

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
II. Objetivos	53

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 9</i> (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
V. Discusión	201
VI Conclusiones	235
Bibliografía	239