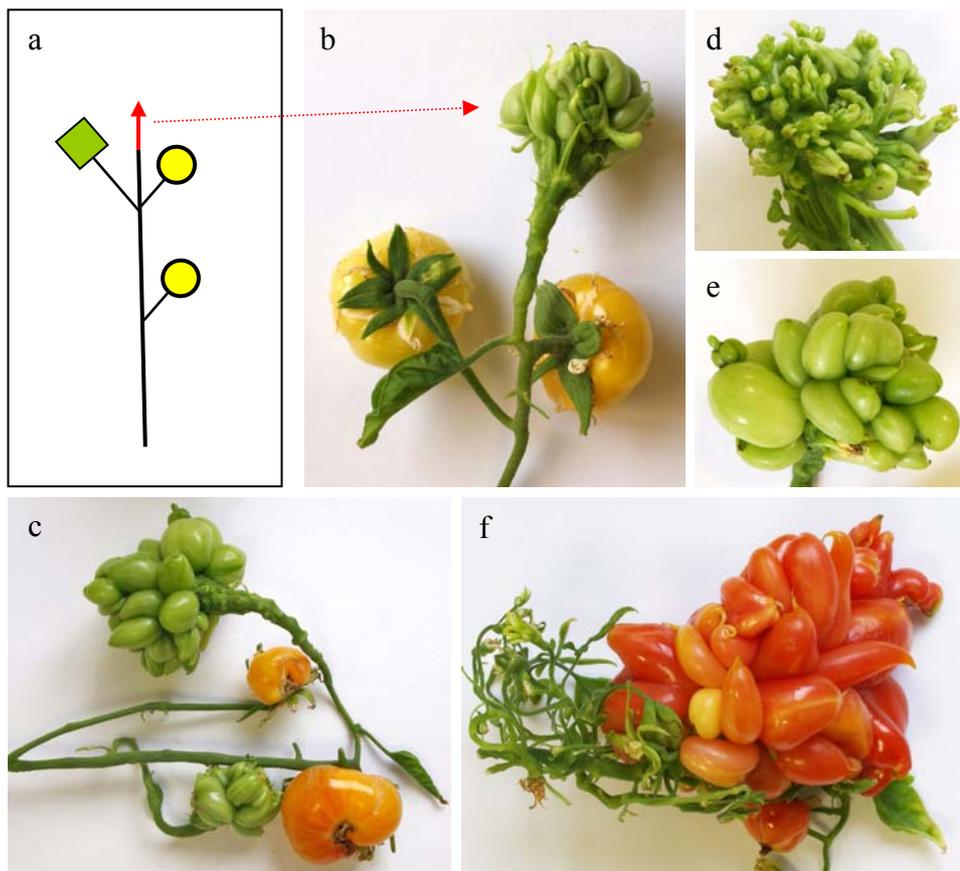
Un aspecto realmente curioso fue que los pétalos no se desprendían del fruto (ver figura 91).



**Figura 91.** Inflorescencia de una planta de 5 meses con frutos de color anaranjado de los que no se desprende la corola (a). Detalles de la cicatriz estilar (b) y del interior de un fruto (c).

En plantas envejecidas se pudo observar el desarrollo de estructuras multicarpelares que, aparentemente, surgían de los meristemos de la inflorescencia, ya que se encontraban siempre en las axilas de alguna hoja o en el extremo de una inflorescencia (figura 92). Estas estructuras maduraban y alcanzaban, a diferencia de lo que se había observado previamente en frutos, una pigmentación roja en la madurez. La textura de estas estructuras era idéntica a la de un fruto.

Conviene indicar que hemos observado interacción entre el fenotipo mutante y el ambiente en el que se cultivaron las plantas. El mutante se cultivó en dos invernaderos con diferentes condiciones medioambientales, sobre todo por lo que se refiere a la humedad relativa y la iluminación. En el invernadero con mayor humedad relativa (IBMCP), la iluminación a lo largo del periodo diurno es prácticamente artificial, mientras que en el de menor humedad relativa (ETSIA), la iluminación es principalmente natural, aunque posee luz de apoyo para suplementar las horas de luz en época invernal. El número de horas de luz-oscuridad en ambos invernaderos es 16-8, respectivamente.



**Figura 92.** a) Parte de una inflorescencia del mutante (ver figura 72). b) desarrollo de estructuras multicarpelares en el extremo de una inflorescencia. c) desarrollo de estructuras multicarpelares en el extremo de una inflorescencia y en la axila de una de las hojas que se forman en la inflorescencia. d, e y f) diferentes niveles de desarrollo en una estructura multicarpelar.

En el invernadero 1 casi todas las inflorescencias del mutante eran indeterminadas, mientras que en el invernadero 2 la mayor parte de las inflorescencias eran determinadas. En las inflorescencias determinadas no se desarrollaban estructuras multicarpelares y los brotes axilares y adventicios no generaban flores tan rápidamente. El resto de alteraciones fenotípicas (morfología de la hoja, hábito de crecimiento y tamaño de la flor) eran idénticas en ambos invernaderos. En nuestra opinión, estas diferencias ocasionadas por las condiciones ambientales podrían deberse a diferencias en el nivel de expresión del gen etiquetado por el T-DNA y/o alteraciones en los niveles de expresión de otros genes que actúan de forma coordinada con el gen etiquetado. El análisis de expresión de genes candidatos y, sobre todo, la clonación y análisis funcional del gen etiquetado permitirán en un futuro esclarecer algunas de estas cuestiones.

Conviene mencionar por último que, como los del fruto del mutante son partenocárpicos, no se pudo obtener la TG2.

### Otros mutantes de la colección de plantas transgénicas con la trampa de intensificadores

De forma muy resumida, en la tabla 31 se pueden ver otros variantes que se detectaron en la colección de líneas T-DNA con el vector pD991.

**Tabla 31.** Otros fenotipos variantes para caracteres reproductivos detectados en TG1

Genotipos	Fenotipos observados
55 ET73 y 220 ET73	Alteraciones relacionadas con el desarrollo de la flor: retraso en el desarrollo de la flor.
87 ET73, 291 ET73, 316 ET73 y 341 ET73	Alteraciones relacionadas con el desarrollo de la flor: plantas con morfología de la flor alterada
73 ET73, 142 ET73, 178 ET73, 201 ET73, 353 ET73, 358 ET73, 383 ET73 y 462 ET73	Alteraciones relacionadas con el desarrollo de la flor y del fruto: plantas afectadas en la morfología y/o tamaño de la flor y en el cuajado del fruto.
130 ET73, 159 ET73, 214 ET73, 234 ET73, 369 ET73, 386 ET73, 435 ET73, 509 ET73, 548 ET73, 650 ET73, 684 ET73, 749 ET73 y 914 ET73	Alteraciones relacionadas con la formación del fruto: cuajado de muy pocos frutos.
11 ET73 y 45 ET73	Alteraciones relacionadas con la formación del fruto: retraso en el cuajado de frutos.
339 ET73	Alteraciones relacionadas con la formación del fruto: cuajado de frutos pequeños.
21 ET73, 85 ET73, 382 ET73, 459 ET73, 483 ET73, 504 ET73, 505 ET73, 540 ET73, 608 ET73, 750 ET73, 815 ET73 y 949 ET73	Alteraciones relacionadas con la formación del fruto: esterilidad.
602 ET73 (figura 93)	Alteraciones relacionadas con el desarrollo de la semilla: cuajado de frutos con un porcentaje considerable de semilla oscura.
9 ET73, 32 ET73, 86 ET73, 104 ET73, 119 ET73, 200 ET73, 202 ET73, 219 ET73, 233 ET73, 379 ET73, 390 ET73, 393 ET73, 419 ET73, 439 ET73, 475 ET73, 476 ET73, 659 ET73, 771 ET73, 796 ET73, 798 ET73 y 885 ET73	Alteraciones relacionadas con el desarrollo de la semilla: frutos con un elevado número de semillas vanas.



**Figura 93.** Detalle de las semillas que se desarrollaban en los frutos del genotipo 602 ET73

### 3.3.2. Mutantes con efectos recesivos

#### 3.3.2.a. Mutantes de la colección de plantas transgénicas con construcciones convencionales

Tras caracterizar 17 progenies TG2, se identificó un mutante al que denominamos *frankenstein* por las cicatrices que aparecen en la piel de los frutos. Sus características más relevantes se describen a continuación

#### *frankenstein* (código 102a P4)

Este mutante procede de una transformación genética realizada con una construcción que porta el gen marcador *nptII* y el gen delator *GFP*.

Detección del mutante: Se cultivaron 10 plantas de la progenie TG2 y 5 de ellas exhibieron el fenotipo mutante.

Morfología y color de la hoja: el mutante desarrolló hojas similares a las de p73.

Tamaño y hábito de crecimiento del mutante: el tamaño y la arquitectura de la planta no diferían respecto a p73, pero había un notable retraso en la aparición de las inflorescencias (figura 94a y 94b).

La longitud del tallo hasta la primera inflorescencia era mayor que en p73. Entre inflorescencias ocurría algo similar. El número de fitómeros hasta la primera inflorescencia también era mayor que en p73 y lo mismo ocurría entre inflorescencias.

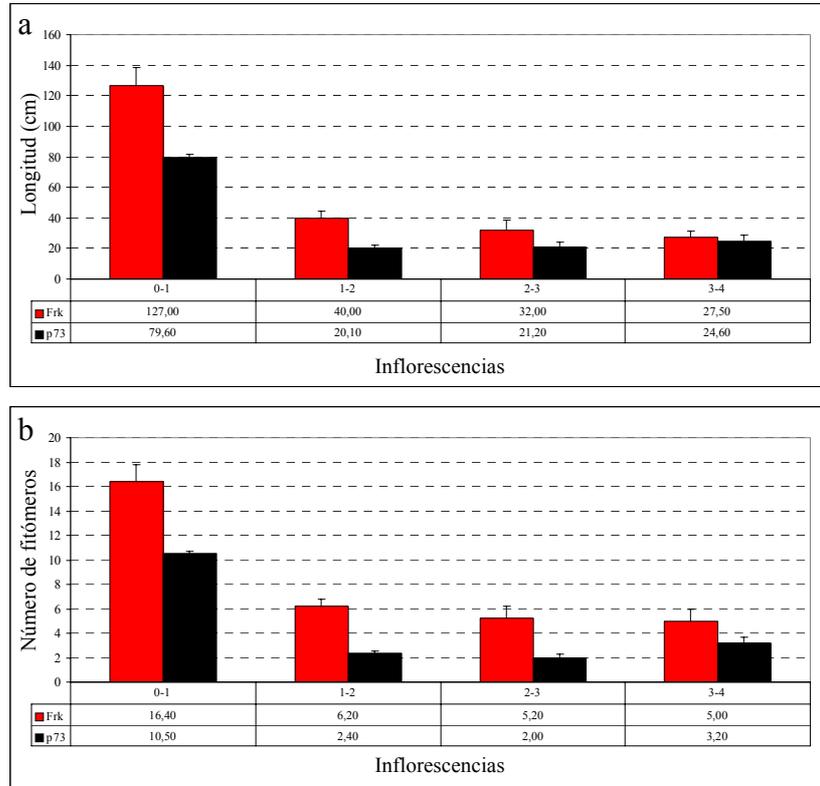
De hecho, el desarrollo tardío de inflorescencias sólo permitió evaluar las cuatro primeras inflorescencias (las plantas se decapitan cuando sobrepasan los 0,5 metros del tutor, lo que equivale a una altura de 2,20-2,30 metros).

Tiempo de floración. El mutante *frankenstein* exhibió un retraso de la floración en el espacio y en el tiempo ya que, aunque el ritmo de crecimiento era similar al de p73, la primera inflorescencia se formó después del fitómero 16 (figuras 94a y 94b).

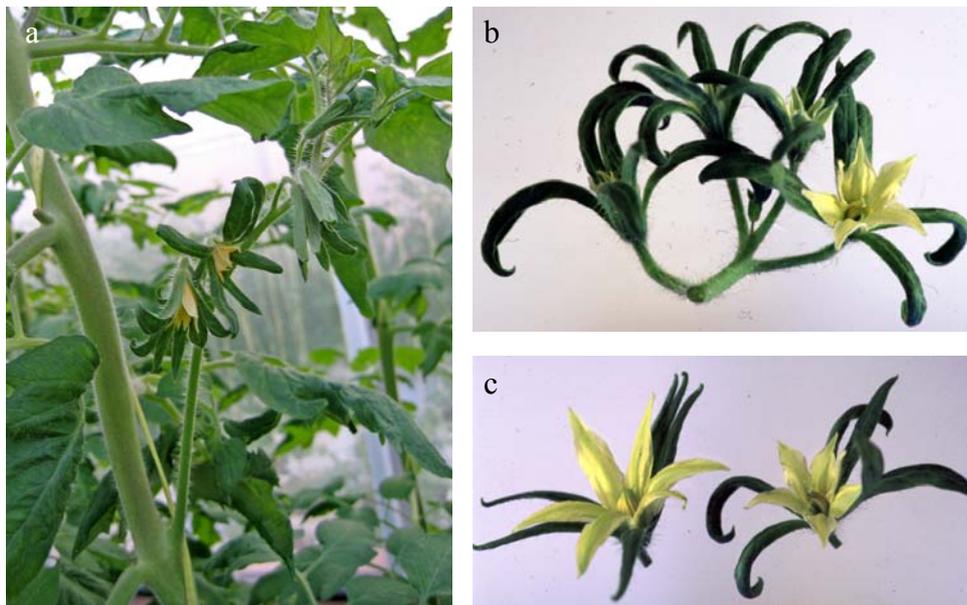
Inflorescencia: la arquitectura fue similar a la de p73 pero el número de flores por inflorescencia era menor ( $4,52 \pm 0,4$  en el mutante y  $7,1 \pm 0,3$  cm en p73).

Tamaño, morfología y color de la flor: una de las características más relevantes del mutante fue el enorme tamaño de los sépalos consecuencia de la conversión homeótica de

los mismos en estructuras tipo hoja (figura 95). Los pétalos y estambres del mutante eran de menor tamaño que los de p73 (figura 95c).



**Figura 94.** Caracteres relacionados con el desarrollo vegetativo de *frankenstein* a) Longitud hasta la primera inflorescencia (0-1) y entre inflorescencias (1-2, 2-3...), b) número de fitómeros hasta la primera inflorescencia (0-1) y entre inflorescencias (1-2, 2-3...).



**Figura 95.** Inflorescencia del mutante *frankenstein* (a y b) donde se aprecia como rasgo más aparente el desarrollo de sépalos tipo hoja. c) Comparación de una flor *frankenstein* respecto a la de p73 en estadio de antesis.

Un análisis más detallado de las flores en diferentes estadios de desarrollo (botón floral, preantesis y antesis) reveló la existencia de conversiones homeóticas en ciertos verticilos o, dicho de otra forma, el desarrollo ectópico de estructuras correspondientes a un verticilo en otro distinto. Estas alteraciones no ocurrían de forma sistemática en todas las flores, sino que algunas flores exhibían alteraciones en ciertos verticilos, otras mostraban alteraciones en otros verticilos y a veces, las alteraciones en el mismo verticilo eran diferentes (figura 96).



**Figura 96.** Algunas de las alteraciones que se observaron en las flores del mutante *frankenstein*. a) desarrollo de óvulos en las paredes del ovario en una flor en estadio de botón floral, b) estructuras de pétalo en el estigma de una flor en estadio de preantesis, c) estambres fusionados al estilo o desarrollo de estructuras de estambre en el estilo, d) detalle del desarrollo de estambres en el estilo, e) desarrollo de estructuras del pistilo en estambres, f) detalle de estambres que han desarrollado en su extremo tejidos propios del pistilo.

pet: pétalo, etb: estambre, etl: estilo, etg: estigma, ovr: ovario, ovl: óvulos

Caracteres relacionados con el fruto: las plantas de fenotipo mutante desarrollaron frutos de pequeño calibre con cicatrices longitudinales (figura 97). En nuestra opinión, estas cicatrices son las marcas que deja un estambre fusionado al ovario cuando se desprende de un fruto que ha cuajado.



**Figura 97.** Frutos del mutante *frankenstein* en diferentes estadios de desarrollo. La cicatriz típica del fruto dio el nombre al mutante.

Los frutos de las plantas mutantes tenían poca semilla, pero el número de semillas que obtuvimos fue suficiente para comprobar que la descendencia (progenie TG3) procedente de este tipo de plantas manifestaba siempre el fenotipo mutante.

### ***3.3.2.b. Mutantes de la colección de plantas transgénicas con la trampa de intensificadores***

Tras caracterizar 20 progenies TG2 de la colección de líneas T-DNA con la trampa de intensificadores se identificó un posible mutante. Sus características más relevantes se describen a continuación

#### **41 ET73**

Detección del mutante: Se cultivaron 10 plantas TG2 y 2 de ellas exhibieron el fenotipo mutante.

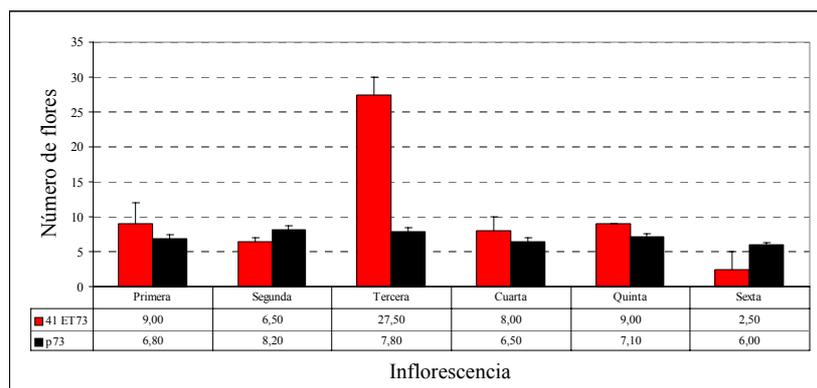
Número de insertos. El análisis Southern realizado en la UAL indica que la TG1 tiene 2 inserciones.

Morfología y color de la hoja: las plantas mutantes desarrollaban hojas similares a las de p73.

Tamaño y hábito de crecimiento del mutante: el tamaño y la arquitectura de la planta no diferían respecto a p73.

Tiempo de floración: era similar al de p73

Inflorescencia: en las plantas de fenotipo mutante se observó una mayor ramificación en la tercera inflorescencia dando lugar a un elevado número de flores (figura 98 y 99). Conviene indicar que la inflorescencia era determinada, es decir, el mayor número de flores no se debe a una indeterminación de la inflorescencia.



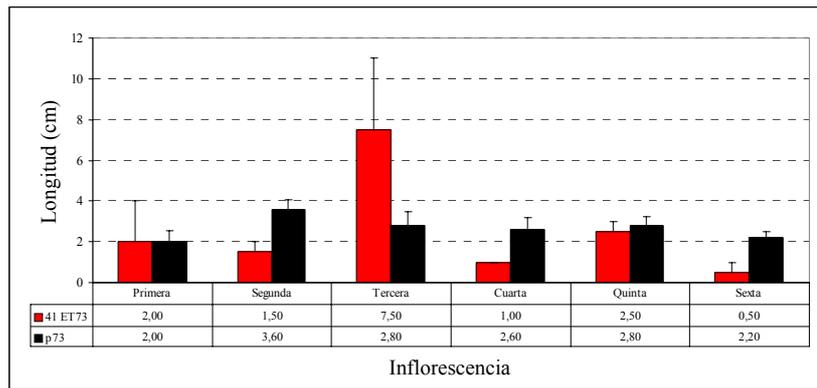
**Figura 98.** Número de flores por inflorescencia en el mutante 41 ET73 y en p73



**Figura 99.** Detalle del número de flores en la tercera inflorescencia de las plantas de fenotipo mutante.

Tamaño, morfología y color de la flor: las flores del mutante eran similares a las de p73

Caracteres relacionados con el fruto: la morfología de los frutos del mutante era idéntica a la de los frutos de p73. Sin embargo, el número de frutos que generaron las plantas de fenotipo mutante fue mayor, consecuencia del mayor número de flores en la tercera inflorescencia (figura 100 y 101).

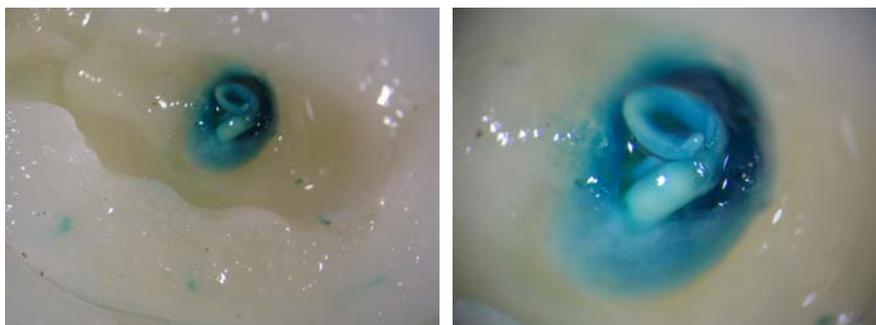


**Figura 100.** Número de frutos por inflorescencia en el mutante 41 ET73 y en



**Figura 101.** Detalle del cuajado de frutos en la tercera inflorescencia de una de las plantas de fenotipo mutante.

Expresión del delator. En este mutante se observó un elevado nivel de expresión del delator en los estambres de la flor y en el embrión de las semillas en plantas TG1, así como en algunas de las plantas TG2 (figura 102). No se detectó diferencia entre la expresión del delator en las plantas TG2 de fenotipo mutante respecto a las de fenotipo silvestre (supuestamente hemicigóticas).



**Figura 102.** Expresión del delator en el embrión de la planta 41 ET73.



## V. DISCUSIÓN

Los genomas de las plantas superiores están compuestos por miles de genes que controlan diferentes caracteres. El conocimiento de la función de los genes que determinan los caracteres de interés agronómico es uno de los principales retos de los proyectos de genómica funcional en curso. Estos conocimientos van a proporcionar la base científica para abordar los programas de mejora genética en los años venideros.

En este contexto, el análisis detallado de un mutante representa uno de los caminos más exitosos para determinar la función de un gen. Desde un punto metodológico, los mutantes pueden ser generados a través de mutagénesis química (e.g. EMS), física (irradiación) o insercional (transposones o T-DNA). Entre estas aproximaciones, la mutagénesis insercional se ha convertido en los últimos años en una herramienta básica para la identificación y etiquetado de genes, así como para el análisis de su función. En este sentido, la disrupción de un gen endógeno o la integración del inserto transgénico en la vecindad del mismo pueden ocasionar la anulación o alteración de su función. Además, el uso de la mutagénesis insercional proporciona, en principio, el camino más rápido para la clonación del gen mutado (Radhamony *et al.* 2005).

Una de las ventajas del T-DNA sobre los transposones como mutágeno insercional es que el T-DNA no salta tras la inserción y es química y físicamente estable a lo largo de las generaciones (Radhamony *et al.*, 2005). La mutagénesis insercional por T-DNA ha sido ampliamente utilizada en *Arabidopsis* (Feldmann, 1991; Azpiroz-Leehan and Feldmann, 1997; Krysan *et al.*, 1999; Bouche and Bouchez, 2001) y arroz (Jeon *et al.*, 2000; Yin and Wang, 2000; Jeong *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2003; Sallaud *et al.*, 2003; Sha *et al.*, 2004) donde se han obtenido miles de líneas etiquetadas. También se ha utilizado, aunque evidentemente a menor escala, en otras especies como *Lotus japonicus* (Webb *et al.*, 2000), *Medicago truncatula* (Scholte *et al.*, 2002), *Salvia miltiorrhiza* (Lee *et al.*, 2008), *Brachypodium distachyon* (Vain *et al.*, 2008), *Brassica rapa* (Lee *et al.*, 2004), álamo (Harrison *et al.*, 2007), *tomate* (Mathews *et al.*, 2003), cebada (Zhao *et al.*, 2006) y fresa (Oosumi *et al.*, 2006).

Diferentes aspectos de carácter social, económico y científico hacen que el tomate sea una especie de enorme interés estratégico a la hora de identificar genes relevantes para su mejora genética. Es, entre la amplia gama de especies hortícolas que se comercializan, la más importante por lo que representa su producción, así como por aspectos relacionados

con su distribución y consumo. Asimismo, la cantidad, calidad y diversidad de centros públicos y privados dedicados a la investigación y mejora de esta especie reflejan tanto su importancia económica como social.

Desde un punto de vista científico, su naturaleza diploide, pequeño tamaño del genoma (0.9 pg por genoma haploide), corto ciclo de vida, relativa facilidad para obtener plantas transgénicas, disponibilidad de colecciones de mutantes (sobre todo, espontáneos e inducidos por EMS) y recursos genéticos y genómicos (marcadores de DNA, colecciones de EST, microarrays públicos y un mapa físico desarrollado) convierten al tomate en uno de los más efectivos modelos entre las especies de interés agronómico (Giovannoni, 2004). En particular, y como consecuencia de los avances moleculares y genéticos conseguidos en esta especie, el tomate ha emergido como el sistema modelo para el estudio de los procesos de desarrollo y maduración de frutos climatéricos (Giovannoni, 2007).

A pesar de todas estas cuestiones, se conoce muy poco en torno a los genes y mecanismos que regulan las etapas iniciales del desarrollo, de cómo se establece la identidad del meristemo característico de esta especie, el meristemo simpodial, y cuáles son los determinantes genéticos y mecanismos que especifican las distintas etapas del desarrollo de la flor y el fruto de tomate.

Habida cuenta del interés que despierta el conocimiento de los procesos del desarrollo en plantas, en parte porque su conocimiento permite la mejora de determinados caracteres, lo que redundaría en nuestro propio beneficio, en nuestro laboratorio se inició, en colaboración con los grupos de los doctores Rafael Lozano y Trinidad Angosto (UAL-Almería) y de la Dra. M<sup>a</sup> Carmen Bolarín (CEBAS-Murcia), una línea de investigación relacionada con la identificación de secuencias codificantes y elementos de regulación de genes implicados en procesos básicos del desarrollo vegetativo y reproductivo, así como en la tolerancia o susceptibilidad al estrés hídrico y/o salino.

La aportación de esta Tesis Doctoral en este proyecto de investigación ha sido la generación una colección de líneas de inserción por T-DNA en tomate y la identificación de mutantes afectados en caracteres relacionados con el desarrollo. En concreto, se han generado más de 1200 líneas T-DNA y se han obtenido sus descendencias TG2. La caracterización de estas líneas en TG1 ha conducido a la detección de 256 mutantes (de tipo dominante, semidominante o aditivo) afectados en caracteres vegetativos y/o

reproductivos. Asimismo, se ha caracterizado una pequeña muestra de progenies TG2 (en concreto 37) lo que ha permitido la identificación de 6 mutantes recesivos.

Conviene indicar que el número de mutantes detectados ha superado nuestras propias expectativas. En cualquier caso, y siendo realistas, es probable que no todos los variantes identificados sean verdaderos mutantes, ni que todos los mutantes sean de tipo insercional. Es posible que alguna de las líneas que exhiben ciertas alteraciones fenotípicas no sea más que un variante epigenético, debido, por ejemplo, a una alteración en el proceso de metilación del DNA (Jain, 2001). En este caso, estas alteraciones no se transmitirán a la descendencia, a no ser que estén asociadas a un fenómeno de paramutación (Cuzin *et al*, 2008). Podría ocurrir también que algunos de los mutantes que hemos identificado sean de tipo somaclonal y no insercional. La variación somaclonal es la variación genética que surge como consecuencia del cultivo *in vitro* y puede deberse a múltiples causas (Moreno, 1997). Curiosamente, algunos cambios de tipo epigenético, como por ejemplo la metilación, pueden convertirse en cambios genéticos, es decir en verdaderas mutaciones, mediante el mecanismo que en su tiempo se denominó como RIP (Lee and Phillips, 1988). No obstante, una buena parte de los mutantes puntuales de tipo somaclonal surgen como consecuencia de la activación de elementos transponibles. Por citar un ejemplo, Hirochika *et al* (1996) identificaron 15 retrotransposones en arroz (*Tos6-Tos20*) que estaban inactivos (o casi inactivos) en condiciones normales de crecimiento, pero comprobaron que tres de ellos (*Tos10*, *Tos17* y *Tos19*) se activaron en condiciones de cultivo *in vitro* y que en estas condiciones el más activo era *Tos17*. La activación de elementos transponibles *in vitro* tiene los mismos efectos que una mutación insercional (anulación de función o alteración de expresión de un gen endógeno), pero la diferencia estriba en que el gen endógeno no quedaría etiquetado por el T-DNA, sino por el transposón.

Lo cierto es que los trabajos del grupo indican que, a diferencia de lo que ocurre en melón (Moreno and Roig, 1990), la tasa de variación epigenética en plantas de tomate regeneradas en cultivo *in vitro* es muy escasa. De forma similar, con el método de regeneración desarrollado en nuestro laboratorio para los experimentos de transformación, la frecuencia de mutaciones somaclonales es muy baja. Aún así, es evidente que, en una colección de más de 1200 líneas T-DNA, debe haber algún mutante de tipo somaclonal.

Por tanto, para llegar a la conclusión de que un determinado mutante es de tipo insercional (y no somaclonal) hay que comprobar que hay correlación entre el inserto y la mutación. En el caso de que el mutante sea fértil, se puede hacer un análisis genético en la

descendencia para comprobar la cosegregación inserto-mutación. La forma habitual de hacerlo es estudiar la segregación del gen marcador (en nuestro caso el gen *nptII*, que confiere resistencia a la kanamicina) y el fenotipo mutante. No obstante, incluso en el caso de una simple inserción, el análisis puede no ser tan sencillo como podría parecer. Por ejemplo, si la mutación insercional tienen un efecto recesivo la cosegregación es parcial (todas las plantas mutantes son resistentes a la kanamicina, pero no todas las plantas resistentes a la kanamicina tienen fenotipo mutante). Además, con independencia del efecto de la mutación (dominante, semidominante, aditivo o recesivo) hay toda una gama de procesos (e.g. silenciamiento en homocigosis del gen marcador, letalidad ocasionada por la inserción en plantas homocigóticas, letalidad a nivel de un tipo de gametos, etc.) que pueden ocasionar desviaciones en la segregación esperada.

La cosa se complica mucho más si, en lugar de una inserción, hay dos o más inserciones del T-DNA. Ahora bien, con independencia del número de copias, no hay que descartar la presencia de insertos anómalos. Por ejemplo en una planta con dos insertos podría ocurrir que la copia que provoca la mutación insercional haya perdido el gen *nptII*, mientras que la otra copia (que no tiene efecto insercional) sí tenga el gen marcador. En este caso se trata de un mutante insercional en el que la copia anómala ha etiquetado un gen endógeno, pero los análisis indicarán que no hay cosegregación entre el fenotipo mutante y la resistencia a la kanamicina. Es más, aunque el análisis de cosegregación se haga mediante pruebas de tipo molecular (PCR o Southern), si la sonda utilizada está diseñada para detectar el gen marcador (que es lo más habitual), el resultado será el mismo: no habrá cosegregación.

Por esa razón, si los análisis de cosegregación se efectúan mediante pruebas moleculares (PCR o Southern), conviene utilizar cebadores de secuencias de los bordes (derecho o izquierdo), además de las que los que habitualmente se utilizan (e.g. cebadores del gen marcador o delator). Aún así, es probable que durante la integración del T-DNA se pierda un trozo de la secuencia correspondiente a uno de los bordes, en cuyo caso, si se utiliza una sonda que detecta este borde, el resultado del análisis será que no hay cosegregación, aunque en realidad sí es una mutación insercional.

Por ejemplo, Miyao *et al* (2007) a partir de una colección de mutantes insercionales en arroz generados con el retrotransposón *Tos17* observaron la falta de correlación mutación-inserto en algunos variantes. Los autores indicaron que, en esos casos, los variantes podrían estar ocasionados por la inserción de otro transposón nativo, por

aberraciones cromosómicas u otro tipo de mutaciones generadas como consecuencia del cultivo *in vitro* (i.e. mutaciones somaclonales).

Otro problema, por desgracia habitual en mutantes dominantes o semidominantes, es la falta de fertilidad. Si la infertilidad sólo afecta a un tipo de gametos (masculinos o femeninos), no se conseguirá la TG2, pero si se podrá lograr alguno de los retrocruces. Si la infertilidad es total, no hay nada que hacer, ya que no se puede obtener la TG2 ni los retrocruces.

Si el mutante es infértil, o, como suele ocurrir en muchos casos, hay serias dificultades para hacer el análisis genético y comprobar la existencia de cosegregación inserto-mutación, no queda más remedio que secuenciar y analizar las secuencias flanqueantes del T-DNA (o de los T-DNAs en el caso de múltiples copias). En este caso, a través de la información existente sobre las regiones del genoma que ya se han secuenciado es factible inferir si la mutación se debe o no a la disrupción de un gen endógeno o a la alteración en la expresión de dicho gen que ocasiona la inserción del T-DNA en la vecindad del mismo. Por desgracia, a diferencia de lo que ocurre en *Arabidopsis* y arroz, en el caso del tomate no disponemos todavía de la secuencia completa del genoma. Por tanto, si no se identifica algún gen candidato, la única solución es secuenciar el gen endógeno etiquetado por un T-DNA mediante TAIL-PCR o Anchor-PCR (Schupp *et al*, 1999) y, a posteriori, llevar a cabo un análisis funcional para comprobar si la anulación de función del mismo (e.g. RNAi) o su sobreexpresión (e.g. 35s) genera un fenotipo similar al del mutante. La ventaja de esta aproximación estriba en que, además de demostrar que el fenotipo mutante se debe a una inserción del T-DNA, se habrá avanzado considerablemente en el análisis funcional del gen.

Cuando iniciamos el proyecto sobre mutagénesis insercional en tomate, el planteamiento anterior nos parecía irreal. Sin embargo, gracias a la colaboración con el grupo de los Dres. Rafael Lozano y Trinidad Angosto, ahora sabemos que estábamos equivocados. Los trabajos efectuados por el grupo de la UAL han permitido poner a punto métodos eficaces para la secuenciación de las regiones flanqueantes a un T-DNA en tomate. De esta forma, lo que antes parecía un tanto irreal, ahora es factible. Con todo, el que sea factible no significa que sea fácil.

En el momento presente, el planteamiento anterior es asequible en el caso de líneas T-DNA con una o, a lo sumo, dos inserciones. En el caso de tres o más copias, la cosa se

complica porque, aparte del trabajo que representa la clonación de las secuencias flanqueantes, hay que llevar a cabo el análisis funcional de cada uno de los genes, lo que implica una enorme cantidad de trabajo porque hay que obtener y evaluar un número suficiente de plantas transgénicas en las que se haya obtenido la anulación de función y la sobreexpresión de cada uno de los genes.

Por lo que respecta a la estrategia a seguir en primera instancia para el análisis funcional, RNAi o sobreexpresión, la ventaja de la primera es que no requiere la clonación de toda la región estructural del gen, y además es el método más adecuado en el caso de mutantes insercionales de anulación de función. La sobreexpresión puede ser más adecuada, al menos en principio, en el caso de ciertas mutaciones dominantes, semidominantes o aditivas que generan una sobreexpresión del gen endógeno, debido, por ejemplo, a la inserción del T-DNA corriente arriba del gen o en alguno de sus elementos de control en 5'. Aún así, conviene tener en cuenta que si, como es habitual, se utiliza el promotor 35s, el fenotipo de las plantas transgénicas en las que se produce la sobreexpresión del gen no tiene porqué ser idéntico al del mutante insercional. Es más, la sobreexpresión con el promotor 35s suele generar efectos pleiotrópicos que pueden generar confusión a la hora de llevar a cabo el análisis funcional.

Por conexión con la pleiotropía, aunque retomando el tema de la evaluación de líneas T-DNA, un aspecto a tener en cuenta es que los mutantes insercionales (como cualquier otro tipo de mutantes) suelen exhibir efectos pleiotrópicos, lo que suele complicar la asignación de la función (o, mejor dicho, la inferencia en torno a la función) del gen mutado. Esto puede deberse a que el gen en cuestión esté implicado no en uno, sino en varios caracteres que afectan al desarrollo de la planta, aunque también puede ocurrir que la alteración de la expresión del gen mutado provoque cambios dramáticos en el nivel de expresión de otros genes que interactúan con dicho gen.

Menda *et al* (2004) observaron que el 48% de los mutantes de tomate obtenidos a través de mutagénesis por EMS y neutrones rápidos exhibían pleiotropía. Miyao *et al* (2007) indicaron que casi la mitad de los mutantes de arroz que identificaron estaban afectados en más de un carácter.

Nosotros hemos observado que el 52% de los mutantes que identificamos en TG1 y el 33% de los que se detectaron en la TG2 exhibían alteraciones en más de un carácter. De hecho, la mayor parte de mutantes con efectos pleiotrópicos mostraban alteraciones en

caracteres relacionados con el desarrollo vegetativo y reproductivo (las dos categorías que utilizamos para la clasificación de los mutantes en esta Tesis Doctoral). De hecho, los efectos pleiotrópicos que exhibieron la mayor parte de los mutantes nos hicieron dudar sobre el apartado en el que había que incluir a dichos mutantes.

A la hora de llevar a cabo la clasificación, lo que decidimos fue incluir a cada mutante en el apartado correspondiente al carácter del desarrollo (vegetativo o reproductivo) que, de forma más notable, había contribuido a la identificación del mismo, lo que no significa que el gen mutado responsable de dicha alteración fenotípica esté implicado, al menos de forma directa, en aspectos relacionados con ese carácter. Por tanto, en lo que respecta a nuestros mutantes, podría ocurrir que el gen etiquetado en un mutante adscrito al desarrollo vegetativo esté implicado realmente en el desarrollo floral o el desarrollo del fruto, o al contrario, es decir que el gen mutado en uno adscrito al desarrollo reproductivo esté implicado en el desarrollo foliar. Sin duda, tras el aislamiento y caracterización de los genes etiquetados en los mutantes de inserción y su posterior análisis funcional en plantas transgénicas, tendremos una idea más clara del sitio en el que deberíamos haber incluido cada mutante.

Los mutantes que se han identificado en esta Tesis Doctoral han exhibido alteraciones en una amplia gama de caracteres relacionados con el desarrollo, es decir, se han detectado una gran variedad de fenotipos. De forma un tanto arbitraria, hemos clasificado de forma individual cada uno de los fenotipos que se han detectado en los mutantes. El resultado se muestra en la tabla 1, en la que se indica el número de plantas (TG1) o descendencias (TG2) en las que se observaron estos fenotipos diferenciales (o descriptores fenotípicos). Al respecto conviene recordar que muchos de los mutantes exhibieron alteraciones en más de un carácter (pleiotropía), y, por consiguiente, en la tabla un mutante puede estar representado en diferentes descriptores fenotípicos.

Tal y como puede verse en la tabla 1, los fenotipos más abundantes están relacionados con caracteres del desarrollo vegetativo, en concreto, alteraciones en el crecimiento (hábito y compacidad) o desarrollo de la hoja (tamaño, morfología o color). Por lo que respecta al desarrollo reproductivo, los fenotipos más abundantes estaban relacionados con esterilidad o infertilidad.

**Tabla 1.** Número de mutantes en función del descriptor fenotípico.

Descriptor fenotípico	TG1	Porcentaje	TG2	Porcentaje*
Crecimiento <i>in vitro</i> <sup>1</sup>	12	2,18	0	0,00
Desarrollo radicular	0	0,00	1	10,00
Enanismo	5	0,91	2	20,00
Hábito de crecimiento <sup>2</sup>	108	19,64	0	0,00
Compacidad	42	7,64	0	0,00
Abundante viviparidad	5	0,91	0	0,00
Abundante ramificación axilar	2	0,36	0	0,00
Menor tamaño de la hoja	28	5,09	0	0,00
Morfología de la hoja	27	4,91	0	0,00
Color de la hoja	29	5,27	0	0,00
Jaspeado	39	7,09	0	0,00
Senescencia	3	0,55	1	10,00
Ausencia de flores	1	0,18	0	0,00
Menor nº de flores/inflorescencia	14	2,55	1	10,00
Mayor nº de flores/inflorescencia	2	0,36	1	10,00
Tiempo de floración	22	4,00	1	10,00
Arquitectura de la inflorescencia	5	0,91	0	0,00
Morfología de la flor	29	5,27	1	10,00
Tamaño de la flor	17	3,09	0	0,00
Color de la flor	6	1,09	0	0,00
Número de órganos florales	7	1,27	0	0,00
Ausencia de frutos (esterilidad)	62	11,27	0	0,00
Escaso porcentaje de cuajado	40	7,27	0	0,00
Desarrollo tardío de frutos	9	1,64	0	0,00
Partenocarpia	13	2,36	0	0,00
Frutos con poca semilla	1	0,18	0	0,00
Tamaño del fruto	14	2,55	1	10,00
Morfología del fruto	7	1,27	0	0,00
Letalidad	-	0,00	1	0,00
Color semilla	1	0,18	0	0,00
<b>TOTAL</b>	<b>550</b>	<b>100</b>	<b>10</b>	<b>100</b>

<sup>1</sup> Se han incluido mutantes afectados en el enraizamiento o crecimiento de la planta *in vitro* en el medio de cultivo que habitualmente se utiliza para el desarrollo de una planta a partir del ápice meristemático o las yemas axilares.

<sup>2</sup> Se han incluido todos los mutantes que exhibieron una arquitectura vegetativa diferencial respecto al control, como por ejemplo mutantes con alteraciones en el número de fitómeros entre inflorescencias, porte débil y retraso del crecimiento.

\* Teniendo en cuenta que sólo se han evaluado 37 progenies TG2, los datos correspondientes al porcentaje tienen escaso valor y simplemente se muestran a modo indicativo.

Nuestros resultados son parecidos a los de otros autores. Por ejemplo, en la colección de mutantes insercionales de arroz obtenida por Miyao *et al* (2007), los fenotipos más frecuentes exhibían alteraciones en caracteres del desarrollo vegetativo, como tamaño de la planta o aspectos relacionados con el desarrollo foliar, aunque un elevado número de fenotipos estaban relacionados con esterilidad o baja fertilidad. Entre los diferentes

fenotipos que identificaron en la colección de mutantes inducidos (EMS y neutrones rápidos) de tomate, Menda *et al* (2004) observaron que los más abundantes estaban relacionados con el tamaño de la planta, diferentes tipos de esterilidad y mutaciones en la hoja, mientras que los menos abundantes estaban relacionados con el desarrollo del fruto, morfología de la flor, tiempo de floración, color de las flores y arquitectura de la inflorescencia.

Muchos de los mutantes que hemos identificado exhibieron diferentes alteraciones en caracteres relacionados con el desarrollo de la hoja. Probablemente, en muchos de estos mutantes se analizará la expresión de genes candidatos cuya expresión puede haberse visto alterada como consecuencia de la mutación. Por tanto, conviene tener una idea de los genes implicados en este proceso. De forma resumida, y en lo que respecta a genes muy concretos, hoy en día se sabe que el desarrollo inicial de la hoja a partir del meristemo apical del tallo (SAM) requiere de la expresión coordinada de varios tipos de genes: *CLAVATA*, *WUSCHEL*, *KNOX* y *PHANTASTICA* (Kessler and Sinha, 2004). En este escenario, *CLAVATA* y *WUSCHEL* son necesarios para la regulación del tamaño del meristemo, la clase I de los genes homeobox tipo *KNOTTED* (*KNOX*) es necesaria para el mantenimiento de la identidad de los meristemos y *PHANTASTICA* actúa como un regulador de la expresión de los genes *KNOX* en el primordio foliar. En efecto, se ha demostrado que en especies de hoja simple, como *Arabidopsis* y maíz, el nivel de expresión de genes *KNOX* disminuye en el primordio de la hoja, y en este proceso *PHANTASTICA* desempeña un papel clave. Por otro lado, se ha propuesto que en el proceso de iniciación de la hoja se producen interacciones entre los genes *CLAVATA*, *WUSCHEL* y *KNOX* (Kessler and Sinha, 2004). A diferencia de lo que ocurre en especies de hoja simple, en las especies que desarrollan hojas compuestas, como es el caso del tomate (con hojas pinnadocompuestas), se produce un mayor nivel de expresión de los genes *KNOX1* durante el proceso de iniciación de la hoja. Además, diversos estudios sugieren una conexión entre la expresión de genes *KNOX* y el grado de disección de la hoja. En un trabajo pionero, Hareven *et al* (1996) demostraron que la sobreexpresión de genes *KNOX1* (*Knotted-1* de maíz) en plantas transgénicas de tomate incrementaba la lobulación y expansión de la hoja. En este trabajo, los autores además aislaron, mediante homología de secuencias con el gen *Knotted-1* de maíz, su homólogo en tomate (*TKn1*). Janssen *et al* (1998) obtuvieron fenotipos similares en tomate mediante la sobreexpresión del gen *LeT6* (un gen *KNOX* de clase I de tomate). Los datos indicaban que la morfología

final de la hoja podía ser modificada como consecuencia de una alteración en el nivel de expresión de genes *KNOX*. De hecho, se demostró que el mayor grado de disección y la diferente morfología de las hojas en los mutantes dominantes *Mouse ears (Me)* y *Curl (Cu)* se debía a diferentes tipos de alteración de la expresión de dos alelos del gen tipo *KNOX* de tomate *Tkn2* (Parnis *et al*, 1997). Asimismo, el mutante recesivo *clausa*, que fenocopia parcialmente el fenotipo de las plantas transgénicas que sobreexpresan el gen *Knotted-1* de maíz, exhibe una alteración de la expresión del gen *KNOX* de clase I de tomate *LeT6/TKn2* (Avivi *et al*, 2000).

Müller *et al* (2006) demostraron un cambio de morfología de hoja, de simple a compuesta, expresando de forma constitutiva un gen *KNOX* de clase I de cebada en plantas transgénicas de diente de león (*Taraxacum officinale* Web.). Hay y Tsiantis (2006), comprobaron que la anulación de la actividad *KNOXI* en *Cardamine hirsuta* daba lugar a una conversión de hojas compuestas en hojas simples. Para ello utilizaron una construcción RNAi a partir del gen *KNOXI* de *C. hirsuta*. Los autores concluyeron que la actividad *KNOXI* es necesaria para la formación de foliolos en esta especie.

Por otro lado, se ha podido demostrar que en plantas que desarrollan hojas compuestas, como es el caso del tomate, debe existir una expresión solapada de genes tipo *KNOX* y *PHANTASTICA*. En plantas heterocigóticas para la mutación *Mouse ears (Me/+)* se produce un incremento del nivel de expresión del gen *LeT6* y una reducción del nivel de expresión del ortólogo de *PHANTASTICA* en tomate (*LePHAN*), indicando que *LeT6* reprime la expresión de *LePHAN*. En el homocigoto *Mouse ears (Me/Me)* el incremento del nivel de expresión de *LeT6* es mucho mayor y la mayor reducción del nivel de expresión de *LePHAN* hace que las hojas no se desarrollen adecuadamente, formándose estructuras que parecen hojas sin limbo. Este fenómeno también se había observado en algunos fenotipos que exhibían una exacerbada sobreexpresión de *LeT6* (Janssen *et al*, 1998). Es decir, en ausencia de *LePHAN*, los foliolos de las hojas de tomate no se desarrollan, lo que sugiere que debe existir alguna actividad de *PHANTASTICA* (junto a la de *KNOX*) para el inicio del desarrollo de los foliolos (Kim *et al*, 2003). En definitiva, el normal desarrollo de las hojas compuestas de tomate requiere la actividad de estos dos genes antagonistas.

Siguiendo con la misma línea de argumentación, se sabe que algunos reguladores del crecimiento en plantas (principalmente, giberelinas, auxinas y citoquininas) están implicados en el control de la morfología foliar (Champagne and Sinha, 2004). En el caso

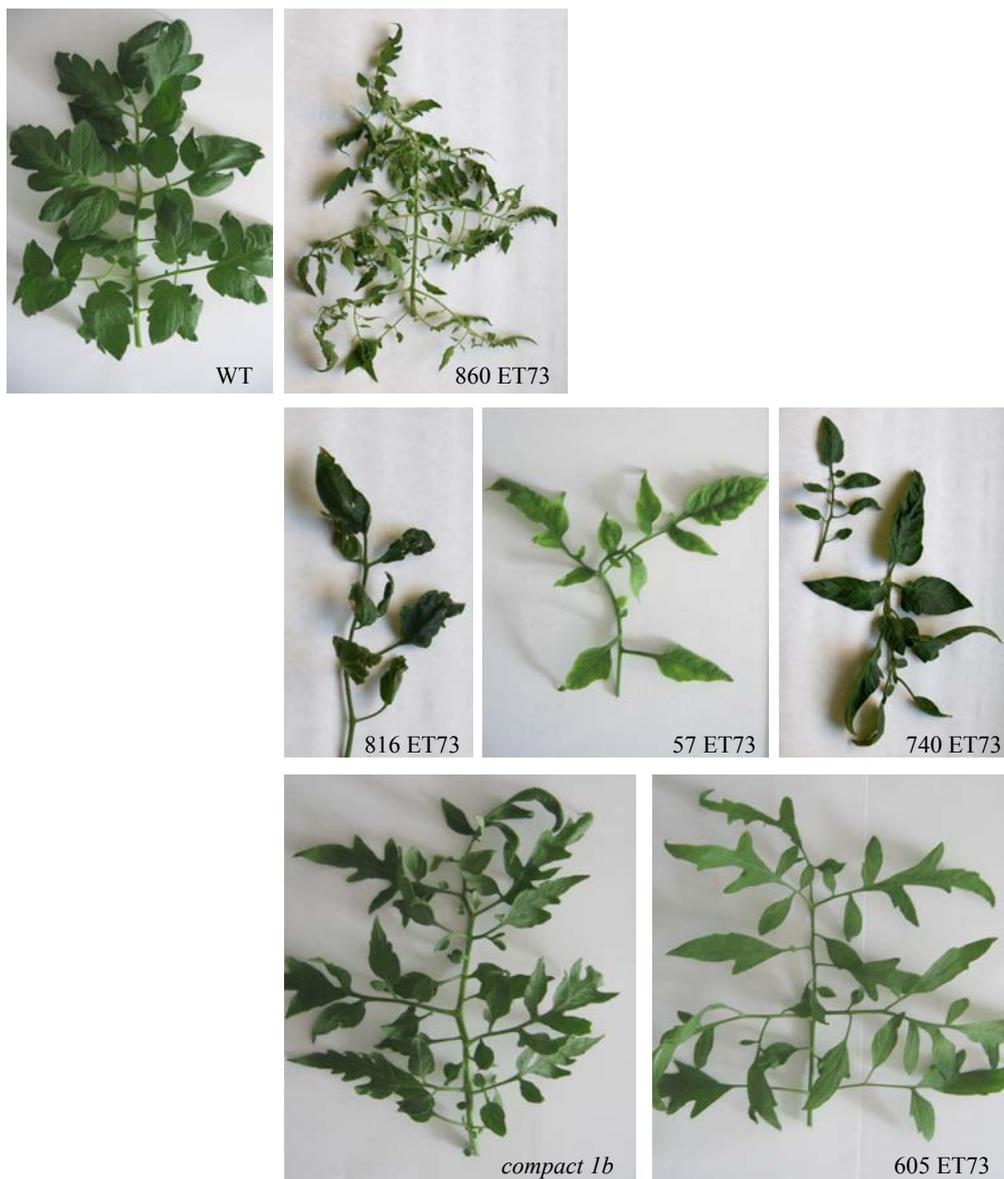
del tomate, se ha comprobado que el incremento en el grado de disección de la hoja compuesta, mediado por un mayor nivel de expresión de genes tipo *KNOX*, va acompañado de una reducción del nivel de expresión del gen *Le20ox1*, implicado en la biosíntesis de giberelinas (Hay *et al*, 2002). De hecho, los mutantes *Me* y *Cu*, que manifiestan una expresión ectópica de *LeT6*, exhiben además una concomitante reducción de *GA20-OXIDASA*, es decir menores niveles de giberelina. Asimismo, Hay *et al* (2002) demostraron que tanto la aplicación exógena de giberelinas como la señalización constitutiva de giberelinas (que exhibe el mutante de tomate *procera*) reducía el grado de disección de las hojas de tomate. Estos resultados indican que la complejidad de la hoja en tomate está regulada también por giberelinas (Hay *et al*, 2002; Hay *et al*, 2004).

Experimentos recientes de genética molecular han permitido comprobar que las auxinas desempeñan un papel importante durante el desarrollo inicial de los primordios de hoja. En este sentido, la aplicación exógena de auxinas naturales en los flancos del SAM conduce a la formación de nuevos primordios mientras que cuando se realizan tratamientos con inhibidores del transporte polar de auxinas no se desarrollan órganos laterales a partir del SAM (Reinhardt *et al*, 2000, Reinhardt *et al*, 2003; Vogler & Kuhlemeier, 2003). Evidencias recientes indican que las auxinas pueden ser requeridas para una regulación negativa de la expresión de genes tipo *KNOX* durante el desarrollo inicial de los primordios de hoja (Scanlon, 2003). Al-Hammadi *et al* (2003) comprobaron que el mutante *polycotyledon* de tomate, que exhibe diversas alteraciones relacionadas con el tamaño y la morfología foliar (entre otros defectos relacionados con el desarrollo), adolece de un incremento del transporte polar de auxinas.

Diversos trabajos ejemplifican la relación entre los niveles endógenos de citoquinina y la expresión de genes tipo *KNOX*. Por ejemplo, los fenotipos de expresión alterada de genes *KNOX* son similares a los de sobreexpresión de citoquininas (Estruch *et al*, 1991; Sinha *et al*, 1993). Asimismo, se ha comprobado que la sobreexpresión de genes tipo *KNOX* estimula la síntesis de citoquinina (Kusaba *et al*, 1998; Frugis *et al*, 1999; Ori *et al*, 1999; Hewelt *et al*, 2000).

Algunos de los mutantes que hemos identificado en este trabajo exhibieron diferentes tipos de alteraciones en lo que respecta a su desarrollo foliar. Por ejemplo, el mutante 860 ET73 exhibió un mayor grado de disección foliar (figura 1). En los mutantes 57 ET73, 740 ET73 y 816 ET73 observamos todo lo contrario, es decir, menor grado de disección foliar (figura 1). Casi todos los mutantes mencionados exhibieron también alteraciones en el

tamaño de la hoja o en la morfología de los folíolos. No obstante, hemos observado que muchos de los mutantes exhibían alteraciones relacionadas con la morfología de los folíolos pero no tanto con el grado de disección foliar, que era similar al de las hojas del testigo (e.g. mutantes *compact1b*, 605 ET73). Se ha comprobado, en este sentido, que alteraciones no tan drásticas en los niveles de expresión de genes tipo *KNOX* ocasionan lóbulos más pronunciados o arrugamiento en las hojas (Hake *et al*, 2004).



**Figura 1.** Alteraciones morfológicas (especialmente en lo que se refiere al patrón de disección foliar y a la morfología del folíolo) observadas en las hojas de algunos mutantes

En definitiva, las alteraciones morfológicas que se han observado en las hojas de los diversos mutantes (figura 1) podrían deberse a cambios de expresión en genes tipo *KNOX* y *PHANTASTICA*, así como genes implicados en los procesos de biosíntesis o transporte

de reguladores del crecimiento. En cualquier caso, se podrían haber etiquetado nuevos genes implicados en los procesos relacionados con el desarrollo foliar en tomate. En este sentido, en un trabajo reciente, Brand *et al* (2007) caracterizan cuatro grupos de mutantes de tomate afectados en el grado de complejidad y morfología de la hoja. En uno de los mutantes (*goblet*) que exhibía un menor grado de disección foliar, pero lóbulos más pronunciados, los niveles de expresión de los genes *TKn1* y *LeT6/TKn2* eran prácticamente indetectables respecto a los niveles del testigo. Comprobaron que la mutación *GOBLET* se encuentra en el cromosoma 7 de tomate mientras que los genes *TKn1* y *LeT6/TKn2* se encuentran en los cromosomas 2 y 4, respectivamente, lo que quiere decir que no se trata de una mutación en dichos genes, aunque, de manera indirecta, sí altera sus niveles de expresión.

Por otro lado, en otro de los mutantes (*multi drop*), el mayor grado de disección foliar se pudo correlacionar con el mayor nivel de expresión de los genes *TKn1* y *LeT6/TKn2*. Sin embargo, en dos mutantes que exhibían menor nivel de disección foliar (*expelled shoot* y *shot pedicel*) el nivel de expresión de *TKn1* no variaba respecto al testigo y *LeT6/TKn2* estaba sobreexpresado.

Brand *et al* (2007) sugieren que, junto con la participación de los genes *KNOX*, deben existir otros genes (que aún no han sido identificados) implicados en los procesos que controlan la morfología de la hoja y, por ende, el mantenimiento de la identidad del SAM. De hecho, otros genes con funciones muy distintas podrían estar implicados en la morfología foliar. Por ejemplo, en guisante, que tiene hojas compuestas, no se expresan los genes tipo *KNOX* en la hoja (Hofer *et al*, 2001), lo que revela una ruta independiente a *KNOX* responsable de la disección foliar. En el mutante de guisante de pérdida de función *unifoliata* (*uni*) las hojas compuestas se transforman en simples. El análisis molecular del mutante indicó que *UNI* codifica para el ortólogo de *LEAFY* (*LFY*) de *Arabidopsis* y *FLORICULA* (*FLO*) de *Antirrhinum* y que su función es requerida en hojas para mantener una fase transitoria de indeterminación que conduzca a la formación de folíolos (Hofer *et al*, 1997). Curiosamente, la pérdida de función de *FALSIFLORA* (*FA*) en tomate (ortólogo de *FLO/LFY*) conlleva, entre otras consecuencias fenotípicas, a una reducción del número de folíolos intercalados de la hoja (Molinero-Rosales *et al*, 1999), lo que sugiere que *FA* desempeña un cierto papel en el desarrollo de la hoja compuesta.

Por otra parte, no habría que descartar que a partir de un mutante concreto se puedan identificar nuevos genes tipo *KNOX* o *PHANTASTICA*. A título de ejemplo, Kimura *et al*

(2008) han identificado un nuevo gen *KNOX* de clase I (*PETROSELINUM*) responsable de la variación existente en la morfología de la hoja de las especies silvestres de tomate de las Islas Galápagos. Los autores indican que la variación existente en estos tomates silvestres se debe a una deleción en un simple nucleótido del promotor del gen *PETROSELINUM* lo que ocasiona una mayor actividad génica.

Cabe añadir, en relación con este tema, que algunos de los mutantes que exhibieron alteraciones en la arquitectura foliar desarrollaban brotes ectópicos en el raquis de la hoja (fenómeno al que hemos denominado en esta memoria viviparidad). Algunos autores han reportado el desarrollo de este tipo de estructuras en plantas transgénicas que sobreexpresan genes *KNOX* de clase I. Por ejemplo, Kano-Murakami *et al* (1993) indicaron que las plantas transgénicas de tabaco que expresaban el gen *OSHI* de arroz (un gen tipo *Kn1*) bajo el control del promotor 35S desarrollaban brotes ectópicos en la cara adaxial de la hoja. Estos mismos fenotipos se observaron en plantas transgénicas de tabaco tanto con el gen *Kn1* como con el gen *NTH15* (un gen tipo *Kn1* de tabaco), así como en plantas transgénicas de *Arabidopsis* con el gen *KNAT1* (un gen de *Arabidopsis* tipo homeobox), todas ellas bajo el control del promotor 35S (Sinha *et al*, 1993; Lincoln *et al*, 1994; Tamaoki *et al*, 1997). Sentoku *et al* (2000) también observaron la formación de brotes ectópicos en la cara adaxial de plantas transgénicas de arroz con genes *OSH*.

Por lo que respecta al tomate, las alteraciones que exhibe el mutante *clausa* se han atribuido a una alteración de la expresión del gen *KNOX* de clase I de tomate *LeT6/TKn2*, y en lo que se refiere a la hoja, el mutante se caracteriza por el desarrollo de estructuras tipo brote a partir del raquis de la hoja (Avivi *et al*, 2000).

Nosotros hemos identificado siete variantes que exhibieron abundante viviparidad. Uno de ellos (*vitro blooming*), se caracterizó por desarrollar flores en este tipo de estructuras vivíparas por lo que no se puede descartar la posibilidad de que, además de alteraciones en genes de tomate tipo *KNOX*, se haya producido la alteración de algún gen implicado en los procesos de floración.



Debido a cómo hemos llevado a cabo la identificación de los mutantes (en invernadero, cultivando las plantas con fibra de coco y riego hidropónico) no hemos

podido realizar un cribado de nuestra colección de líneas T-DNA sobre la base del crecimiento radicular, es decir, fenotipar un órgano que está creciendo bajo tierra. No obstante, y tratando de investigar sobre las causas que podrían ocasionar el retraso de crecimiento (enanismo) de un mutante concreto (*nanotom*), pudimos comprobar que los problemas observados en la parte aérea se debían a notables alteraciones relacionadas con el desarrollo radicular. En concreto, comprobamos que *nanotom* exhibía importantes alteraciones en el desarrollo radicular que parecían estar relacionadas con una limitación de la capacidad de crecimiento de los meristemos radiculares.



En la literatura existen muchos trabajos en los que se describe el análisis genético y molecular de mutantes de *Arabidopsis* afectados en el desarrollo radicular. Respecto a los que exhiben alteraciones en la raíz primaria, merece la pena destacar los mutantes *short root* (*shr*), *scarecrow* (*scr*), *gollum* (*glm*) y *root meristemless* (*rml*). *Shr* y *shr* se identificaron en la descendencia de colecciones de líneas de inserción mientras que *glm* y *rml* se identificaron en la descendencia de colecciones de líneas EMS. Una característica común de *shr*, *scr* y *glm* es el desarrollo anómalo y retrasado del sistema radicular respecto al del testigo. La observación al microscopio de secciones de raíz teñidas con toluidina reveló la existencia de aberraciones a nivel de división y diferenciación celular de las capas que componen la organización radial de la raíz de *Arabidopsis* (Scheres *et al*, 1995). Las raíces primarias de las plantas de fenotipo silvestre contienen, en forma de capas simples de células, epidermis, cortex, endodermis y periciclo. En el interior de estas capas se encuentran las células vasculares del protofloema y protoxilema. En lo que respecta a los mutantes, *shr* carece de endodermis, *scr* muestra un fenotipo similar, y además no contiene cortex, y *glm* carece de la organización característica de tejidos vasculares y de periciclo. La ausencia de este tipo de células específicas en los mutantes está relacionada con defectos relacionados con divisiones particulares durante la embriogénesis así como defectos relacionados con la especificación celular. Por lo que se refiere a *rml*, se trata de un mutante cuya alteración en el sistema radicular (sus raíces primarias tienen un tamaño de unos 2 mm de longitud) se traduce en un menor tamaño de las distintas partes aéreas de la planta (aunque su fenotipo es normal). Las alteraciones en el sistema radicular se deben a una limitada división celular en el meristemo de las raíces primarias (Cheng *et al*, 1995). En definitiva, por lo que respecta a *nanotom*, no se puede descartar que hayamos

conseguido etiquetar algún gen implicado en los procesos de división y diferenciación radicular.

Habida cuenta de que el nivel endógeno de fitohormonas influye sobre el crecimiento y desarrollo radicular, realizamos algunos experimentos *in vitro* para determinar si el cultivo del mutante en medios suplementados con algún regulador de crecimiento (diferentes tipos de auxina, citoquinina, giberelina o ácido abscísico) permitía restaurar el fenotipo silvestre. Lo que observamos que en la mayor parte de los medios empleados no se producía la restauración del fenotipo silvestre. Sin embargo, en uno de ellos, concretamente en un medio suplementado con zeatina, se produjo una excesiva respuesta morfogénica en comparación con la respuesta del testigo.

En nuestro laboratorio se obtuvo hace algunos años una colección de plantas transgénicas de tomate con el gen *ipt*, que codifica para un enzima (isopentenil transferasa) que cataliza el paso limitante de la ruta biosintética de citoquininas. Se vio que las plantas transgénicas con mayor nivel de expresión del gen no eran capaces de enraizar en los medios de cultivo diseñados para tal efecto. Además, estas plantas desarrollaban en la base del tallo un prominente callo con numerosas estructuras organogénicas en vez de raíces.

Cuando las plantas del cultivar p73 (es decir, del testigo) se cultivaron en un medio suplementado con 0,5 mg/l de zeatina no fueron capaces de enraizar, aunque tampoco desarrollaron estructuras organogénicas, probablemente porque la concentración de zeatina que se utilizó en el experimento no fue suficiente para originar este tipo de respuesta. En cambio, cuando las plantas de *nanotom* se cultivaron en este mismo medio con 0,5 mg/l de zeatina se observó un fenotipo similar al de las plantas transgénicas que sobreexpresan el gen *ipt*, pero lo curioso es que el fenotipo es mucho más extremo.

Hasta llevar a cabo un análisis más detallado del mutante, nuestra hipótesis es que las alteraciones en el sistema radicular que manifiesta *nanotom* podrían estar relacionadas con el correcto desarrollo de los meristemos radiculares. No obstante, a tenor de los resultados obtenidos en el medio suplementado con zeatina, no se puede descartar que se haya



producido la alteración del nivel de expresión de algún gen implicado en la síntesis endógena de fitohormonas que conduzca, en última instancia, a un mayor nivel de síntesis de citoquininas. En principio, ello podría deberse a dos motivos. Podría haberse producido, por ejemplo, una mutación en un gen que actúa como regulador negativo de otro implicado en la síntesis de citoquininas. En este caso, la anulación de función del primero conduciría a un incremento en la expresión del segundo. De forma alternativa, podría tratarse de una mutación insercional que genera la sobreexpresión de un gen implicado en la síntesis de citoquininas, en cuyo caso lo más probable es que tenga un efecto dominante.

El mayor número de mutantes que se han identificado en el contexto de esta Tesis está relacionado con el crecimiento de la parte aérea de la planta. En este sentido, un elevado número de mutantes exhibieron un hábito de crecimiento distinto al del testigo, siendo muy comunes las plantas de porte débil con mayor o menor longitud internodal. También conviene resaltar el elevado número de mutantes que exhibieron crecimiento compacto. Por lo que respecta a algunos de los mutantes que exhibieron un porte más elongado o más compacto que el del testigo, nuestra hipótesis es que el fenotipo resultante de dicha mutación podría estar conferido por cambios en los niveles de expresión de genes implicados en la síntesis, regulación o percepción de las giberelinas o brasinosteroides. Esta hipótesis se basa en las evidencias fotográficas de algunos trabajos en los que se describen mutantes o plantas transgénicas que muestran alteraciones en los niveles endógenos de los factores genéticos relacionados con esta hormona. Aunque la función más obvia es promover el crecimiento vegetativo, hoy en día se sabe que las giberelinas desempeñan un papel muy importante en aspectos relacionados con la expansión de las hojas, el desarrollo de la flor, el cuajado del fruto y la germinación de las semillas (Hedden and Kamiya, 1997). En lo que respecta al porte de la planta, los mutantes deficientes en giberelinas tienden a ser más pequeños debido a una reducción de la longitud del tallo. En el caso contrario, los mutantes con incrementos en los niveles endógenos de giberelinas tienen tallos más largos



y delgados (Richards *et al*, 2001; Sakamoto *et al*, 2004). Estos fenotipos también se obtienen mediante la aplicación exógena de giberelinas en plantas de fenotipo silvestre.

Recientemente se ha demostrado que los fenotipos semi-enanos de las variedades de trigo y arroz que contribuyeron a lo que se ha denominado como segunda revolución verde están directamente relacionados con genes que codifican para reguladores negativos de la respuesta a giberelinas (Sakamoto and Matsuoka, 2004). En tomate se ha reportado que la alteración de la expresión de genes implicados en la síntesis de giberelinas modifica la arquitectura de la planta. Por ejemplo, Xiao *et al* (2006) comprobaron que la anulación de función del gen *GA 20-oxidasa* (un importante regulador de la ruta de biosíntesis de giberelinas) en plantas transgénicas de tomate daba lugar a fenotipos de menor tamaño y con menor longitud internodal.

Los niveles endógenos de giberelinas también se pueden alterar a través de modificaciones genéticas de las proteínas DELLA. Los estudios de genética molecular efectuados en *Arabidopsis* han contribuido a esclarecer la ruta de transducción de señales de DELLA. De acuerdo con el modelo propuesto en *Arabidopsis*, la respuesta a giberelinas se encuentra bajo el control negativo de una familia de proteínas DELLA, denominadas RGA, GAI, RGL1, RGL2 y RGL3 (Peng *et al*, 1997; Dill and Sun, 2001; Lee *et al*, 2002; Wen and Chang, 2002). El alelo semidominante tipo GAI *gai-1*, que codifica una proteína de ganancia de función (*Atgai<sup>del</sup>*), carece del motivo de degradación DELLA. De esta forma, los mutantes de *Arabidopsis gai-1* tienen activada la ruta DELLA de manera constitutiva y son parcialmente insensibles a giberelinas (Peng *et al*, 1997). Martí *et al* (2007) transformaron tomate con *Atgai<sup>del</sup>* y con una construcción antisentido de un gen *DELLA* de tomate. En las plantas transgénicas con *Atgai<sup>del</sup>* había una ramificación abundante y una reducción de su tamaño, lo que hacía que las plantas exhibieran una estructura de tipo compacta, mientras que las plantas de anulación de función de DELLA eran muy altas y tenían tallos delgados. Martí *et al* (2007) fenocopiaron estos mismos fenotipos aplicando de forma exógena a los parentales silvestres ácido giberélico (fenotipo similar al de plantas transgénicas de anulación de función de DELLA) y pacobutrazol (fenotipo similar al de plantas transgénicas con *Atgai<sup>del</sup>*).

Recientemente, se ha demostrado que el mutante *procera*, que exhibe un fenotipo de respuesta constitutiva de giberelinas, es un mutante nulo para *DELLA* (Bassel *et al*, 2008). Las plantas de fenotipo *procera* son más desgarradas, más altas, con tallos más finos y

hojas con lóbulos menos pronunciados que las de fenotipo silvestre (Stubbe, 1957; Jones, 1987; Jupe *et al*, 1988; Van Tuinen *et al*, 1999).

En definitiva, es posible que algunos de los mutantes que exhiben un porte débil o más compacto tengan alterada alguna de las rutas de señalización de giberelinas. No obstante, podría ocurrir que en algunos mutantes de fenotipo más compacto se haya producido una alteración de genes que codifican para brasinosteroides (BR). En este sentido, muchos mutantes deficientes en las rutas de señalización o biosíntesis de BR exhiben enanismo o mayor compacidad (Altmann, 1999; Yokota, 1997; Fujioka and Yokota, 2003). En el tomate, mutaciones en los loci *Dwarf* (*D*) y *Dumpy* (*Dpy*) ocasionan deficiencia biosintética de BR (Bishop *et al*, 1999; Koka *et al*, 2000) mientras que mutaciones en el locus *Curl3* afectan a la señalización de BR (Koka *et al*, 2000; Montoya *et al*, 2002). Además de la similitud entre muchos de nuestros mutantes de porte más compacto y los que aparecen en algunas publicaciones, otra de las evidencias que apuntan en la dirección de que algunos podrían estar afectados en los niveles de giberelinas o BR es la esterilidad exhibida por gran parte de ellos, una de las consecuencias de la deficiencia en giberelinas y BR.

Siguiendo con mutantes que muestran alteraciones en la arquitectura, hemos identificado dos mutantes que exhibieron una exacerbada brotación axilar. Estos mutantes podrían estar ocasionados por alteraciones de naturaleza hormonal o por la modificación de la expresión de genes implicados en el desarrollo de meristemos axilares. En el caso del tomate, se conocen dos genes que, de forma directa o indirecta, están implicados en este proceso: *LATERAL SUPPRESSOR* (*LS*) y *BLIND* (*BL*). Mientras que *BL* está relacionado con el desarrollo de los meristemos simpodiales y axilares (Rick and Butler, 1956; Schmitz *et al*, 2002), *LS* sólo está implicado en el desarrollo de los meristemos axilares (Malayer and Guard, 1964; Schumacher *et al*, 1999). La clonación y caracterización funcional de *LS* reveló que este gen codifica para un factor de transcripción de la familia *GRASS* relacionado con la regulación negativa de la respuesta a giberelinas (Schumacher *et al*, 1999). En el caso de *BL*, se trata de un miembro de la clase R2R3 de los factores de transcripción MYB y está relacionado con la regulación de varios procesos biológicos (Schmitz *et al*, 2002).

También hemos identificado 4 mutantes (3 de tipo dominante o semidominante y 1 recesivo) que exhibieron senescencia prematura en las estructuras vegetativas. Que nosotros sepamos, no se han descrito mutantes de tomate con alteraciones en procesos de

senescencia. En *Arabidopsis*, sin embargo, sí que existen algunos mutantes de este tipo. Los procesos de senescencia asociados al mutante *hypersenescence1* (*hys1*) están relacionados con desequilibrios en las rutas de señalización de azúcares (Yoshida *et al*, 2002). Recientemente se ha visto que la expresión del gen *AtNAP*, un gen que codifica para un factor de transcripción de la familia NAC, está estrechamente relacionada con los procesos de senescencia de las hojas en roseta de *Arabidopsis*. En este sentido, la sobreexpresión inducible del gen ocasionó senescencia precoz (Guo and Gan, 2006). Los autores sugieren que genes homólogos en otras plantas podrían desempeñar funciones similares. También se ha podido comprobar que las proteínas kinasas, en concreto las kinasas tipo receptores asociadas a membranas (RLKs), están implicadas en procesos de senescencia (Hajouj *et al*, 2000; Li *et al*, 2006).

Por otro lado, se sabe que entre los factores que inducen senescencia se encuentran los niveles endógenos de fitohormonas. El etileno y las citoquininas constituyen importantes reguladores del programa de senescencia. Las hojas senescentes exhiben incrementos considerables del nivel de etileno y disminuciones drásticas del contenido de citoquininas.

De hecho, una de las vías para conseguir retrasar la senescencia consiste en reprimir la síntesis endógena de etileno (John *et al*, 1995; Bovy *et al*, 1999; Huang *et al*, 2007). Jing *et al* (2002) identificaron tres mutantes de *Arabidopsis* (*old1*, *old2* y *old3*) que exhibían síntomas prematuros de senescencia foliar. Los autores demostraron que los tres genes estaban implicados en una ruta de regulación de genes asociados a senescencia (SAGs) bajo el control de etileno.

Otra de las vías para paliar los síntomas de senescencia está relacionada con el incremento del nivel endógeno de citoquininas. La expresión ectópica de genes que codifican la síntesis de citoquininas ha permitido inhibir los síntomas de senescencia en diferentes especies (Smart *et al*, 1991; Gan and Amasino, 1995; Ori *et al*, 1999; McCabe *et al*, 2001; Chang *et al*, 2003; Robson *et al*, 2004; Luo *et al*, 2006). En relación con este tema, se ha demostrado que es necesario que se exprese una invertasa extracelular para que el proceso de inhibición de la senescencia mediado por citoquininas ocurra satisfactoriamente (Balibrea Lara *et al*, 2004).

Si entramos en el apartado de caracteres reproductivos, conviene empezar comentando el elevado número de mutantes afectados en aspectos relacionados con el

desarrollo floral. En este sentido, se han identificado un elevado número de mutantes que muestran alteraciones en procesos tan diversos como el tiempo de floración, número flores por inflorescencia, arquitectura de la inflorescencia, morfología de la flor, tamaño de la flor y número de órganos por verticilo (ver tabla 1).

En tomate se conocen varios genes que están implicados en el tiempo de floración. Según Kinet y Peet (1997), el tomate está considerada como una planta de día neutro y el tiempo de floración, entendido como el número de hojas desarrolladas hasta el inicio de la floración, no está afectado por el fotoperiodo. No obstante, el hecho de que los mutantes de tomate de floración tardía *uniflora* (*uf*) y *compound inflorescence* (*s*) muestren un fenotipo más exacerbado en cosechas de invierno (baja irradiación) sugiere que debe existir una ruta dependiente de condiciones medioambientales en la regulación de la transición floral (Dielen *et al*, 1998; Quinet *et al*, 2006b). De hecho, los resultados obtenidos por Quinet *et al* (2006a) parecen indicar que *UF* es un importante regulador de la floración en tomate. Aún así, se han identificado y caracterizado algunos genes como miembros de rutas autónomas que controlan la transición floral. En el segmento inicial, *FALSIFLORA* (*FA*) y *SINGLE FLOWER TRUSS* (*SFT*) promueven la transición floral (Molinero-Rosales *et al*, 1999; Molinero-Rosales *et al*, 2004; Lifschitz *et al*, 2006), mientras que *SELF-PRUNING* (*SP*) regula este proceso en los segmentos simpodiales (Pnueli *et al*, 1998). También se ha podido comprobar que la sobreexpresión del gen *API* de *Arabidopsis* en plantas transgénicas de tomate ocasiona un adelanto de la floración sin que ello tenga efectos obvios sobre el desarrollo simpodial de la planta (Ellul *et al*, 2004).

Adicionalmente, parece que *JOINTLESS* (*J*) y *BLIND* (*BL*) promueven floración autónoma en tomate a pesar de que las alteraciones más evidentes producidas por mutaciones en ambos genes afecten al desarrollo de la inflorescencia o a la zona de abscisión del fruto (Mao *et al*, 2000; Schmitz *et al*, 2002; Szymkowiak y Irish, 2006). Aunque tomate florezca de forma autónoma, las bajas temperaturas (10-15°C) reducen el número de nudos hasta la primera inflorescencia. De forma similar, se ha observado una reducción significativa en el tiempo de floración en muchos cultivares mantenidos en condiciones de día corto (Samach y Lotan, 2007). Asimismo, una elevada irradiación acelera la floración, un fenómeno que se ha asociado con el desarrollo foliar y la mayor disponibilidad de asimilados en el meristemo (Kinet y Peet, 1997; Dielen *et al*, 2003). En la actualidad se sabe que las plantas perciben la luz a través de fotoreceptores, especialmente fitocromos (*PHY*) y criptocromos (*CRY*). Se ha podido comprobar que la

sobreexpresión o el silenciamiento del gen de tomate *CRY2* no altera el tiempo de floración (a nivel espacial) pero las plantas transgénicas requieren más días para que la primera flor alcance el estadio de antesis (Giliberto *et al*, 2005). Además, se sabe que las giberelinas promueven floración en tomate ya que los mutantes deficientes en giberelinas requieren de su aplicación exógena para florecer (Koorneef *et al*, 1990). En este contexto, la mayor parte de los mutantes de fenotipo compacto de los que hablábamos en un párrafo anterior exhibieron un notable retraso de la floración.

Muchos de los mutantes afectados en el tiempo de floración que nosotros hemos identificado podrían tener niveles de expresión alterados de los genes que, por lo que parece, influyen en este carácter. En relación con este tema, conviene indicar que, de forma similar a lo que observaron Menda *et al* (2004) en su colección de mutantes de EMS y neutrones rápidos, la mayor parte de los mutantes que nosotros hemos identificado exhibieron floración tardía (tanto a nivel espacial como a nivel temporal).

Por lo que respecta a alteraciones en la inflorescencia, conviene indicar que la iniciación del desarrollo reproductivo vincula la conversión del meristemo apical en meristemo de inflorescencia, a partir del cual se desarrolla lateralmente el meristemo floral que da lugar a la primera flor. Los sucesivos meristemos florales se desarrollan por debajo alrededor de un eje principal. Las inflorescencias de tomate son determinadas y están compuestas por 5 a 10 flores (Allen y Sussex, 1996). El cultivar que nosotros hemos utilizado en este proyecto (p73) desarrolla de 6 a 8 flores por inflorescencia. Nosotros hemos detectado algunos mutantes con modificaciones en la arquitectura de la inflorescencia y/o en el número de flores por inflorescencia.

Se sabe que la actividad del meristemo está afectada por los genes *BL* y *UF*. En el mutante *bl* la inflorescencia desarrolla un número reducido de flores mientras que en *uf* sólo se forma una flor (Rick and Butler, 1956; Fehleisen, 1967; Dielen *et al*, 1998; Schmitz *et al*, 2002). La inusual estructura reproductiva del mutante *uf* no se debe al aborto de las yemas florales sino a la incapacidad para producir una inflorescencia (Dielen *et al*, 2004).

Una de las características comunes que hemos encontrado en algunos de los mutantes afectados en el desarrollo de la inflorescencia es el crecimiento indeterminado de la misma. Por ejemplo, en los mutantes 282 ET73 y 740 ET73, el elevado número de flores por inflorescencias se debe, en parte, a la extrema bifurcación a partir de meristemos localizados en las regiones terminales y axilares de la inflorescencia. La inflorescencia de estos mutantes comparte estructuras de tipo vegetativo y reproductivo. Estos fenotipos son parcialmente similares a los que se han observado en otros mutantes previamente descritos. Por ejemplo, los mutantes *jointless* (*j*) y *macrocalyx* (*mc*) experimentan una reversión de meristemos de inflorescencia a meristemos vegetativos, lo que sugiere que el mantenimiento de la identidad del meristemo de inflorescencia requiere de la actividad de *JOINTLESS* y *MACROCALYX* (Rick y Sawant, 1955; Rick y Butler, 1956; Vrebalov *et al*, 2002; Szymkowiak e Irish, 2006). Asimismo, Molinero-Rosales *et al* (2004) demostraron que *SFT* previene el cambio de identidad del meristemo de inflorescencia desde el momento en el que se inicia la floración.



Por otro lado, mutaciones en los genes *ANANTHA* (*AN*) y *COMPOUND INFLORESCENCE* (*S*) modifican la identidad del meristemo floral dando lugar a inflorescencias más ramificadas y compuestas (Rick y Butler, 1956; Allen y Sussex, 1996).

Con relación a la flor, hemos identificado diferentes mutantes afectados en la morfología, tamaño de la flor y número de órganos florales. En el descriptor fenotípico de la morfología de la flor hemos incluido mutaciones que afectan a la identidad de los órganos florales o aquellos mutantes en los que se han observado conversiones homeóticas parciales o totales en alguno de los verticilos de la flor. Por ejemplo, la caracterización fenotípica del mutante *frankenstein* reveló que, entre otras alteraciones del desarrollo, se producía una conversión de sépalos en estructuras tipo hoja. Un análisis más detallado de la flor en diferentes estadios del desarrollo permitió que observáramos la conversión parcial en algunos de los verticilos (e.g. tejidos de pétalo en el estigma de la flor, o estambres que aparecen en las paredes del estilo). Estas alteraciones fenotípicas podrían estar ocasionadas por modificaciones en los niveles de expresión de los genes requeridos para el adecuado desarrollo de los cuatro verticilos florales.



La caracterización de mutantes homeóticos o de plantas transgénicas con niveles alterados de genes homólogos de las clases A, B y C parece confirmar el modelo ABC de *Arabidopsis* (Coen y Meyerowitz, 1991; Meyerowitz *et al*, 1991). Por ejemplo, la mutación *macrocalyx*, que da lugar a una conversión homeótica de sépalos en estructuras tipo hoja (Rick y Butler, 1956), reside en el homólogo de función A de *Arabidopsis* *API* (Verbalov *et al*, 2002). En algunos mutantes de clase B se ha observado la transformación parcial o total en el segundo y tercer verticilo. Por ejemplo, *stamenless* (*sl*) y su mutante alélico *corollaless* (*cs*) exhiben sépalos en vez de pétalos en el segundo verticilo y estambres reemplazados por carpelos en el tercer verticilo (Gómez *et al*, 1999). Mutaciones en *SL* afectan a un gen de clase B (el candidato es *TM6*) que es un homólogo de *DEFICIENS* (*DEF*) de *Antirrhinum* y *APETALA3* (*AP3*) de *Arabidopsis*. Asimismo, se ha demostrado que *TOMATO AGAMOUSI* (*TAG1*), ortólogo de del gen de clase C *AGAMOUSI* de *Arabidopsis*, desempeña un papel clave en la especificación de la identidad del estambre y el carpelo (Pnueli *et al*, 1994a). Además, recientemente se ha demostrado que las funciones A, B y C requieren de la actividad de los genes *SEPALLATA* (*SEP*) de clase E para que se desarrollen adecuadamente los cuatro órganos florales. En tomate, se ha reportado que

*TM5* (Pnueli *et al*, 1994b) y *TM29* (Ampomah -Dwamena *et al*, 2002) son genes tipo *SEPALLATA*.

Por otro lado, existe una gama de genes cuya modificación podría alterar, ya sea de forma directa o indirecta, el tamaño y el número de órganos florales. En este sentido, se ha podido demostrar que la alteración de la expresión de los principales genes implicados en el mantenimiento del SAM<sup>1</sup> (genes *CLAVATA* y *WUSCHEL*) puede alterar el tamaño y/o el número de órganos florales. Por ejemplo, la anulación de función de los genes de maíz *thick tassel dwarf1* (ortólogo de *CLAVATA1* de *Arabidopsis*) o *fasciated ear2* (similar a *CLAVATA3* de *Arabidopsis*) ocasiona un incremento en la densidad de espiguillas y un mayor número de estambres en las flores masculinas (Taguchi-Shiobara *et al*, 2001; Bommert *et al*, 2005). En arroz se han observado fenotipos similares en mutantes para ortólogos de los genes *CLAVATA1* y *CLAVATA3*. Por ejemplo, la anulación de función de los genes *FLORAL ORGAN NUMBER1* (ortólogo de *CLAVATA1*) o *FLORAL ORGAN NUMBER4* (ortólogo de *CLAVATA3*) da lugar a un incremento del número de órganos florales (Suzaki *et al*, 2004).

Se ha podido demostrar que el desarrollo de una flor como una estructura reproductiva determinada implica, a su vez, la determinación del meristemo floral (a este proceso se le denomina terminación floral). Por lo que se sabe en la actualidad, en *Arabidopsis* este proceso está controlado por tres genes (*WUSCHEL*, *LEAFY* y *AGAMOUS*) a través de una regulación negativa de retroalimentación. De manera resumida, *WUSCHEL* y *LEAFY* activan la expresión de *AGAMOUS*, y este último reprime la actividad de *WUSCHEL* cuando la flor ha completado la formación de los órganos florales (Lohmann *et al*, 2001). Recientemente se ha identificado el gen de tomate *INHIBITOR OF MERISTEM ACTIVITY (IMA)*, que codifica una proteína tipo *mini zinc finger*, que reprime la proliferación celular durante el proceso de terminación floral a través de la represión de *WUSCHEL* (Sicard *et al*, 2008). Lo que se ha podido ver es que cuando se sobreexpresa de manera ectópica *IMA* se producen diferentes alteraciones en el desarrollo vegetativo y reproductivo de la planta (e.g. reducción del tamaño de la planta, distinto color y morfología de la hoja, así como flores y frutos pequeños). Los resultados más interesantes surgen de anulación de función, ya que las plantas transgénicas sin actividad *IMA*, en las que no se observan cambios importantes a nivel vegetativo,

<sup>1</sup> Para que el SAM permanezca en un estado equilibrado, la ruta *CLAVATA*, que restringe la acumulación celular, tiene que ser compensada por un factor de transcripción que promueva producción celular (*WUSCHEL*).

desarrollan flores que exhiben en el cuarto verticilo floral hasta 9 ovarios fusionados (Sicard *et al*, 2008).

Conviene indicar que aunque todavía no se ha conseguido clonar el ortólogo del gen *WUSCHEL* en tomate, ha sido cartografiado en el locus *locule number* localizado en el cromosoma 2 (Barrero *et al*, 2006). *Locule number*<sup>2</sup> y *fasciated*<sup>2</sup> (localizado en el cromosoma 11) son los *loci* que, por lo que parece, contribuyen de forma más significativa al incremento del número de lóculos en el fruto de tomate. *FASCIATED*, clonado recientemente, afecta al tamaño del meristemo floral controlando el número de carpelos a lo largo del desarrollo de la flor y el fruto (Cong *et al*, 2008). Según los autores del trabajo, el gen codifica para un factor de transcripción tipo YABBY, y el mayor número de lóculos en el mutante *fasciated* se debe a un cambio en la regulación del gen. Además del mayor número de lóculos, otro cambio característico del mutante *fasciated* es el mayor número de órganos florales (sépalos, pétalos y estambres). En este sentido, se han identificado diferentes QTLs que podrían controlar el número de órganos florales (Frary *et al*, 2004; Barrero y Tanksley, 2004; Barrero *et al*, 2006). A pesar de que uno de los *loci* más importantes que contribuyen al mayor número de sépalos, pétalos y estambre es, de nuevo, *fasciated*, existen otros QTLs que controlan el número de estos órganos florales. Según Barrero *et al* (2006), los candidatos de *Arabidopsis* que podrían ser los ortólogos funcionales de esos *loci* son *CLAVATA1*, *CLAVATA3* y *WIGGUM*. En *Arabidopsis*, *WIGGUM* actúa en procesos relacionados con la regulación del tamaño del meristemo y número de órganos florales en una ruta independiente de la ruta CLAVATA. En efecto, los mutantes de anulación de función del gen *WIGGUM* de *Arabidopsis* producen un elevado número de sépalos y pétalos (Running *et al*, 1998).

---

<sup>2</sup> *Fasciated* es el locus que contribuye de manera más significativa al incremento del número de lóculos en el fruto de tomate, mientras que *locule number* es el segundo en importancia en relación con este carácter.

Por lo que respecta a nuestro trabajo, en los mutantes en los que se han observado diferencias fenotípicas en relación con el tamaño y/o número de órganos florales es posible que se haya etiquetado alguno de los genes que regula



este tipo de caracteres. A título de ejemplo, en el mutante 740 ET73 se detectaron diferencias fenotípicas (mayor tamaño de las flores, mayor número de órganos por verticilo y frutos con múltiples carpelos) que sugieren firmemente la alteración de la función de alguno (o algunos) de los genes anteriormente mencionados.

En nuestra colección de líneas T-DNA se ha identificado un elevado número de mutantes infértiles o parcialmente infértiles (aquellos que exhibieron un escaso porcentaje de cuajado de fruto). En este contexto, conviene recordar el gran número de líneas T-DNA con la trampa de intensificadores en las que observamos expresión del delator en estambres. Según Ge *et al* (2008), la transformación genética de *Arabidopsis* con T-DNA generó un elevado número de fenotipos estériles (en TG1) con independencia de los transgenes incluidos en el vector. Según los autores, las plantas transgénicas que sufrían este tipo de problemas exhibieron un bloqueo o un retraso en el proceso de dehiscencia de la antera. Aunque sugirieron que el T-DNA podría estar afectando a genes implicados en este proceso, no aportaron datos que demostraran tal afirmación. Xing y Zachgo (2007) indicaron que un elevado número de líneas RNAi o de sobreexpresión exhibían fenotipos de subletalidad de polen (20 a 50% de polen no viable) con independencia del tipo de construcción usada. Los autores señalaron que una posible explicación radica en la disrupción de genes implicados en el desarrollo del polen por el T-DNA. Menda *et al* (2004) también observaron un porcentaje muy elevado de plantas que exhibían diferentes tipos de esterilidad en su colección de mutantes generados por EMS o neutrones rápidos. Asimismo, Miyao *et al* (2007) detectaron un elevado número de mutantes estériles o con baja fertilidad en la colección de mutantes de inserción de arroz generada mediante transposones. Estos resultados parecen indicar que no se trata de un fenómeno asociado a la integración del T-DNA *per se*, sino más bien a que deben existir muchos genes implicados en el carácter, lo que aumenta la probabilidad de detectar un mutante estéril. En

este sentido, se ha estimado que en torno a 3.500 genes se expresan en la antera (Scott *et al*, 2004). De hecho, en *Arabidopsis* se ha visto que el número de genes que pueden ocasionar esterilidad masculina como consecuencia de la alteración de sus niveles de expresión es muy elevado (e.g. Scott *et al*, 2004; Zhang *et al*, 2007; Wan *et al*, 2008). Además, alteraciones en los niveles endógenos de fitohormonas, por ejemplo giberelinas (Huang *et al*, 2003; Fei *et al*, 2004; Duca *et al*, 2008;), o genes que alteren procesos generales del desarrollo de la planta (Li *et al*, 2008) pueden conducir también a esterilidad masculina.

En tomate, se han identificado más de 40 genes relacionados con esterilidad del polen (Georgiev, 1991) aunque, que nosotros sepamos, por el momento no se ha conseguido aislar ninguno de estos genes. Uno de los mejor caracterizados es *ps-2*, cuya mutación ocasiona esterilidad por la ausencia de dehiscencia en las anteras (Atanassova, 1999). Experimentos recientes han permitido obtener un mapa de alta resolución del locus *ps-2*, localizado en el brazo corto del cromosoma 4, aunque por el momento el gen no ha sido clonado (Gorguet *et al*, 2006). Conviene indicar, en cualquier caso, que los fenómenos de esterilidad pueden deberse, igualmente, a alteraciones relacionadas con el desarrollo de los óvulos, ya que existe una amplia gama de genes implicados en el desarrollo del gametofito femenino (ver Skinner *et al*, 2004). El análisis más detallado de nuestros mutantes puede conducir en un futuro próximo al aislamiento de genes implicados en los procesos que rigen el control del desarrollo de los órganos reproductores en tomate.

Por lo que se refiere a los mutantes que exhiben alteraciones en caracteres de fruto, conviene resaltar los que están afectados en procesos relacionados con la partenocarpia, el tamaño o la morfología del fruto. Por lo que se refiere a la partenocarpia, uno de los mutantes más interesantes, *pat76*, además de desarrollar frutos sin semilla de morfología cordiforme, exhibe importantes alteraciones pleiotrópicas (e.g. hojas con menor patrón de disección foliar o flores con alteraciones en cada uno de sus verticilos).



Este mutante muestra muchas similitudes con el mutante partenocárpico clásico de tomate *pat* (Soressi and Salamini, 1975). El mutante *pat* exhibe un desarrollo anormal de

las flores, un crecimiento prematuro del ovario, un reducido número de óvulos viables y un incremento en el número de capas celulares en el pericarpio (Mazzucato *et al*, 1998). A pesar de que ya se dispone de una localización más o menos precisa del gen *pat*, éste aún no se ha clonado. Beraldi *et al* (2004) reportaron la localización del gen en el brazo largo del cromosoma 3. Se ha sugerido que la partenocarpia del mutante *pat* podría estar relacionada con un gen homeótico de acuerdo con las similitudes fenotípicas observadas con plantas que exhiben un reducido nivel de expresión de los genes MADS-box *TM5* o *TM29* (Mazzucato *et al*, 1998). Además, se han observado mayores niveles de expresión de *TM4* (*TDR4*), un gen MADS-box de tomate homólogo de *FUL*, en ovarios de naturaleza partenocárpica cuando las plantas crecen a bajas temperaturas (Lozano *et al*, 1998). Sin embargo, por el momento no está claro si la partenocarpia está directamente regulada por proteínas tipo TM o por cambios hormonales que acontecen en los frutos que les permiten cuajar en ausencia de polinización (Lozano *et al*, en prensa).

De hecho, se ha sugerido que la partenocarpia de tomate se debe a desajustes de tipo hormonal. En efecto, los primeros trabajos encaminados a lograr el desarrollo de frutos partenocárpicos en plantas transgénicas estaban relacionados con el incremento del nivel de auxinas en frutos (Rotino *et al*, 1997; Ficcadenti *et al*, 1999; Acciarri *et al*, 2002; Pandolfini *et al*, 2002; Carmi *et al*, 2003; Mezzetti *et al*, 2004; Rotino *et al*, 2005; Yin *et al*, 2006; Costantini *et al*, 2007). No obstante, y desde hace bastante tiempo, se sabe que las giberelinas constituyen el factor clave para el cuajado y desarrollo del fruto (García-Martínez *et al*, 1991). El nexo de unión entre las auxinas y las giberelinas radica en la regulación biosintética de las giberelinas por auxinas (García-Martínez *et al*, 1997; Ross *et al*, 2000; Pandolfini *et al*, 2007). Martí *et al* (2007) comprobaron que el silenciamiento de *DELLA* (un represor de giberelinas) induce partenocarpia facultativa en tomate. Los autores vieron que en estas plantas el eje central de la inflorescencia era más largo y los frutos eran de menor calibre y de morfología más alargada que los del testigo. Recientemente, se ha demostrado que el mutante *pat* manifiesta mayores niveles de biosíntesis de giberelinas (Olimpieri *et al*, 2007). Olimpieri y colaboradores comprobaron que el gen *GA20ox1* se expresaba de forma constitutiva en los ovarios no polinizados (a partir del estadio de anthesis) y a lo largo del desarrollo del fruto del mutante *pat*. Parece razonable pensar, por tanto, que la elevada concentración de giberelinas en ovarios sea la causante del fenotipo de partenocarpia. Además, Olimpieri *et al* (2007) vieron que los niveles de expresión de genes tipo *KNOX* de tomate (*LeT6* y *LeT12*), implicados también

en el control de la biosíntesis de giberelinas, eran menores. El fenotipo del mutante partenocárpico identificado en nuestro laboratorio (*pat76*) sugiere firmemente la expresión constitutiva de algún gen relacionado con la biosíntesis de giberelinas ya que, además de cuajar frutos de gran calibre completamente partenocárpicos y diferente morfología, las plantas desarrollaron hojas con un menor patrón de disección foliar, un fenotipo asociado a un mayor nivel de expresión de giberelinas en este tipo de estructuras vegetativas (Hay *et al*, 2002; Hay *et al*, 2004). Los análisis de expresión de los genes de tomate tipo *KNOX* indicarán, a buen seguro, patrones de expresión alterados en *pat76*.

Por lo que respecta al tamaño del fruto, se han identificado algunos mutantes que desarrollan frutos de menor calibre que los de p73. Además, algunos de estos mutantes no exhibieron alteraciones en otros caracteres del desarrollo. En tomate, parece ser que mutaciones en seis *loci* (o QTLs) han sido esenciales en el cambio de fruto pequeño a fruto grande. De esos 6, se han identificado 4 QTLs relacionados con el tamaño de fruto: (*fw1.1*, *fw2.2*, *fw3.1* y *fw4.1*). Hasta la fecha, *fw2.2* es el único de esos *loci* que ha sido clonado y estudiado a nivel molecular. La clonación de *fw2.2* ha permitido demostrar que este locus codifica para un represor negativo de la división celular, con actividad confinada en la fase de división celular del desarrollo del fruto. Conviene indicar que la mutación se encuentra localizada en la región de control del gen y no en la secuencia codificante. Por lo que respecta a nuestros mutantes, será interesante comprobar si en algún caso se ha etiquetado algún nuevo gen que contribuya al incremento del tamaño del fruto.

Por lo que se refiere a la forma del fruto, algunos de los mutantes identificados exhibieron morfologías muy diferentes a la de los frutos de p73. El caso más extremo fue el del mutante 740 ET73, cuya alteración fenotípica podría estar ocasionada, como comentábamos en un párrafo anterior, a la alteración de la expresión de algún gen tipo *WUSCHEL* o *CLAVATA*. En el mutante *pat76*, la morfología cordiforme del fruto partenocárpico podría deberse a un mayor nivel de expresión de genes implicados en la síntesis de giberelinas. Los frutos que cuajaron en el mutante *vitro-blooming*, que exhibió abundante viviparidad en el raquis foliar, eran tipo “navel”, muy parecidos a los que se forman en el mutante *clausa* (Avivi *et al*, 2000), un mutante asociado a alteraciones en los niveles de expresión de genes tipo *KNOX*.

Por otro lado, la morfología de los frutos del mutante 630 ET73 recuerda a la de los ‘frutos cuadrados’ descritos por Tanksley (2004). El interés de conseguir este tipo de frutos no está basado en un folklore sino en el hecho de que la maquinaria agrícola que se desarrolló en la década de los 60 para la cosecha de tomates para procesado industrial estaba diseñada para tomates de este tipo. Según Tanksley (2004), el fenotipo de tomate de morfología cuadrada podría ser atribuido al locus *fs8.1* que mapea como un simple locus en el cromosoma 8 cerca del centrómero. Además, este autor indica que los cambios en la morfología



del fruto atribuibles a este gen se producen en estadios muy tempranos del desarrollo del fruto. De acuerdo con esto, nosotros hemos observado que los ovarios de nuestro mutante en estadio de anthesis tenían una forma similar a la del fruto (ver figura 85, página 186). No se puede descartar, por tanto, la posibilidad de que en nuestro mutante se haya etiquetado el gen (o uno de los genes) responsable de la morfología ‘cuadrada’ del fruto.

En nuestra colección de líneas T-DNA hemos identificado también un mutante con fenotipo de letalidad a nivel de plántula al que hemos denominado *seedling lethal* (111 ET73). El mutante *seedling lethal* era capaz de germinar pero las plántulas colapsaban antes de que se llegaran a desarrollar hojas verdaderas. Aunque en la bibliografía no hemos encontrado ningún mutante de tomate con letalidad a nivel de plántula, el número de



mutantes de este tipo en *Arabidopsis* es muy elevado. En este sentido, tras realizar un cribado de una colección de 8000 líneas T-DNA, Feldmann (1991) detectó que el mayor porcentaje de mutaciones estaba relacionado con fenotipos *seedling lethal*. Por su parte,

Budziszewski *et al* (2001) identificaron más de 500 líneas *seedling lethal* a partir de una colección de 38.000 líneas de inserción con T-DNA y transposones. Los autores comprobaron que muchos de los mutantes estaban afectados en funciones cloroplásticas. Revisando la bibliografía hemos podido comprobar que los mutantes tipo *seedling lethal* pueden deberse a alteraciones en genes implicados en funciones muy diversas. En efecto, la ausencia de expresión de genes implicados en procesos relacionados con la reorganización del citoesqueleto (mutante *spike1*, Qiu *et al*, 2002), regulación hormonal (mutante *short blue root*, Subramanian *et al*, 2002; mutante *cullin1*, Moon *et al*, 2007), biosíntesis de carotenoides (mutante *spc1-2*, Dong *et al*, 2007) y metabolismo peroxisomal (mutante *sugar-dependent2*, Eastmond, 2007) conduce a un fenotipo *seedling lethal*. También se ha podido comprobar que la ausencia de expresión de genes que codifican para tiamina pirofosfatasa (Ajjawi *et al*, 2007), topoisomerasa (Takahashi *et al*, 2002) o acetil-CoA carboxilasa 1 (Baud *et al*, 2004) ocasiona fenotipos *seedling lethal*. Asimismo, la anulación de función de genes que cumplen funciones diversas en cloroplastos da lugar a este tipo de letalidad (Kuroda and Maliga, 2003; Frick *et al*, 2003; Ihnatowicz *et al*, 2004; Del Bosco *et al*, 2004; Lezhneva *et al*, 2004; Pollmann *et al*, 2007; Ruppel and Hangarter, 2007; Hu *et al*, 2008). Según Budziszewski *et al* (2001), los mutantes afectados en funciones cloroplásticas exhibían una pigmentación alterada. Nosotros hemos observado que las plántulas de nuestro mutante *seedling lethal III* exhiben una tonalidad verde más clara que las plantas de fenotipo silvestre, por lo que no se puede descartar la posibilidad de que la mutación se haya producido en un gen relacionado con funciones cloroplásticas.

Por último, en algunos mutantes hemos detectado interacciones fenotipo-ambiente. En este sentido, pudimos observar que el fenotipo característico de algunos mutantes se veía más exacerbado en determinadas condiciones medioambientales. Miyao *et al* (2007) señalaron que algunos mutantes de arroz obtenidos con el retrotransposon *Tos17* podían ser sensibles a condiciones medioambientales y, en estos casos, la expresión fenotípica del carácter en cuestión podía ser inestable. Siguiendo con esta línea de argumentación, Lozano *et al* (1998) demostraron que el desarrollo de flores y frutos puede verse seriamente afectado cuando las plantas se cultivan con bajas temperaturas. En concreto, los autores observaron transformaciones homeóticas que condujeron a una modificación de la identidad de estambres y carpelos. Lozano y colaboradores comprobaron que en condiciones de bajas temperaturas aumentaba el nivel de expresión de los genes tipo MADS-box *TM4*, *TM5*, *TM6* y *TAG1*, y sugirieron que las anomalías observadas en

las flores podrían deberse a los cambios de expresión de esos genes. Por tanto, y en lo que respecta a nuestros mutantes, diferentes condiciones medioambientales a lo largo del cultivo podrían alterar la expresión de los genes que interactúan con el gen etiquetado, afectando al nivel de expresión fenotípica del carácter. Como comentábamos en un párrafo anterior, los mutantes de tomate de floración tardía *uniflora (uf)* y *compound inflorescence (s)* parecen exhibir un fenotipo más exacerbado en cosechas de invierno (Dielen *et al*, 1998; Quinet *et al*, 2006b). El análisis de la expresión de genes candidatos que podrían interactuar de forma coordinada con el gen etiquetado quizás nos ayude a esclarecer los fenotipos diferenciales que se han observado en algunos de nuestros mutantes cuando se cultivan en diferentes condiciones medioambientales.

Como corolario, conviene indicar que esta Tesis Doctoral constituye una parte de un proyecto de investigación de mayor envergadura en el que se están utilizando dos herramientas genómicas, mutagénesis insercional y *trapping*, en tomate (cvs. p73 y Moneymaker) y una accesión de una especie silvestre relacionada (*S. pennellii*) que exhibe un alto grado de tolerancia a la salinidad y al estrés hídrico para identificar secuencias codificantes o elementos de regulación de genes implicados en procesos básicos del desarrollo vegetativo y reproductivo, así como en la tolerancia o susceptibilidad a estos dos tipos de estrés abiótico. La caracterización fenotípica que se ha realizado en el contexto de esta Tesis Doctoral nos ha permitido identificar un elevado número de mutantes afectados en diferentes aspectos del desarrollo en la colección de líneas T-DNA del cv. p73. En el laboratorio de los Dres. Lozano y Angosto han conseguido ya la secuenciación de las secuencias flanqueantes al T-DNA en algunos de los mutantes y actualmente estamos llevando a cabo el análisis funcional de alguno de los genes clonados. En definitiva, los resultados obtenidos parecen indicar que se ha abierto una vía para la identificación y el análisis funcional de genes implicados en una amplia gama de procesos del desarrollo de tomate.



## CONCLUSIONES

1. En el contexto de esta Tesis Doctoral se han generado más de 1200 líneas T-DNA diploides de tomate y se han obtenido sus correspondientes progenies TG2. En concreto, se han obtenido 262 líneas T-DNA empleando vectores convencionales (i.e., cuyo T-DNA porta un gen marcador y un gen delator) y 960 líneas con una trampa de intensificadores (vector pD991). Las líneas T-DNA obtenidas con vectores convencionales se han utilizado para la identificación de mutantes insercionales en TG1 (mutaciones con efectos dominantes, semidominantes o aditivos) o TG2 (mutaciones con efectos recesivos). En el caso de las líneas T-DNA generadas con la trampa de intensificadores, además de llevar a cabo el fenotipado en TG1 o TG2 para la identificación de mutantes de inserción, también se ha realizado un análisis de la expresión del delator para detectar elementos de regulación de genes implicados en procesos del desarrollo.
2. Los análisis de expresión del delator *uidA* (GUS) en diferentes tejidos vegetativos de plantas cultivadas *in vitro* indican que el mayor número de eventos de expresión GUS se produce tanto en el tallo como en la raíz, habiéndose detectado muchos menos eventos de expresión en limbo y peciolo de hoja. En conjunto, en torno al 30% de las plantas evaluadas han mostrado expresión del delator en, al menos, uno de los tejidos analizados.
3. Tras la evaluación de la expresión del delator en diferentes tejidos vegetativos de plantas cultivadas *in vivo* se ha observado que el porcentaje de plantas con actividad GUS en los diferentes tejidos analizados era similar a lo que ocurre *in vitro*. En conjunto, en torno al 25% de las plantas evaluadas han mostrado expresión del delator en, al menos, uno de los tejidos analizados. Se ha comprobado que la mayor parte de las plantas que expresaron el delator *in vitro* también lo hacían *in vivo*.
4. Se ha realizado un estudio para identificar secuencias de regulación que promueven la activación o inactivación de genes en distintas fases del desarrollo de la hoja, habiéndose observado que el mayor número de eventos de expresión del delator se da en las hojas adultas y, en especial, en aquellas que están en fase de senescencia. En función de los resultados, es muy probable que se hayan etiquetado elementos

de regulación que promueven la activación o inactivación génica en tejidos adultos o en proceso de senescencia.

5. Se ha evaluado la expresión del delator en tejidos reproductivos. Los resultados indican que el número de líneas T-DNA con expresión del delator en la flor es muy elevado (en torno al 45%), debido especialmente al elevado número de líneas en las que se ha detectado tinción GUS en estambres. De forma similar, el número de líneas con expresión del delator en el fruto es muy elevado (casi el 50%). Además, se han identificado genotipos que sólo expresan el delator en un determinado verticilo floral o en tejidos específicos del pistilo. Asimismo, se han identificado algunos genotipos en los que la expresión ocurre en zonas muy específicas del fruto.
6. El análisis de los resultados obtenidos a nivel vegetativo y reproductivo nos ha permitido seleccionar una serie de líneas T-DNA sobre la base de la expresión específica del delator. En este contexto, se han identificado líneas que sólo expresan el delator en tallo (7), raquis (1), peciolo (1), limbo de hoja (1), pétalo (1), estambres (54), estigma (5), ovario (1), exocarpio de fruto (5), mesocarpio de fruto (2), mucílago de fruto (1) y embriones (23). Es probable, por tanto, que se hayan etiquetado distintos elementos de regulación que promueven expresión en órganos específicos de la planta. Además, se ha podido comprobar que en la mayor parte de los genotipos analizados el patrón de expresión del gen delator es el mismo en la TG1 y en las plantas TG2 que heredan el T-DNA en homocigosis o hemicigosis.
7. La caracterización fenotípica en TG1 de las 1210 líneas T-DNA ha permitido identificar 256 mutantes con efectos de tipo dominante, semidominante o aditivo. En concreto, se han identificado 163 mutantes afectados en caracteres relacionados con el desarrollo vegetativo y 93 con alteraciones en caracteres de tipo reproductivo. Asimismo, la caracterización fenotípica de una muestra de progenies TG2, en concreto 37, ha permitido la identificación de 6 mutantes recesivos.
8. Se ha observado que en torno al 50% de los mutantes identificados exhibe alteraciones en una amplia gama de caracteres relacionados con el desarrollo, es decir, muestra efectos pleiotrópicos. Se ha podido comprobar que las alteraciones fenotípicas más frecuentes están relacionadas con caracteres del desarrollo vegetativo, en concreto, alteraciones en el crecimiento de la planta o desarrollo de

la hoja. Por lo que respecta al desarrollo reproductivo, los cambios más frecuentes están relacionados con esterilidad o infertilidad.

9. Se han detectado diversos mutantes que exhiben alteraciones en el desarrollo del fruto y algunos otros en los que el cuajado del fruto se produce en ausencia de polinización (partenocarpia). Previsiblemente, la clonación y análisis funcional de los genes etiquetados aportará una información muy valiosa en torno a los procesos que determinan el desarrollo del fruto y la partenocarpia, caracteres de gran importancia en la mejora vegetal.



## BIBLIOGRAFÍA

- Acciarri N., Restaino F., Vitelli G., Perrone D., Zottini M., Pandolfini T., Spena A., Rotino G.L. (2002). Genetically modified parthenocarpic eggplants: improved fruit productivity under both greenhouse and open field cultivation. *BMC Biotechnology*. 2: 4.
- Adams-Phillips L., Barry C., Giovannoni J. 2004. Signal transduction systems regulating fruit ripening. *Trends in Plant Science*. 9 (7): 331–338.
- Ahad A., Wolf J., Nick P. 2003. Activation-tagged tobacco mutants that are tolerant to antimicrotubular herbicides are cross-resistant to chilling stress. *Transgenic Research*. 12 (5): 615–629.
- Ajjawi I., Rodriguez Milla M.A., Cushman J., Shintani D.K. 2007. Thiamin pyrophosphokinase is required for thiamin cofactor activation in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*. 65:151–162.
- Al-Hammadi, Sreelakshmi Y., Negi S., Siddiqi I., Sharma R. 2003. The *polycotyledon* mutant of tomato shows enhanced polar auxin transport. *Plant Physiology*. 133: 113–125.
- Allen K.D. and Sussex I.M. 1996. *Falsiflora* and *anantha* control early stages of floral meristem development in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Planta*. 200 (2): 254–264.
- Alonso J.M., Stepanova A.N., Leisse T.J., Kim C.J., Chen H., Shinn P., Stevenson D.K., Zimmerman J., Barajas P., Cheuk R., Gadrinab C., Heller C., Jeske A., Koesema E., Meyers C.C., Parker H., Prednis L., Ansari Y., Choy N., Deen H., Geralt M., Hazari N., Hom E., Karnes M., Mulholland C., Ndubaku R., Schmidt I., Guzman P., Aguilar-Henonin L., Schmid M., Weigel D., Carter D.E., Marchand T., Risseuw E., Brogden D., Zeko A., Crosby W.L., Berry Ch.C., Ecker J.R. 2003. Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*. 301 (5633): 653–657.
- Alonso J.M. and Ecker J.R. 2006. Moving forward in reverse: genetic technologies to enable genome-wide phenomic screens in *Arabidopsis*. *Nature Reviews Genetic*. 7: 524–536.
- Altmann T. 1999. Molecular physiology of brassinosteroids revealed by the analysis of mutants. *Planta*. 208: 1–11.
- Alvarado M.C., Zsigmond L.M., Kovács I., Cséplö A., Koncz C., Szabados L.M. 2004. Gene trapping with *Firefly Luciferase* in *Arabidopsis*. Tagging of stress-responsive genes. *Plant Physiology*. 134: 18–27.
- Amir H., Karas M., Giat J., Danilenko M., Levy R., Yermiahu T., Levy J., Sharoni Y. 1999. Lycopene and 1,25-dihydroxyvitamin D3 cooperate in the inhibition of cell cycle progression and induction of differentiation in HL-60 leukemic cells. *Nutrition and Cancer*. 33 (1): 105 – 112.
- Ampomah-Dwamena Ch., 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: 605–617.
- An G., Lee S., Kim S.H., Kim S.R. 2005. Molecular genetics using T-DNA in rice. *Plant Cell Physiology*. 46 (1): 14–22.
- An S., Park S., Jeong D.H., Lee D.Y., Kang H.G., Yu J.H., Hur J., Kim S.R., Kim Y.H., Lee M., Han S., Kim S., Yang J., Kim E., Wi S. J., Chung S. H., Hong J. P., Choe V., Lee H.K., Choi J.H., Nam J., Kim S.R., Park P.B., Park K.I., Kim W.T., Choe S., Lee Ch.B.,

- An G. 2003.** Generation and analysis of end sequence database for T-DNA tagging lines in rice. *Plant Physiology*. 133: 2040–2047.
- André D., Colau D., Schell J., Montagu M.V., Hernalsteens J.P. 1986.** Gene tagging in plants T-DNA insertion mutagen that generates *APH (3')* II-plant gene fusions. *Molecular and General Genetics*. 204 (3): 512–518.
- Angeles G.C., Franken J., Busscher M., Van Dijken A., Van Went J.L., Dons H.J., Van Tunen A.J. 1995.** A novel class of MADS box genes is involved in ovule development in petunia. *Plant Cell*. 7: 1569–1582.
- Anton T. 2004.** Aproximación al análisis funcional de genes de *Nicotiana tabacum* mediante el empleo de una trampa de intensificadores. Trabajo final de carrera. ETSIA. UPV.
- Atanassova B. 1999.** Functional male sterility (*ps2*) in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and its application in breeding and hybrid seed production. *Euphytica*. 107: 13–21.
- Atherton J.G. and Harris G.P. 1986.** Flowering. In: *The tomato Crop* (ed. J. G. Atherton and J. Rudich), pp- 167–200. New York/London: Chapman and Hall.
- Aukerman M.J. and Sakai H. 2003.** Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its *APETALA2*-Like target genes. *Plant Cell*. 15: 2730–2741.
- Avivi Y., Lev-Yadun S., Morozova N., Libs L., Williams L., Zhao J., Varghese G., Grafi G. 2000.** *Clausa*, a tomato mutant with a wide range of phenotypic perturbations, displays a cell type-dependent expression of the homeobox gene *LeT6/TKn2*. *Plant Physiology*. 124: 541–552.
- Ayliffe M. A. and Pryor A.J. 2007.** Activation tagging in plants—generation of novel, gain-of-function mutations. *Australian Journal of Agricultural Research*. 58: 490–497.
- Azpiroz-Leehan R. and Feldman K.A. 1997.** T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis* going back and forth. *Trends in Genetics*. 13 (4): 152-156.
- Bade J., vanGrinsven E., Custers J., Hoekstra S., Ponstein A. 2003.** T-DNA tagging in *Brassica napus* as an efficient tool for the isolation of new promoters for selectable marker genes. *Plant Molecular Biology*. 52: 53–68.
- Balbi V. and Lomax T.L. 2003.** Regulation of early tomato fruit development by *Diageotropica* gene. *Plant Physiology*. 131: 186–197.
- Balibrea Lara M.E., Gonzalez Garcia M.C, Fatima T., Ehneß R., Kyun Lee T., Proels R., Tanner W., Roitsch T. 2004.** Extracellular invertase is an essential component of cytokinin-mediated delay of senescence. *Plant Cell*. 16: 1276–1287.
- Ballinger D.G. and Benzer S. 1989.** Targeted gene mutations in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 86: 9402–9406.
- Balzegue S., Dubreucq B., Chauvin S., Leclainche I., Le Boulaire F., Derose R., Samson F., Biaudet Y., Lecharny A., Cruaud C., Weissenbach J., Caboche M., Lepiniec L. 2001.** Improved PCR-walking for large scale isolation of plant T-DNA borders. *Biotechniques*. 30 (3): 496–504.
- Barrero L.S., Cong B., Wu F., Tanksley S.D. 2006.** Developmental characterization of the *fasciated* locus and mapping of *Arabidopsis* candidate genes involved in the control of floral meristem size and carpel number in tomato. *Genome*. 49: 991–1006.
- Barrero L.S., Tanksley S.D. 2004.** Evaluating the genetic basis of multiple-locule fruit in a broad cross section of tomato cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*. 109 (3): 669–679.

- Barthels N., van der Lee F.M., Klap J., Goddijn O.J.M., Karimi M., Puzio P., Grundler F.M.W., Ohl S.A., Lindsey K., Robertson L., Robertson W.M., Van Montagu M., Gheysen G., Sijmons P.C. 1997.** Regulatory sequences of *Arabidopsis* drive reporter gene expression in nematode feeding structures. *Plant Cell*. 9: 2119–2134.
- Bassel G.W., Mullen R.T., Bewley J.D. 2008.** *procera* is a putative DELLA mutant in tomato (*Solanum lycopersicum*): effects on the seed and vegetative plant. *Journal of Experimental Botany*. 59 (3): 585–593.
- Baud S., Bellec Y., Miquel M., Bellini C., Caboche M., Lepiniec L., Faure J.D., Rochat C. 2004.** *gurke* and *pasticcino3* mutants affected in embryo development are impaired in acetyl-CoA carboxylase. *EMBO Reports*. 5: 515–520.
- Bellen H.J. 1999.** Ten years of enhancer detection: Lessons from the fly. *Plant Cell*. 11: 2271–2281.
- Benfey P.N. and Chua N-H. 1989.** Regulated genes in transgenic plants. *Science*. 244 (4901): 174–181.
- Bennetzen J.L., Springer P.S., Cresse A.D.; Hendrickx, M. 1993.** Specificity and regulation of the Mutator transposable element system in maize. *Critical Review in Plant Science*. 12 (1-2): 57–95.
- Bensen R.J., Johal G.S., Crane V.C., Tossberg J.T., Schnable P.S., Meeley R.B., Briggs S.P. 1995.** Cloning and characterization of the maize *An1* gene. *Plant Cell*. 7: 75–84.
- Beraldi D., Picarella M.E., Soressi G.P., Mazzucato A. 2004.** Fine mapping of the parthenocarpic fruit (pat) mutation in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*. 108: 209–216.
- Bishop G.J., Harrison K., Jones J.D.G. 1996.** The tomato *Dwarf* gene isolated by heterologous transposon tagging encodes the first member of a new cytochrome P450 family. *Plant Cell*. 8: 959–969.
- Bishop G.J., Nomura T., Yokota T., Harrison K., Noguchi T., Fujioka S., Takatsuto S., Jones J.D.G., Kamiya Y. 1999.** The tomato DWARF enzyme catalyses C-6 oxidation in brassinosteroid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 96: 1761–1766.
- Blázquez M.A. and Weigel D. 2000.** Integration of floral inductive signals in *Arabidopsis*. *Nature*. 404: 889–892.
- 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.
- Bonnema G., Hontelez J., Verkerk R., Zhang Y.Q., van Daelen R., van Kammen A., Zabel P. 1996.** An improved method of partially digesting plant megabase DNA suitable for YAC cloning: application to the construction of a 5.5 genome equivalent YAC library of tomato. *Plant Journal*. 9 (1): 125–133.
- Borevitz J.O., Xia Y., Blount J., Dixon R.A., Lamb C. 2000.** Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of Phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell*. 12: 2383–2394.
- Bouché N. and Bouchez D. 2001.** *Arabidopsis* gene knockout: phenotypes wanted. *Current Opinion in Plant Biology*. 4: 111–117
- Bouchez D. and Höfte H. 1998.** Functional genomics in plants. *Plant Physiology*. 118: 725–732.

- Bovy A.G., Angenent G.C., Dons H.J.M., van Altvorst A.C. 1999.** Heterologous expression of the *Arabidopsis etr1-1* allele inhibits the senescence of carnation flowers. *Molecular Breeding*. 5: 301–308.
- Brand A., Shirding N., Shleizer Sh., Ori N. 2007.** Meristem maintenance and compound-leaf patterning utilize common genetic mechanisms in tomato. *Planta*. 226: 941–951
- Brunaud V., Balzergue S., Dubreucq B., Aubourg S., Samson F., Chauvin S., Bechtold N., Cruaud C., DeRose R., Pelletier G., Lepiniec L., Caboche M., Lecharny A. 2002.** T-DNA integration into *Arabidopsis* genome depends on sequences of pre-insertion sites. *EMBO Reports*. 3 (12): 1152–1157.
- Budiman M.A., Mao L., Wood T.C., Wing R.A. 2000.** A deep-coverage tomato BAC library and prospects toward development of an STC framework for genome sequencing. *Genome Research*. 10: 129–136.
- Budziszewski G.J., Lewis S.P., Glover L.W., Reineke J., Jones G., Ziemnik L.S., Lonowski J., Nyfeler B., Aux G., Zhou Q., McElver J., Patton D.A., Martienssen R., Grossniklaus U., Ma H., Law M., Levin J.Z. 2001.** *Arabidopsis* genes essential for seedling viability: isolation of insertional mutants and molecular cloning. *Genetics*. 159: 1765–1778.
- Busi M. V., Bustamante C., D’Angelo C., Hidalgo-Cuevas M., Boggio S., Valle E.M., Zabaleta E. 2003.** MADS-box genes expressed during tomato seed and fruit development. *Plant Molecular Biology*. 52: 801–815.
- Busov V.B., Meilan R., Pearce D.W., Ma C., Rood S.B., Strauss S. H. 2003.** Activation tagging of a dominant gibberellin catabolism gene (*GA2-oxidase*) from poplar that regulates tree stature. *Plant Physiology*. 132: 1283–1291.
- 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. *Plant Journal*. 17(6): 699–707.
- Candela H. and Hake S. 2008.** The art design of genetic screens: maize. *Nature Reviews Genetics*. 9 (3): 192–203.
- Cara B. and Giovannoni J.J. 2008.** Molecular biology of ethylene during tomato fruit development and maturation. *Plant Science*. 175: 106–113.
- Carmi N., Salts Y., Dedicova B., Shabtai S., Barg R. 2003.** Induction of parthenocarpy in tomato via specific expression of the rolB gene in the ovary. *Planta*. 217: 726–735.
- Carroll B.J., Klimyuk V.I., Thomas C.M., Bishop G.J., Harrison K., Scofield S.R., Jones J.D.G. 1995.** Germinal transpositions of the maize element dissociation from T-DNA loci in tomato. *Genetics*. 139: 407–420.
- Casson S.A., Chilley P.M., Topping J.F., Evans I.M., Souter M.A., Lindsey K. 2002.** The *POLARIS* gene of *Arabidopsis* encodes a predicted peptide required for correct root growth and leaf vascular patterning. *Plant Cell*. 14: 1705–1721.
- Castle L.A. and Meinke D.W. 1994.** A *FUSCA* gene of *Arabidopsis* encodes a novel protein essential for plant development. *Plant Cell*. 6: 25–41.
- Castle L.A., Errampalli D., Atherton T.L., Franzmann L.H., Yoon E.S., Meink D.W. 1993.** Genetic and molecular characterization of embryonic mutants identified following seed transformation in *Arabidopsis*. *Molecular and General Genetics*. 241: 504–514.

- Chaiwongsar S., Otegui M.S., Jester P.J., Monson S.S., Krysan P.J. 2006.** The protein kinase genes MAP3Ke1 and MAP3Ke2 are required for pollen viability in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*. 48 (2): 193–205.
- Chalfun-Junior A., Franken J., Mes J.J., Marsch-Martinez N., Pereira A., Angenent G.C. 2005.** *ASYMMETRIC LEAVES2-LIKE1* gene, a member of the AS2/LOB family, controls proximal-distal patterning in *Arabidopsis* petals. *Plant Molecular Biology*. 57 (4): 559–575.
- Champagne C. and Sinha N. 2004.** Compound leaves: equal to the sum of their parts?. *Development*. 131: 4401-4412.
- Chang H., Jones M.L., Banowetz G.M., Clark D.G. 2003.** Overproduction of cytokinins in petunia flowers transformed with PSAG12-*IPT* delays corolla senescence and decreases sensitivity to ethylene. *Plant Physiology*. 132: 2174–2183.
- Chen Q.G. and Bleeker A.B. 1995.** Analysis of ethylene signal – transduction kinetics associated with seedling-growth response and chitinase induction in wild-type and mutant *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 108 (2): 597–607.
- Chen S., Jin W., Wang M., Zhang F., Zhou J., Jia Q., Wu Y., Liu F., Wu P. 2003.** Distribution and characterization of over 1000 T-DNA tags in rice genome. *Plant Journal*. 36 (1): 105–113.
- Cheng J.Ch., Seeley K.A., Sung Z.R. 1995.** *RML7* and *RML2*, *Arabidopsis* genes required for cell proliferation at the root tip. *Plant Physiology*. 107: 365-376.
- Chiang H.H., Hwang I., Goodman H.M. 1995.** Isolation of the *Arabidopsis GA4* Locus. *Plant Cell*. 7: 195–201.
- Chin H.G., Choe M.S., Lee S.H., Park S.H., Koo J. Ch, Kim N.Y., Lee J.J., Oh B.G., Yi G.H., Kim S.Ch., Choi H.Ch., Cho M.J., Han Ch-d. 1999.** Molecular analysis of rice plants harboring an Ac/Ds transposable element- mediated gene trapping system. *Plant Journal*. 19 (5): 615–623.
- Christensen C. A., King E. J., Jordan J.R., Drews G.N. 1997.** Megagametogenesis in *Arabidopsis* wild type and the *Gf* Mutant. *Sexual Plant Reproduction*. 10: 49–64.
- Cluster P.D., O'Dell M., Metzloff M., Flavell R.B. 1996.** Details of T-DNA structural organization from a transgenic *Petunia* population exhibiting co-suppression. *Plant Molecular Biology*. 32 (6): 1197–1203.
- Coen E.S. and Meyerowitz E.M. 1991.** The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature*. 353: 31- 37.
- Cong B., Barrero L.S., Tanksley S.D. 2008.** Regulatory change in YABBY-like transcription factor led to evolution of extreme fruit size during tomato domestication. *Nature Genetics*. 40 (6): 800 – 804.
- Cooley M.B., Yoder J.I., Goldsbrought A.P., Still D.W. 1996.** Site-selected insertional mutagenesis of tomato with maize *Ac* and *Ds* elements. *Molecular and General Genetics*. 252 (1-2): 184–194.
- Costantini E., Landi L., Silvestroni O., Pandolfini T., Spena A., Mezzetti B. 2007.** Auxin synthesis-encoding transgene enhances grape fecundity. *Plant Physiology* 143:1689–1694.
- Cresse A.D., Hulbert S.H., Brown W.E., Lucas J.R., Bennetzen J.L. 1995.** Mu1- related transposable elements of maize preferentially insert into low copy number DNA. *Genetics*. 140: 315–324.

- Cuzin F., Grandjean V., Rassoulzadegan M. 2008.** Inherited variation at the epigenetic level: paramutation from the plant to the mouse. *Current Opinion in Genetics and Development*. 18: 193–196.
- De Greve H., Nguyen V.K., Deboeck F., Thia-Toong L., Karimi M., Hernalsteens J.-P. 2001.** T-DNA tagging of the translation initiation factor *Eif-4A1* of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*. 161 (4): 685–693.
- Del Bosco C., Lezhneva L., Biehl A., Leister D., Strotmann H., Wanner G., Meurer J. 2004.** Inactivation of the chloroplast ATP synthase gamma subunit results in high non-photochemical fluorescence quenching and altered nuclear gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*. 279: 1060–1069.
- 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. 2003.** *UNIFLORA*, a pivotal gene that regulates floral transition and meristem identity in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *New Phytologist*. 161: 393–400.
- Dill A. and Sun T. 2001.** Synergistic Derepression of Gibberellin Signaling by Removing RGA and GAI Function in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*. 159: 777–785.
- Dong H., Deng Y., Mu J., Lu Q., Wang Y., Xu Y., Chu C., Chong K., Lu C., Zuo J. 2007.** The *Arabidopsis* Spontaneous Cell Death1 gene, encoding a  $\zeta$ -carotene desaturase essential for carotenoid biosynthesis, is involved in chloroplast development, photoprotection and retrograde signalling. *Cell Research*. 17: 458–470.
- Dooner H.K. and Belachew A. 1989.** Transposition pattern of the maize element *Ac* from the *bz-m2* (*Ac*) allele. *Genetics*. 122: 447–457.
- Dooner H.K., Keller J., Harper E., Ralston E. 1991.** Variable patterns of transposition of the maize element activator in tobacco. *Plant Cell*. 3: 473–482.
- Duca M., Port A., Orozco- Cardenas M., Lovatt C. 2008.** Gibberellin-induced gene expression associated with cytoplasmic male sterility in sunflower. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. 22 (2): 691–698.
- Eastmond P. J. 2007.** *MONODEHYDROASCORBATE REDUCTASE4* is required for seed storage oil hydrolysis and postgerminative growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 19:1376–1387.
- Ellul P., Angosto T., García-Sogo B., García-Hurtado N., Martín-Trillo M., Salinas M., Moreno V., Lozano L., Martínez-Zapater J. M. 2004.** Expression of *Arabidopsis APETALA1* in tomato reduces its vegetative cycle without affecting plant production. *Molecular Breeding*. 13: 155–163.
- Emmanuel E. and Levy A. A. 2002.** Tomato mutants as tool for functional genomics. *Current Opinion in Plant Biology*. 5:112–117.
- Enoki H, Izawa T, Kawahara M, Komatsu M, Koh S, Kyojuka J, Shimamoto K. 1999.** *Ac* as a tool for the functional genomics of rice. *Plant Journal*. 19 (5): 605–613
- Eriksson E.M., Bovy A., Manning K., Harrison L., Andrews J., De Silva J., Tucker G. A., Seymour G.B. 2004.** Effect of the *Colorless non- ripening* mutation on cell wall biochemistry and gene expression during tomato fruit development and ripening. *Plant Physiology*. 136: 4184–4197.

- Estruch J.J., Prinsen E., Van Onckelen H., Schell J., Spena A. 1991.** Viviparous leaves produced by somatic activation of an inactive cytokinin- synthesizing gene. *Science*. 254: 1364–1367.
- Farrar K., Evans M., Topping J.F., Souter M.A., Nielsen J., Lindsey K. 2003.** *EXORDIUM*– a gene expressed in proliferating cells and with a role in meristem function, identified by promoter trapping in *Arabidopsis*. *Plant Journal*. 33 (1): 61–73.
- Favaro R., Pinyopich A., Battaglia R., Kooiker M., Borghi L., Ditta G., Yanofsky M. F., Kater M.M., Colombo L. 2003.** MADS–box protein complexes control carpel and ovule development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 15: 2603–2611.
- Fedoroff N.V. and Smith D.L. 1993.** A versatile system for detecting transposition in *Arabidopsis*. *Plant Journal*. 3 (2): 273–289.
- Fehleisen S. 1967.** *Uniflora* and *conjunctiflora*: two new mutants in tomato. *Tomato Genetics Cooperative Reports*. 17: 26–28.
- Fei H., Zhang R., Pharis R.P., Sawhney V.K. 2004.** Pleiotropic effects of the *male sterile33* (*ms33*) mutation in *Arabidopsis* are associated with modifications in endogenous gibberellins, indole-3-acetic acid and abscisic acid. *Planta*. 219: 649–660.
- Feldmann K.A. 1991.** T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: mutational spectrum. *Plant Journal*. 1(1): 71–82.
- Feldmann K.A., Marks M.D., Christianson A., Quatrano R. S. 1989.** A *Dwarf* mutant of *Arabidopsis* generated by T-DNA insertion mutagenesis. *Science*. 243 1351–1354.
- Ferrario S., Immink R.G.H., Shchennikova A., Busscher–Lange J., Angenent G.C. 2003.** The MADS box gene *FBP2* is required for *SEPALLATA* function in petunia. *Plant Cell*. 15: 914–925.
- Ferrario S., Shchennikova A. V., Franken J., Immink R. G. H., Angenent G. C. 2006.** Control of floral meristem determinacy in petunia by MADS-box transcription factor. *Plant Physiology*. 140: 890–898.
- Ficcadenti N., Sestili S., Pandolfini T., Cirillo C., Rotino G. L., Spena A. 1999.** Genetic engineering of parthenocarpic fruit development in tomato. *Molecular Breeding*. 5: 463–470.
- Fobert P.R., Labbé H., Cosmopoulos J., Gottlob-McHugh S., Ouellet T., Hattori J., Sunohara G., Iyer V.N., Miki B. L. 1994.** T-DNA tagging of a seed coat-specific cryptic promoter in tobacco. *Plant Journal*. 6 (4): 567–577.
- Foolad M. R. 2007.** Genome mapping and molecular breeding of tomato. *International Journal of Plant Genomics*. 2007: 1–52.
- Forsbach A., Schubert D., Lechtenberg B., Gils M., Schmidt R. 2003.** A comprehensive characterization of single–copy T-DNA insertions in the *Arabidopsis thaliana* genome. *Plant Molecular Biology*. 52 (1): 161–176.
- Fos M., Nuez F., Garcia–Martinez J.L. 2000.** The gene *pat-2*, which induces natural parthenocarpy, alters the gibberellin content in unpollinated tomato ovaries. *Plant Physiology*. 122: 471–480.
- Fos M., Proano K., Nuez F., Garcia–Martinez J.L. 2001.** Role of gibberellins in parthenocarpic fruit development induced by the genetic system *pat-3/pat-4* in tomato. *Physiologia Plantarum*. 111: 545–550.

- Franzman L.H., Yoon E.S., Meinke D. W. 1995.** Saturating the genetic map of *Arabidopsis thaliana* with embryonic mutations. *Plant Journal*. 7 (2): 341–350.
- Frary A., Fritz L.A., Tanksley S.D. 2004.** A comparative study of the genetic bases of natural variation in tomato leaf, sepal, and petal morphology. *Theoretical Applied Genetics*. 109: 523–533.
- Frary A., Nesbitt T.C., Frary A., Grandillo S., van der Knaap E., Cong B., Liu J., Meller J., Elber R., Alpert K.B., Tanksley S.D. 2000.** *fw2.2*: A quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science*. 289: 85–88.
- Frey M., Stettner C., Gierl A. 1998.** A general method for gene isolation in tagging approaches: amplification of insertion mutagenised sites (AIMS). *Plant Journal*. 13 (5): 717–721.
- Frick G., Su Q., Apel K., Armstrong G.A. 2003.** An *Arabidopsis porB porC* double mutant lacking light dependent NADPH:protochlorophyllide oxidoreductases B and C is highly chlorophyll-deficient and developmentally arrested. *Plant Journal*. 35 (2): 141–153.
- Frugis G, Giannino D, Mele G, Nicolodi C, Innocenti AM, Chiappetta A, Bitonti MB, Dewitte W, Van Onckelen H, Mariotti D. 1999.** Are homeobox *Knotted*-like genes and cytokinins the leaf architects?. *Plant Physiology*. 119: 1–3.
- Fu X., Duc L.T., Fontana S., Bong B.B., Tinjuangjun P., Sudhakar D., Twyman R. M., Christou P., Kohli A. 2000.** Linear transgene constructs lacking vector backbone sequences generate low-copy-number transgenic plant with simple integration patterns. *Transgenic Research*. 9 (1): 11–19.
- Fujioka Sh. and Yokota T. 2003.** Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Annual Review of Plant Biology*. 54: 137–164.
- Furini A., Koncz C., Salamini F., Bartels D. 1997.** High level transcription of a member of a repeated gene family confers dehydration tolerance to callus tissue of *Craterostigma plantagineum*. *EMBO Journal*. 16: 3599–3608.
- Gan S. and Amasino R.M. 1995.** Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science*. 270 (5244): 1986–1988.
- Gan S. and Amasino R.M. 1997.** Making sense of senescence (Molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence). *Plant Physiology*. 113 (2): 313–319.
- García-Martínez J.L., Santes C, Croker S, Hedden P. 1991.** Identification, quantitation and distribution of gibberellins in fruits of *Pisum sativum* L. cv. Alaska during pod development. *Planta*. 184: 53–60
- García-Martínez J.L. and Hedden P. 1997.** Gibberellins and fruit development. In: FA Toma's-Barbera'n, RJ Robins, eds, *Phytochemistry of Fruit and Vegetables*. Clarendon Press, Oxford, pp 263–286.
- Gaspar T., Franck T., Bisbis B., Kevers C., Jouve L., Hausman J.F., Dommès J. 2002.** Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation*. 37: 263–285.
- Gasser Ch.S., Winter J.A., Hironaka C.M., Shah D.M. 1988.** Structure, expression, and evolution of the 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase genes of *Petunia* and *Tomato*. *Journal of Biological Chemistry*. 263 (9): 4280–4289.

- Ge X., Wang H., Cao K. 2008.** Transformation by T-DNA integration causes highly sterile phenotype independent of transgenes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Report*. 27:1341–1348.
- Georgiev H. 1991.** Heterosis in tomato breeding. In: Kalloo G (Ed), Genetic Improvement of Tomato. Monograph on Theor Appl Genet 14. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 83–98.
- Gerster H. 1997.** The potential role of lycopene for human health. *Journal of the American College of Nutrition*. 16 (2): 109–126.
- Gidoni D., Fuss E., Burbidge A., Speckmann G-J., James S., Nijkamp D. Mett A. Feiler J, Smoker M., Vroomen M.J, Leader D. Liharska T., Groenendijk J., Coppoolse E., Smit J.J.M., Levin I., Both M., Schuch W., Jones J.D.G., Taylor I.B., Theres K., Haaren M.J.J. 2003.** Multi-functional T-DNA/Ds tomato lines designed for gene cloning and molecular and physical dissection of the tomato genome. *Plant Molecular Biology*. 51: 83–98.
- Giliberto L., Perrotta G., Pallara P., Weller J.L., Fraser P.D., Bramley P.M., Fiore A., Tavazza M., Giuliano G. 2005.** Manipulation of the Blue Light Photoreceptor Cryptochrome 2 in tomato affects vegetative development, flowering time, and fruit antioxidant content. *Plant Physiology*. 137: 199–208.
- Gillaspy G., Ben–David H., Gruissem W. 1993.** Fruits: A developmental perspective. *Plant Cell*. 5: 1439–1451.
- Gilliland L.U., Pawloski L.C., Kandasamy M.K., Meagher R.B. 2003.** *Arabidopsis* actin gene *ACT7* plays an essential role in germination and root growth. *Plant Journal*. 33 (2): 319–328.
- Giovannoni J.J. 2004.** Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell*. 16: 170–180.
- Giovannoni J.J. 2007.** Fruit ripening mutants yield insights into ripening control. *Current Opinion in Plant Biology*. 10 (3): 283–289.
- Giovannucci E. and Clinton S.K. 1998.** Tomato, lycopene and prostate cancer. *Proceeding of the Society Experimental Biology and Medicine*. 218 (2): 129 -139.
- Glover J.A., Blömer K.C., Farrell L.B., Chaudhury A.M., Dennis E. S. 1996.** Searching for tagged male-sterile mutants of *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology Reporter*. 14 (4): 330–342.
- Goff S.A., Ricke D., Lan T.H., Presting G., Wang R., Dunn M., Glazebrook J., Sessions A., Oeller P., Varma H., Hadley D., Hutchison D., Martin Ch, Katagiri F., Lange B.M., Moughamer T., Xia Y., Budworth P., Zhong J., Miguel T., Paszkowski U., Zhang Sh., Colbert M., Sun W-l, Chen L., Cooper B., Park S., Wood T. Ch., Mao L., Quail P., Wing R., Dean R., Yu Y., Zharkikh A., Shen R., Sahasrabudhe S., Thomas A., Cannings R., Gutin A., Pruss D., Reid J., Tavtigian S., Mitchell J., Eldredge G., Scholl T., Miller R. M., Bhatnagar S., Adey N., Rubano T., Tusneem N., Robinson R., Feldhaus J., Macalma T., Oliphant A., Briggs S. 2002.** A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science*. 296 (5565): 92–100.
- Goldsbrough A.P., Tong Y., Yoder J.I. 1996.** *Lc* as a non-destructive visual reporter and transposition excision marker gone for tomato. *Plant Journal*. 9 (6): 927–933.
- Gómez P., Jamilena M., Capel J., Zurita S., Angosto T., Lozano R. 1999.** *Stamenless*, a tomato mutant with homeotic conversions in petals and stamens. *Planta*. 209: 172–179.

- Good X., Kellogg J.A., Wagoner W., Langoff D., Matsumura W., Bestwick R.K. 1994.** Reduced ethylene synthesis by transgenic tomatoes expressing S-adenosylmethionine hydrolase. *Plant Molecular Biology*. 26: 781–90.
- Gorguet B., Schipper D., van Heusden A.W., Lindhout P. 2006.** High-resolution fine mapping of *ps-2*, a mutated gene conferring functional male sterility in tomato due to non-dehiscent anthers. *Theoretical and Applied Genetics* 113: 1437–1448.
- Gorguet B., Van Heusden A.W., Lindhout P. 2005.** Parthenocarpic fruit development in tomato. *Plant Biology*. 7(2): 131–139.
- Grant J.J., Chini A., Basu D., Loake G.L. 2003.** Targeted activation tagging of the *Arabidopsis* *NBS-LRR* gene, *ADRI*, conveys resistance to virulent pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 16 (8): 669–680.
- Greb T., Clarenz O., Schäfer E., Müller D., Herrero R., Schmitz G., Theres K. 2003.** Molecular analysis of the *LATERAL SUPPRESSOR* gene in *Arabidopsis* reveals a conserved control mechanism for axillary meristem formation. *Genes and Development*. 17: 1175–1187.
- Greco R., Ouwerkerk P.B.F, Sallaud C., Kohli A., Colombo L., Puigdomènech P., Guiderdoni E., Christou P., Hoge J.H.C., Pereira A. 2001.** Transposon insertional mutagenesis in rice. *Plant Physiology*. 125: 1175–1177.
- Greenblatt I.M. 1984.** A chromosome replication pattern deduced from pericarp phenotypes resulting from movements of the transposable element, modulator, in maize. *Genetics*. 108: 471–485.
- Groover A., Fontana J. R., Dupper G., Ma C., Martienssen R., Strauss S., Meilan R. 2004.** Gene and enhancer trap tagging of vascular-expressed genes in poplar trees. *Plant Physiology*. 134: 1742–1751.
- Grossniklaus U., Bellen H.J., Wilson C., Gehring W. J. 1989.** P-element-mediated enhancer detection applied to the study of oogenesis in *Drosophila*. *Development*. 107 (2): 189–200.
- Gu, Q., Ferrándiz, C., Yanofsky, M.F., Martienssen, R. 1998.** The *FRUITFULL* MADS-box gene mediates cell differentiation during *Arabidopsis* fruit development. *Development*. 125: 1509–1517.
- Guo Y. and Gan S. 2006.** *AtNAP*, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence. *Plant Journal*. 46 (4): 601–612.
- Hackett R.M., Ho Ch. W., Lin Z., Foote H.C.C., Fray R.G., Grierson D. 2000.** Antisense inhibition of the *Nr* gene restores normal ripening to the tomato *Never-ripe* mutant, consistent with the ethylene receptor-inhibition model. *Plant Physiology*. 124: 1079–1085.
- Hajouj T., Michelis R., Gepstein Sh. 2000.** Cloning and characterization of a receptor-like protein kinase gene associated with senescence. *Plant Physiology*. 124: 1305–1314.
- Hake S., Smith H.M.S., Holtan H., Magnani E., Mele G., Ramirez J. 2004.** The role of *KNOX* genes in plant development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 20: 125–151.
- Hamilton A.J. and Baulcombe D.C. 1999.** A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*. 286 (5441): 950–952.
- Hareven D., Gutfinger T., Parnis A., Eshed Y., Lifschitz E. 1996.** The making of a compound leaf: genetic manipulation of leaf architecture in tomato. *Cell*. 84 (5):735–744.

- Harrison E.J., Bush M., Plett J.M., McPhee D.P., Vitez R. O, Malley B., Sharma V., Bosnich W., Seguin A., MacKay J. 2007. Diverse developmental mutants revealed in an activation-tagged population of poplar *Canadian Journal of Botany*. 85 (11): 1071-1081.
- Haseloff J., Siemering K.R., Prasher D.C., Hodge S. 1997. Removal of cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 94 (6): 2122–2127.
- Hay A., Craft J., Tsiantis M. 2004. Plant hormones and homeoboxes: bridging the gap?. *Bioessays*. 26: 395–404.
- Hay A., and Tsiantis M. 2006. The genetic basis for differences in leaf form between *Arabidopsis thaliana* and its wild relative *Cardamine hirsute*. *Nature Genetics*. 38: 942–947.
- Hay, A., Kaur, H., Phillips, A., Hedden, P., Hake, S. and Tsiantis, M. 2002. The gibberellin pathway mediates KNOTTED1-type homeobox function in plants with different body plans. *Current Biology*. 12: 1557–1565.
- Hayashi H., Czaja I., Lubenow H., Schell J., Walden R. 1992. Activation of a plant gene by T-DNA tagging: auxin-independent growth *in vitro*. *Science*. 258 (5086): 1350–1353.
- He Y., Tang W., Swaim J.D., Green A.L., Jack T.P., Gan S. 2001. Networking senescence-regulating pathways by using *Arabidopsis* enhancer trap lines. *Plant Physiology*. 126: 707–716.
- Hedden P. and Kamiya Y. 1997. Gibberellin biosynthesis: enzymes, genes and their regulation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 48: 431–460.
- Hehl R. and Baker B. 1990. Properties of the maize transposable element activator in transgenic tobacco plants: a versatile inter-species genetic tool. *Plant Cell*. 2: 709–721.
- Herman L., Jacobs A., Montagu M.V., Depicker A. 1990. Plant chromosome/marker gene fusion assay for study of normal and truncated T-DNA integrations events. *Molecular and General Genetics*. 224 (2): 248–256.
- Hewelt A., Prinsen E., Thomas M., Van Onckelen H., Meins F.Jr. 2000. Ectopic expression of maize *knotted1* results in the cytokinin-autotrophic growth of cultured tobacco tissues. *Planta*. 210: 884–889.
- Hirayama T., Kieber J.J., Hirayama N., Ecker J.R. 1999. *Responsive-to-antagonist1*, a Menkes/Wilson disease-related copper transporter, is required for ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Cell*. 97: 383–93.
- Hirochika H., Guiderdoni E., An G., Hsing Y., Eun M. Y., Han Ch-d., Upadhyaya N., Ramachandran S., Zhang Q., Pereira A., Sundaresan V., Leung H. 2004. Rice mutant resource from gene discovery. *Plant Molecular Biology*. 54 (3): 325–334.
- Hirochika H., Sugimoto K., Otsuki Y., Tsugawa H., Kanda M. 1996. Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 93: 7783–7788.
- Hofer J., Turner L., Hellens R., Ambrose M., Matthews P. 1997. *UNIFOLIATA* regulates leaf and flower morphogenesis in pea. *Current Biology* 7: 581–587.
- Hofer J.M.I., Gourelay C.W., Ellis T.H.N. 2001. Genetic control of leaf morphology: a partial view. *Annals of Botany*. 88: 1129–1139.

- Holtorf H., Guitton M-C., Reski R. 2002.** Plant functional genomics. *Naturwissenschaften*. 89: 235–249.
- Honma M. and Shimomura T. 1978.** Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Agricultural and Biological Chemistry*.43:1825– 1831.
- Howden R., Park S.K., Moore J.M., Orme J., Grossniklaus U., Twell D. 1998.** Selection of T-DNA-tagged male and female gametophytic mutants by segregation distortion in *Arabidopsis*. *Genetics*. 149: 621–631.
- Hueros G. and Jouve N. 2002.** Genómica funcional en plantas. En: Genómica y Mejora Vegetal. Junta de Andalucía, Ediciones Mundi Prensa D.L. (Sevilla, España). pp 331 – 364.
- Hsing Y. I., Chern Ch. G., Fan M. J., Lu P. Ch., Chen K.-T., Lo Sh.F., Sun P.K., Ho Sh.L., Lee K.W., Wang Y.Ch., Huang W.L., Ko S.S., Chen Sh., Chen J.L., Chung Ch., Lin Y.Ch., Hour A.L., Wang Y.W., Chang Y.Ch., Tsai M.W., Lin Y.Sh., Chen Y.Ch., Yen H.M., Li Ch.P., Wey Ch.K., Tseng Ch.Sh., Lai M.H., Huang Ch.Sh., Chen L.J., Yu S.M. 2007.** A rice gene activation/knockout mutant resource for high throughput functional genomics. *Plant Molecular Biology*. 63 (3): 351 – 364.
- Huang L.Ch., Lai U.L., Yang S.F., Chu M.J., Kuo Ch.I., Tsai M.F., Sun Ch.W. 2007.** Delayed flower senescence of *Petunia hybrida* plants transformed with antisense broccoli *ACC synthase* and *ACC oxidase* genes. *Postharvest Biology and Technology*. 46: 47–53.
- Huang S., Cerny R.E., Qi Y.L., Bhat D., Aydt C.M., Hanson D.D., Malloy K.P., Ness L.A. 2003.** Transgenic studies on the involvement of cytokinin and gibberellin in male development. *Plant Physiology*. 131: 1270–1282.
- Ihnatowicz A., Pesaresi P., Varotto C., Richly E., Schneider A., Jahns P., Salamini F., Leister D. 2004.** Mutants for photosystem I subunit D of *Arabidopsis thaliana*: effects on photosynthesis, photosystem I stability and expression of nuclear genes for chloroplast functions. *Plant Journal*. 37 (6): 839–852.
- Imaizumi R., Sato S., Kameya N., Nakamura I., Nakamura Y., Tabata S., Ayabe Sh., Aoki T. 2005.** Activation tagging approach in a model legume, *Lotus japonicus*. *Journal of Plant Research*. 118 (6): 391–399.
- Immink R.G.H., Hannapel D.J., Ferrario S., Busscher M., Franken J., Lookeren Campagne M.M., Angenent G.C. 1999.** A petunia MADS box gene involved in the transition from vegetative to reproductive development. *Development*. 126: 5117–5126.
- Iwakawa H., Shinmyo A., Sekine M. 2006.** *Arabidopsis* CDKA<sub>1</sub>, a cdc2 homologue, controls proliferation of generative cells in male gametogenesis. *Plant Journal*. 45 (5): 819–831.
- Jain M.G., Hislop G.T., Howe G.R., Ghadirian P. 1999.** Plant foods, antioxidants, and prostate cancer risk: findings from case-control studies in Canada. *Nutrition and Cancer*. 34 (2): 173–184.
- Jain S.M. 2001.** Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica*. 118: 153–166.
- 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: 771–786.
- Jefferson J.S., Kavanagh T.A., Bevan M.W. 1987.** GUS fusions: β- Glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal*. 6:3901–3907.
- Jeon J.S., Lee S., Jung K.H., Jun S.H., Jeong D.H., Lee J., Kim Ch., Jang S., Lee Sh., Yang K., Nam J., An K., Han M.- J., Sung R.J., Choi H. S., Yu J.H., Choi J.H., Cho S.Y., Cha**

- S.S., Kim ShI., An G. 2000.** T-DNA insertional mutagenesis for functional genomics in rice. *Plant Journal*. 22 (6): 561- 570.
- Jeong D.H. , An S., Kang H.G., Moon S., Han J.J., Park S., Lee H.S., An K., An G. 2002.** T-DNA insertional mutagenesis for activation tagging in rice. *Plant Physiology*. 130: 1–9.
- Jiménez–Gomez J.M., Alonso–Blanco C., Borja A., Anastasio G., Angosto T., Lozano R., Martínez–Zapater J.M. 2007.** A quantitative genetic analysis of flowering time in tomato. *Genome*. 50: 303–315.
- Jing H.Ch., Sturre M.J.G., Hille J., Dijkwel P.P. 2002.** *Arabidopsis* onset of leaf death mutants identify a regulatory pathway controlling leaf senescence. *Plant Journal*. 32 (1): 51–63.
- Jofuku K.D., Boer B.G.V., Van Montagu M., Okamoto J.K. 1994.** Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene *APETALA2*. *Plant Cell*. 6: 1211–1225.
- John I., Drake R., Farrell A., Cooper W., Lee P., Horton P., Grierson D. 1995.** Delayed leaf senescence in ethylene-deficient ACC oxidase antisense tomato plants: molecular and physiological analysis. *Plant Journal*. 7 (3): 483–490.
- Johnson A.A.T., Hibberd J.M., Gay C., Essah P.A., Haseloff J., Tester M., Guiderdoni E. 2005.** Spatial control of transgene expression in rice (*Oryza sativa* L.) using the *GAL 4* enhancer trapping system. *Plant Journal*. 41 (5): 779–789.
- Jones D.A., Thomas C.M., Hammond-Kosack K.E., Balint- Kurti P.J., Jones J.D.G. 1994.** Isolation of the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science*. 266: 789–792.
- Jones M.G. 1987.** Gibberellins and the *procera* mutant of tomato. *Planta*. 172 (2): 280–284.
- Jones J.D.G, Carland F., Lim E., Ralston E., Dooner H.K. 1990.** Preferential transposition of the maize element activator to linked chromosomal locations in tobacco. *Plant Cell*. 2: 701–701.
- Jung K.H., Lee J., Dardick Ch., Seo Y.S., Cao P., Canlas P., Phetsom J., Xu X., Ouyang Sh., An K., Cho Y.J., Lee G.Ch, Lee Y., An G., Ronald P.C. 2008.** Identification and functional analysis of light-responsive unique genes and gene family members in rice. *Plos Genetics*. 4 (8): 1–19.
- Jupe S.C., Causton D.R., Scott I.M. 1988.** Cellular basis of the effects of gibberellin and the *pro* gene on stem growth in tomato. *Planta*. 174: 106–111.
- Kaiser K. and Goodwin S.F. 1990.** “Site–selected” transposon mutagenesis of *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 87 (5): 1686–1690.
- Kano-Murakami Y., Yanaib T., Tagirib A., Matsuokab M. 1993.** A rice homeotic gene, *OSHI*, causes unusual phenotypes in transgenic tobacco. *FEBS*. 334 (3): 365–368.
- Kato K., Ohta K., Somata Y., Araki T., Kanahama K., Kanayama Y. 2005.** Morphological and molecular analyses of the tomato floral mutant *leafy inflorescence*, a new allele of *falsiflora*. *Plant Science*. 169: 131–138.
- Keddie J.S., Carrol B., Jones J.D.G., Gruissem W. 1996.** The *DCL* gene of tomato is required for chloroplast development and palisade cell morphogenesis in leaves. *EMBO Journal*. 15: 4208–4217.
- Keddie J.S., Carrol B.J., Thomas C.M., Reyes M.E. KlimyuknVI., Holtan H., Gruissem W., Jones J.D. 1998.** Transposon tagging of the *Defective embryo and meristems* gene of tomato. *Plant Cell*. 10: 877–888.

- Keller J., Lim E., Dooner H.K. 1993.** Preferential transposition of *Ac* to linked sites in *Arabidopsis*. *Theoretical and Applied Genetics*. 86 (5): 585–588.
- Kerr E.A. 1982.** *Single flower truss 'sft'* appears to be on chromosome 3. *Tomato Genetics Cooperative Reports*. 32: 31.
- Kertbundit S., De Greve H., Deboeck F., Van Montagu M., Hernalsteens J.-P. 1991.** *In-vivo* random b-glucuronidase gene fusions in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 88: 5212–5216.
- Kessler S. and Sinha N. 2004.** Shaping up: the genetic control of leaf shape. *Current Opinion in Plant Biology*. 7:65–72.
- Kiegle E., Moore C.A., Haseloff J., Tester M.A., Knight M.R. 2000.** Cell-type-specific calcium responses to drought, salt and cold in the *Arabidopsis* root. *Plant Journal*. 23 (2): 267–278.
- Kim M., Pham T., Hamidi A., McCormick Sh, Kuzoff R. K., Sinha N. 2003.** Reduced leaf complexity in tomato wiry mutants suggests a role for *PHAN* and *KNOX* genes in generating compound leaves. *Development*. 130: 4405–4415.
- Kim H. U., van Oostende C., Basset G.J.C., Browse J. 2008.** The *AAE14* gene encodes the *Arabidopsis* o- succinylbenzoyl-CoA ligase that is essential for phyloquinone synthesis and photosystem – I function. *Plant Journal*. 54 (2): 272–283.
- Kimura S., Koenig D., Kang J. Yoong F. Y, Sinha N. 2008.** Natural variation in leaf morphology results from mutation of a novel *KNOX* gene. *Current Biology*. 18: 672–677.
- Kinet J.M. and Peet M.M. 1997.** Tomato. In: *The Physiology of Vegetable Crops*, H. C. Wien, ed. (Wallingford, UK: Commonwealth Agricultural Bureau (CAB) International). pp 207–258.
- Kirik V., Simon M., Huelskamp M., Schiefelbein J. 2004.** The *ENHANCER OF TRY AND CPC1* gene acts redundantly with *TRYPTYCHON* and *CAPRICE* in trichome and root hair cell patterning in *Arabidopsis*. *Developmental Biology*. 268: 506–513.
- Klee H. and Tieman D. 2002.** The tomato ethylene receptor gene family. *Physiologia Plantarum*. 115 (3): 336–341.
- Klimyuk V.I., Nussaume L., Harrison K., Jones J.D.G. 1995.** Novel GUS expression patterns following transposition of enhancer trap *Ds* element in *Arabidopsis*. *Molecular and General Genetics*. 249 (4): 357–365.
- Klucher K.M., Chow H., Reiser L., Fisher R.L. 1996.** The *AINTEGUMENTA* gene of *Arabidopsis* required for ovule and female gametophyte development is related to the floral homeotic gene *APETALA2*. *Plant Cell*. 8: 137–153.
- Ko S. and Kamada H. 2002.** Enhancer–trapping system for somatic embryogenesis in carrot. *Plant Molecular Biology Reporter*. 20: 421a–421j.
- Koes R., Souer E., van Houwelingen A., Mur L., Spelt C., Quattrocchio F., Wing J., Oppedijk B., Ashmed S., Maes T. 1995.** Targeted gene inactivation in petunia by PCR-based selection of transposon insertion mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 92 (18): 8149–8153.
- Koka C.V., Cerny R.E., Gardner R.G., Noguchi T., Fujioka S., Takatsuto S., Yoshida S., Clouse S.D. 2000.** A putative role for the tomato genes *DUMPY* and *CURL-3* in brassinosteroid biosynthesis and response. *Plant Physiology*. 122: 85–98.

- Kolesnik T., Szeverenyi I., Bachmann D., Kumar C.S., Jiang S., Ramamoorthy R., Cai M., Ma Z.G., Sundaresan V., Ramachandran S. 2004.** Establishing an efficient *Ac/Ds* tagging system in rice: large-scale analysis of *Ds* flanking sequences. *Plant Journal*. 37 (2): 301–314.
- Komari T. 1990.** Genetic characterization of a double-flowered tobacco plants obtained in a transformation experiment. *Theoretical and Applied Genetics*. 80: 167–171.
- Koncz C., Martini N., Mayerhofer R., Koncz-Kalman Z., Körber H., Redei G.P., Schell J. 1989.** High-frequency T-DNA-mediated gene tagging in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 86: 8467–8471.
- Kononov M.E., Bassuner B., Gelvin S.B. 1997.** Integration of T-DNA binary vector “Backbone” sequences into the tobacco genome: evidence for multiple complex patterns of integration. *Plant Journal*. 11 (5): 945–957.
- Koornneef M., Bosma T.D.G., Hanhart C.J., van der Veen J.H., Zeevaart J.A.D. 1990.** The isolation and characterization of gibberellin-deficient mutants in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*. 80: 852–857.
- Kotake-Nara E., Kushiro M., Zhang H., Sugawara T., Miyashita K., Nagao A. 2001.** Carotenoids affect proliferation of human prostate cancer cells. *Journal of Nutrition*. 131: 3303–3306.
- Krysan P.J., Young J.C., Tax F., Sussman M.R. 1996.** Identification of transferred DNA insertions within *Arabidopsis* genes involved in signal transduction and ion transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 93: 8145–8150.
- Krysan P.J., Young J.C., Sussman M.R. 1999.** T-DNA as an Insertional Mutagen in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 11: 2283–2290.
- Kubo H., Peeters A.J., Aarts M.G., Pereira A., Koornneef M. 1999.** *ANTHOCYANINLESS2*, a homeobox gene affecting anthocyanin distribution and root development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 11: 1217–1226.
- Kumar A., Taylor M.A., Mas S.A., Davies H.V. 1996.** Potatos plants expressing antisense and sense *S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC)* transgenes show altered levels of polyamines and ethylene: antisense plants display abnormal phenotypes. *Plant Journal*. 9 (2): 147–158.
- Kuroda H. and Maliga P. 2003.** The plastid clpP1 protease gene is essential for plant development. *Nature*. 425: 86–89.
- Kusaba S., Kano-Murakami Y., Matsuoka M., Tamaoki M., Sakamoto T., Yamaguchi I., Fukumoto M. 1998.** Alteration of hormone levels in transgenic tobacco plants overexpressing a rice homeobox gene *OSH1*. *Plant Physiology*. 116: 471–476.
- Lanfermeijer F.C., Dijkhuis J., Sturre M.J.G., de Hann P., Hille J. 2003.** Cloning and characterization of the durable tomato mosaic virus resistance gene *Tm2<sup>2</sup>* from *Lycopersicon esculentum*. *Plant Molecular Biology*. 52 (5): 1039–1051.
- Lashbrook C.C., Tieman D.M., Klee H.J. 1998.** Differential regulation of the tomato *ETR* gene family throughout plant development. *Plant Journal*. 15 (2): 243–252.
- Laufs P., Autran D., Traas J.,A. 1999.** Chromosomal paracentric inversion associated with T-DNA integration in *Arabidopsis*. *Plant Journal*. 18 (2): 131–139.
- Leclercq J., Adams-Phillips L., Zegzouti H., Jones B., Latche´ A., Giovannoni J.J., Pech J.C., Bouzayan M. 2002.** *LeCTR1*, a tomato CTR1-like gene, demonstrates ethylene signaling

- ability in *Arabidopsis* and novel expression patterns in tomato. *Plant Physiology*. 130: 1132–1142.
- LeClere S. and Bartel B. 2001.** A library of *Arabidopsis* 35S-cDNA lines for identifying novel mutants. *Plant Molecular Biology*. 46 (6): 695–703.
- Lee C.Y., Agrawal D.C., Wang C.S., Yu S.M., Chen J.J., Tsay H.S. 2008.** T-DNA activation tagging as a tool to isolate *Salvia miltiorrhiza* transgenic lines for higher yields of tanshinones. *Plant Medicine*. 74 (7): 780–786.
- Lee M. and Phillips R.L. 1988.** Chromosomal basis of somaclonal variation. *Annual Review of Plan Physiology and. Plant Molecular Biology*. 39: 413–437.
- Lee M.K., Kim H.S., Kim J.S., Kim S.H., Park Y.D. 2004.** *Agrobacterium* mediated transformation system for large-scale production of transgenic Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp *pekinensis*) plants for insertional mutagenesis. *Journal of Plant Biology*. 47: 300–306.
- Lee S., Jung K.H., An G., Chung Y.Y. 2004.** Isolation and characterization of a rice cysteine protease gene, OsCP1, using T-DNA gene-trap system. *Plant Molecular Biology*. 54: 755–765.
- Lee S.C., Cheng H., King K.E., Wang W., HeY., Hussain A., Lo J., Harberd N.P., Peng J.R. 2002.** Gibberellin regulates *Arabidopsis* seed germination via *RGL2*, a *GAI/RGA-like* gene whose expression is upregulated following imbibition. *Genes and Development*. 16: 646–658.
- Lelievre J.M., Latche A., Jones B., Bouzyen M., Pech J.C. 1997.** Ethylene and fruit ripening. *Physiologia Plantarum*. 101 (4): 727-739.
- Levy M., Wang Q., Kaspi R., Parrella M.P., Abel S. 2005.** *Arabidopsis* IQD1, a novel calmodulin-binding nuclear protein, stimulates glucosinolate accumulation and plant defense. *Plant Journal*. 43 (1): 79–96.
- Lezhneva L., Amann K., Meurer, J. 2004.** The universally conserved HCF101 protein is involved in assembly of [4Fe-4S]-cluster containing complexes in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *Plant Journal*. 37 (2): 174–185.
- Li X., Gan R., Li P.L., Ma Y.Y., Zhang L.W., Zhang R., Wang Y., Wang N.N. 2006.** Identification and functional characterization of a leucine-rich repeat receptor-like kinase gene that is involved in regulation of soybean leaf senescence. *Plant Molecular Biology*. 61:829–844.
- Li X., Qin G., Chen Z., Gu H., Qu L. 2008.** A gain-of-function mutation of transcriptional factor PTL results in curly leaves, dwarfism and male sterility by affecting auxin homeostasis. *Plant Molecular Biology*. 66: 315–327.
- Lifschitz E. and Eshed Y. 2006.** Universal florigenic triggered by *FT* homologues regulate growth and flowering cycles in perennial day – neutral tomato. *Journal of Experimental Botany*. 57: 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*. 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: 766–770.
- Lincoln C., Long J., Yamaguchi J., Serikawa K., Hake S. 1994.** A *knotted1*-like homeobox gene in *Arabidopsis* is expressed in the vegetative meristem and dramatically alters leaf morphology when overexpressed in transgenic plants. *Plant Cell*. 6: 1859–1876.
- Lindsey K., Wei, W., Clarke M.C., McArdle H.F., Rooke L.M., Topping J.F. 1993.** Tagging genomic sequences that direct transgene expression by activation of a promoter trap in plants. *Transgenic Research*. 2: 33–47.
- Linnaeus C. 1753.** *Species Plantarum*. Holmiae. Stockholm, Sweden, 1<sup>st</sup> edition.
- Liu J., Van Eck J., Cong B., Tanksley S.D. 2002.** A new class of regulatory genes underlying the cause of pear-shaped tomato fruit. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 99 (20): 13302–13306.
- Lohmann J.U., Hong R.L., Hobe M., Busch M.A., Parcy F., Simon R., Weigel D. 2001.** Molecular link between stem cell regulation and floral patterning in *Arabidopsis*. *Cell*. 105: 793–803.
- 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: 91–100.
- Lozano R., Giménez E., Cara B., Capel J., Angosto T. 2008.** Developmental genetics of tomato, a model species in plant biology. *Journal of Integrative Plant Biology*. (Accepted).
- Lukyanenko A.N. 1991.** Parthenocarpy in tomato. In Genetic Improvement of Tomato, Monographs on Theoretical and Applied Genetics 14, G Kaloo, ed. (Berlin: Springer-Verlag). pp. 167–178.
- Luo K., Deng W., Xiao Y., Zheng X., Li Y., Pei Y. 2006.** Leaf senescence is delayed in tobacco plants expressing the maize *knotted1* gene under the control of a wound-inducible promoter. *Plant Cell Report*. 25: 1246–1254.
- Malamy J.E. and Benfey P.N. 1997.** Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development*. 124: 33–44.
- Malayer J.C. and Guard A.T. 1964.** A comparative developmental study of the mutant *sideshootless* and normal tomato plants. *American Journal of Botany*. 51: 140–143.
- Manning K., Tör M., Poole M., Hong Y., Thompson A., King G.J., Giovannoni J.J., Seymour G.B. 2006.** A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. *Nature Genetics*. 38: 948 - 952.
- Mao L., Begum D., Chuang H.W., Budiman M.A., Szymkowiak E.J., Irish E.E., Wing R.A. 2000.** *JOINTLESS* is a MADS-box gene in tomato controlling flower abscission zone development. *Nature*. 406: 910–913.
- Marsch-Martinez N., Greco R., Van Arkel G., Herrera-Estrella L., Pereira A. 2002.** Activation tagging using the *En-1* maize transposon system in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 129: 1544–1556.
- Martí C., Orzáez D., Ellul P., Moreno V., Carbonell J., Granell A. 2007.** Silencing of DELLA induces facultative parthenocarpy in tomato fruits. *Plant Journal*. 52 (5): 865–876.

- 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. *Plant Cell*. 15: 1689–1703.
- 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. *Plant Cell*. 15: 1689–1703.
- Matsukura Ch., Yamaguchi I., Inamura M., Ban Y., Kobayashi Y., Yin Y, Saito T., Kuwata Ch, Imanishi Sh., Nishimura Sh. 2007.** Generation of gamma irradiation- induced mutant lines of the miniature tomato (*Solanum lycopersicum L.*) cultivar “Micro-Tom”. *Plant Biotechnology*. 24: 39–44.
- Mazzucato A., Taddei A.R., Soressi G.P. 1998.** The parthenocarpic fruit (pat) mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum Mill.*) sets seedless fruits and has aberrant anther and ovule development. *Development*. 125: 107–114.
- McCabe M.S., Garratt L.C., Schepers F., Jordi W.J.R.M., Stoopen G.M., Davelaar E., van Rhijn J.H.A., Power J.B., Davey M.R. 2001.** Effects of PSAG12-*IPT* gene expression on development and senescence in transgenic lettuce. *Plant Physiology*. 127: 505–516.
- McKinney E.C., Ali N., Traut A., Feldman K.A., Belostotsky D.A., McDowel J.M., Meagher R.B. 1995.** Sequence-based identification of T-DNA insertion mutations in *Arabidopsis*: actin mutants *act2-1* and *act4-1*. *Plant Journal*. 8 (4): 613–622.
- McNevin J.P., Woodward W., Hannoufa A., Feldmann K.A., Lemieux B. 1993.** Isolation and characterization of *eceriferum* (*cer*) mutants induced by T-DNA insertions in *Arabidopsis thaliana*. *Genome*. 36: 610–618.
- Meinke D.W. 1985.** Embryo-lethal mutants of *A. thaliana*: analysis of mutants with a wide range of lethal phases. *Theoretical and Applied Genetics*. 69: 543–552.
- Meinke D.W., Franzman L.H., Nickle T.C., Yeung E.C. 1994.** Leafy cotyledon mutants in *Arabidopsis*. 6 (8): 1049–1064.
- Meissner R., Chague V., Zhu Q., Emmanuel E., Elkind Y., Levy A.A. 2000.** A high throughput system for transposon tagging and promoter trapping in tomato. *Plant Journal*. 22 (3):265–274.
- Mena M., Ambrose B. A.; Meeley R. B., Briggs S. P., Yanofsky M. F., Schmidt R. J. 1996.** Diversification of C-function activity in maize flower development. *Science*. 274 (5292): 1537–1540.
- Menda N., Semel Y., Peled D., Eshed Y., Zamir D. 2004.** In silico screening of a saturated mutation library of tomato. *Plant Journal*. 38 (5): 861–872.
- Meyerowitz E.M., Bowman J.L., Brockman L.L., Drews G.N., Jack T., Sieburth L.E., Weigel D. 1991.** A genetic and molecular model for flower development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* (Suppl.). 1: 157–167.
- Mezzetti B., Landi L., Pandolfini T., Spena A. 2004.** The *defH9-iaaM* auxin-synthesizing gene increases plant fecundity and fruit production in strawberry and raspberry. *BMC Biotechnology*. 4 (4): 1–10.
- Miller P. 1754.** *The Gardeners Dictionary*. John and Francis Rivington. London, UK, 4<sup>th</sup> edition.

- Milyaeva E.L., Gurko N.A., Bavrina T.V., Skurat E.V., Dorokhov Y.L., Romanov G. A. 2002.** Development of male reproductive organs in an insertion mutant *TPD1* of tobacco characterized by extended flowering. *Russian Journal of Plant Physiology*. 49 (4): 470–477.
- Miyao A., Iwasaki Y., Kitano H., Itoh J. I., Maekawa M., Murata K., Yatou O., Nagato Y., Hirochika H. 2007.** A large-scale collection of phenotypic data describing an insertional mutant population to facilitate functional analysis of rice genes. *Plant Molecular Biology*. 63: 625–635.
- Miyao A., Tanaka K., Murata K., Sawaki H., Takeda S., Abe K., Shinozuka Y., Onosato K., Hirochika H. 2003.** Target site specificity of the *Tos17* retrotransposon shows a preference for insertion within genes and against insertion in retrotransposon-rich regions of the genome. *Plant Cell*. 15: 1771–1780.
- Modrusan Z., Roiser L., Feldmann K.A., Fischer R.L., Haughn G.W. 1994.** Homeotic transformation of ovules into carpel-like structures in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 6: 333–349.
- 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. *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: 427–434.
- Mollier P., Hoffmann B., Orsel M., Pelletier G. 2000.** Tagging of a cryptic promoter that confers root-specific gus expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports*. 19 (11): 1076–1083.
- Montoya T., Nomura T., Farrar K., Kaneta T., Yokota T., Bishoop G. J. 2002.** Cloning the tomato *Cur13* gene highlights the putative dual role of the leucine-rich repeat receptor kinase tBRI1/SR160 in plant steroid hormone and peptide hormone signalling. *Plant Cell*. 14: 3163–3176.
- Moon J., Zhao Y., Dai X., Zhang W., Gray W. M., Huq E., Estelle M. 2007.** A New *CULLIN 1* mutant has altered responses to hormones and light in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 143: 684–696.
- Moreno, V. 1997.** La selección somaclonal, una alternativa biotecnológica para la mejora de plantas ornamentales. *Biotecnología y agricultura: las plantas del futuro*. Fundación Bancaixa. 59–96.
- Moreno, V. and Roig, L.A. 1990.** Somaclonal variation in cucurbits. En: BAJAJ, Y.P.S. (ed.). *Biotechnology in agriculture and forestry*. Vol. 11. Somaclonal variation in crop improvement I. Springer Verlag Heidelberg, Berlin, p: 435–464.
- Mori M., Tomita Ch., Sugimoto K., Hasegawa M., Hayashi N., Dubouzet J. G., Ochiai H., Sekimoto H., Hirochika H., Kikuchi Sh. 2007.** Isolation and molecular characterization of a *Spotted leaf 18* mutant by modified activation–tagging rice. *Plant Molecular Biology*. 63: 847–860.
- Mueller L.A., Solow T.H., Taylor N., Skwarecki B., Buels R., Binns J., Lin Ch., Wright M., Ahrens R., Wang Y., Herbst E.V., Keyder E., Menda N., Zamir D., Tanksley S.D. 2005.** The SOL genomics network. a comparative resource for solanaceae biology and beyond. *Plant Physiology*. 138: 1310–1317.

- Müller K.J., HeX., Fischer R., Prüfer D. 2006.** Constitutive *knox1* gene expression in dandelion (*Taraxacum officinale*, Web.) changes leaf morphology from simple to compound. *Planta*. 224: 1023–1027.
- Muthukalianan G.K., Lee S., Yum H., Ku S., Kwun M., Kang H.G., An G., Chung Y.Y. 2003.** Identification of anther-specific gene expression from T-DNA tagging rice. *Molecules and Cells*. 15: 102–107.
- Nam J., Mysore K.S., Zheng C., Knue M.K., Matthyse A.G., Gelvin S.B. 1999.** Identification of T-DNA tagged *Arabidopsis* mutants that are resistant to transformation by *Agrobacterium*. *Molecular and General Genetics*. 261 (3): 429–438.
- Nash A.F., Gardner R.G., Henderson W.R. 1985.** Evaluation of allelism and seed set of eight stamenless tomato mutants. *HortScience*. 20: 440–442.
- Neff M.M., Nguyen S.M., Malancharuvil E.J., Fujioka Sh., Noguchi T., Seto H., Tsubuki M., Honda T., Takatsuto S., Yoshida Sh., Chory J. 1999.** *BASI*: a gene regulating brassinosteroid levels and light responsiveness in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 96 (26): 15316–15323.
- Negruk V., Eisner G., Lemieux B. 1996.** Addition-deletion mutations in transgenic *Arabidopsis thaliana* generated by the seed co-cultivation method. *Genome*. 39 (6): 1117–1122.
- Nuez F., Costa J., Cuartero J. 1986.** Genetics of the parthenocarpy for tomato varieties “Sub-Artic Plenty”, “75/59” and “Severianin”. *Zeitschrift für Pflanzzüchtung*. 96: 200–206.
- Ogarkova O.A., Tomilova N.B., Tomilov A.A., Tarasov V.A. 2001.** Collection of *Arabidopsis thaliana* morphological insertion mutants. *Russian Journal of Genetic*. 37 (8): 899–904.
- Ohba T., Yoshioka Y., Machida Ch., Machida Y. 1995.** DNA rearrangement associated with the integration of T-DNA in tobacco: an example for multiple duplications of DNA around the integration target. *Plant Journal*. 7 (1): 157–164.
- Olimpieri I., Siligato F., Caccia R., Mariotti L., Ceccarelli N., Soressi G.P., Mazzucato A. 2007.** Tomato fruit set driven by pollination or by the *parthenocarpic fruit* allele are mediated by transcriptionally regulated gibberellin biosynthesis. *Planta*. 226: 877–888.
- Oosumi T., Gruszewski H. A., Blischak L.A., Baxter A.J., Wadl P.A., Shuman J.L., Veilleux R.E., Shulaev V. 2006.** High-efficiency transformation of the diploid strawberry (*Fragaria vesca*) for functional genomics. *Planta*. 223: 1219–1230.
- Ori N., Juarez M.T., Jackson D., Yamaguchi J., Banowitz G.M., Hake S. 1999.** Leaf senescence is delayed in tobacco plants expressing the maize homeobox gene *knotted1* under the control of a senescence-activated promoter. *Plant Cell*. 11: 1073–1080.
- Osborne B.I., Corr C.A., Prince J.P., Hehl R., Tanksley S.D., McCormick S., Baker B. 1991.** *Ac* transposition from a T-DNA can generate linked and unlinked clusters of insertions in the tomato genome. *Genetics*. 129: 833–844.
- Pandolfini T., Molesini B., Spena A. 2007.** Molecular dissection of the role of auxin in fruit initiation. *Trends in Plant Science*. 12 (8): 327–329.
- Pandolfini T., Rotino G.L., Camerini S., Defez R., Spena A. 2002.** Optimisation of transgene action at the post-transcriptional level: high quality parthenocarpic fruits in industrial tomatoes. *BMC Biotechnology*. 2 (1).

- Pandolfini, T., Rotino G. L.; Camerini S.; Defez R.; Spena A. 2002.** Optimisation of transgene action at the post-transcriptional level: high quality parthenocarpic fruits in industrial tomatoes. *BMC Biotechnology*. 2 (1).
- Paran I. and van der Knaap E. 2007.** Genetic and molecular regulation of fruit and plant domestication traits in tomato and pepper. *Journal of Experimental Botany*. 58 (14): 3841–3852.
- Parnis A., Cohen O., Gutfinger T., Hareven D., Zamir D., Lifschitz E. 1997.** The dominant developmental mutants of tomato, *mouse-ear* and *curl*, are associated with distinct modes of abnormal transcriptional regulation of a knotted gene. *Plant Cell*. 9: 2143–2158.
- 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: 200 – 203.
- Peng H., Huang H., Yang Y., Zhai Y., Wu J., Huang D., Lu T. 2005.** Functional analysis of GUS expression patterns and T-DNA integration characteristics in rice enhancer trap lines. *Plant Science*. 168: 1571–1579.
- Peng J., Carol P., Richards D.E., King K.E., Cowling R.J., Murphy G.P., Harberd N.P. 1997.** The *Arabidopsis* *GAI* gene defines a signalling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes & Development*. 11: 3194–3205.
- Peterhans A., Schlüpmann H., Basse C., Paszkowski J. 1990.** Intrachromosomal recombination in plants. *EMBO Journal*. 9 (11): 3437–3445.
- Philouze J. and Maisonneuve B. 1978.** Heredity of the natural ability to set parthenocarpic fruits in the Soviet variety Severianin. *Tomato Genetics Cooperative Reports*. 28: 12–13.
- Philouze J. 1983.** Epistatic relations between *ls* and *pat-2*. *Tomato Genetics Cooperative Reports*. 33: 9–12.
- Pinyopich A., Ditta G.S., Savidge B., Liljegren S.J., Baumann E., Wisman E., Yanofsky M.J. 2003.** Assessing the redundancy MADS–box genes during carpel and ovule development. *Nature*. 424: 85–88.
- Plesch G., Kamann E., Mueller R.B. 2000.** Cloning of regulatory sequences mediating guard-cell specific gene expression. *Gene*. 249 (1): 83–89.
- Pnueli L., Goren L.C., Hareven D., Gutfinger T., Alvarez J., Ganai M., Zamir D., Lifschitz E. 1998.** The *SELF-PRUNING* gene of tomato regulates vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the ortholog of *CEN* and *TFL1*. *Development*. 125: 1979–1989.
- Pnueli L., Hareven A., Rounsley S. D. Yanofsky M. F., Lifschitz E. 1994a.** Isolation of the Tomato *AGAMOUS* gene *TAG7* and analysis of its homeotic role in transgenic plants. *Plant Cell*. 6: 163–173.
- Pnueli L., Hareven D., Broday L., Hurwitz Ch., Lifschitz E. 1994b.** The *TM5* MADS Box gene mediates organ differentiation in the three inner whorls of tomato flowers. *Plant Cell*. 6: 175–186.
- Pollan S., Springer A., Buhr F., Lahroussi A., Samol I., Bonneville J.M., Tichtinsky G., von Wettstein D., Reinbothe C., Reinbothe S. 2007.** A plant porphyria related to defects in plastid import of protochlorophyllide oxidoreductase A. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104 (6): 2019–2023.

- Porrini M. and Riso P. 2000.** Lymphocyte lycopene concentration and DNA protection from oxidative damage is increased in women after a short period of tomato consumption. *Journal of Nutrition*. 130: 189–192.
- Qin G., Kang D., Dong Y., Shen Y., Zhang L., Deng X., Zhang Y., Li S., Chen N., Niu W., Chen C., Liu P., Chen H., Li J., Ren Y., Gu H., Deng X., Li-Jia Q., Chen Z. 2003.** Obtaining and analysis of flanking sequences from T-DNA transformants of *Arabidopsis*. *Plant Science*. 165 (5): 941–949.
- Qiu J. L., Jilk R., Marks M.D., Szymanski D.B. 2002.** The *Arabidopsis* SPIKE1 gene is required for normal cell shape control and tissue development. *Plant Cell*. 14: 101–118.
- Quinet M. and Kinet J.M. 2007.** Transition to flowering and morphogenesis of reproductive structures in tomato. *International Journal of Plant Developmental Biology*. 1: 64–74.
- Quinet M., Dielen V., Batoko H., Boutry M., Havelange A., Kinet J.M. 2006a.** Genetic interactions in the control of flowering time and reproductive structure development in tomato (*Solanum lycopersicum*). *New Phytologist*. 170: 701–710.
- Quinet M., Dubois C., Goffin M.C., Chao J., Dielen V., Batoko H., Boutry M., Kinet J.M. 2006b.** 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.
- Radhamony R.S., Prasad A.M., Srinivasan R. 2005.** T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis*: a tool for functional genomics. *Electronic Journal of Biotechnology*. 8 (1): 83–106.
- Rao A. V. and Agarwal S. 1998.** Bioavailability and *in vivo* antioxidant properties of lycopene from tomato products and their possible role in the prevention of cancer. *Nutrition and Cancer*. 31: 199–203.
- Rao A. V., Fleshner N., Agarwal S. 1999.** Serum and tissue lycopene and biomarkers of oxidation in prostate cancer patients: a case-control study. *Nutrition and Cancer*. 33(2): 159–64.
- Rao A.V. and Agarwal S. 2000.** Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease. *Journal of the American College of Nutrition*. 19 (5): 563–569.
- Reeves P.H. and Coupland G. 2001.** Analysis of flowering time control in *Arabidopsis* by comparison of double and triple mutants. *Plant Physiology*. 126: 1085–1091.
- Reinhardt D., Mandel T., Kuhlemeier C. 2000.** Auxin regulates the initiation and radial position of plant lateral organs. *Plant Cell*. 12: 507–518.
- Reinhardt D., Pesce E.-R., Stieger P., Mandel T., Baltensberger K., Bennett Traas J., Friml J., Kuhlemeier C. 2003.** Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature*. 426: 255–260.
- Richards, D.E., King, K.E., Ait-ali, T., and Harberd, N.P. 2001.** How gibberellin regulates plant growth and development: A molecular genetic analysis of gibberellin signalling. *Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 52: 67–88.
- Rick C and Butler L. 1956.** Cytogenetics of tomato. *Advances in Genetic*. 8: 267–382.
- Rick C. 1978.** El tomate. *Investigación y Ciencia*. Octubre: 45 – 55.
- Rick C.M., and Sawant A.C. 1955.** Factor interactions affecting the phenotypic expression of the jointless character in tomatoes. *American Society for Horticultural Science*. 66: 354–360.

- Riechmann J. L. and Ratcliffe O. J. 2000.** A genomic perspective on plant transcription factors. *Current Opinion in Plant Biology*. 3 (5): 423–434.
- Robbins T.P., Jenkin M., Courtney-Gutterson N. 1994.** Enhanced frequency of transposition of the maize transposable element *Activator* following excision from T-DNA in *Petunia hybrida*. *Molecular and General Genetics*. 244 (5): 491–500.
- Robinson-Beers K., Pruitt R.E., Gasser C.S. 1992.** Ovule development in wild-type *Arabidopsis* and female-sterile mutants. *Plant Cell*. 4: 1237–1249.
- Robles P. and Pelaz S. 2005.** Flower and fruit development in *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Developmental Biology*. 49: 633 – 643.
- Robson P.R.H., Donnison I.S., Wang K., Frame B., Pegg S.E., Thomas A., Thomas H. 2004.** Leaf senescence is delayed in maize expressing the *Agrobacterium IPT* gene under the control of a novel maize senescence-enhanced promoter. *Plant Biotechnology Journal*. 2: 101–112.
- Rommens C.M., Rudenko G.N., Dijkwel P.P., van Haaren M.J., Ouwerkerk P.B., Blok K.M., Nijkamp H.J., Hille J. 1992.** Characterization of the *Ac/Ds* behaviour in transgenic tomato plants using plasmid rescue. *Plant Molecular Biology*. 20 (1): 61–70.
- Ross J.J., O'Neill D.P., Smith J.J., Kerckhoffs L.H.J., Elliot R. C. 2000.** Evidence that auxin promotes gibberellin A<sub>1</sub> biosynthesis in pea. *Plant Journal*. 21 (6): 547–552.
- Rosso M.G., Li Y., Strizhov N., Reiss B., Dekker K., Weisshaar B. 2003.** An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Molecular Biology*. 53 (1-2): 247–259.
- Rotino G.L., Acciarri N., Sabatini E., Mennella G., Scalzo R.L., Maestrelli A., Molesini B., Pandolfini T., Scalzo J., Mezzetti B., Spena A. 2005.** Open field trial of genetically modified parthenocarpic tomato: seedlessness and fruit quality. *BMC Biotechnol*. 5: 32.
- Rotino G.L., Perri E, Zottini M., Sommer H., Spena A. 1997.** Genetic engineering of parthenocarpic plants. *Nature Biotechnology*. 15: 1398–1401.
- Running M.P., Fletcher J.C., Meyerowitz E.M. 1998.** The *WIGGUM* gene is required for proper regulation of floral meristem size in *Arabidopsis*. *Development*. 125: 2545–2553.
- Ruppel N.J. and Hangarter R.P. 2007.** Mutations in a plastid-localized elongation factor G alter early stages of plastid development in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*. 7: 37.
- Sakamoto T. and Matsuoka M. 2004.** Generating high-yielding varieties by genetic manipulation of plant architecture. *Current Opinion in Biotechnology*. 15(2): 144-147.
- Sakamoto T., Miura K., Itoh H., Tatsumi T., Ueguchi-Tanaka M., Ishiyama K., Kobayashi M., Agrawal G.K., Takeda S., Abe K., Miyao A., Hirochika H., Kitano H., Ashikari M., Matsuoka M. 2004.** An overview of gibberellin metabolism enzyme genes and their related mutants in rice. *Plant Physiology*. 134: 1642–1653.
- Sallaud C., Gay C., Larmande P., Bès M., Piffanelli P., Piegú B., Droc G., Regad F., Bourgeois E., Meynard D., Périn C., Sabau X., Ghesquière A., Glaszmann J.C., Delseny M. and Guiderdoni E. 2004.** High throughput T-DNA insertion mutagenesis in rice: a first step towards *in silico* reverse genetics. *Plant Journal*. 39 (3): 450–464.
- Sallaud, C., Meynard, D., Van Boxtel, J., Gay C., Bès M., Brizard J. P., Larmande P., Ortega D., Raynal M., Portefaix M., Ouwerkerk P.B.F., Rueb S., Delsany M., Guiderdoni E. 2003.** Highly efficient production and characterization of T-DNA plants for rice (*Oryza sativa* L.) functional genomics. *Theoretical and Applied Genetics*. 106: 1396–1408.

- Samach A. and Lotan H. 2007.** The transition to flowering in tomato. *Plant Biotechnology*. 24: 71–82.
- Sanchez A.M, Bosch M., Bots M., Nieuwland J., Feron R., Mariani C. 2006.** Pistil factors controlling pollination. *Plant Cell*. 16: 98–106.
- Sawhney V.K. 1992.** Floral mutants in tomato: development, physiology and evolutionary implications. *Canadian Journal of Botany*. 81: 1640–1647.
- Sawhney, V.K. and Shukla A. 1994.** Male sterility in flowering plants: Are plant growth substances involved? *American Journal of Botany*. 81: 1640–1647.
- Scanlon M.J. 2003.** The polar auxin transport inhibitor *N*-1-Naphthylphthalamic acid disrupts leaf initiation, KNOX protein regulation, and formation of leaf margins in maize. *Plant Physiology*. 133: 597–605.
- Scheres B., Laurenzio L.D., Willemsen V., Hauser M.T., Janmaat K., Weisbeek P., Benfey P.N. 1995.** Mutations affecting the radial organisation of the *Arabidopsis* root display specific defects throughout the embryonic axis. *Development*. 121: 53–62.
- 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*. 99 (2): 1064–1069.
- Scholte M., d’Erfurth I., Rippa S., Mondy S., Cosson V., Durand P., Breda C., Trinh H., Rodriguez-Llorente I., Kondorosi E., Schultze M., Kondorosi A., Ratet P. 2002.** T-DNA tagging in the model legume *Medicago truncatula* allows efficient gene discovery. *Molecular Breeding*. 10: 203–215.
- Schumacher K., Schmitt T., Rossberg M., Schmitz G., Theres K. 1999.** The *Lateral suppressor (Ls)* gene of tomato encodes a new member of the VHIID protein family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 96: 290–295.
- Schupp J.M., Price L.B., Klevytska A., Keim P. 1999.** Internal and flanking sequence from AFLP fragments using ligation-mediated suppression PCR. *Biotechniques*. 26: 5: 905–910.
- Scott, R.J., Spielman M., Dickinson H.G. 2004.** Stamen structure and function. *Plant Cell*. 16: 46–60.
- Sentoku N., Sato Y., Matsuoka M. 2000.** Overexpression of rice *OSH* genes induces ectopic shoots on leaf sheaths of transgenic rice plants. *Developmental Biology*. 220: 358–364.
- Sessions A., Burke E., Presting G., Aux G., McElver J., Patton D., Dietrich B., Ho P., Bacwaden J., Ko C., Clarke J.D., Cotton D., Bullis D., Snell J., Miguel T., Hutchison D., Kimmerly B., Mitzel T., Katagiri F., Glazebrook J., Law M., Goff S.A. 2002.** A high-throughput *Arabidopsis* reverse genetics system. *Plant Cell*. 14: 2985–2994.
- Seymour G.B., Manning K., Eriksson E.M., Popovich A.H., King G.J. 2002.** Genetic identification and genomic organization of factors affecting fruit texture. *Journal of Experimental Botany*. 53 (377): 2065–2071.
- Sha Y., Li S., Pei Z., Luo L., Tian Y., He C. 2004.** Generation and flanking sequence analysis of a rice T-DNA tagged population. *Theoretical and Applied Genetics*. 108: 306–314.
- Shuai B., Reynaga-Peña C.G., Springer P.S. 2002.** The *LATERAL ORGAN BOUNDARIES* gene defines a novel, plant-specific gene family. *Plant Physiology*. 129: 747–761.

- Sicard A., Petit J., Mouras A., Chevalier C., Hernould M. 2008.** Meristem activity during flower and ovule development in tomato is controlled by the mini zinc finger gene *INHIBITOR OF MERISTEM ACTIVITY*. *Plant Journal*. 55 (3): 415–427.
- Sinha, N.R., Williams, R.E., Hake, S. 1993.** Overexpression of the maize homeobox gene, *KNOTTED-1*, causes a switch from determinate to indeterminate cell fates. *Genes and Development*. 7: 787–795.
- Skinner D.J., Hill T. A., Gasser Ch.S. 2004.** Regulation of ovule development. *Plant Cell*. 16: 32–45.
- Smart C. M. 1994.** Gene expression during leaf senescence. *New Phytologist*. 126(3): 419–448.
- Smart C.M., Scofield S.R., Bevan M.W., Dyer T.A. 1991.** Delayed leaf senescence in tobacco plants transformed with *tmr*, a gene for cytokinin production in *Agrobacterium*. *Plant Cell*. 3: 647–656.
- Soressi G.P. and Salamini F. 1975.** A monomendelian gene inducing parthenocarpic fruits. *Report Tomato Genetic Cooperative*. 25: 22
- Springer P.S. 2000.** Gene traps: tools for plant development and genomics. *Plant Cell*. 12: 1007–1020.
- Springer P.S., McCombie W.R., Sundaresan V., Martienssen R.A. 1995.** Gene trap tagging of *PROLIFERA*, an essential *MCM2-3-5*-like gene in *Arabidopsis*. *Science*. 268: 877–880.
- Stearns J.C. and Glick B.R. 2003.** Transgenic plants with altered ethylene biosynthesis or perception. *Biotechnology Advances*. 21: 193–210.
- Stubbe, H. 1957.** Mutanten der Kulturtomate *Lycopersicon esculentum* Miller I. Kulturpflanze. 5: 110–220.
- Subramanian S., Rajagopal B., Rock C.D. 2002.** *Harlequin (hlq)* and *short blue root (sbr)*, two *Arabidopsis* mutants that ectopically express an abscisic acid- and auxin- inducible transgenic carrot promoter and have pleiotropic effects on morphogenesis. *Plant Molecular Biology*. 49 (1): 93–105.
- Sundaresan V. 1996.** Horizontal Spreads of transposon mutagenesis: new uses for old elements. *Trends in Plant Science*. 1 (6): 184–190.
- Sundaresan V., Springer P., Volpe T., Haward S., Jones J. Dean C., Ma H., Martienssen R. 1995.** Patterns of gene action in plant development by enhancer trap and gene trap transposable elements. *Genes and Development*. 9: 1797–1810.
- Sussman M.R., Amasino R.M., Young J.C., Krysan P.J., Austin-Phillips S. 2000.** The *Arabidopsis* knockout facility at the university of Wisconsin-Madison. *Plant Physiology*. 124: 1465–1467.
- 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: 5649–5657.
- Suzuki Y., Uemura S., Saito Y., Murofushi N., Schmitz G., Theres K. Yamaguchi I. 2001.** A novel transposon tagging element for obtaining gain of function mutants based on a self-stabilizing *Ac* derivative. *Plant Molecular Biology*. 45 (2): 123–131.
- Svitashev S.K., Pawlowski W.P., Makarevitch I., Plank D.W., Somers D.A. 2002a.** Complex transgene locus structures implicate multiple mechanisms for plant transgene rearrangement. *Plant Journal*. 32 (4): 433–445.

- Svitashev S.K. and Somers D.A. 2002b.** Characterization of transgene loci in plants using FISH: a picture is worth a thousand words. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 69 (3): 205–214.
- Swaminathan K., Yang Y., Grotz N., Campisi L., Jack T. 2000.** An enhancer trap line associated with a D- Class cyclin gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 124: 1658–1667.
- Szymkowiak E.J. and Irish E.E. 2006.** *JOINTLESS* suppresses sympodial identity in inflorescence meristems of tomato. *Planta*. 223 (4): 646–658.
- Taguchi-Shiobara F., Yuan Z., Hake S., Jackson D. 2001.** The *fasciated ear2* gene encodes a leucine-rich repeat receptor-like protein that regulates shoot meristem proliferation in maize. *Genes and Development*. 15 (20): 2755–2766.
- Takahashi T., Matsuhara S., Abe M., Komeda Y. 2002.** Disruption of a DNA topoisomerase I gene affects morphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14: 2085–2093.
- Takano M., Egawa H., Ikeda J.E., Wakasa K. 1997.** The structures of integration sites in transgenic rice. *Plant Journal*. 11 (3): 353–361.
- Takeoka G.R., Dao L., Flessa S., Gillespie D.M., Jewell W.T., Huebner B., Bertow D., Ebeler S.E. 2001.** Processing effects on lycopene content and antioxidant activity of tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49 (8): 3713–3717.
- Takken F.L., Schipper D., Nijkamp H.J., Hille J. 1998.** Identification and *Ds*-tagged isolation of a new gene at the *Cf-4* locus of tomato involved in disease resistance to *Cladosporium fulvum* race 5. *Plant Journal*. 14 (4): 401–411.
- Tamaoki M., Kusaba S., Kano – Murakami Y., Matsuoka M. 1997.** Ectopic expression of a tobacco homeobox gene, *NTH15*, dramatically alters leaf morphology and hormone levels in transgenic tobacco. *Plant Cell Physiology*. 38: 917–927.
- Tanksley S.D, Ganal M.W., Prince J.P., Vicente M.C., Bonierbale M.W., Broun P., Fulton T.M., Giovannoni J.J., Grandillo S., Martin G.B., Messeguer R., Miller J.C., Miller L., Paterson A.H., Pineda O., Riider M.S., Wing R.A., Wu W., Young N.D.. 1992.** High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics*. 132: 1141–1160.
- Tanksley S.D. 2004.** The genetic, developmental, and molecular bases of fruit size and shape variation in tomato. *Plant Cell*. 16: 181–189.
- Tax F.E. and Vernon D.M. 2001.** T-DNA-associated duplication/translocations in *Arabidopsis*: implications for mutant analysis and functional genomics. *Plant Physiology*. 126: 1527–1538.
- Tieman D.M. and Klee H.J. 1999.** Differential expression of two novel members of the tomato ethylene- receptor family. *Plant Physiology*. 120: 165–172.
- Tieman D.M., Ciardi J.A., Taylor M.G., Klee J. 2001.** Members of the tomato *LeEIL* (*EIN3-like*) gene family are functionally redundant and regulate ethylene responses throughout plant development. *Plant Journal*. 26 (1): 47–58.
- Tinland, B. 1996.** The Integration of T-DNA into Plant Genomes. *Trends in Plant Science*. 1 (6):178–183.
- Topping J.F. and Lindsey K. 1995.** Insertional mutagenesis and promoter trapping in plants for the isolation genes and the study of development. *Transgenic Research*. 4 (5): 291–305.
- Topping J.F. and Lindsey K. 1997.** Promoter trap markers differentiate structural and positional components of polar development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 9: 1713–1725.

- Topping J.F., Agyeman F., Henricot B., Lindsey K. 1994.** Identification of molecular markers of embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* by promoter trapping. *Plant Journal*. 5(6): 895–903.
- Topping J.F., Wei W., Lindsey K. 1991.** Functional tagging of regulatory elements in the plant genome. *Development*. 112: 1009–1019.
- Trieu A.T., Burleigh S.H., Kardailsky I.V., Maldonado-Mendoza I.E., Versaw W.K., Blaylock L.A., Shin H., Chiou T.J., Katagi H., Dewbre G.R., Weigel D., Harrison M.J. 2000.** Transformation of *Medicago truncatula* via infiltration of seedlings of flowering plants with *Agrobacterium*. *Plant Journal*. 22 (6): 531–541.
- Tzfira T. and Citovsky V. 2001.** Partners-in-infection: host proteins involved in the transformation of plant cells by *Agrobacterium*. *Trends in Cell Biology*: 12: 121–128
- Vain P., Worland B., Thole V., McKenzie N., Alves S.C., Opanowicz M., Fish L.J., Bevan M.W., Snape J.W. 2008.** *Agrobacterium*-mediated transformation of the temperate grass *Brachypodium distachyon* (genotype Bd21) for T-DNA insertional mutagenesis. *Plant Biotechnology Journal*. 6 (3): 236–245.
- Van der Biezen E.A., Brandwagt B.F., van Leewen W., Nijkamp H.J.J., Iille J. 1996.** Identification and isolation of the *FEEBLY* gene from tomato by transposon tagging. *Molecular and General Genetics*. 251: 267–280.
- Van der Fits L. and Memelink J. 2000.** *ORCA3*, a jasmonate – responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. *Science*. 289 (5477): 295 – 297.
- Van der Graaff E., Hooykaas P.J.J., Keller B. 2002.** Activation tagging of the two closely linked genes *LEP* and *VAS* independently affects vascular cell number. *Plant Journal*. 32 (5): 819 – 830.
- Van der Hoeven R., Ronning C., Giovannoni J., Martin G., Tanksley S. 2002.** Deductions about the number, organization, and evolution of genes in the tomato genome based on analysis of a large expressed sequence tag collection and selective genomic sequencing. *Plant Cell*. 14: 1441–1456.
- Van Lijsebettens M., Vanderhaeghen R., van Montagu M. 1991.** Insertional Mutagenesis in *Arabidopsis thaliana*: isolation of T-DNA-Linked mutation that alters leaf morphology. *Theoretical and Applied Genetics*. 81: 277–284.
- Van Tuinen A., Peters A.H.L.J., Kendrick R.E., Zeevaart J.A.D., Koornneef M. 2002.** Characterisation of the *procera* mutant of tomato and the interaction of gibberellins with end-of-day far-red light treatments. *Physiologia Plantarum*. 106 (1): 121 – 128.
- Verkerk K. 1971.** Chimerism of the tomato plant after seed irradiation with fast neutrons. *Netherlands Journal of Agricultural of Science*. 19: 197–203.
- Vogler H. and Kuhlemeier C. 2003.** Simple hormones but complex signalling. *Current Opinion in Plant Biology*. 6: 51–56.
- Vrebalov J., Ruzinsky 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: 343–346.
- Wan J., Patel A., Mathieu M., Kim S.Y., Xu D., Stacey G. 2008.** A lectin receptor-like kinase is required for pollen development in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*. 67 : 469–482.

- Wang H., Liu Y., Bruffett K., Lee J., Hause G., Walker J., Zhang Sh. 2008.** Haplo-insufficiency of MPK3 in MPK6 Mutant background uncovers a novel function of these two MAPKs in *Arabidopsis* ovule development. *Plant Cell*. 20: 602–613.
- Watanabe S., Kitade Y., Masaki T., Nishioka M., Satoh K., Nishino H. 2001.** Effects of lycopene and Sho-saiko-to on hepatocarcinogenesis in a rat model of spontaneous liver cancer. *Nutrition and Cancer*. 39 (1): 96–101.
- Watanabe Sh., Mizoguchi T., Aoki K., Kubo Y., Mori H., Imanishi Sh, 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.
- Webb K.J., Skot L., Nicholson M.N., Jorgensen B., Mizen, S. 2000.** *Mesorhizobium loti* increases root-specific expression of a calcium-binding protein homologue identified by promoter tagging in *Lotus japonicus*. *Molecular Plant–Microbe Interactions*. 13: 606–616.
- Wei W., Twell D., Lindsey K. 1997.** A novel nucleic acid helicase gene identified by promoter trapping in *Arabidopsis*. *Plant Journal*. 11 (6): 1307–1314.
- Weigel D., Ahn, J.H., Blázquez M.A., Borevitz J., Christensen S.K., Fankhauser C., Ferrándiz C., Kardailsky I., Malancharuvil E.J., Neff M.M., Nguyen J.T., Sato S., Wang Z., Xia Y., Dixon R.A., Harrison M.J., Lamb C.J., Yanofsky M.F., Chory J. 2000.** Activation tagging in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 122 (4): 1003–1014.
- Weigel D., Alvarez J., Smyth D.R., Yanofsky M.F., Meyerowitz E.M. 1992.** *LEAFY* controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Cell*. 69: 843–859.
- Wen Ch.K. and Chang C. 2002.** *Arabidopsis RGL1* encodes a negative regulator of gibberellin responses. *Plant Cell*. 14: 87–100.
- Wen J., Lease K. A., Walker H.C. 2004.** *DVL*, a novel class of small polypeptides: overexpression alters *Arabidopsis* development. *Plant Journal*. 37 (5): 668–677.
- Wilkinson J. K., Lanahan M.B., Yen H. Ch., Giovannoni J. J., Klee H. J. 1995.** An ethylene-inducible component of signal transduction encoded by *never ripe*. *Science*. 270 (5243): 1807–1809.
- Wilson K., Long D., Swinburne J., Coupland G. 1996.** A dissociation insertion causes a semidominant mutation that increases expression of *TINY*, an *Arabidopsis* gene related to *APETALA2*. *Plant Cell*. 8: 659–671.
- Wolters A.M.A., Trindade L.M., Jacobsen E., Visser R.G.F. 1998.** Fluorescence *in situ* hybridization on extended DNA fibres as a tool to analyse complex T-DNA loci in potato. *Plant Journal*. 13 (6): 837–847.
- Wu Ch., Li X., Yuan W., Chen G., Kilian A., Li J., Xu C., Li X., Zhou D.X., Wang Sh., Zhang Q. 2003.** Development of enhancer trap lines for functional análisis of the rice genome. *Plant Journal*. 35 (3): 418–427.
- Xia Y., Suzuki H., Borevitz J., Blount J., Guo Z., Patel K., Dixon R. A., Lamb C. 2004.** An extracellular aspartic protease functions in *Arabidopsis* disease resistance signalling. *EMBO Journal*. 23: 980–988.
- Xiao J., Li H., Zhang J., Chen R., Zhang Y., Ouyang B., Wang T., Ye Z. 2006.** Dissection of GA 20-oxidase members affecting tomato morphology by RNAi-mediated silencing. *Plant Growth Regulation*. 50:179–189.

- Xing S. and Zachgo S. 2007.** Pollen lethality: a phenomenon in *Arabidopsis* RNA interference plants. *Plant Physiology*. 145: 330–333.
- Yadegari R., de Paiva G.R., Laux T., Koltunow A. M., Apuya N., Zimmerman J. L., Fischer R. L., Harada J. J., Goldberg R. B. 1994.** Cell differentiation and morphogenesis are uncoupled in *Arabidopsis* raspberry embryos. *Plant Cell*. 6: 1713–1729.
- Yang Y., Peng H., Huang H., Wu J., Jia Sh., Huang D., Lu T. 2004.** Large-scale production of enhancer trapping lines for rice functional genomics. *Plant Science*. 167: 281–288.
- Yano K., Aoki K., Shibata D. 2007.** Genomic databases for tomato. *Plant Biotechnology* 24: 17–25.
- Yanofsky M.F., Hong Ma., 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: 35–39.
- Yeager, A. F. 1927.** Determinate growth in the tomato. *Journal of Heredity*. 18: 263–265.
- Yin Z., Malinowski R., Ziółkowska A., Sommer H., Plcader W., Malepszy S. 2006.** The *DefH9-iaaM-* containing construct efficiently induces parthenocarpy in cucumber. *Cellular and Molecular Biology*. 11 (2): 279–290.
- Yin Z. and Wang G. L. 2000.** Evidence of multiple complex patterns of T-DNA integration into the rice genome. *Theoretical and Applied Genetics*. 100: 461–470.
- Yoder J.I. 1990.** Rapid proliferation of the maize transposable element activator in transgenic tomato. *Plant Cell*. 2: 723–730.
- Yoder J.I., Palys J., Alpert K., Lassner M. 1988.** *Ac* transposition in transgenic tomato plants. *Molecular and General Genetic*. 213 (2-3): 291–296.
- Yokota T. 1997.** The structure, biosynthesis and function of brassinosteroids. *Trends in Plant Science*. 2 (4): 137–143.
- Yokotani N., Tamura S., Nakano R., Inaba A., Kubo Y. 2003.** Characterization of a novel tomato EIN3-like gene (*LeEIL4*). *Journal of Experimental Botany*. 54 (393): 2775–2776.
- Yoshida S., Ito M., Nishida I., Watanabe A. 2002.** Identification of a novel gene HYS1/CPR5 that has a repressive role in the induction of leaf senescence and pathogen-defence responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*. 29 (4): 427–437.
- Zhang Z.B., Zhu J., Gao J.F., Wang Ch., Li H., Li H., Zhang H. Q., Zhang S., Wang D.M., Wang Q.X., Huang H., Xia H.J., Yang Z.N. 2007.** Transcription factor *AtMYB103* is required for anther development by regulating tapetum development, callose dissolution and exine formation in *Arabidopsis*. *Plant Journal*. 52 (3): 528–538.
- Zhao T., Palotta M., Langridge P., Prasad M., Graner A., Schulze-Lefert P., Koprek T. 2006.** Mapped Ds/T-DNA launch pads for functional genomics in Barley. *Plant Journal*. 47 (5): 811–826.
- Zhao Y., Christensen S.K., Fankhauser C., Cashman J.R., Cohen J.D., Weigel D., Chory J. 2001.** A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. *Science*. 291: 306–309.
- Zhao Z., Khachik F., Richie J. P., Jr. and Cohen L.A. 1998.** Lycopene uptake and tissue disposition in male and female rats. *Proceedings of the Society Experimental Biology and Medicine*. 218: 109–114.

- Zhu H.L., Zhu B.Z., Shiao Y., Wang X.G., Lin X.J., Xie Y.H., Li Y.C., Gao H.Y., Luo Y.B. 2006.** Tomato fruit development and ripening are altered by the silencing of *LeEIN2* gene. *Journal of Integrative Plant Biology*. 48 (12): 1478–1485.
- Zhu Y., Nam J., Carpita N. C., Matthyse A. G., Gelvin S. B. 2003a.** *Agrobacterium*–mediated root transformation is inhibited by mutation of an *Arabidopsis* cellulose synthase–like gene. *Plant Physiology*. 133: 1000–1010.
- Zhu Y., Nam J., Humara J.M., Mysore K.S., Lee L.Y., Cao H., Valentine L., Li J., Kaiser A.D., Kopecky A.L., Hwang H.-H., Bhattacharjee S., Rao P. K., Tzfira T., Rajagopal J., Yi H., Veena, Yadav B.S., Crane Y.M., Lin K., Larcher Y., Gelvin M.J. K., Knue M., Ramos C., Zhao X., Davis S.J., Kim S., Ranjith-Kumar C. T., Choi Y.J., Hallan V. K., Chattopadhyay S., Sui X., Ziemienowicz A., Matthyse A.G., Citovsky V., Hohn B., Gelvin S.B. 2003b.** Identification of *Arabidopsis* *rat* mutants. *Plant Physiology*. 132: 494–505.
- Zubko E., Adams C.J., Macháèková I., Malbeck J., Scollan C., Meyer P. 2002.** Activation tagging identifies a gene from *Petunia hybrida* responsible for the production of active cytokinins in plants. *Plant Journal*. 29 (6): 797–808.