



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario Mixto de Biología Molecular y
Celular de Plantas

Identificación de genes de tomate (*Solanum lycopersicum*
L.) relacionados con el desarrollo de la parte aérea
mediante mutagénesis insercional

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Biotecnología Molecular y Celular de
Plantas

AUTOR/A: Rodríguez Cuesta, Álvaro

Tutor/a: Atarés Huerta, Alejandro

Cotutor/a: Moreno Ferrero, Vicente

Director/a Experimental: MARTIN VASQUEZ, CONSTANZA ANDREA

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

TRABAJO FINAL DE MÁSTER

***IDENTIFICACIÓN DE GENES DE
TOMATE
(Solanum lycopersicum L.)
RELACIONADOS CON EL
DESARROLLO DE LA PARTE
AÉREA MEDIANTE MUTAGÉNESIS
INSERCIONAL***

Autor

Álvaro Rodríguez Cuesta

Directores

Alejandro Atarés Huerta

Vicente Moreno Ferrero

Directora experimental

Constanza Martín Vásquez

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP)

Universidad Politécnica de Valencia (UPV)

Enero, 2023

Título: Identificación de genes de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) relacionados con el desarrollo de la parte aérea mediante mutagénesis insercional.

Resumen

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una de las hortalizas más producidas y consumidas a nivel mundial y desde su domesticación en América del Sur y Central ha sido empleado por multitud de culturas. Pero su uso no solo se limita a la alimentación, ya que el tomate es una especie muy usada en la investigación por sus características, como su facilidad de cultivo y la producción de un fruto carnoso. El cultivo *in vitro* es una herramienta clave en la investigación vegetal, ya que permite la obtención de plantas mutantes y el estudio de diferentes procesos, como la morfogénesis. Para favorecer su obtención se puede hacer uso de técnicas de mutagénesis, como la mutagénesis insercional, con trampas génicas. Por ello, el objetivo de este trabajo es la evaluación de plantas de tomate mutantes obtenidas mediante mutagénesis insercional y alteradas en el desarrollo de la parte aérea. Se presentan los resultados de seis líneas diferentes de mutantes de tomate. Todas estas líneas, previamente identificadas en nuestro grupo, presentan un fenotipo de menor desarrollo de la parte aérea, con una menor elongación del tallo que los controles *wild type*. En ellas se ha estudiado su desarrollo en condiciones *in vitro* e *in vivo*, además de su capacidad de regeneración adventicia. También se determinó el modo de herencia de la mutación, el número de insertos presentes y el posible fenómeno de cosegregación entre el inserto y la mutación. La finalidad última de estas líneas es la identificación del gen afectado por la mutación.

Palabras clave: Tomate; mutagénesis insercional; cultivo *in vitro*; desarrollo de la parte aérea.

Autor: Álvaro Rodríguez Cuesta.

Localidad y fecha: Valencia, enero de 2023.

Tutores académicos: Alejandro Atarés Huerta y Vicente Moreno Ferrero.

Directora experimental: Constanza Martín Vásquez.

Title: Identification of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) genes related to aerial part development by insertional mutagenesis.

Summary

Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is one of the most produced and consumed vegetables worldwide and since its domestication in South and Central America, it has been used by plenty of cultures. However, its use is not only limited to food, as tomato is a species widely used in research due to its characteristics, such as its ease of cultivation and the production of a fleshy fruit. *In vitro* culture is a key tool in plant research, since it allows obtaining mutant plants and studying different processes, such as morphogenesis. In order to obtain mutant plants, mutagenesis techniques can be used, for example insertional mutagenesis via enhancer traps. Therefore, the main objective of this work is the evaluation of tomato mutant plants obtained by insertional mutagenesis and altered in the development of the aerial part. The results of six different tomato mutant lines are presented. All these lines, previously identified in our group, show a phenotype of less aerial part development, with less stem elongation, than the wild type controls. Their development under *in vitro* and *in vivo* conditions has been studied, as well as their capacity for adventitious regeneration. The way of inheritance of the mutation, the number of inserts present and the possible cosegregation phenomenon between the insert and the mutation were also determined. The ultimate purpose of these lines is to identify the gene affected by the mutation.

Keywords: Tomato; insertional mutagenesis; *in vitro* culture; aerial part development.

Índice de contenido

1. Introducción.....	1
1.1. Tomate: origen y domesticación.....	1
1.2. Importancia económica e investigación.....	3
1.3. Cultivo <i>in vitro</i>	4
1.4. Mutagénesis: uso en la investigación.....	5
1.5. Caracteres de interés en el tomate.....	7
2. Objetivos.....	9
3. Materiales y métodos.....	10
3.1. Material vegetal y construcción génica	10
3.2. Almacenamiento y esterilización de semillas.....	11
3.3. Germinación de las semillas	11
3.4. Medios de cultivo y regeneración.....	12
3.5. Crecimiento de plántulas y plantas	13
3.6. Regeneración de explantes.....	14
3.7. Aclimatación de plantas y cultivo en invernadero.....	14
3.8. Medición de clorofila.....	15
3.9. Cruces sexuales.....	16
3.10. Extracción de semillas	16
3.11. Análisis estadístico	16
4. Resultados.....	18
4.1. 1372 ETMM	18
4.1.1. Fenotipado <i>in vitro</i>	18
4.1.2. Fenotipado <i>in vivo</i>	21
4.1.3. Análisis de modo de herencia y número de insertos	25
4.1.4. Análisis de cosegregación	25
4.2. 2114 ETMM	26

4.2.1. Fenotipado <i>in vitro</i>	26
4.2.2. Fenotipado <i>in vivo</i>	28
4.2.3. Análisis de modo de herencia y número de insertos	32
4.2.4. Análisis de cosegregación	32
4.3. 1415 ETMM	32
4.3.1. Fenotipado <i>in vitro</i>	33
4.3.2. Fenotipado <i>in vivo</i>	34
4.3.3. Análisis de modo de herencia	36
4.3.4. Análisis del número de insertos	37
4.3.5. Análisis de cosegregación	38
4.4. 2059 ETMM	38
4.4.1. Fenotipado <i>in vitro</i>	39
4.4.2. Fenotipado <i>in vivo</i>	40
4.4.3. Análisis de cosegregación	43
4.5. 2099 ETMM	43
4.5.1. Fenotipado <i>in vitro</i>	44
4.5.2. Fenotipado <i>in vivo</i>	45
4.5.3. Análisis de cosegregación	47
4.6. 125 ETMM	47
4.6.1. Fenotipado <i>in vitro</i>	47
4.6.2. Fenotipado <i>in vivo</i>	49
4.6.3. Análisis de modo de herencia	50
4.6.4. Análisis del número de insertos y cosegregación	50
5. Discusión	52
6. Conclusiones	58
7. Referencias bibliográficas	60

Índice de figuras

Figura 1. A) Planta de tomate. B) Detalle de una hoja de tomate. C) Detalle de una flor de tomate. D) Diferentes frutos de tomate en varias etapas de maduración.....	1
Figura 2. Mapa que recoge la ruta del proceso de domesticación del tomate a través de América (Adaptado de Razifard et al., 2020).....	2
Figura 3. A) Proporción por continentes de producción de tomate fresco en 2021. B) Toneladas totales producidas de tomate fresco por país en 2021. (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2021).....	4
Figura 4. Esquema de las vías morfogénicas que puede seguir un explante en su proceso de selección, en función de la formación de callo desorganizado (izquierda) o tipo de estructuras producidas (derecha).	5
Figura 5. Esquema del funcionamiento de un sistema enhancer trap (Durick et al., 1999).	6
Figura 6. Planta de tomate Micro Tom en la que se puede apreciar su reducido tamaño.	8
Figura 7. Esquema del vector pD991 utilizado para transformar los explantes de tomate y obtener así las líneas de estudio Enhancer Trap.	10
Figura 8. Esquema de los cortes realizados en una plántula de tomate para poder separar el ápice meristemático de los explantes de cotiledón e hipocótilo.	13
Figura 9. Fórmula utilizada para conocer el contenido en clorofila A (arriba) y B (abajo) en las hojas de tomate analizadas.	15
Figura 10. Detalle de plantas wild type (WT) y mutantes (M) pertenecientes a la línea 1372 ETMM. A) Plantas TG3 tras 34 días de crecimiento en medio MB3. B) Plantas TG4 tras 28 días de crecimiento en medio MB3. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.	19
Figura 11. Proceso de enraizamiento adventicio de explantes wild type (WT) y mutantes (M) de la línea 1372 ETMM de hipocótilo (izquierda) y cotiledón (derecha) tras 28 días de crecimiento en medio I40. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.	19
Figura 12. Desarrollo de los explantes de hipocótilo wild type y mutantes de la línea 1372 ETMM a los 28 días tras el subcultivo en medio MB3. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.	20

Figura 13. Proceso de regeneración adventicia de explantes wild type (WT) y mutante (M) de la línea 1372 ETMM. A) Explantes de cotiledón tras 28 días de crecimiento en medio IKZ. B) Brotes elongados a partir de callos organogénicos provenientes de explantes de cotiledón, tras el subcultivo en medio IK y 29 días de crecimiento. C) Elongación de explantes tras 27 días en medio MB3. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.....	21
Figura 14. Proceso de desarrollo de plantas wild type (WT) y mutantes (M) pertenecientes a la TG3 de la línea 1372 ETMM en condiciones in vivo. A) 14 días tras germinación. B) 43 días tras germinación. C) 78 días tras germinación. D) 89 días tras germinación.. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.....	22
Figura 15. Longitud media de los entrenudos (cm) en plantas wild type (WT) y mutantes (M) de la línea 1372 ETMM. Se representa la media \pm desviación estándar (n = 3). Los 2 * indican diferencias muy significativas (p < 0,01) según una prueba t.	22
Figura 16. Detalle de hojas wild type (WT) y mutantes (M) de la TG3 perteneciente a la línea 1372-1M ETMM. Se observa el fenotipo clorótico característico presente en la hoja. A) 63 días tras germinación. B) 89 días tras germinación. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.....	23
Figura 17. Desarrollo de plantas wild type (WT) y mutante (M) perteneciente a la TG4 de la línea 1372-1M-1M ETMM. A) 37 días de cultivo en el invernadero tras la germinación. B) Comparación de las hojas de las plantas WT y M en las que se observa el patrón clorótico característico C) Comparación de las raíces WT y M, con un peso fresco de 8,37 g y 3,98 g respectivamente. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.	23
Figura 18. Contenido medio en clorofila A y B (mg/g material vegetal) de la zona apical y basal de folíolos de hojas de plantas wild type (WT) y mutantes (M) pertenecientes a la línea 1372 ETMM. Se representa la media \pm desviación estándar (n = 3). Los 2 * indican diferencias muy significativas (p < 0,01), según una prueba t.	24
Figura 19. Detalle de flores en estadio de antesis (arriba) y de frutos maduros (abajo) procedentes de plantas wild type (WT) y mutantes (M) de la línea 1372 ETMM. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.	25
Figura 20. Detalles de plantas wild type (WT) y mutantes (M) pertenecientes a la línea 2114 ETMM. A) Plantas tras 29 días de crecimiento en medio MB3. B) Plantas tras 49 días de crecimiento en medio MB3. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.	26

Figura 21. Proceso de enraizamiento adventicio de explantes de hipocótilo (izquierda) y cotiledón (derecha) de plantas wild type (WT) y mutantes (M) pertenecientes a la línea 2114 ETMM tras 28 días de desarrollo en medio I40. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.	27
Figura 22. Proceso de regeneración adventicia de explantes de cotiledón wild type (WT) y mutantes (M) pertenecientes a la línea 2114 ETMM. A) Tras 32 días en medio IKZ. B) Tras 32 días en medio IK. C) Tras 28 días en medio MB3. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.	28
Figura 23. Desarrollo de plantas wild type (MB3) y mutantes (M) pertenecientes a la TG3 de la línea 2114 ETMM en condiciones in vivo. A) 14 días tras germinación. B) 43 días tras germinación. C) 65 días tras germinación. D) 98 días tras germinación. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.	29
Figura 24. Longitud media de los entrenudos (cm) en plantas wild type (WT) y mutantes (M) de la línea 2114 ETMM. Se representa la media \pm desviación estándar (n = 3). Los 3 * indican diferencias altamente significativas (p < 0,001) según una prueba t.	29
Figura 25. Desarrollo de las plantas wild type (WT) y mutantes (M) pertenecientes a la TG4 de la línea 2114 ETMM en condiciones in vivo. A) 23 días tras la germinación. B) 37 días tras la germinación. C) 64 días tras la germinación. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.	30
Figura 26. Desarrollo de plantas wild type (WT) y mutantes (M) pertenecientes a la línea 2114 ETMM aclimatadas tras 82 días (A) y 132 días (B) de cultivo en condiciones in vivo. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.	31
Figura 27. Detalle de flores en estadio de antesis (arriba) y frutos maduros (abajo) procedentes de plantas wild type (WT) y mutantes (M) de la línea 2114 ETMM. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.	31
Figura 28. Detalle de plantas wild type (WT) y mutantes (M) pertenecientes a la línea 1415 ETMM. A) Plantas tras 28 días de crecimiento en medio MB3. B) Plantas tras 60 días de crecimiento en medio MB3. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.	33
Figura 29. Desarrollo del proceso de regeneración adventicia de explantes de cotiledón wild type (WT) y mutantes (M) pertenecientes a la línea 1415 ETMM. A) Tras 29 días de cultivo en medio IKZ. B) Tras 41 días de cultivo en medio IK. C) Tras 36 días de cultivo en medio MB3. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.	34

Figura 30. Desarrollo de plantas wild type (WT) y mutantes (M) pertenecientes a la línea 1415 ETMM en el invernadero. A) 20 días tras la germinación. B) 52 días tras la germinación. C) 91 días tras la germinación. D) 127 días tras la germinación. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.	35
Figura 31. Desarrollo in vivo de plantas wild type (WT) y mutantes (M) pertenecientes a la línea 1415 ETMM tras ser aclimatadas. A) 38 días. B) 52 días. C) 79 días. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.	35
Figura 32. Detalle de flores en estadio de anthesis (arriba) y frutos maduros (abajo) provenientes de plantas wild type (WT) y mutantes (M) pertenecientes a la línea 1415 ETMM. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.	36
Figura 33. Desarrollo en condiciones in vitro de plantas wild type (WT) y mutantes (M). A) 15 días tras el subcultivo. B) 30 días tras el subcultivo. C) 54 días tras el subcultivo. D) 162 días tras el subcultivo. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.	39
Figura 34. Desarrollo del proceso de regeneración adventicia de explantes de cotiledón de plantas wild type (WT) y mutantes (M) pertenecientes a la línea 2059 ETMM. A) Tras 30 días en medio IKZ. B) Tras 22 días en medio IK. C) Tras 36 días en medio MB3. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.	40
Figura 35. Desarrollo de plantas wild type (WT) y mutantes (M) pertenecientes a la línea 2059 ETMM en condiciones de invernadero. A) 15 días tras la germinación. B) 37 días tras la germinación. C) 59 días tras la germinación. D) 91 días tras la germinación. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.	41
Figura 36. Desarrollo de plantas wild type (WT) y mutantes (M) pertenecientes a la línea 2059 ETMM en el invernadero. A) 31 días tras la aclimatación. B) 59 días tras la aclimatación. C) 68 días tras la aclimatación. D) Detalle de la distancia entrenudos. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.	42
Figura 37. Detalle de flores en estadio de anthesis (arriba) y frutos maduros (abajo) de plantas wild type (WT) y mutantes (M) pertenecientes a la línea 2059 ETMM. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.	42
Figura 38. Desarrollo in vitro de plantas wild type (WT) y mutantes (M) pertenecientes a la línea 2099 ETMM. A) 17 días tras el subcultivo. B) 27 días tras el subcultivo. C) 58 días tras el subcultivo. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.	44
Figura 39. Proceso de regeneración adventicia de explantes de cotiledón de plantas wild type (WT) y mutantes (M) pertenecientes a la línea 2099 ETMM. A) Tras 32 días en	

medio IKZ. B) Tras 32 días en medio IK. C) Tras 28 días en medio MB3. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.	45
Figura 40. Desarrollo de plantas wild type (WT) y mutantes (M) pertenecientes a la línea 2099 ETMM en condiciones de invernadero. A) 49 días tras la germinación. B) 64 días tras la germinación. C) 127 días tras la germinación. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.	45
Figura 41. Desarrollo de plantas wild type (WT) y mutantes (M) pertenecientes a la línea 2099 ETMM aclimatadas a condiciones in vivo. A) 41 días tras la aclimatación. B) 52 días tras la aclimatación. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.	46
Figura 42. Detalle de flores en estadio de anthesis (arriba) y frutos maduros (abajo) pertenecientes a plantas wild type (WT) y mutantes (M) de la línea 2099 ETMM. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.	46
Figura 43. Desarrollo de plantas wild type (WT) y mutantes (M) pertenecientes a la línea 125 ETMM en condiciones in vitro. A) 27 días tras el subcultivo en medio MB3. B) 44 días tras el subcultivo en medio MB3. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.	48
Figura 44. Desarrollo del proceso de regeneración adventicia a partir de explantes de cotiledón de plantas wild type (WT) y mutantes (M) pertenecientes a la línea 125 ETMM. A) Tras 28 días en medio IKZ. B) Tras 22 días en medio IK. C) Tras 28 días en medio MB3. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.	49
Figura 45. Desarrollo de plantas wild type (WT) y mutantes (M) pertenecientes a la línea 125 ETMM aclimatadas a condiciones in vivo. A) Tras 58 días en invernadero. B) Tras 77 días en invernadero. C) Tras 96 días en invernadero. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.	49

Índice de tablas

Tabla 1. Composición de los diferentes medios de cultivo utilizados durante los ensayos realizados.	13
Tabla 2. Composición de la solución de fertirrigación utilizada en el invernadero.	15
Tabla 3. Análisis de la segregación del modo de herencia del fenotipo mutante presente en la línea 1415 ETMM.	37
Tabla 4. Análisis de la segregación de la resistencia a la kanamicina, para conocer el número de insertos presentes en la línea 1415 ETMM.	37
Tabla 5. Análisis de la segregación del modo de herencia del fenotipo mutante presente en la línea 125 ETMM.	50
Tabla 6. Análisis de la segregación de la resistencia a la kanamicina, para conocer el número de insertos presentes en la línea 125 ETMM.	51

1. Introducción

1.1. Tomate: origen y domesticación

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una especie vegetal perteneciente a la familia Solanaceae, dentro de la que se encuentran otras plantas de interés económico como las patatas (*Solanum tuberosum*), los pimientos (*Capsicum annuum*), las berenjenas (*Solanum melongena*) o el tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Bai et al., 2007).

La planta de tomate es una herbácea perenne autógama que puede llegar a superar el metro y medio de altura durante su crecimiento y que presenta gran cantidad de tricomas tanto en el tallo como en las hojas. Estas últimas están formadas por 7 a 9 folíolos verdes, lobulados y con borde dentado. Las flores tienen 5 o más sépalos, 5 o más pétalos de color amarillo, 5 o 6 estambres y un ovario con 2 o más segmentos. El fruto del tomate es la parte de la planta que se consume. Se trata de una baya cuyo peso puede llegar a alcanzar los 600 g, constituida por pericarpio, tejido placentario y semillas. Cuando está inmaduro, el tomate es de color verde, volviéndose rojo al madurar (**Figura 1**) (López Marín, 2017).



Figura 1. A) Planta de tomate. B) Detalle de una hoja de tomate. C) Detalle de una flor de tomate. D) Diferentes frutos de tomate en varias etapas de maduración.

El origen del tomate se sitúa en la región andina de América del Sur, que va desde el centro de Ecuador, pasando por Perú hasta el norte de Chile y en las Islas Galápagos. Las especies salvajes se desarrollaron en una amplia variedad de condiciones ambientales, por lo que muchas de ellas se adaptaron a un clima concreto. A este hecho hay que sumarle que normalmente se situaban en valles aislados, lo que ha provocado la existencia de una

gran diversidad de especies silvestres (Bergougnoux, 2014), como: *S. cheesmaniae*, *S. galapense*, *S. pimpinellifolium*, *S. chilense*, *S. chmielewskii*, *S. habrochaites*, *S. pennellii*, *S. neorickii*, *S. peruvianum*, *S. arcanum*, *S. huaylasense* y *S. corneliomulleri* (Peralta et al., 2005, 2008).

Existían dos hipótesis sobre el inicio de la domesticación del tomate antes de su llegada a Europa en función del lugar en el que se dio, la peruana y la mexicana (Bergougnoux, 2014). Su cultivo se expandió desde la región de América Central a Europa y América del Norte, debido a que los tomates de estas zonas comparten isoenzimas y marcadores moleculares (Bauchet et al., 2012; Peralta & Spooner, 2007). Además, gracias a un análisis de polimorfismos de nucleótido único (SNPs), se cree que ocurrió un primer paso de predomesticación en la región andina (hipótesis peruana), seguido de la domesticación en Mesoamérica (hipótesis mexicana), para posteriormente ser introducido en Europa por parte de los españoles, desde donde finalmente se dispersó al resto del mundo (Blanca et al., 2012). En estudios recientes se ha comprobado que *S. pimpinellifolium* dio lugar a *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* antes de la llegada de los humanos a América, al pasar de condiciones desérticas a los climas más húmedos de la región andina. Posteriormente, los primeros agricultores de la región habrían comenzado la domesticación propiamente dicha, centrándose sobre todo en la morfología del fruto. Estas plantas se habrían trasladado a Mesoamérica, donde se habría dado una segunda fase de mejora, causando la aparición de *S. lycopersicum* var. *lycopersicum* (**Figura 2**) (Blanca et al., 2022).

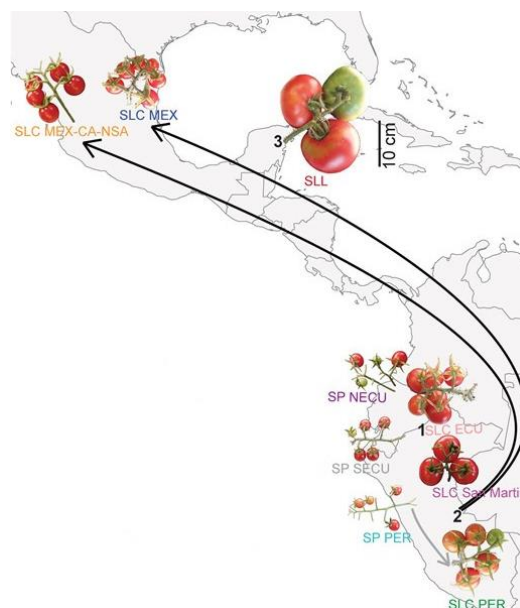


Figura 2. Mapa que recoge la ruta del proceso de domesticación del tomate a través de América (Adaptado de Razifard et al., 2020).

Tras la conquista de la ciudad azteca de Tenochtitlan en 1521, Hernán Cortés llevó una variedad de tomate amarillo a España, desde donde se distribuyó a Nápoles, que por aquel entonces aún seguía bajo dominio español. En un primer momento, en Europa se dio un uso ornamental y no alimentario a las plantas de tomate, al descubrirse que estaban emparentadas con especies tóxicas ya conocidas del género *Solanum*, como la mandrágora o la belladona. En el siglo XVIII, el tomate se exportó desde Inglaterra hacia Oriente Medio, Asia y América del Norte, favoreciendo así su expansión por el resto del mundo. Ya en el siglo XIX, en Estados Unidos, Alexander W. Livingston desarrolló variedades modernas de tomate, con características interesantes para el consumo humano, dando inicio al proceso de mejora de este cultivo. Finalmente, en el siglo XX, las empresas productoras de semillas aplicaron la metodología de los híbridos F1 para desarrollar variedades modernas de tomate que presenten caracteres de interés de ambos parentales, pero que, debido a la segregación de la descendencia, no pudieran ser mantenidas por los agricultores (Bergougnoux, 2014).

1.2. Importancia económica e investigación

El tomate se cultiva comercialmente para ser consumido tanto fresco como en forma de pasta, sopa, zumo, salsa o polvo (Bergougnoux, 2014). En el año 2021 se produjeron aproximadamente 189 millones de toneladas de tomate en todo el mundo, siendo los principales productores China, India, Turquía, Estados Unidos e Italia, con España ocupando el séptimo lugar (**Figura 3**) (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2021). En nuestro país, el tomate es la hortaliza más producida, con casi 4,8 millones de toneladas en 2021, seguida del pimiento, la cebolla, la sandía y la lechuga. Dentro de España, las principales regiones productoras de tomate son Extremadura (2,2 millones de toneladas), Andalucía (1,7 millones de toneladas) y la Región de Murcia (220 mil toneladas) (Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, 2021). El tomate es un alimento con un bajo contenido en calorías y grasas que aporta diferentes vitaminas, como la A, B y C, y minerales como el potasio (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición, 2007). Además, es rico en licopeno, un carotenoide con alto poder antioxidante, por lo que su consumo es beneficioso para las personas (Bhatia et al., 2004).

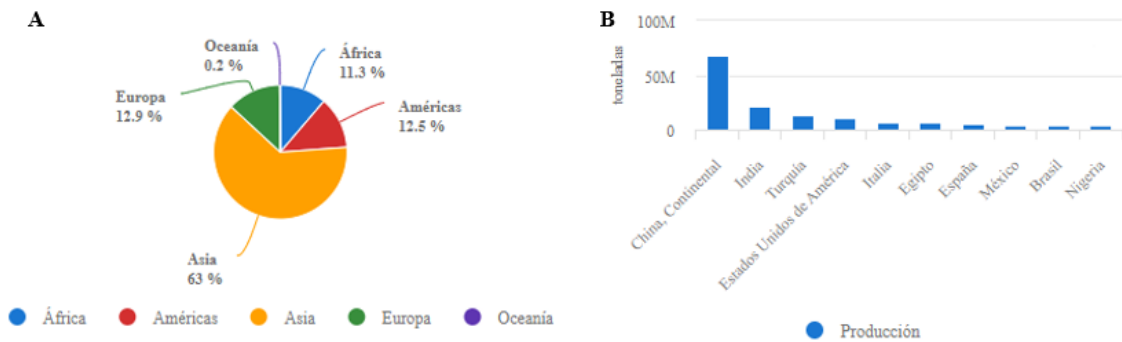


Figura 3. A) Proporción por continentes de producción de tomate fresco en 2021. B) Toneladas totales producidas de tomate fresco por país en 2021. (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2021)

El uso del tomate como especie modelo en la investigación científica se ha incrementado en los últimos años, ya que presenta una serie de características que lo hacen muy interesante: puede ser cultivado en multitud de condiciones ambientales y se adapta bien a diferentes tipos de estrés, como la sequía o la salinidad, su ciclo de vida es relativamente corto, es insensible al fotoperiodo, por lo que puede florecer independientemente de la duración del día, se puede controlar fácilmente su polinización e hibridación, su genoma es relativamente pequeño (unas 900 Mb), lo que facilita los estudios genéticos y se puede propagar vegetativamente mediante esquejes y regenerar a partir de diferentes partes de la planta (Bergougnoux, 2014).

1.3. Cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* engloba al conjunto de técnicas que permiten el crecimiento de plantas o sus órganos y tejidos en un medio de cultivo en condiciones asépticas y controladas, iniciado por Haberlandt al inicio del siglo XX. Su importancia radica en tres aspectos: permite obtener plantas libres de enfermedades (saneamiento), mantener y multiplicar genotipos de interés (multiplicación) y modificar las características genéticas de las plantas (mejora genética) (Espinosa-Leal et al., 2018).

Una de las claves del cultivo *in vitro* es la capacidad de aprovechar la morfogénesis, que consiste en el crecimiento organizado de un fragmento de la planta (explante) con el fin de regenerarla de nuevo. Esta morfogénesis puede ser indirecta, si se pasa por una etapa de callo desorganizado, o directa, si se obtiene de nuevo la planta sin la formación de callo. Además, la morfogénesis también puede clasificarse en organogénica, si da lugar a tallos (caulogénesis) o raíces (rizogénesis), o en embriogénica, si se forman embriones a

partir del explante (**Figura 4**) (Phillips, 2004; Espinosa-Leal et al., 2018). El proceso de regeneración también puede causar la variación del material genético del explante, sobre todo en la morfogénesis indirecta, donde hay una mayor posibilidad de que sucedan mutaciones aleatorias en el genoma de las células vegetales (Gerszberg et al., 2015). Esto puede llegar a ser interesante de cara a la obtención de nuevas variedades.

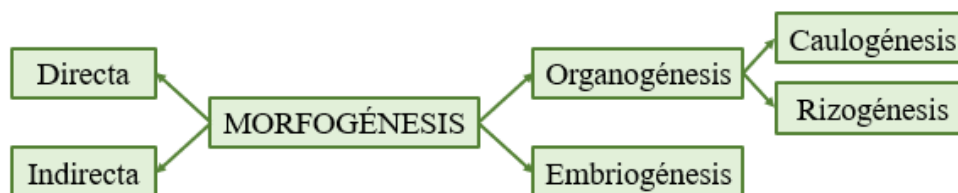


Figura 4. Esquema de las vías morfogénicas que puede seguir un explante en su proceso de selección, en función de la formación de callo desorganizado (izquierda) o tipo de estructuras producidas (derecha).

El proceso de regeneración de las plantas es dependiente de multitud de factores, como son el genotipo, la edad de la planta, la zona de la que se obtiene el explante, el medio de cultivo y las condiciones de este. En el caso del tomate se han podido regenerar plantas completas a partir de diferentes tipos de explante (cotiledón, hipocótilo u hojas). Además de todo lo anterior, en el cultivo *in vitro* es clave el uso de fitohormonas como las auxinas o las citoquininas, ya que posibilitan o favorecen el desarrollo de determinados procesos morfogénicos. La relación entre ellas también es importante, ya que un medio con una mayor cantidad de auxinas favorecerá la rizogénesis, mientras que si el medio tiene una mayor concentración de citoquininas permitirá que ocurra la caulogénesis. Si ambas fitohormonas se encuentran en la misma proporción se dará la formación de un callo desorganizado. Los explantes de tomate no suelen necesitar del uso de auxinas para favorecer su enraizamiento. Otras variables que influyen sobre los procesos de cultivo *in vitro* son el tipo de luz, la temperatura y la consistencia del medio (Gerszberg et al., 2015).

1.4. Mutagénesis: uso en la investigación

La modificación de caracteres de interés y la introducción de nuevas características en los cultivos es un campo muy importante de la investigación vegetal, al permitir mejorar las especies utilizadas por el ser humano para que resulten más nutritivas, productivas o resistentes a las condiciones climáticas adversas (Gerszberg et al., 2016).

Pero para poder llevar a cabo esas modificaciones es necesario conocer cuáles son los genes que intervienen en cada uno de esos caracteres para saber sobre cuál de ellos

queremos actuar. Una buena forma de abordar esta cuestión es mediante el uso de la mutagénesis inducida, ya que permite generar una amplia diversidad genética sin depender de la búsqueda e identificación de mutantes naturales que se producen con una baja probabilidad. Para la generación de mutantes se puede hacer uso de mutágenos físicos, como los rayos gamma, o químicos, como el metanosulfonato de etilo (EMS, por sus siglas en inglés). Estos métodos tienen el inconveniente de producir mutaciones aleatorias que no permiten abordar de manera rápida la identificación del gen alterado en cada mutante (Chaudhary et al., 2019).

Por otra parte, se puede hacer uso de la mutagénesis insercional, en la que el agente mutagénico es un fragmento de ADN, como un *T-DNA*, transposón o retrotrasposón. Cuando estos elementos se insertan dentro de un gen, bien sea en la región promotora o en la codificante, se produce su anulación de expresión o su modificación, de forma que se pueden observar fenotipos mutantes asociados a esa alteración. La ventaja principal de este método de mutagénesis es que, como se conoce la secuencia del agente mutagénico, la región responsable queda etiquetada, lo que facilita su estudio (Chaudhary et al., 2019).

Aunque los sistemas de transposón de maíz *Ac/Ds* y *En/Spm* pueden ser utilizados en tomate, el sistema basado en *T-DNA* ofrece grandes ventajas, como una integración estable que se mantiene en sucesivas generaciones y que es totalmente aleatoria. Además, aunque cualquier *T-DNA* serviría para este proceso, se han generado construcciones como las trampas génicas que aportan un valor añadido a este tipo de estrategias. Dentro de estos últimos se incluye el *enhancer trap*, que permite la identificación de elementos reguladores ya que porta un gen reportero con un promotor mínimo, de forma que si la construcción se integra bajo la influencia de un intensificador, éste puede expresarse (**Figura 5**) (Pérez-Martín et al., 2017).

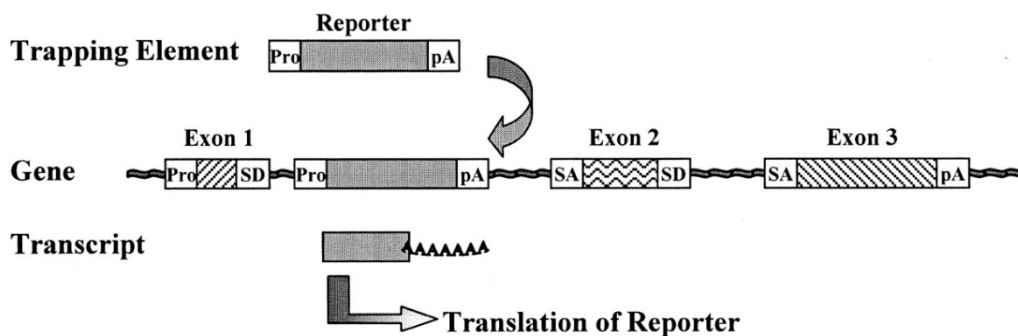


Figura 5. Esquema del funcionamiento de un sistema *enhancer trap* (Durick et al., 1999).

1.5. Caracteres de interés en el tomate

Existen multitud de aproximaciones a la hora de mejorar los cultivos para hacerlos más resistentes o productivos. Esto se debe a que es posible modificar diferentes caracteres con el fin de que las plantas tengan un mejor rendimiento. Gracias a las técnicas de ingeniería genética, se puede conseguir de forma más rápida los objetivos, sin tener que depender de la mejora tradicional (Gerszberg et al., 2015).

Dentro de la mejora de caracteres que aumentan la resistencia al estrés abiótico se encuentran aquellos relativos a la salinidad, las altas y bajas temperaturas, el estrés oxidativo, los metales pesados o la sequía. Lo interesante de este tipo de estrés es que hay una gran cantidad de genes implicados en señalización, regulación de las diferentes vías o que codifican para enzimas que confieren resistencia, facilitando y acelerando el proceso (Gerszberg et al., 2015).

Otro grupo de caracteres interesantes en la mejora son los relacionados con el estrés biótico. Tradicionalmente, se ha hecho uso de pesticidas para controlar las enfermedades que afectan a los cultivos. Pero en la actualidad, gracias a la investigación, se han descubiertos los mecanismos que confieren resistencia a las plantas frente a los patógenos. Su modificación puede dar lugar a plantas más resistentes al estrés biótico y a una reducción en la aplicación de productos utilizados para combatir las plagas (Gerszberg et al., 2015).

Además de mejorar la resistencia a diferentes tipos de estrés, de cara a los agricultores y consumidores también puede ser interesante la mejora de las características morfológicas del tomate. En el caso del fruto, se puede incrementar su calidad centrándose en las propiedades organolépticas y nutricionales del mismo, ya que las características que más valoran los consumidores suelen ser el sabor la textura y el tamaño (Gerszberg et al., 2015).

Por último, si nos fijamos en la parte vegetativa del tomate, hay que tener en cuenta que su modificación podría ayudar a mejorar caracteres como el porte de la planta, su compacidad y, de forma indirecta, el rendimiento. Un ejemplo de esta relación se produjo en la revolución verde con la introducción de los genes *semidwarf SD1* en arroz y *Rht* en trigo. De esta forma se obtuvo un incremento muy notorio en el rendimiento de dichos cultivos (Itoh et al., 2004).

En el caso de la compacidad en el desarrollo vegetativo se han identificado varios mutantes afectados en ese carácter. Uno de estos es el locus *br*, que contribuye a entrenudos más cortos en tomate y, aunque el locus ha sido mapeado en el cromosoma 1, el gen no ha sido clonado aún (Barabaschi et al., 2016). Además, los análisis de mutantes compactos han revelado que algunas de las mutaciones están relacionadas con rutas de biosíntesis y traducción de señales de fitohormonas (Z. feng Li et al., 2018).

Además, un ejemplo de mutante afectado en estos caracteres que está teniendo un impacto enorme en tareas de investigación es el caso de la variedad de tomate Micro Tom (**Figura 6**). Estas plantas se caracterizan por un fenotipo enano y la primera utilidad que se les dio fue la de una planta ornamental. Al estudiar las causas de su fenotipo se comprobó que presentaban tres mutaciones recesivas en los genes *DWARF*, *MINIATURE* y *SELF-PRUNING*. El primero codifica para una proteína p450 que cataliza uno de los pasos de biosíntesis de brasinoesteroides, el segundo está ligado a la señalización de giberelinas y el tercero codifica para una proteína reguladora que controla la relación entre ápices vegetativos y reproductivos. Por último, resultan evidentes las ventajas de esta planta para usarse en investigación, ya que además de ser de menor tamaño y tener un ciclo reproductivo mucho más corto que el resto de variedades de tomate, es capaz de producir frutos de forma similar a una *wild type* y su manejo implica un menor espacio y el empleo de menos recursos (Martí et al., 2006).



Figura 6. Planta de tomate Micro Tom en la que se puede apreciar su reducido tamaño.

2. Objetivos

Como se ha comentado en el apartado anterior, la mejora de los cultivos es un proceso clave para incrementar su rendimiento. Uno de los aspectos a estudiar para mejorar ese carácter es el desarrollo vegetativo de las plantas de tomate, para lo que es necesario conocer los genes implicados en él.

Por ello, el objetivo principal de este Trabajo Final de Máster es la evaluación y caracterización de diferentes líneas de tomate obtenidas previamente en el programa de mutagénesis insercional de nuestro grupo que presentan alteraciones en el desarrollo de la parte aérea (menor tamaño).

Este objetivo general se concreta en los siguientes objetivos concretos:

- A- Evaluación del fenotipo de las plantas en condiciones *in vitro* e *in vitro*.
- B- Caracterización del modo de herencia del carácter afectado.
- C- Determinación del número de insertos presentes en cada línea mediante el análisis de sus descendencias.
- D- Identificación de la existencia del fenómeno de cosegregación entre fenotipo mutante y el gen *nptII* presente en el *T-DNA*.
- E- Obtención de poblaciones F2 a partir del cruce de plantas mutantes con *S. pimpinellifolium* para abordar la identificación del gen afectado cuando no exista cosegregación.

3. Materiales y métodos

3.1. Material vegetal y construcción génica

Las plantas de tomate que se utilizaron durante los experimentos del trabajo pertenecían al cultivar *Money Maker* y habían sido transformadas previamente por el grupo de trabajo con el vector pD991 (**Figura 7**), donado amablemente por el Dr. Thomas Jack de la Universidad de Dartmouth. Este contiene entre los bordes izquierdo (LB) y derecho (RB) el gen delator *uidA* controlado por el promotor mínimo -60 del gen 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y el gen marcador *ntpII* controlado por un promotor constitutivo.

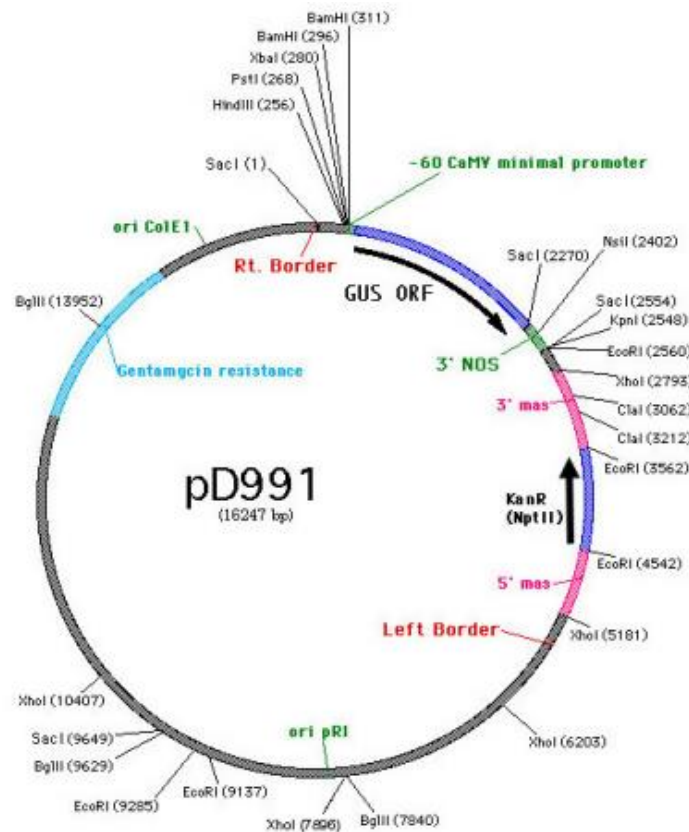


Figura 7. Esquema del vector pD991 utilizado para transformar los explantes de tomate y obtener así las líneas de estudio *Enhancer Trap*.

Las líneas usadas en el trabajo se designaron de la siguiente forma: la planta transgénica se nombra con un número (por ejemplo 1372) seguido de las letras ETMM, que indican que es una planta que contiene un *T-DNA* procedente de un vector de *enhancer trap* y pertenece al cultivar *Money Maker*. Así 1372 ETMM sería la planta TG1, obtenida a partir de la regeneración del explante transformado. A las generaciones posteriores obtenidas por autofecundación a partir de ella (TG2, TG3...) se les van añadiendo números al

nombre para poder realizar un seguimiento. Por ejemplo, 1372-1-2 ETMM sería la planta 2 de la tercera generación (TG3) de la línea 1372, obtenida a partir de la planta 1 de la generación 2 (TG2).

3.2. Almacenamiento y esterilización de semillas

Las semillas de tomate que se utilizaron en los experimentos se almacenaron en bolsas de plástico con autocierre, etiquetadas y agrupadas por línea dentro de recipientes herméticos con perlas de gel de sílice de 3 a 5 nm (PanReac). Esos recipientes se guardaron en un frigorífico a 4 °C para preservarlas el mayor tiempo posible hasta su uso.

En el momento de utilizar las semillas se realizó un proceso de esterilización superficial. Se formaron paquetes de gasa con las semillas en su interior y se sumergieron en 200 mL de una solución de lejía comercial (Divex) diluida al 50% con agua destilada y unas gotas de Tween 20, en la que se mantuvieron durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, con el fin de eliminar los restos de lejía que pudieran quedar en la cubierta de las semillas, los sacos se pasaron por sucesivos botes con 200 mL de agua estéril, donde se dejaron durante 5, 10 y 15 minutos. Este protocolo se repitió pasadas 24 horas para mejorar el proceso de esterilización. Entre ambos, las semillas se mantuvieron en agua estéril para favorecer la germinación.

3.3. Germinación de las semillas

Tras el proceso de esterilización de las semillas, éstas se transfirieron de los paquetes de gasa a placas Petri con dos círculos de papel de filtro estériles como soporte y 10 mL de agua destilada estéril. Las placas se sellaron con parafilm y se mantuvieron en oscuridad a 28 °C en una estufa durante un mínimo de 72 horas.

Cuando las semillas desarrollaron la radícula se transfirieron a botes con medio MG, colocándose 12 semillas en cada uno. Los botes se incubaron en cámaras de cultivo con un fotoperiodo de 16 horas de luz (intensidad luminosa de $70 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y 8 horas de oscuridad, a $25 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$, durante al menos 7 días.

3.4. Medios de cultivo y regeneración

Durante los procesos de cultivo *in vitro* se utilizaron diferentes medios de cultivo, cada uno con una finalidad. En la **Tabla 1** se recoge la composición de estos y su uso aparece a continuación:

- Medio de germinación (MG): Se empleó para que las semillas se desarrollaran inicialmente. En este periodo se formó la raíz embrionaria y se desarrolló el hipocótilo, los cotiledones y las primeras hojas de la planta de tomate.
- Medio básico (MB3): Es el medio que usamos para el cultivo y mantenimiento de los ápices meristemáticos. Permitió que se desarrollaran las raíces adventicias a partir de la zona de corte del hipocótilo y que la parte aérea creciera.
- Medio I40: Se empleó para analizar la capacidad de enraizamiento adventicio de diferentes tipos de explante. Se distribuyó en placa Petri y permitió que los explantes de hipocótilo y cotiledón desarrollaran raíces adventicias con la ayuda de la auxina presente, el ácido indolacético.
- Medio IKZ: En este medio se forman callos organogénicos a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo u hoja de tomate, gracias a la relación auxina/citoquininas (ácido indolacético/kinetina + zeatina) y así conocer la capacidad de regeneración de las líneas analizadas.
- Medio IK: Medio idéntico al anterior, pero sin zeatina, en el que los ápices y brotes presentes en un callo organogénico elongan los tallos con el fin de poder ser individualizados para subcultivarlos en un medio de enraizamiento y finalizar el proceso de regeneración.
- Medio ε: Medio de selección basado en el IKZ, al que se le adicionó kanamicina. Su finalidad fue evaluar la resistencia a la kanamicina de una planta mediante el cultivo de explantes de hipocótilo o cotiledón para saber si existe cosegregación entre un inserto de *T-DNA* con el gen *nptII* funcional y el fenotipo mutante.

Tabla 1. Composición de los diferentes medios de cultivo utilizados durante los ensayos realizados.

Medio	MS ^a	Sacarosa (g/L)	Inositol ^b (g/L)	THCl ^c (mg/L)	Vit. SH ^d	AIA ^e (mg/L)	Kinetina ^b (mg/L)	Zeatina ^b (mg/L)	Kanamicina ^b (mg/L)
MG	✓	10	×	×	×	×	×	×	×
MB3	✓	30	0,1	1	×	×	×	×	×
I40	✓	30	0,1	×	✓	4	×	×	×
IK	✓	30	0,1	×	✓	4	4	×	×
IKZ	✓	30	0,1	×	✓	4	4	1	×
ε	✓	30	0,1	×	✓	4	4	1	100

- a) Sales minerales Murashige & Skoog (Duchefa Biochemie) utilizadas según la recomendación del fabricante (Murashige & Skoog, 1962).
- b) Inositol, kinetina, zeatina y kanamicina (Duchefa Biochemie).
- c) THCl: Tiamina-HCl (Sigma-Aldrich).
- d) Mezcla de vitaminas elaboradas según Shahin (1985).
- e) AIA: Ácido indolacético (Sigma-Aldrich).

Los diferentes medios de cultivo, una vez elaborados, se ajustaron a un pH de 5,7 mediante HCl o NaOH, se les añadió 6,8 g/L de agar bacteriológico y se autoclavaron para esterilizarlos durante 30 minutos a 113 °C. Pasado este proceso, se dejaron enfriar y se almacenaron a temperatura ambiente hasta su uso.

3.5. Crecimiento de plántulas y plantas

Para estudiar el desarrollo *in vitro* de las plantas y poder mantenerlas en crecimiento, las plántulas obtenidas en medio MG se subcultivaron a medio MB3, eliminando su raíz embrionaria y cotiledones mediante un bisturí y pasando el ápice meristemático al nuevo medio (**Figura 8**). Los botes con los explantes se colocaron en las cámaras de cultivo con las condiciones ambientales antes nombradas para que se desarrollaran adecuadamente. Durante este proceso, se fueron observando para determinar el fenotipo característico de cada línea y poder documentar las características principales del mismo.

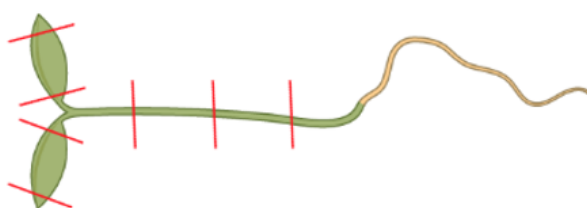


Figura 8. Esquema de los cortes realizados en una plántula de tomate para poder separar el ápice meristemático de los explantes de cotiledón e hipocótilo.

3.6. Regeneración de explantes

Con el fin de analizar la capacidad de regeneración que presentaban las diferentes líneas de estudio, los explantes de cotiledón obtenidos de las plántulas y con un corte en la zona distal y proximal se cultivaron en placas Petri con medio IKZ, se sellaron con parafilm y se incubaron en las cámaras de cultivo. Pasados 28 días, los callos organogénicos que se formaron se transfirieron a botes con medio IK, con el fin de que los ápices y brotes formados elongaran. Finalmente, tras otros 28 días aproximadamente, los brotes se subcultivaron a medio MB3 para su enraizamiento.

3.7. Aclimatación de plantas y cultivo en invernadero

Cuando se quieren transferir las plantas que se encuentran creciendo en las condiciones axénicas de las cámaras de cultivo a las condiciones *in vivo* del invernadero, es necesario llevar a cabo un proceso de aclimatación, ya que *in vitro* las plantas se desarrollan con mayor humedad, menor intensidad de luz, alta disponibilidad de nutrientes y, además, están libres de plagas y enfermedades.

Las plantas se sacaron de los botes en los que se encontraban creciendo, sus raíces se limpiaron con agua para eliminar los restos de medio gelificado que pudieran causar la aparición de hongos, se colocaron en macetas llenas de sustrato y se cubrieron con un vaso de plástico para que el cambio de humedad no fuera tan brusco. Posteriormente se llevaron a los invernaderos, donde se fueron destapando progresivamente para que se adaptaran a las nuevas condiciones de humedad.

En el invernadero las plantas se cultivaron en macetas de 9, 12 o 30 cm de diámetro, en función de su tamaño. Como sustrato se utilizó una mezcla de turba y perlita que se esterilizaba en el autoclave y se fertirrigaron mediante goteo con la solución nutritiva que aparece recogida en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Composición de la solución de fertirrigación utilizada en el invernadero.

Componente	Cantidad
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	2,36 g/L
KNO ₃	381 mg/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	367,5 mg/L
KH ₂ PO ₄	102 mg/L
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	9,76 mg/L
MnO ₄ ·5H ₂ O	33,2 mg/L
CuSO ₄	2,23 mg/L
H ₃ BO ₃	32,55 mg/L
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂ ·4H ₂ O	1,51 mg/L
Fe (quelato)	34,95 mg/L

3.8. Medición de clorofila

Con el fin de conocer el contenido de clorofila A y B presentes en las hojas de tomate se realizó una extracción basada en el protocolo descrito por Carbonell et al. (2015): en primer lugar, se seleccionaron la cuarta y quinta hoja de las plantas que se querían estudiar y se cortaron. Se extrajeron cinco discos foliares a partir de los foliolos mediante un sacabocados, se pesaron y se colocaron en un tubo Falcon recubierto de papel de aluminio que contenía 10 mL de una solución de acetona diluida al 80% con agua destilada. Los tubos se dejaron en agitación orbital a 150 rpm durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se midió la absorbancia de la solución resultante a una longitud de onda de 647 y 663 nm mediante un espectrofotómetro. Con las lecturas obtenidas se obtuvieron los mg de clorofila A o B por g de material vegetal aplicando la fórmula matemática recogida en la **Figura 9**.

$$\text{Clorofila A } \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}} \text{ material vegetal} \right) = \frac{\left((12,21 * \text{abs } 663 \text{ nm}) - (2,81 * \text{abs } 647 \text{ nm}) \right) * 0,01 \text{ l}}{\text{peso discos foliares (g)}}$$

$$\text{Clorofila B } \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}} \text{ material vegetal} \right) = \frac{\left((20,13 * \text{abs } 647 \text{ nm}) - (5,03 * \text{abs } 663 \text{ nm}) \right) * 0,01 \text{ l}}{\text{peso discos foliares (g)}}$$

Figura 9. Fórmula utilizada para conocer el contenido en clorofila A (arriba) y B (abajo) en las hojas de tomate analizadas.

3.9. Cruces sexuales

Para poder abordar la identificación del gen causante del fenotipo observado mediante mapeo por secuenciación, es necesario realizar un cruce sexual entre una planta mutante y una planta de *S. pimpinellifolium* (ya que en esta especie se conocen múltiples polimorfismos respecto del genoma de tomate). Para ello primero se localizó una flor en estado de preantesis en la planta mutante. Se eliminaron sus sépalos, pétalos y estambres y se dejó el pistilo desnudo. Posteriormente, se recolectó el polen de flores de *S. pimpinellifolium* en una placa Petri de vidrio, se cubrió el estigma de la flor del mutante con él y se etiquetó. Finalmente, se cosechó el fruto una vez que alcanzó su estado óptimo de maduración. A partir de las semillas F1 obtenidas se cultivaron plantas F1 y se recolectaron los frutos producidos por autofecundación. En la población de plantas obtenidas a partir de las semillas F2 se identificaron 20 plantas F2 que presentaron fenotipo *wild type* y 20 de fenotipo mutante y se tomaron muestras de cada una que se congelaron en tubos Eppendorf con nitrógeno líquido y se almacenaron en congeladores a -80 °C hasta realizar la identificación del gen en colaboración con los investigadores de la Universidad de Almería dirigidos por el Dr. Rafael Lozano.

3.10. Extracción de semillas

Tras cosechar los tomates maduros es necesario obtener las semillas que se encuentran en su interior, de tal forma que se puedan almacenar para futuros usos. Los frutos se cortaron transversalmente para dejar expuestos los lóbulos con semillas. Estas se retiraron y colocaron en un bote con una solución de sulfamán (HCl 24%, Divex) diluida con agua durante 24 horas. Pasado este tiempo, las semillas se limpiaron debajo de un grifo con agua corriente y se depositaron en una placa Petri, que se introdujo en una estufa, a 50 °C durante 24 horas. Pasado este tiempo, las semillas se almacenaron en sus respectivas bolsas con autocierre.

3.11. Análisis estadístico

Para conocer el comportamiento de la mutación que causa el fenotipo observado fue necesario realizar tres tipos diferentes de análisis: modo de herencia, número de insertos y cosegregación. En todos los casos, para saber si los datos observados se ajustaban a la

distribución esperada se realizó una prueba χ^2 . La H_0 (los datos observados se ajustan a los esperados) se rechazaba cuando el porcentaje de error era superior al 5%.

Además, para analizar la comparación de medias, que se representa por ejemplo en la **Figura 15**, se realizó una prueba t mediante el programa Statgraphics versión 18. La H_0 (no hay diferencias significativas entre las medias de dos muestras independientes) se rechazaba cuando el valor p era inferior a 0,05. El número de asteriscos (*) mostrados en las figuras de comparación de medias hace referencia al nivel de significancia entre las medias, siendo un asterisco $p < 0,05$, dos asteriscos $p < 0,01$ y tres asteriscos $p < 0,001$.

4. Resultados

Durante este Trabajo de Fin de Máster se analizaron 16 líneas de *T-DNA*. Todas ellas fueron seleccionadas en nuestro grupo por presentar alteraciones en el desarrollo de la parte aérea, lo que resultaba en plantas con un menor porte y crecimiento del tallo. En el presente trabajo se recogen los resultados de seis de estas líneas: 1372 ETMM, 2114 ETMM, 1415 ETMM, 2059 ETMM, 2099 ETMM y 125 ETMM.

4.1. 1372 ETMM

Esta línea se había identificado previamente en nuestro grupo, pero no se había realizado más que una caracterización fenotípica inicial. En el momento de iniciar mi trabajo únicamente se disponía de líneas TG3 y TG4 identificadas como mutantes por lo que todos los experimentos se han realizado utilizando al parental *Money Maker* como testigo. Se presentan los resultados obtenidos en su fenotipado, tanto *in vitro* como *in vivo*, así como su análisis genético.

4.1.1. Fenotipado *in vitro*

Se analizó el desarrollo *in vitro* de las plantas pertenecientes a esta línea mediante la realización de un semillero con semillas TG3 y TG4. Como se puede ver en la **Figura 10A**, tras 34 días de desarrollo de los ápices meristemáticos TG3 obtenidos a partir de las plántulas en medio MB3, los mutantes presentaron una menor longitud de la parte aérea respecto a los controles. Este fenotipo se repitió en las plantas de la generación posterior (TG4), donde también se observó que los mutantes tenían un menor desarrollo de la parte aérea tras 28 días de crecimiento en medio MB3 (**Figura 10B**).

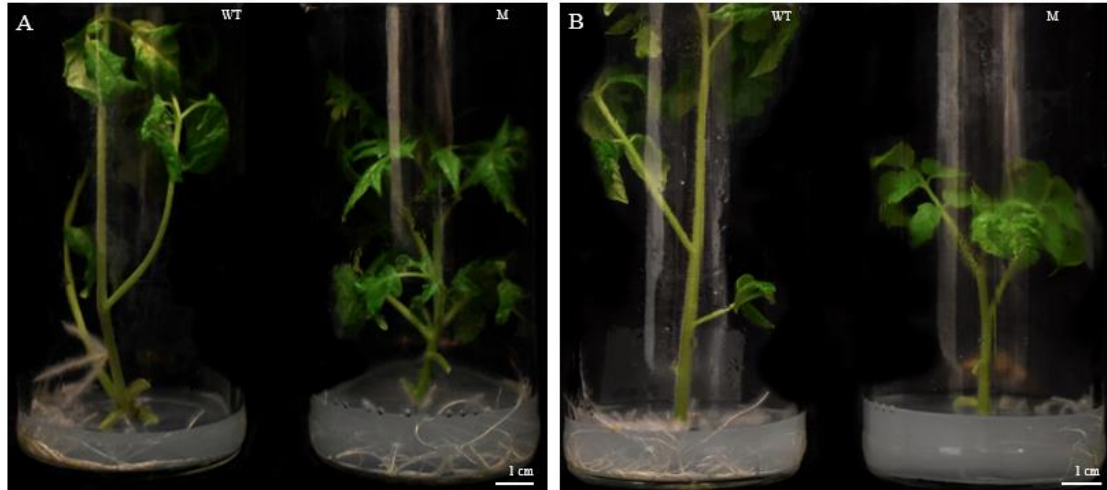


Figura 10. Detalle de plantas *wild type* (WT) y mutantes (M) pertenecientes a la línea 1372 ETMM. A) Plantas TG3 tras 34 días de crecimiento en medio MB3. B) Plantas TG4 tras 28 días de crecimiento en medio MB3. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.

Con el fin de ver si las plantas mutantes presentaban la misma capacidad de enraizamiento adventicio que las plantas *wild type*, se cultivaron explantes de hipocótilo y cotiledón en placas con medio I40. Tras 28 días de desarrollo, se observó que el enraizamiento de las plantas mutantes no estaba afectado (**Figura 11**) ya que ambos tipos de explante mutante formaron raíces adventicias de forma similar a los explantes *wild type*.



Figura 11. Proceso de enraizamiento adventicio de explantes *wild type* (WT) y mutantes (M) de la línea 1372 ETMM de hipocótilo (izquierda) y cotiledón (derecha) tras 28 días de crecimiento en medio I40. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.

Además, en este mutante también se analizó si los brotes regenerados del extremo distal de los explantes de hipocótilo en medio I40 mantenían el fenotipo característico de la línea, por lo que se subcultivaron en medio MB3. Pasados 28 días, se confirmó que los explantes mutantes mantenían el fenotipo de menor desarrollo de la parte aérea propio de la línea 1372 ETMM (**Figura 12**).



Figura 12. Desarrollo de los explantes de hipocótilo *wild type* y mutantes de la línea 1372 ETMM a los 28 días tras el subcultivo en medio MB3. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.

Finalmente, se analizó si las plantas mutantes presentaban alguna alteración en el proceso de regeneración adventicia a partir de explantes de cotiledón. Este carácter es uno de los más importantes para las técnicas de cultivo *in vitro* y por eso se analiza en busca de mutantes. Para ello, se colocaron explantes de cotiledón en placas con medio IKZ, con el fin de favorecer la formación de callo organogénico. Tras 28 días, se observó que los explantes mutantes presentaban una capacidad de regeneración de yemas adventicias similar a los explantes *wild type* (**Figura 13A**). Pasado este tiempo, los callos organogénicos se subcultivaron en medio IK, para permitir que los ápices y brotes presentes pudieran desarrollarse y elongar. Como se puede ver en la **Figura 13B**, tras 22 días, los explantes mutantes presentaron una capacidad similar de desarrollo de ápices y brotes a los explantes *wild type*, aunque manteniendo el menor tamaño característico de la línea. Finalmente, los ápices se subcultivaron en medio MB3 para que elongaran. Las plantas mutantes mantuvieron el menor tamaño característico de la línea 1372 ETMM (**Figura 13C**).



Figura 13. Proceso de regeneración adventicia de explantes *wild type* (WT) y mutante (M) de la línea 1372 ETMM. A) Explantes de cotiledón tras 28 días de crecimiento en medio IKZ. B) Brotes elongados a partir de callos organogénicos provenientes de explantes de cotiledón, tras el subcultivo en medio IK y 29 días de crecimiento. C) Elongación de explantes tras 27 días en medio MB3. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.

4.1.2. Fenotipado *in vivo*

Para comprobar si el fenotipo observado en condiciones *in vitro* se mantenía a largo plazo, se analizó el desarrollo de las plantas también en condiciones *in vivo*.

Para ello, se realizó un semillero en el invernadero con semillas mutantes TG3 y se comparó el desarrollo de las plantas a lo largo del tiempo con individuos *wild type* como control. Como se puede ver en la **Figura 14A**, las plantas mutantes en condiciones *in vivo* presentaban también un menor desarrollo de la parte aérea a los 14 días tras la germinación. Este fenotipo se mantuvo a largo de todo el desarrollo de la planta, pues a los 43 días (**Figura 14B**), 78 días (**Figura 14C**) y 89 días (**Figura 14D**), los individuos mutantes seguían siendo más pequeños que los *wild type*. Se comprobó que las plantas mutantes presentaban una diferencia estadísticamente significativa en la longitud de los entrenudos, lo que causaba que, de media, la distancia fuera de $5,42 \pm 1,11$ cm, en comparación con los valores de las plantas *wild type*, con una media de $10,44 \pm 0,83$ cm (**Figura 15**).



Figura 14. Proceso de desarrollo de plantas *wild type* (WT) y mutantes (M) pertenecientes a la TG3 de la línea 1372 ETMM en condiciones *in vivo*. A) 14 días tras germinación. B) 43 días tras germinación. C) 78 días tras germinación. D) 89 días tras germinación.. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.

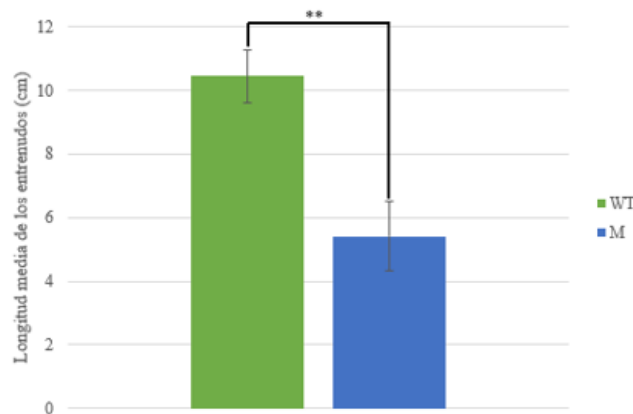


Figura 15. Longitud media de los entrenudos (cm) en plantas *wild type* (WT) y mutantes (M) de la línea 1372 ETMM. Se representa la media \pm desviación estándar ($n = 3$). Los 2 * indican diferencias muy significativas ($p < 0,01$) según una prueba t.

Durante el cultivo de las plantas en el invernadero se observó la presencia de un patrón de coloración anómalo en las hojas, caracterizado por una clorosis en los folíolos. Este fenotipo característico se vio en todas las plantas cultivadas en condiciones *in vivo* y comenzaba a aparecer a las seis semanas tras la germinación, manteniéndose durante todo el desarrollo (**Figura 16**). Se repitió esta evaluación en plantas TG4 procedentes de la descendencia de estas.

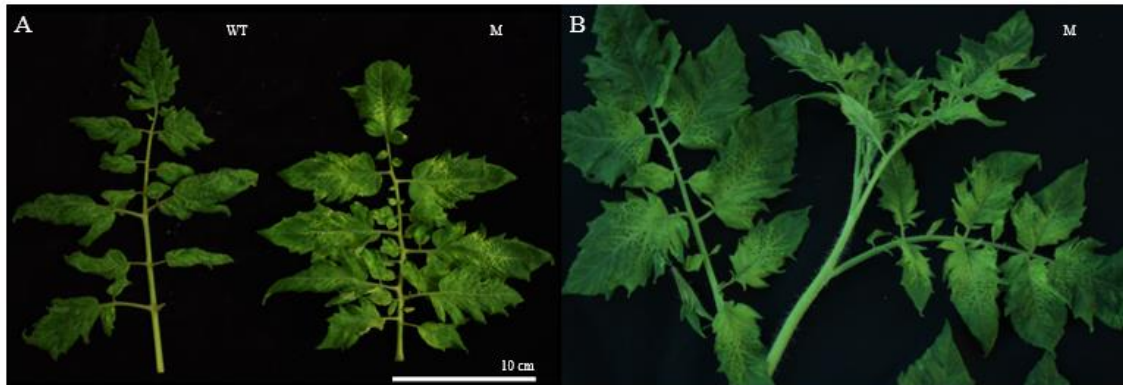


Figura 16. Detalle de hojas *wild type* (WT) y mutantes (M) de la TG3 perteneciente a la línea 1372-1M ETMM. Se observa el fenotipo clorótico característico presente en la hoja. A) 63 días tras germinación. B) 89 días tras germinación. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.

En el semillero de plantas mutantes TG4 se corroboró el fenotipo de menor desarrollo de la parte aérea, al volver a ver plantas con un menor porte (**Figura 17A**). Además, el fenotipo clorótico de las hojas apareció de nuevo (**Figura 17B**).

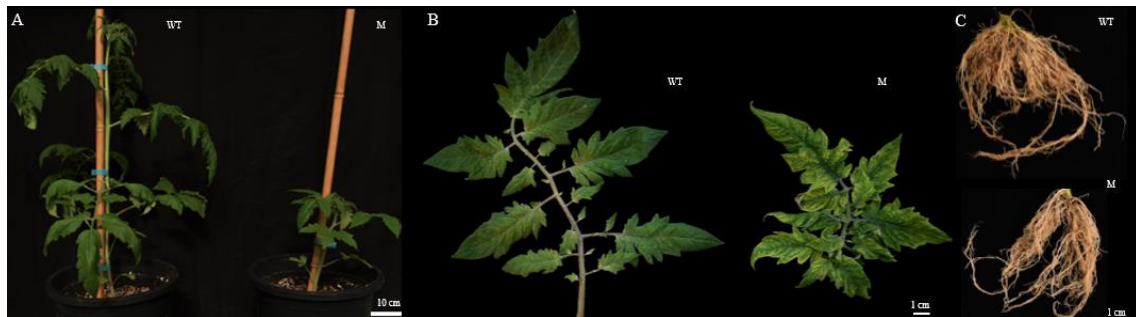


Figura 17. Desarrollo de plantas *wild type* (WT) y mutante (M) perteneciente a la TG4 de la línea 1372-1M-1M ETMM. A) 37 días de cultivo en el invernadero tras la germinación. B) Comparación de las hojas de las plantas WT y M en las que se observa el patrón clorótico característico C) Comparación de las raíces WT y M, con un peso fresco de 8,37 g y 3,98 g respectivamente. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.

En la **Figura 18** se representa el contenido de clorofila A y B (mg/g material vegetal) presente en la zona apical y basal de los folíolos de plantas *wild type* y mutantes pertenecientes a la línea 1372 ETMM. Se puede ver que existen diferencias estadísticamente significativas en el contenido en clorofila, tanto A como B, y en ambas zonas, entre los individuos *wild type* y mutantes. Por ello se concluyó que la mutación presente en la línea 1372 ETMM causaba, además de un menor desarrollo de la parte aérea, clorosis en los folíolos.

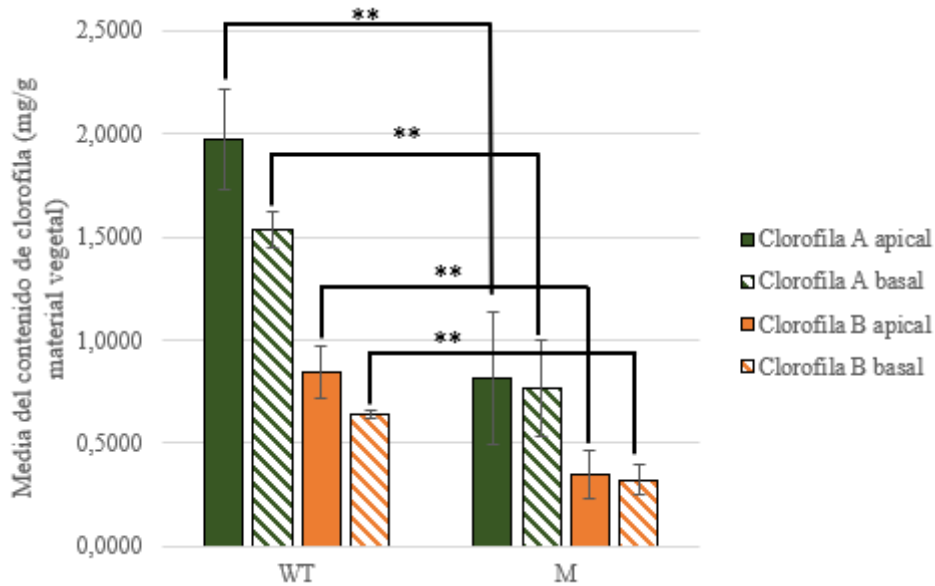


Figura 18. Contenido medio en clorofila A y B (mg/g material vegetal) de la zona apical y basal de folíolos de hojas de plantas *wild type* (WT) y mutantes (M) pertenecientes a la línea 1372 ETMM. Se representa la media \pm desviación estándar (n = 3). Los 2 * indican diferencias muy significativas (p < 0,01), según una prueba t.

Finalmente, también se fenotipó el desarrollo reproductivo de los individuos mutantes de la línea 1372 ETMM. Para ello se compararon flores en el estadio de antesis y frutos de individuos *wild type* y mutantes. En ambos casos, el fenotipo fue aparentemente similar, por lo que se concluyó que no existían diferencias apreciables en las estructuras y el desarrollo reproductivo de los individuos mutantes era parecido al de las plantas *wild type* (**Figura 19**).



Figura 19. Detalle de flores en estadio de antesis (arriba) y de frutos maduros (abajo) procedentes de plantas *wild type* (WT) y mutantes (M) de la línea 1372 ETMM. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.

4.1.3. Análisis de modo de herencia y número de insertos

Debido a que no se disponía de poblaciones segregantes pertenecientes a la línea 1372 ETMM, no se pudo evaluar el modo de herencia de la mutación ni tampoco comprobar el número de insertos que portaba la línea, aunque en los análisis iniciales de la línea realizados por el grupo de investigación se apuntó a que la mutación podría tener una herencia recesiva 3:1 *wild type*-mutante. No obstante, para poder corroborarlo, se ha realizado el cruce de un individuo mutante con polen proveniente de una planta *wild type* con la finalidad de obtener plantas hemizigotas para la mutación y, a partir de ellas, poblaciones segregantes en las que poder evaluar estas características.

4.1.4. Análisis de cosegregación

Para conocer si existía cosegregación entre un inserto de *T-DNA* y el fenotipo mutante en la línea 1372 ETMM, se cultivaron explantes de hipocótilo de plantas TG3 mutantes en medio ϵ . Pasados 28 días, se comprobó que todos ellos eran sensibles a la kanamicina, por lo que se puede afirmar que en esta línea no hay cosegregación entre el inserto y la

mutación. El origen de esta mutación probablemente esté en la variación somaclonal ocurrida durante el proceso de regeneración inicial que llevó a la obtención de la línea.

Al no haber fenómeno de cosegregación inserto-mutación, se cultivaron algunas plantas mutantes sensibles en invernadero para realizar cruces con polen de *S. pimpinellifolium*, obtener plantas F1 y, a partir de ellas, una población F2 segregante para poder conocer cuál es el gen responsable de la mutación que porta la línea 1372 ETMM mediante mapeo por secuenciación.

4.2. 2114 ETMM

Esta línea se había identificado previamente en nuestro grupo, pero no se había realizado más que una caracterización fenotípica inicial. En el momento de iniciar mi trabajo únicamente se disponía de líneas TG3 procedentes de plantas TG2 tanto *wild type* como mutantes. Esta planta se caracterizaba por tener un menor tamaño que los controles *wild type*. A continuación, se incluyen los resultados obtenidos durante su estudio.

4.2.1. Fenotipado *in vitro*

Para poder caracterizar el fenotipo propio de la línea 2114 ETMM, en primer lugar, se analizaron plantas mutantes TG3 en condiciones de crecimiento *in vitro*. De esta manera, se comprobó que los individuos mutantes presentaban un menor desarrollo de la parte aérea transcurridos 29 días (**Figura 20A**) y 49 días (**Figura 20B**) del subcultivo de los ápices meristemáticos en medio MB3, al tener una menor longitud que las plantas *wild type control*.

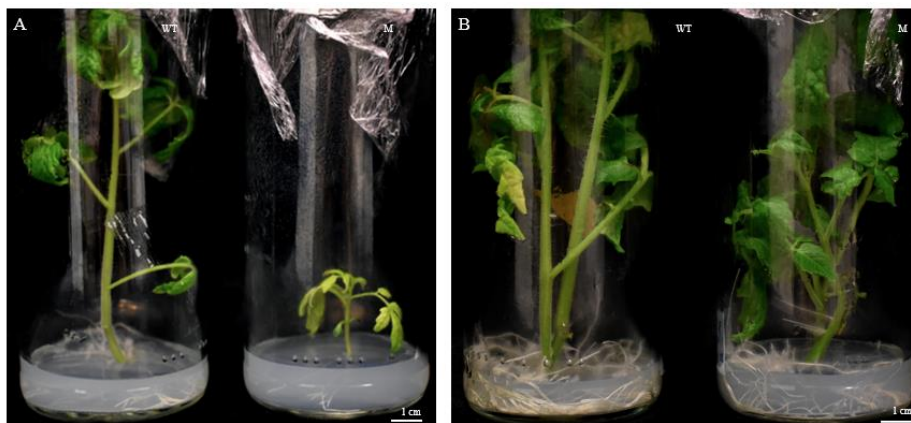


Figura 20. Detalles de plantas *wild type* (WT) y mutantes (M) pertenecientes a la línea 2114 ETMM. A) Plantas tras 29 días de crecimiento en medio MB3. B) Plantas tras 49 días de crecimiento en medio MB3. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.

También se comprobó la capacidad de enraizamiento adventicio que presentaba la línea mediante el cultivo de explantes de hipocótilo y cotiledón en medio I40. Como se ve en la **Figura 21**, los explantes mutantes presentaron una capacidad similar de enraizamiento al *wild type*, por lo que su proceso de producción de raíces adventicias no está afectado por la mutación.

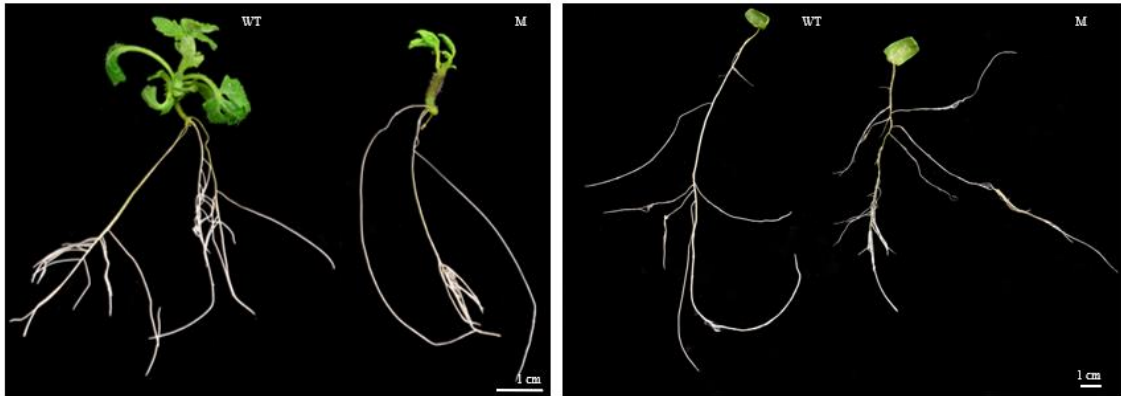


Figura 21. Proceso de enraizamiento adventicio de explantes de hipocótilo (izquierda) y cotiledón (derecha) de plantas *wild type* (WT) y mutantes (M) pertenecientes a la línea 2114 ETMM tras 28 días de desarrollo en medio I40. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.

La última prueba que se realizó en condiciones *in vitro* fue el análisis de la capacidad de regeneración adventicia de explantes de cotiledón provenientes de plantas mutantes. Para ello, los explantes se colocaron en medio IKZ. Transcurridos 32 días, se comprobó que los explantes mutantes eran capaces de generar, de forma similar a los *wild type*, callo organogénico (**Figura 22A**). Los callos se subcultivaron en medio IK, para favorecer el desarrollo y elongación de los ápices y brotes que surgieron. Como se ve en la **Figura 22B**, los brotes elongaron menos en los explantes mutantes tras 32 días de cultivo en el medio, algo que concuerda con lo observado durante el cultivo de los ápices meristemáticos en medio MB3. Finalmente, los ápices de estos brotes se subcultivaron en medio MB3, para poder confirmar que los mutantes mantenían el fenotipo característico de menor desarrollo de la parte aérea propio de la línea 2114 ETMM. Efectivamente, los explantes presentaban el mismo fenotipo observado en anteriores ocasiones tras 28 días, por lo que se pudo concluir que el proceso de regeneración no estaba afectado en esta línea mutante y que los brotes adventicios mantenían el fenotipo mutante de menor tamaño (**Figura 22C**).

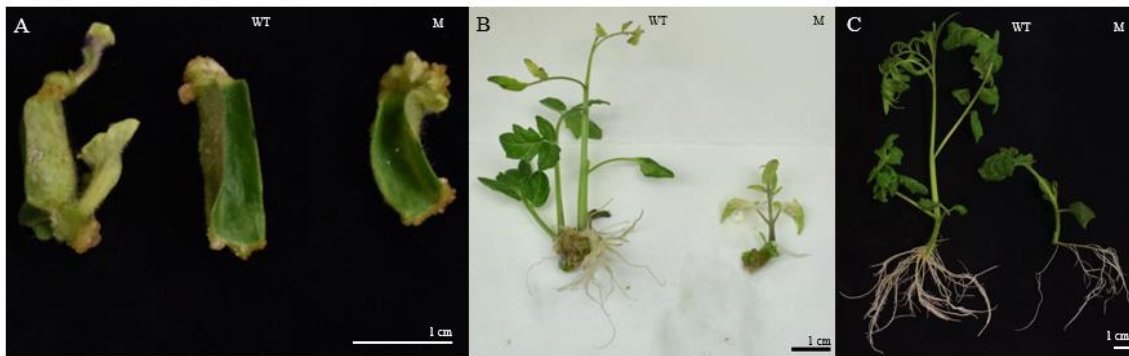


Figura 22. Proceso de regeneración adventicia de explantes de cotiledón *wild type* (WT) y mutantes (M) pertenecientes a la línea 2114 ETMM. A) Tras 32 días en medio IKZ. B) Tras 32 días en medio IK. C) Tras 28 días en medio MB3. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.

4.2.2. Fenotipado *in vivo*

Con el fin de comprobar si el fenotipo de la línea 2114 ETMM observado en condiciones *in vitro* se mantenía al cultivar las plantas en condiciones *in vivo*, se realizó un semillero con semillas TG3 y TG4 mutantes. Se realizó un seguimiento del crecimiento de las plantas mutantes en el invernadero para poder fenotiparlas correctamente. Se corroboró que los mutantes también presentaban un menor desarrollo de la parte aérea en condiciones *in vivo*, a lo largo de todo su crecimiento, como se puede ver en la **Figura 23**, que recoge fotografías del desarrollo de individuos mutantes a los 14 días (**Figura 23A**), 43 días (**Figura 23B**), 65 días (**Figura 23C**) y 98 días (**Figura 23D**) desde la germinación de las semillas. Para poder caracterizar mejor el fenotipo, se midió la longitud de las plantas y se contó el número de hojas que presentaban, para poder establecer la relación entre ambos parámetros y así saber la longitud de los entrenudos. Los mutantes tenían una longitud media de entrenudos de $4,23 \pm 0,56$ cm, frente a los $10,45 \pm 0,83$ cm de las plantas *wild type* (**Figura 24**), siendo esta una diferencia estadísticamente significativa.

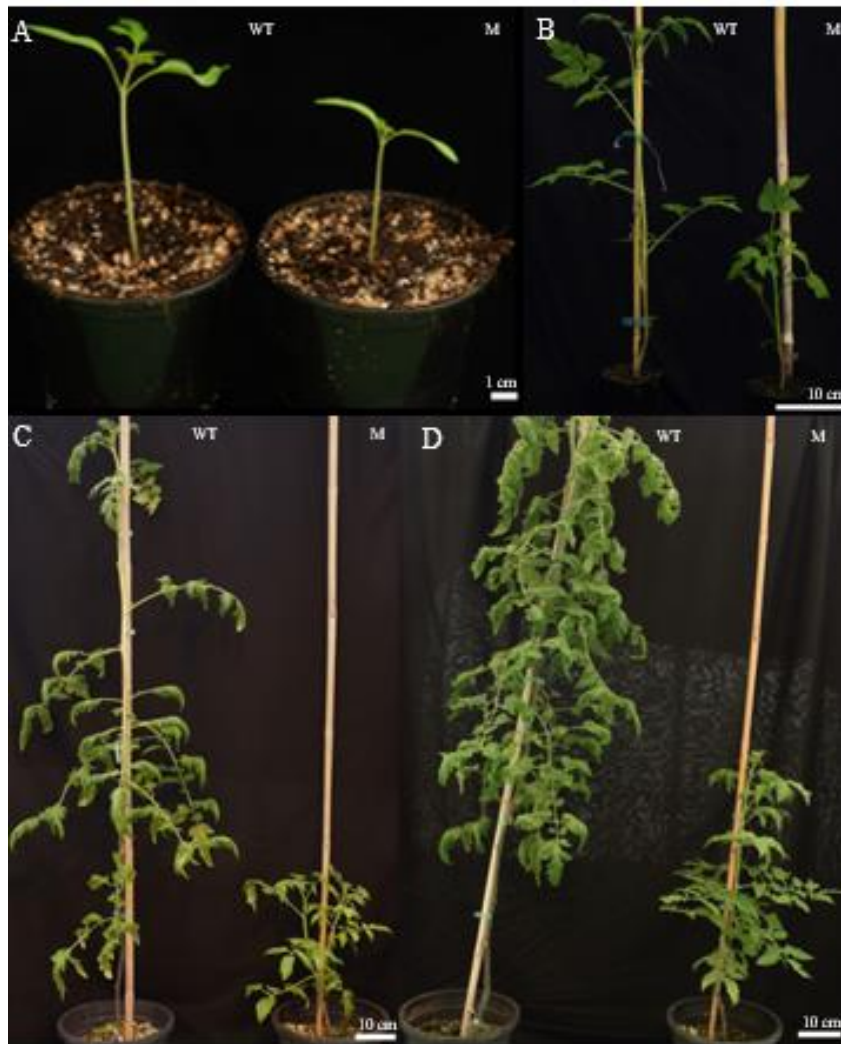


Figura 23. Desarrollo de plantas *wild type* (MB3) y mutantes (M) pertenecientes a la TG3 de la línea 2114 ETMM en condiciones *in vivo*. A) 14 días tras germinación. B) 43 días tras germinación. C) 65 días tras germinación. D) 98 días tras germinación. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.

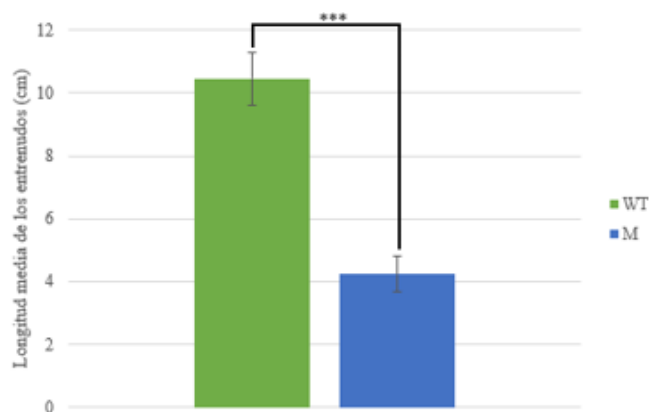


Figura 24. Longitud media de los entrenudos (cm) en plantas *wild type* (WT) y mutantes (M) de la línea 2114 ETMM. Se representa la media \pm desviación estándar ($n = 3$). Los 3 * indican diferencias altamente significativas ($p < 0,001$) según una prueba t.

En la generación sucesiva (TG4), las plantas mutantes mantuvieron el fenotipo característico de la línea (**Figura 25**), volviendo a observarse individuos de menor tamaño que los controles *wild type*.

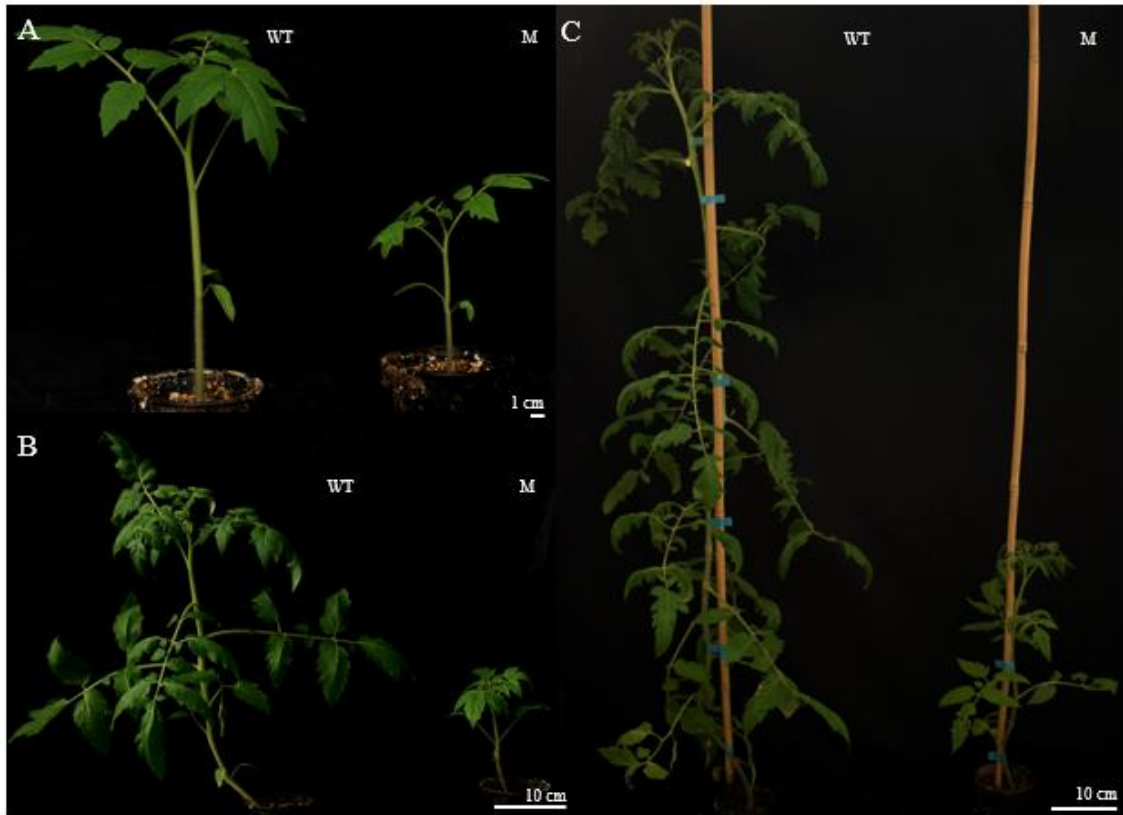


Figura 25. Desarrollo de las plantas *wild type* (WT) y mutantes (M) pertenecientes a la TG4 de la línea 2114 ETMM en condiciones *in vivo*. A) 23 días tras la germinación. B) 37 días tras la germinación. C) 64 días tras la germinación. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.

Para terminar de caracterizar el fenotipo de la línea, se aclimataron plantas TG3 que se encontraban creciendo en condiciones *in vitro*. De nuevo, se vio el menor desarrollo de la parte aérea (**Figura 26**), por lo que se puede afirmar que la línea 2114 ETMM presenta una mutación que disminuye el crecimiento de la parte aérea de la planta.



Figura 26. Desarrollo de plantas *wild type* (WT) y mutantes (M) pertenecientes a la línea 2114 ETMM aclimatadas tras 82 días (A) y 132 días (B) de cultivo en condiciones *in vivo*. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.

Finalmente, se comprobó que las plantas mutantes no presentaban ninguna alteración en el desarrollo reproductivo, al verse que las flores mutantes eran similares a las flores *wild type* y que el cuajado de los frutos y su morfología era similar en ambas poblaciones (Figura 27).



Figura 27. Detalle de flores en estadio de antesis (arriba) y frutos maduros (abajo) procedentes de plantas *wild type* (WT) y mutantes (M) de la línea 2114 ETMM. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.

4.2.3. Análisis de modo de herencia y número de insertos

Debido a que no se disponía de semilla *wild type* segregante perteneciente a la línea 2114 ETMM no se pudo analizar el modo de herencia de la mutación ni tampoco el número de insertos presentes. No obstante, en los experimentos iniciales de caracterización de la línea por parte del grupo de investigación, se detectó que la mutación poseía posiblemente un tipo de herencia recesiva 3:1 *wild type*-mutante.

4.2.4. Análisis de cosegregación

Al analizar la resistencia a la kanamicina de las plantas mutantes mediante el cultivo de explantes de hipocótilo en medio ϵ , se detectaron 5 individuos sensibles al antibiótico de un total de 19 plantas. Esto permite afirmar que en la línea 2114 ETMM no hay fenómeno de cosegregación, y que, por lo tanto, la mutación no se debe a un inserto de *T-DNA*, sino a una variación somaclonal ocurrida durante el proceso inicial de regeneración.

Es por ello por lo que se han realizado cruces sexuales en plantas mutantes sensibles con polen de *S. pimpinellifolium* con el fin de obtener una población segregante F2 que permita hacer el mapeo por secuenciación de la mutación detectada.

4.3. 1415 ETMM

Esta línea se había identificado previamente en el grupo de investigación, pero no se había realizado más que una caracterización fenotípica inicial. En el momento de iniciar el trabajo se disponía de semillas TG2 y líneas TG3. Este mutante se caracterizaba por tener un menor tamaño que los controles *wild type*. A continuación, se incluyen los resultados obtenidos de mis experimentos.

4.3.1. Fenotipado *in vitro*

En la línea 1415 ETMM se analizó el desarrollo en condiciones *in vitro* de plantas mutantes pertenecientes a la TG2 para poder caracterizar su fenotipo. Se comprobó que los mutantes presentaban un menor desarrollo de la parte aérea, lo que resultaba en tallos con una menor longitud, como se puede observar en la **Figura 28**, donde los individuos mutantes son más pequeños tras 28 días (**Figura 28A**) y 60 días (**Figura 28B**) de cultivo de los ápices meristemáticos en medio MB3.

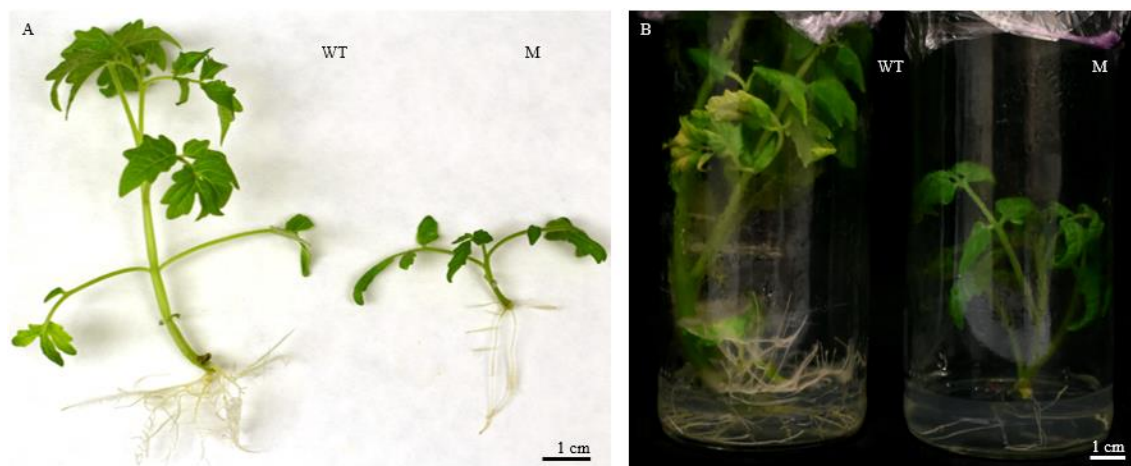


Figura 28. Detalle de plantas *wild type* (WT) y mutantes (M) pertenecientes a la línea 1415 ETMM. A) Plantas tras 28 días de crecimiento en medio MB3. B) Plantas tras 60 días de crecimiento en medio MB3. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.

Para saber si la línea presentaba alguna alteración en el proceso de regeneración adventicia, se analizó la formación y desarrollo de callos organogénicos mediante el cultivo de explantes de cotiledón *wild type* y mutantes en medio IKZ. Pasados 29 días desde el inicio, los explantes provenientes de plantas mutantes formaron callo organogénico de forma similar a los explantes *wild type* (**Figura 29A**). Los callos se individualizaron y se transfirieron a medio IK, con el fin de que los ápices y brotes formados pudieran elongar y así comprobar si el fenotipo de la línea se mantenía tras el proceso de regeneración. A los 41 días tras el subcultivo, los brotes mutantes no fueron capaces de elongar, debido probablemente al pequeño tamaño del explante seleccionado para el proceso (**Figura 29B**). A pesar de ello, se transfirieron a medio MB3 para que se pudieran seguir desarrollando. Pasados 36 días tras el subcultivo, los brotes mutantes ya fueron capaces de desarrollarse y elongar, presentando un menor tamaño respecto de los *wild type* (**Figura 29C**). Por lo tanto, se puede concluir que la línea 1415 ETMM no

presenta ningún problema que afecte al proceso de regeneración adventicia y la mutación que porta permanece y no revierte tras el mismo.



Figura 29. Desarrollo del proceso de regeneración adventicia de explantes de cotiledón *wild type* (WT) y mutantes (M) pertenecientes a la línea 1415 ETMM. A) Tras 29 días de cultivo en medio IKZ. B) Tras 41 días de cultivo en medio IK. C) Tras 36 días de cultivo en medio MB3. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.

4.3.2. Fenotipado *in vivo*

Con el fin de conocer si las plantas mutantes de la línea 1415 ETMM presentaban el mismo fenotipo en condiciones *in vivo* que en condiciones *in vitro*, se realizó un semillero con semilla segregante TG3 en el invernadero. Durante su desarrollo, se detectaron plantas mutantes con un fenotipo similar al observado en condiciones axénicas. Estos se seguían caracterizando por un menor desarrollo de la parte aérea, que resultaba en una menor elongación del tallo, como se puede ver en la **Figura 30**.



Figura 30. Desarrollo de plantas *wild type* (WT) y mutantes (M) pertenecientes a la línea 1415 ETMM en el invernadero. A) 20 días tras la germinación. B) 52 días tras la germinación. C) 91 días tras la germinación. D) 127 días tras la germinación. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.

Además, también se aclimataron plantas mutantes que se encontraban en condiciones axénicas. Estas mantenían el menor crecimiento de la parte aérea cuando crecían en el invernadero, por lo que se corroboró el fenotipo característico de la línea 1415 ETMM de menor desarrollo de la parte aérea (**Figura 31**).

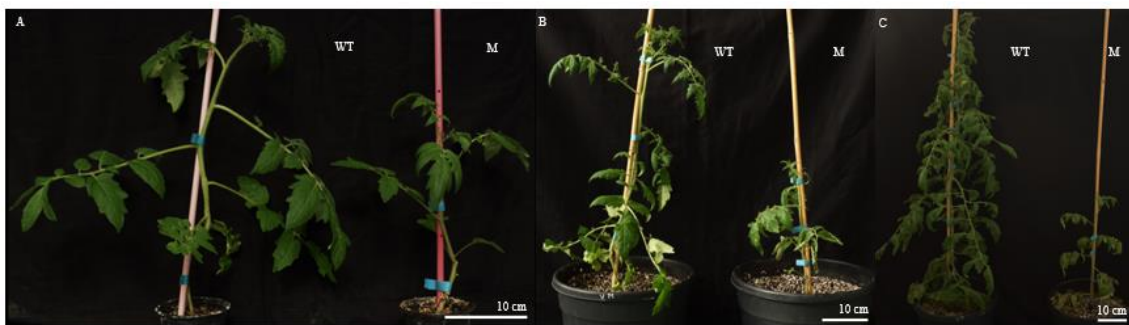


Figura 31. Desarrollo in vivo de plantas *wild type* (WT) y mutantes (M) pertenecientes a la línea 1415 ETMM tras ser aclimatadas. A) 38 días. B) 52 días. C) 79 días. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.

Finalmente, se quiso conocer si el desarrollo reproductivo se veía alterado por la mutación, por lo que se comparó el fenotipo de flores en estadio de antesis y frutos maduros de plantas *wild type* y mutantes pertenecientes a la línea 1415 ETMM. Como se ve en la **Figura 32**, las flores y frutos de individuos mutantes eran aparentemente similares a las de los controles, por lo que se concluyó que la mutación, en principio, no afectaba al desarrollo reproductivo de las plantas.



Figura 32. Detalle de flores en estadio de antesis (arriba) y frutos maduros (abajo) provenientes de plantas *wild type* (WT) y mutantes (M) pertenecientes a la línea 1415 ETMM. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.

4.3.3. Análisis de modo de herencia

Para conocer el modo de herencia de la mutación que porta la línea 1415 ETMM se analizó la segregación entre individuos *wild type* y mutantes, realizando un semillero en condiciones *in vitro*. Como se puede ver en la **Tabla 3**, los datos se ajustaban a una segregación 3:1 *wild type*-mutante, de acuerdo con el $\chi^2 < 3,84$, con 1 grado de libertad y $p < 0,05$. Gracias al χ^2 de homogeneidad, los datos de todos los experimentos se pudieron agrupar, por ser menor de 7,82, con 3 grados de libertad y $p < 0,05$.

Tabla 3. Análisis de la segregación del modo de herencia del fenotipo mutante presente en la línea 1415 ETMM.

TG2	Segregación	WT	M	Total	χ^2
Experimento 1	Observada	19	5	24	0,22
	Esperada (3:1)	18	6	24	
Experimento 2	Observada	13	6	19	0,44
	Esperada (3:1)	14,25	4,75	19	
Experimento 3	Observada	11	4	15	0,02
	Esperada (3:1)	11,25	3,75	15	
Experimento 4	Observada	13	3	16	0,33
	Esperada (3:1)	12	4	16	
Datos agrupados ^a	Observada	53	18	71	0
	Esperada (3:1)	53,25	17,75	71	
$\chi^2_{1\text{ gl}} (p < 0,05) < 3,84$. a) $\chi^2_{H3\text{ gl}} (p < 0,05) 0,81 < 9,49$					

Tras analizar la segregación en una de las TG3 obtenidas a partir de plantas WT se comprobó, como era de esperar, que se ajustaba a una segregación 3 WT: 1 M ($\chi^2 0,65 < 3,84$), segregación característica de la descendencia de una planta hemizigota para la mutación.

4.3.4. Análisis del número de insertos

Con el fin de analizar el número de insertos presentes en los individuos de la línea, se cultivaron explantes de hipocótilo de plantas TG2 pertenecientes a la línea 1415 ETMM en medio ϵ . Pasados 28 días, se contabilizó el número de plantas resistentes y sensibles a la kanamicina.

Como se puede ver en la **Tabla 4**, la segregación se ajustaba a una distribución 3:1 resistentes-sensibles, según un $\chi^2 < 3,84$, con 1 grado de libertad y $p < 0,05$. Por ello se puede decir que en la línea 1415 ETMM hay presente un único inserto de la construcción con la que se transformó.

Tabla 4. Análisis de la segregación de la resistencia a la kanamicina, para conocer el número de insertos presentes en la línea 1415 ETMM.

TG2	Segregación	Resistente	Sensible	Total	χ^2
Experimento 1	Observada	10	2	12	0,44
	Esperada (3:1)	9	3	12	
$\chi^2_{1\text{ gl}} (p < 0,05) < 3,84$					

4.3.5. Análisis de cosegregación

Para saber si existía fenómeno de cosegregación entre inserto y mutación, se comprobó si alguno de los explantes sensibles a la kanamicina detectados en el paso anterior pertenecían a plantas mutantes de la línea 1415 ETMM. Efectivamente, se vio la existencia de una planta mutante sensible a la kanamicina, por lo que se descartó la cosegregación en esta línea.

Por ello se puede afirmar que la mutación que porta la línea 1415 ETMM y que es responsable del fenotipo característico no se debe al inserto, sino a un caso de variación somaclonal ocurrida durante el proceso inicial de regeneración adventicia para la obtención de la línea. Debido a esto, se realizó el cruce sexual entre la planta mutante sensible y polen de *S. pimpinellifolium*, para obtener una población F2 segregante en la que poder identificar la mutación mediante mapeo por secuenciación.

4.4. 2059 ETMM

La línea mutante 2059 ETMM ya había sido parcialmente descrita por Praena-Tamayo (2017), Jáquez-Gutiérrez et al. (2019) y Peralta (2021). Se había determinado que los individuos mutantes presentaban un menor tamaño que las plantas *wild type*, tanto en condiciones *in vitro* como en condiciones *in vivo*, donde la longitud media de los entrenudos era también menor. Además, se apuntaba que los callos organogénicos formados a partir de explantes de cotiledón no eran capaces de generar yemas adventicias, por lo que tenían afectada su vía de regeneración. Por último, se señalaba que el fenotipo mutante tenía un modo de herencia recesivo, solo había presente un inserto y la mutación no se debía a este, al no existir fenómeno de cosegregación.

En este caso mi labor fue la mejora del fenotipado existente y la obtención del material necesario para abordar la clonación del gen responsable de la mutación mediante mapeo por secuenciación. Para ello se realizaron los siguientes experimentos.

4.4.1. Fenotipado *in vitro*

Para comprobar el menor desarrollo de las plantas mutantes en condiciones *in vitro*, se realizó un semillero con semillas provenientes de una planta mutante detectada anteriormente y pertenecientes a una TG4. Como se puede ver en la **Figura 33**, efectivamente las plantas mutantes analizadas se caracterizaban por su menor desarrollo vegetativo, lo que resultaba en un menor crecimiento de la parte aérea. Un efecto inesperado de la mutación que se detectó en el cultivo a largo plazo en condiciones axénicas fue un mayor tiempo de supervivencia, ya que como se puede ver en la **Figura 33D**, las plantas mutantes seguían manteniéndose verdes y con signos de crecimiento tras 162 días tras el subcultivo en el medio, mientras que los controles *wild type* ya mostraban signos de senescencia, como se puede ver por su coloración amarillenta y desecamiento.

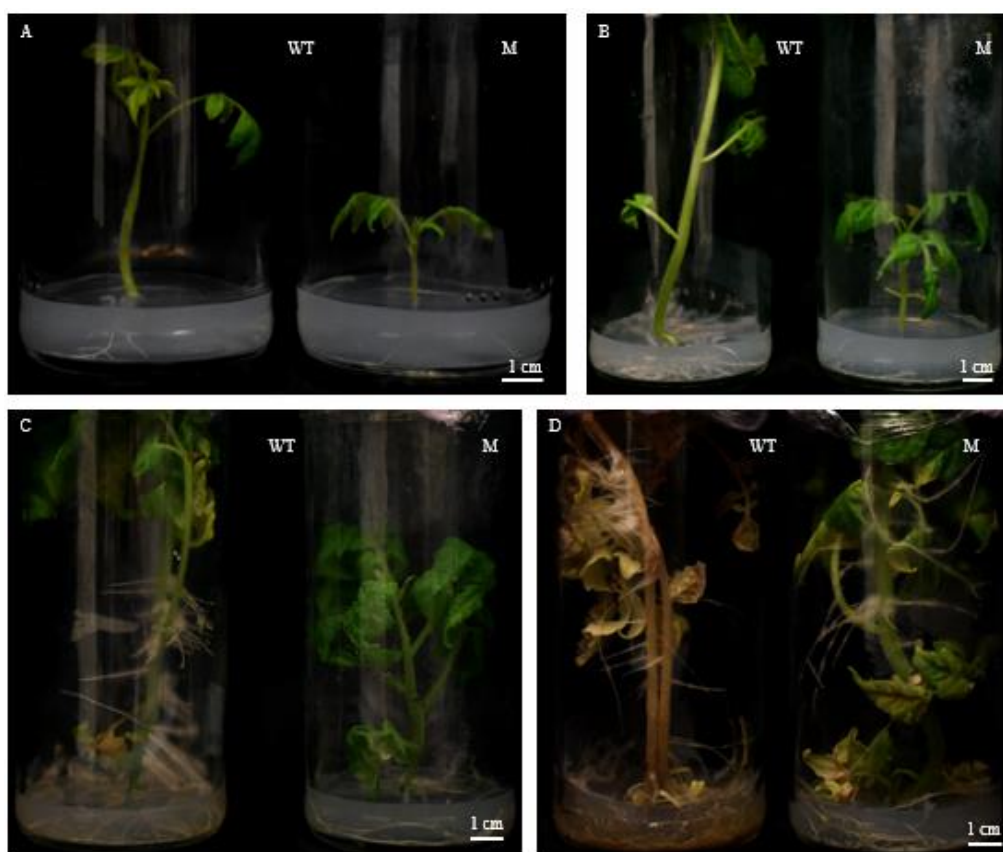


Figura 33. Desarrollo en condiciones *in vitro* de plantas *wild type* (WT) y mutantes (M). A) 15 días tras el subcultivo. B) 30 días tras el subcultivo. C) 54 días tras el subcultivo. D) 162 días tras el subcultivo. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.

Por otro lado, también se quiso confirmar la alteración en la capacidad de regeneración que se detectó en un primer momento. Para ello, se cultivaron de nuevo explantes de cotiledón de plantas *wild type* y mutantes provenientes de semilla mutante en medio IKZ. Tras 30 días en este medio, se observó como los explantes mutantes sí que eran capaces

de formar callo organogénico de forma aparentemente similar a los explantes *wild type* (**Figura 34A**). Estos callos organogénicos se individualizaron y subcultivaron en medio IK, con el fin de que los ápices y brotes formados pudieran desarrollarse y elongar. Tras 22 días, se vio como mientras que los brotes de explantes *wild type* eran capaces de elongar correctamente, los de los mutantes permanecían de un tamaño menor (**Figura 34B**). Por lo tanto, aunque los brotes mutantes eran capaces de elongar, lo hacían poco, algo que concuerda con el fenotipo característico de la línea 2059 ETMM. Finalmente, los ápices meristemáticos de los brotes se subcultivaron en medio MB3 para saber si el proceso de regeneración alteraba de alguna forma el fenotipo de la línea. Tras 36 días en este medio, los explantes mutantes seguían siendo de menor tamaño que los *wild type*, como se ve en la **Figura 34C**, por lo que se mantenía el fenotipo y el proceso de regeneración no causaba la reversión de la mutación.

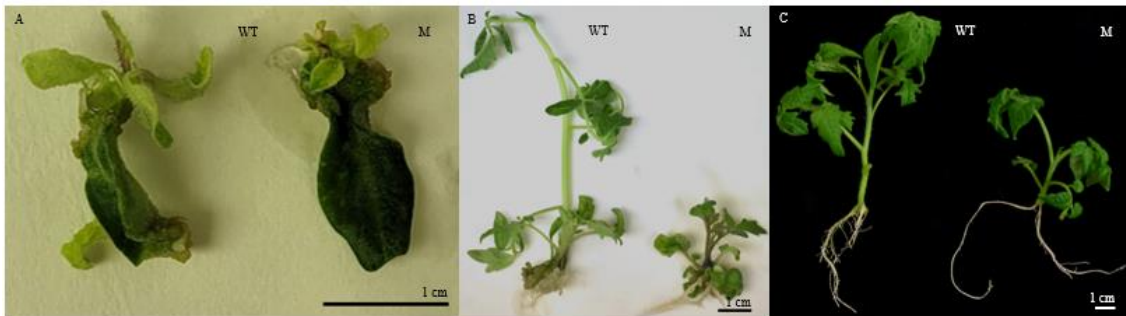


Figura 34. Desarrollo del proceso de regeneración adventicia de explantes de cotiledón de plantas *wild type* (WT) y mutantes (M) pertenecientes a la línea 2059 ETMM. A) Tras 30 días en medio IKZ. B) Tras 22 días en medio IK. C) Tras 36 días en medio MB3. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.

4.4.2. Fenotipado *in vivo*

También se quiso corroborar lo observado anteriormente en condiciones *in vivo*. Se realizó un semillero con semillas TG4 provenientes de plantas mutantes de la línea 2059, con el fin de confirmar el fenotipo. Como se puede ver en la **Figura 35**, durante todo el desarrollo en el invernadero, las plantas mutantes presentaron una menor elongación de la parte aérea, lo que causó que fueran de menor tamaño al tener un tallo más corto.



Figura 35. Desarrollo de plantas *wild type* (WT) y mutantes (M) pertenecientes a la línea 2059 ETMM en condiciones de invernadero. A) 15 días tras la germinación. B) 37 días tras la germinación. C) 59 días tras la germinación. D) 91 días tras la germinación. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.

Además, también se aclimataron plantas para saber si mantenían el fenotipo observado y característico de la línea. En este caso, como se observa en la **Figura 36**, los resultados no fueron los esperados, ya que las plantas mutantes aclimatadas mostraron un tamaño aparentemente similar a las plantas *wild type*. Lo que sí que se observó es que la longitud del entrenudo era aparentemente más pequeña en el caso de los individuos mutantes, lo que sería acorde al fenotipo descrito anteriormente (**Figura 36D**).



Figura 36. Desarrollo de plantas *wild type* (WT) y mutantes (M) pertenecientes a la línea 2059 ETMM en el invernadero. A) 31 días tras la aclimatación. B) 59 días tras la aclimatación. C) 68 días tras la aclimatación. D) Detalle de la distancia entrenudos. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.

Finalmente, se quiso comprobar si la línea 2059 ETMM tenía alguna alteración del proceso reproductivo. Para ello se compararon flores en estadio de antesis y frutos maduros procedentes de plantas *wild type* y mutantes pertenecientes a la línea. Como se recoge en la **Figura 37**, en ambos casos el fenotipo era similar, lo que llevó a afirmar que la línea 2059 ETMM no presentaba mutaciones que afectaran a las estructuras reproductivas de la planta.



Figura 37. Detalle de flores en estadio de antesis (arriba) y frutos maduros (abajo) de plantas *wild type* (WT) y mutantes (M) pertenecientes a la línea 2059 ETMM. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.

4.4.3. Análisis de cosegregación

Se confirmó la ausencia del fenómeno de cosegregación entre inserto y mutación al detectar 4 plantas mutantes sensibles a la kanamicina tras cultivar en medio ϵ explantes de hipocótilo durante 28 días. Esto permite decir que la mutación causante del fenotipo observado no se debe al inserto que porta la línea 2059 ETMM, sino que es debida probablemente al proceso de regeneración adventicia inicial realizado para obtener las plantas mutantes, tras la transformación de los explantes con la construcción génica. Esta mutación estaría ocasionada por un caso de variación somaclonal.

Es por ello por lo que se realizó el cruce sexual entre un individuo mutante sensible perteneciente a la línea 2059 ETMM y polen proveniente de *S. pimpinellifolium*, con el fin de obtener las plantas F1. Se extrajeron las semillas y se germinaron en condiciones axénicas. Posteriormente se subcultivaron en medio MB3 para que los ápices meristemáticos pudieran desarrollarse. Finalmente, se aclimataron a condiciones *in vivo*, para poder obtener los frutos y recoger las semillas que den lugar a la F2. El último paso sería germinar estas, para poder identificar plantas *wild type* y mutantes y congelar muestras de cada una, lo que permitiría realizar un mapeo por secuenciación para la identificación de la mutación y saber así a que gen afecta.

4.5. 2099 ETMM

Praena-Tamayo (2017) había comenzado previamente el análisis parcial de la línea 2099 ETMM, apuntando a que el fenotipo característico de la misma sería un tamaño inferior al de plantas *wild type*, con un entrenudo de menor longitud. Este fenotipo también se repetía en plantas cultivadas en condiciones *in vivo*, obteniendo mutantes con un menor porte. El análisis del modo de herencia de la mutación apuntó a que existe un fenómeno de subletalidad que se traduce en la obtención de un menor número de individuos mutantes cuando se realizan pruebas de segregación de fenotipo. Por otro lado, también se concluyó que la línea 2099 ETMM presenta solo un inserto funcional *nptII*.

En este caso mi labor fue la mejora del fenotipado existente, la determinación de existencia de cosegregación y, en caso de que no la hubiera, la obtención del material necesario para abordar la clonación del gen responsable de la mutación mediante mapeo por secuenciación. Para ello se realizaron los siguientes experimentos.

4.5.1. Fenotipado *in vitro*

Con el fin de confirmar el fenotipo observado inicialmente, se cultivaron plantas TG3 provenientes de semilla obtenida a partir de una planta mutante. Los explantes de ápice meristemático se cultivaron en medio MB3 para caracterizar su desarrollo. Las plantas mutantes que se obtuvieron presentaron un menor desarrollo de la parte aérea respecto a las plantas *wild type* a lo largo de todo su desarrollo en condiciones axénicas (**Figura 38**). Además, como se observa en las **Figuras 38B** y **38C**, las plantas mutantes tenían un mayor número de hojas, haciendo que la longitud del entrenudo fuera menor.



Figura 38. Desarrollo *in vitro* de plantas *wild type* (WT) y mutantes (M) pertenecientes a la línea 2099 ETMM. A) 17 días tras el subcultivo. B) 27 días tras el subcultivo. C) 58 días tras el subcultivo. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.

Otra característica que se quiso comprobar de la línea 2099 ETMM fue su capacidad de regeneración adventicia, para conocer si la mutación afectaba a este proceso. Para ello se cultivaron explantes de cotiledón, tanto *wild type* como mutantes de la línea, en medio IKZ durante 32 días. Pasado este tiempo se vio que los explantes mutantes eran capaces de generar de forma aparentemente similar a los *wild type* callo organogénico (**Figura 39A**). Los callos organogénicos se individualizaron y subcultivaron en medio IK, para permitir el desarrollo de los ápices y la elongación de los brotes. Tras otros 32 días, los explantes mutantes presentaron una capacidad de elongación similar a los *wild type*, aunque manteniendo el menor tamaño, como se observa en la **Figura 39B**. Finalmente,

los ápices meristemáticos de los brotes se subcultivaron en medio MB3. Pasados 28 días, los explantes mutantes presentaron una longitud menor que los explantes *wild type* (**Figura 39C**), por lo que se puede afirmar que el proceso de regeneración adventicia no está afectado en la línea 2099 ETMM, además de que este no causa la reversión del fenotipo mutante característico, pues se siguen viendo plantas mutantes de menor tamaño que las *wild type* al final de este.



Figura 39. Proceso de regeneración adventicia de explantes de cotiledón de plantas *wild type* (WT) y mutantes (M) pertenecientes a la línea 2099 ETMM. A) Tras 32 días en medio IKZ. B) Tras 32 días en medio IK. C) Tras 28 días en medio MB3. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.

4.5.2. Fenotipado *in vivo*

También se quiso evaluar el desarrollo de las plantas mutantes en condiciones *in vivo*, por lo que se realizó un semillero con semilla TG2.

Como se puede ver en la **Figura 40**, las plantas mutantes obtenidas presentaron durante todo su crecimiento una menor longitud del tallo respecto a las plantas *wild type*, lo que concuerda con lo observado en condiciones axénicas.



Figura 40. Desarrollo de plantas *wild type* (WT) y mutantes (M) pertenecientes a la línea 2099 ETMM en condiciones de invernadero. A) 49 días tras la germinación. B) 64 días tras la germinación. C) 127 días tras la germinación. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.

Además, también se analizó el comportamiento de plantas aclimatadas, para conocer si mantenían el fenotipo característico de la línea. Efectivamente, las plantas mutantes

aclimatadas presentaron un menor desarrollo de la parte aérea, además de entrenudos con aparente menor longitud que los de plantas *wild type* (**Figura 41**).



Figura 41. Desarrollo de plantas *wild type* (WT) y mutantes (M) pertenecientes a la línea 2099 ETMM aclimatadas a condiciones *in vivo*. A) 41 días tras la aclimatación. B) 52 días tras la aclimatación. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.

Finalmente, se quiso saber si la mutación causaba alguna clase de alteración en el desarrollo reproductivo de las plantas, por lo que se fenotiparon flores en estadio de anthesis y frutos maduros pertenecientes a plantas *wild type* y mutantes de la línea 2099 ETMM. En ambos casos, la apariencia fue similar (**Figura 42**), por lo que se determinó que la mutación presente en las plantas no afectaba de ninguna manera al desarrollo reproductivo.

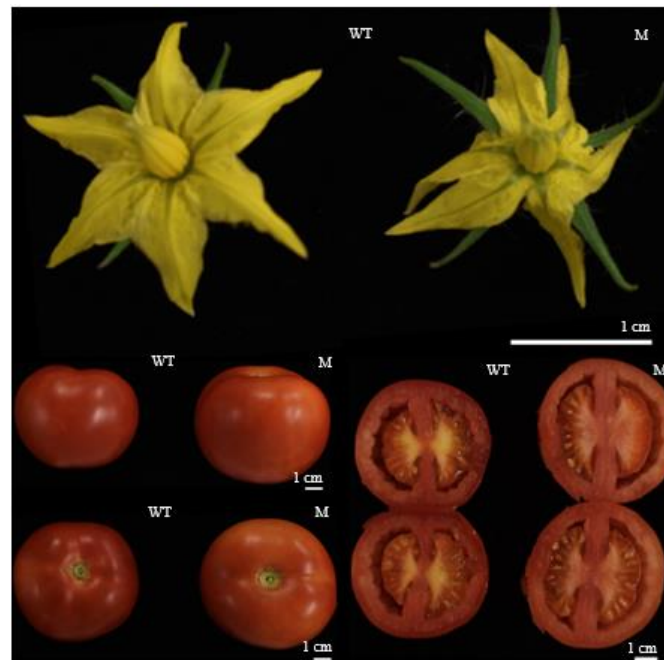


Figura 42. Detalle de flores en estadio de anthesis (arriba) y frutos maduros (abajo) pertenecientes a plantas *wild type* (WT) y mutantes (M) de la línea 2099 ETMM. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.

4.5.3. Análisis de cosegregación

Hasta este trabajo, los resultados obtenidos indicaban que no se podía descartar la existencia del fenómeno de cosegregación entre inserto y fenotipo en la línea 2099 ETMM, al haberse analizado pocas plantas (Praena-Tamayo, 2017).

Para esclarecer la existencia o no de cosegregación en esta línea, se cultivaron en medio ϵ explantes de hipocótilo provenientes de plantas mutantes pertenecientes a cuatro TG3 diferentes de la línea 2099 ETMM. Pasados 28 días, se detectaron un total de 13 plantas mutantes sensibles a la kanamicina, por lo que se descartó la existencia del fenómeno de cosegregación entre un inserto de *T-DNA* y el fenotipo mutante en esta línea. Por tanto, el fenotipo observado se debe a una mutación probablemente surgida durante el proceso de regeneración adventicia inicial llevado a cabo para obtener la planta TG1.

Por ello, se procedió a realizar el cruce sexual entre una planta mutante sensible a la kanamicina perteneciente a la línea 2099 ETMM y polen proveniente de *S. pimpinellifolium*, con el fin de obtener una población F2 segregante en la que poder conocer el gen afectado mediante un mapeo por secuenciación.

4.6. 125 ETMM

La línea 125 ETMM había sido parcialmente caracterizada por Prósper-Ortega (2018) en el pasado, apuntando a que su fenotipo característico consistía en plantas de menor tamaño que los controles *wild type*, a que el modo de herencia era de tipo recesivo y a que había presentes al menos dos insertos *nptII* funcionales.

En este caso mi labor fue la mejora del fenotipado existente y la obtención del material necesario para abordar la clonación del gen responsable de la mutación mediante mapeo por secuenciación. Para ello se realizaron los siguientes experimentos.

4.6.1. Fenotipado *in vitro*

Con el fin de confirmar el fenotipo observado previamente, se cultivaron en condiciones *in vitro* ápices meristemáticos de plantas *wild type* control y mutantes pertenecientes a la línea 125 ETMM en medio MB3. Como se ve en la **Figura 43**, los individuos mutantes

mostraron un menor desarrollo de la parte aérea, lo que se traducía en plantas de menor porte que los controles.

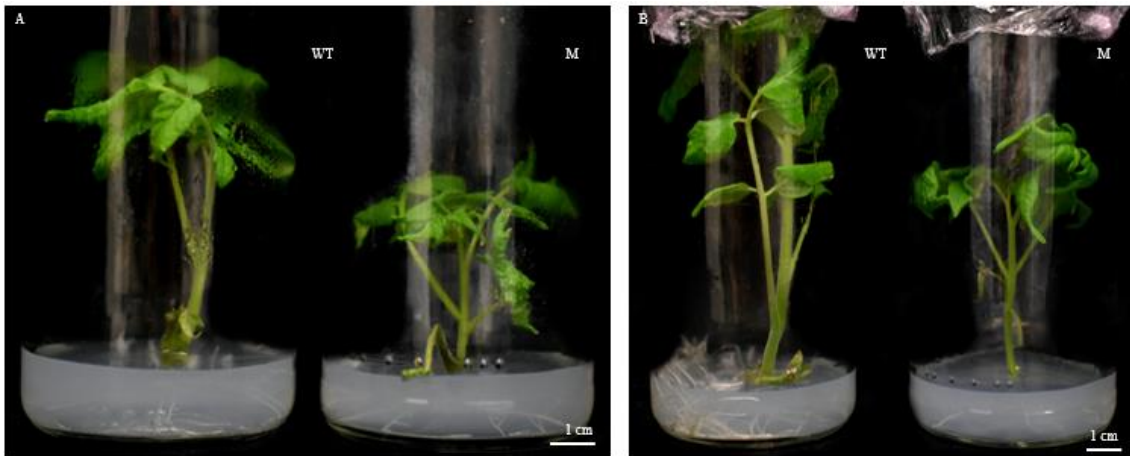


Figura 43. Desarrollo de plantas *wild type* (WT) y mutantes (M) pertenecientes a la línea 125 ETMM en condiciones *in vitro*. A) 27 días tras el subcultivo en medio MB3. B) 44 días tras el subcultivo en medio MB3. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.

Además, se quería saber si la mutación tenía algún efecto sobre el proceso de regeneración adventicia, por lo que se cultivaron explantes de cotiledón de plantas *wild type* y mutantes de la línea 125 ETMM en medio IKZ. Tras 28 días en este medio, se vio que los explantes mutantes tenían una capacidad similar a los controles de generar callo organogénico (**Figura 44A**). Estos callos organogénicos se individualizaron y se subcultivaron en medio IK, con el fin de que los ápices y brotes formados pudieran desarrollarse y elongar. Pasados 22 días, los brotes mutantes presentaron una capacidad similar de elongación a los *wild type*, por lo que el fenotipo característico de la línea de menor desarrollo de la parte aérea no se mantuvo (**Figura 44B**). No obstante, los ápices meristemáticos de los brotes mutantes y *wild type* se subcultivaron en medio MB3 con el fin de confirmar esta pérdida de fenotipo. Tras 28 días, los explantes mutantes presentaron un porte similar a los controles, lo que indicaba que, aunque el proceso de regeneración adventicia no estuviera afectado por la mutación, esta revertía tras el mismo (**Figura 44C**). También cabe la posibilidad de que el explante mutante seleccionado para el proceso no fuera realmente mutante, por lo que es necesario comprobar este efecto en el futuro con nuevos experimentos de regeneración.

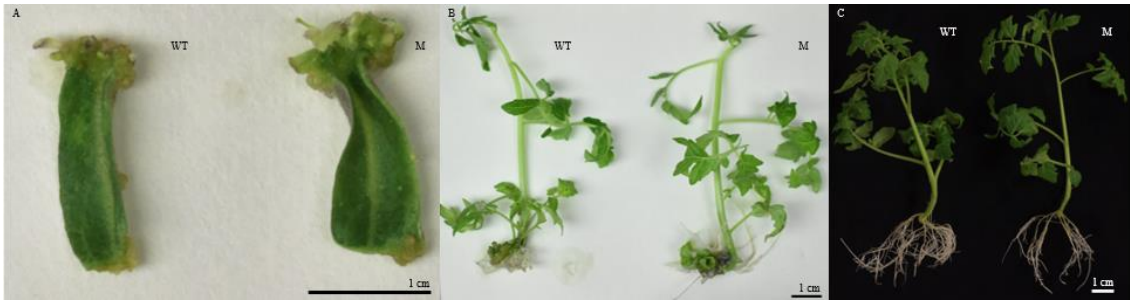


Figura 44. Desarrollo del proceso de regeneración adventicia a partir de explantes de cotiledón de plantas *wild type* (WT) y mutantes (M) pertenecientes a la línea 125 ETMM. A) Tras 28 días en medio IKZ. B) Tras 22 días en medio IK. C) Tras 28 días en medio MB3. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.

4.6.2. Fenotipado *in vivo*

Para saber si el fenotipo de las plantas mutantes observado en condiciones axénicas se mantenía en las condiciones de cultivo en invernadero, se aclimataron individuos mutantes pertenecientes a la línea 125 ETMM. Como se observa en la **Figura 45**, durante todo el tiempo de cultivo en condiciones *in vivo*, las plantas mutantes fueron de un menor tamaño que los controles *wild type*, con un menor desarrollo de la parte aérea. Por ello se puede decir que las plantas mutantes cultivadas en condiciones *in vivo* presentan un fenotipo coherente con el observado en condiciones *in vitro*, lo que permite afirmar que el fenotipo característico de la línea 125 ETMM está caracterizado por una menor elongación del tallo de las plantas mutantes respecto a los controles *wild type*.



Figura 45. Desarrollo de plantas *wild type* (WT) y mutantes (M) pertenecientes a la línea 125 ETMM aclimatadas a condiciones *in vivo*. A) Tras 58 días en invernadero. B) Tras 77 días en invernadero. C) Tras 96 días en invernadero. Escala indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.

4.6.3. Análisis de modo de herencia

Para confirmar el modo de herencia del fenotipo observado se realizó un semillero en condiciones *in vitro* con semilla TG3 y TG4 de la línea 125 ETMM. Los ápices meristemáticos de las plántulas se subcultivaron en botes con medio MB3, con el fin de conocer si las plantas tenían fenotipo *wild type* o mutante y poder obtener así la segregación.

Como se recoge en la **Tabla 5**, la segregación del fenotipo mutante se ajustaba a una distribución 3:1 *wild type*-mutante con un $\chi^2 < 3,84$, con 1 grado de libertad y $p < 0,05$. Por ello, se puede afirmar que la mutación tiene un modo de herencia recesivo, confirmando los resultados obtenidos anteriormente por Prósper-Ortega (2018).

Tabla 5. Análisis de la segregación del modo de herencia del fenotipo mutante presente en la línea 125 ETMM.

TG3/TG4	Segregación	WT	M	Total	χ^2
125-2	Observada	14	10	24	3,56
	Esperada (3:1)	18	6	24	
125-2-2	Observada	11	4	15	0,02
	Esperada (3:1)	11,25	3,75	15	
125-2-4	Observada	18	6	24	0
	Esperada (3:1)	18	6	24	
125-2-16	Observada	25	6	31	0,53
	Esperada (3:1)	23,25	7,75	31	
$\chi^2_{1\text{ gl}} (p < 0,05) < 3,84$					

4.6.4. Análisis del número de insertos y cosegregación

Además de conocer el modo de herencia del fenotipo observado en la línea 125 ETMM, también se quiso saber el número de insertos que portaban los individuos, por lo que se cultivaron explantes de hipocótilo de plantas pertenecientes a varias TG4 en medio ϵ durante 28 días. Pasado este tiempo, se anotó la segregación de resistencia a la kanamicina de los explantes (**Tabla 6**).

Tabla 6. Análisis de la segregación de la resistencia a la kanamicina, para conocer el número de insertos presentes en la línea 125 ETMM.

TG4	Segregación	Resistente	Sensible	Total	χ^2
125-2-2	Observada	15	0	15	5 1
	Esperada (3:1)	11,25	3,75	15	
	Esperada (15:1)	14,06	0,94	15	
125-2-4	Observada	24	0	24	8 1,6
	Esperada (3:1)	18	6	24	
	Esperada (15:1)	22,5	1,5	24	
125-2-16	Observada	21	0	21	7 1,4
	Esperada (3:1)	15,75	5,25	21	
	Esperada (15:1)	19,69	1,31	21	
$\chi^2_{1 \text{ gl}} (p < 0,05) < 3,84$					

En este caso, al no disponer de semillas segregantes para la resistencia a la kanamicina, no se pudo determinar el número de insertos con fiabilidad ya que esta circunstancia es explicable tanto por la inserción de dos o más insertos como por la fijación en homocigosis de uno de ellos. En el futuro se van a realizar retrocruces con plantas *wild type* para tratar de obtener poblaciones segregantes y así determinar tanto el número de insertos como la existencia de cosegregación entre uno de estos insertos y el fenotipo mutante.

5. Discusión

En primer lugar, queda patente que el método de transformación puesto a punto por nuestro grupo es adecuado para la obtención de plantas de tomate que puedan ser analizadas en un programa de mutagénesis insercional. De hecho, en el grupo de investigación se han conseguido generar más de 7.000 líneas *T-DNA* entre tomate y especies silvestres relacionadas, como *S. pimpinellifolium*, *S. pennellii* o *S. galapaguense* (Atarés et al., 2011; Pérez-Martín et al., 2017). Los protocolos puestos a punto para la transformación de estas especies han llegado a tener eficiencias (número de plantas transgénicas diploides por cada 100 explantes transformados) superiores al 25% en tomate y al 100% en algunas especies silvestres, lo que permite obtener gran cantidad de líneas con las que poder abordar un programa de mutagénesis. Además, gracias al escrutinio de estas líneas se ha obtenido una pequeña colección de mutantes afectados en el tamaño de su parte aérea que nos puede conducir a entender mejor los mecanismos biológicos y genes que controlan este carácter tan importante desde un punto de vista aplicado.

La ventaja que aporta el cultivo *in vitro* a la hora de poder evaluar poblaciones mutagenizadas es la facilidad de tener un elevado número de individuos agrupados en un espacio relativamente pequeño y con unas condiciones ambientales de crecimiento perfectamente controladas. Todo esto hace que los experimentos sean altamente reproducibles. Además, como las plantas se encuentran creciendo en un medio axénico, se evitan problemas de enfermedades y plagas que pueden aparecer cuando se cultivan en un invernadero, por ejemplo. El cultivo *in vitro* también permite la multiplicación a gran escala del material vegetal con el que se trabaja, ya que permite su clonación mediante el subcultivo de los ápices meristemáticos y las yemas axilares. Esto permite evaluar el fenotipo a lo largo del tiempo y ver si es consistente, facilitando la asignación de la característica principal afectada en cada línea. Finalmente, el cultivo *in vitro* permite determinar procesos que no se podrían conocer fácilmente de otro modo, como la capacidad de regeneración de los explantes o la formación de raíces adventicias (Sánchez-López et al., 2021).

A pesar de todo lo anterior, cuando se quiere caracterizar una línea mutante afectada en el tamaño de la parte aérea no solo se puede depender de las técnicas de cultivo *in vitro*, sino que hay que complementarlas con el crecimiento de las plantas en condiciones *in*

vivo. En algunas ocasiones, al cultivar los mutantes en el invernadero, el fenotipo característico de la línea se observa de forma más rápida y clara, como es el caso de la línea 2114 ETMM, donde las plantas afectadas por la mutación mostraban un menor crecimiento desde el momento de la germinación. Además, el cultivo *in vivo* permite analizar el desarrollo reproductivo y, como en el caso de la línea 1372 ETMM, otros caracteres como la presencia de clorosis en los folíolos que no era perceptible cuando las plantas se cultivaban *in vitro*. En definitiva, ambos tipos de evaluaciones fenotípicas son compatibles y complementarias a la hora de realizar un fenotipado exhaustivo de un mutante afectado en el desarrollo de la parte aérea.

Como se ve en el apartado de resultados, de las seis líneas presentadas, solo en el caso de la 125 ETMM podría darse el caso de que exista fenómeno de cosegregación entre el inserto *nptII* funcional y la mutación causante del fenotipo. Por lo tanto, en las cinco líneas restantes (1372 ETMM, 2114 ETMM, 1415 ETMM, 2059 ETMM y 2099ETMM) las mutaciones causantes del fenotipo estarían originadas por un evento de inserción parcial de un *T-DNA* o del cuerpo del vector (en ese caso las plantas mutantes serían sensibles a la kanamicina) o, más probablemente, por variación somaclonal ocurrida durante el proceso de regeneración adventicia inicial llevado a cabo para obtener las plantas transgénicas.

La variación somaclonal fue definida por Larkin y Scowcroft (1981) como la variación que surge a partir de los cultivos de células y tejidos, por lo que un variante somaclonal, o somaclón, sería aquella planta surgida a partir de cualquier tipo de cultivo de tejidos que presenta alguna diferencia respecto del material de partida. A pesar de que en un primer momento se consideraba un efecto negativo del cultivo *in vitro*, por querer obtener siempre una multiplicación clonal de plantas genéticamente uniformes, la variación somaclonal resulta muy útil en la mejora de cultivos, permitiendo aumentar la variabilidad intraespecífica como otros métodos de mutagénesis por agentes físicos, como las radiaciones, o químicos. Se considera que la variación somaclonal tiene dos orígenes ya que puede hacer aflorar variabilidad preexistente en el material de partida al regenerar plantas a partir de células del explante o puede surgir *de novo* durante el proceso de regeneración. Se ha comprobado que el uso de explantes provenientes de tejidos diferenciados, es decir, sin meristemos, y el incremento del número de subcultivos y de su duración incrementa la frecuencia de aparición de variantes somaclonales (Bairu et al., 2011). Entre los cambios que se pueden dar en estos variantes somaclonales se han

identificado la modificación en el número y la estructura de los cromosomas, la mutación o duplicación de algún gen, cambios en los patrones de metilación y la activación de elementos transponibles (Bhojwani & Dantu, 2013).

La obtención de un mutante insercional, es decir, producido por la integración de un inserto de *T-DNA* en el gen afectado, aporta la ventaja de dejar el gen responsable etiquetado por un fragmento de ADN de secuencia conocida, lo que facilita enormemente la identificación de este gracias a técnicas como la *Anchor-PCR* o la *TAIL-PCR*. El resultado obtenido en este trabajo, donde uno de los seis mutantes analizados podría presentar cosegregación, es bastante extrapolable a los que está teniendo en su conjunto el programa de mutagénesis insercional. En total, únicamente el 15% de los mutantes identificados presentan cosegregación con un inserto de *T-DNA* que confiera resistencia a la kanamicina. Este resultado, pese a ser negativo en términos de eficiencia a la hora de identificar los genes responsables de los fenotipos mutantes, no supone un obstáculo insalvable. De hecho, en otros programas de mutagénesis similares, estos ratios de cosegregación son incluso inferiores a los obtenidos en nuestros materiales, ya que se han registrado valores del 10% en una colección de mutantes de *Arabidopsis* (van Lijsebettens et al., 1991) o del 1,4% en arroz (A. H. Li et al., 2006).

Todas las plantas mutantes analizadas presentaron una menor longitud del tallo respecto a los controles *wild type*, por lo que se determinó que el fenotipo característico de estas era la menor elongación del tallo. En el caso de la línea 2059 ETMM también se detectó cierta dificultad para llevar a cabo el proceso de regeneración adventicia, debido a que los callos organogénicos aparentemente formaban un menor número de estructuras que los controles y estas se desarrollaban más lento. No obstante, para poder afirmar que este hecho es propio de la línea y que no se debe a efectos del medio de cultivo, es necesario repetir los experimentos de regeneración en el futuro con un mayor número de individuos mutantes. En algunas líneas también se observó la presencia de entrenudos con una menor longitud que los de las plantas *wild type*, como es el caso de las líneas 1372 ETMM y 2114 ETMM y aparentemente en la línea 2099 ETMM.

Pese a no haber logrado identificar cuáles son los genes responsables de estas mutaciones, una posible explicación que se le puede dar al fenotipo observado es la alteración en los niveles de hormonas endógenas relacionadas con la elongación del tallo, como pueden ser las giberelinas y los brasinoesteroides.

Las giberelinas son un grupo de hormonas vegetales diterpénicas que controlan diversos procesos en las plantas, como la germinación de las semillas o la elongación del tallo. A pesar de que existen gran variedad de giberelinas, las formas bioactivas presentes en las plantas son GA₁ y GA₄ que son detectadas por parte del receptor soluble GID1 en las células. Existe un mecanismo de regulación negativa llevado a cabo por parte de las proteínas DELLA que, en ausencia de giberelinas, impiden que se lleven a cabo las respuestas desencadenadas por este tipo de hormonas, bloqueando la actividad de diversos factores de transcripción. En cambio, cuando el receptor GID1 se une a las giberelinas, se produce la unión de las proteínas DELLA con este, lo que lleva a su degradación mediante el proteasoma y se desbloquean las respuestas celulares desencadenadas por giberelinas (Yamaguchi, 2008).

Se conocen varios casos de especies vegetales en los que una mutación que afecta a la vía de biosíntesis de las giberelinas o a su vía de señalización causa la aparición de un fenotipo compacto o enano. Ejemplos de esto serían plantas enanas de maíz, guisante y *Arabidopsis* originadas por una mutación en uno de los genes de biosíntesis de giberelinas activas (Hedden & Sponsel, 2015). El otro caso serían plantas capaces de producir unos niveles adecuados de giberelinas para activar las respuestas, pero que no pueden responder a ellos, por alteraciones en la percepción o transducción de la señal. Una forma de distinguir entre ambos tipos de mutación sería la aplicación de giberelinas exógenas, ya que los mutantes de biosíntesis podrían revertir el fenotipo enano, mientras que los de señalización permanecerían inmutables (Davière & Achard, 2013). Existe en bibliografía mutantes de tomate con un menor tamaño que los controles *wild type* afectados en la ruta de las giberelinas y que presentan un fenotipo similar al observado en las líneas del trabajo, lo que apoyaría que estas presentaran alguna mutación relativa a estas hormonas (Tomlinson et al., 2019).

Un ejemplo claro de la ventaja que presentan las plantas con un menor porte de la parte aérea es la Revolución Verde que tuvo lugar en los años 60. La creación de variedades enanas por una mutación en la vía de las giberelinas (en concreto proteínas DELLA que no eran inactivadas por acción de GID1 activo por las giberelinas) permitió incrementar el rendimiento de los campos de cereal, al poder aplicar una mayor concentración de fertilizantes nitrogenados sin que esto derivara en una mayor elongación del tallo. De esta forma, la obtención de variedades de tomate de menor porte, pero con la misma

arquitectura, podría conllevar ventajas similares, al permitir un mejor aprovechamiento de la fertilización, así como del espacio de cultivo (Davière & Achard, 2013).

Dentro del tomate, un caso famoso de variedad enana es el tomate Micro Tom, altamente utilizado en la investigación. Esta variedad presenta tres mutaciones en los genes *SELF-PRUNING*, *DWARF* y *MINIATURE*, lo que resulta en una planta de menor porte con una menor distancia entrenudos. El segundo gen está relacionado con la síntesis de brasinoesteroides, otro grupo de hormonas vegetales relacionadas con el crecimiento vegetativo. La mutación que porta la variedad Micro Tom hace que la síntesis de brasinoesteroides sea deficiente (Martí et al., 2006). Por ello, podría ser interesante estudiar también en las líneas con menor desarrollo vegetativo si la concentración de estas hormonas es diferente respecto de los controles, lo que permitiría una caracterización más exacta del fenotipo observado, y ayudaría a acotar el gen que puede estar afectado por la mutación originada posiblemente por variación somaclonal.

Finalmente, sería interesante dar alguna posible explicación a la clorosis observada en los folíolos de las plantas mutantes pertenecientes a la línea 1372 ETMM. Una causa de que este fenotipo solo sea visto durante el cultivo en condiciones de invernadero podría estar relacionada con que las plantas que crecen en condiciones *in vitro* se encontrarían en un medio más controlado y que favorecería su desarrollo, al no tener que depender exclusivamente de su capacidad fotosintética. En cambio, cuando crecen *in vivo*, y dado que las condiciones ambientales del invernadero son diferentes, presentarían el fenotipo clorótico. La clorosis es un fenómeno dado por una menor concentración de clorofila en las hojas, lo que hace que estas adquieran una coloración más amarillenta. Esto concuerda con las diferencias significativas en el contenido de clorofila A y B detectadas en los folíolos de las plantas mutantes pertenecientes a la línea 1372 ETMM respecto de los controles *wild type*. La ruta de biosíntesis de clorofila está compartida en sus primeros pasos con la biosíntesis de giberelinas, lo que podría tener relación con el fenotipo característico de la línea 1372 ETMM, al ser las plantas mutantes tanto más pequeñas como cloróticas. En este sentido, se ha descubierto que la sobreexpresión del gen *SIRBZ* de tomate causa plantas enanas y cloróticas, debido a fallos en la formación de los cloroplastos (Fan et al., 2016).

Como posibles experimentos a corto plazo con estos mutantes, sería interesante, además de identificar el gen mutado, realizar una cuantificación de los niveles de giberelinas endógenas, con el fin de determinar si la mutación afecta realmente a este tipo de

hormonas. Además, también se podrían aplicar giberelinas exógenas y observar si se produce una reversión del fenotipo, para saber si la mutación afecta a la biosíntesis o señalización (siempre y cuando antes se haya comprobado que la mutación está relacionada con estas hormonas). Estos podrían ser alguno de los experimentos futuros a realizar con estas líneas y que permitirían caracterizarlas mejor. Además de estos experimentos, también sería factible realizar cruces entre las diferentes líneas de *T-DNA* para ver si las mutaciones son alélicas. Para ello, únicamente habría que cruzarlos entre sí y ver si la descendencia presenta fenotipo mutante (las mutaciones son alélicas) o *wild type* (los genes afectados son diferentes).

6. Conclusiones

Tras realizar este Trabajo de Fin de Máster, las conclusiones que se pueden sacar de él son las siguientes:

- Se ha caracterizado el fenotipo, tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*, de plantas mutantes pertenecientes a las líneas 1372 ETMM, 2114 ETMM y 1415 ETMM. Además, se ha confirmado el fenotipo, también en ambas condiciones, de las líneas 2059 ETMM, 2099 ETMM y 125 ETMM. Todas presentaban en común un menor desarrollo de la parte aérea, caracterizado por una menor elongación del tallo respecto de los controles *wild type*.
- En la línea 1372 ETMM se ha determinado que los mutantes no presentan fallos en el proceso de regeneración adventicia ni de enraizamiento adventicio, que los entrenudos tienen una longitud significativamente menor que en el caso de los *wild type* y que los folíolos en condiciones de crecimiento *in vivo* presentan un patrón clorótico característico por un contenido significativamente menor de clorofila A y B. Además, se ha descubierto que no existe fenómeno de cosegregación entre el inserto y la mutación, por lo que el fenotipo observado se debe posiblemente a un caso de variación somaclonal.
- En la línea 2114 ETMM se ha visto que los mutantes no presentan alteraciones en el proceso de regeneración adventicia ni de enraizamiento adventicio, además de que hay una longitud significativamente menor de los entrenudos. La mutación de la línea no se debe al inserto, sino posiblemente a un evento de variación somaclonal, al no haber fenómeno de cosegregación entre inserto y mutación.
- En la línea 1415 ETMM no hay defectos en el proceso de regeneración adventicia. La mutación tiene un modo de herencia recesivo, presenta un inserto *nptII* funcional y no hay fenómeno de cosegregación entre el inserto y la mutación, por lo que esta se debe probablemente a un caso de variación somaclonal ocurrido durante la regeneración adventicia inicial para obtener la línea.
- Se ha confirmado que la línea 2059 ETMM presenta cierta capacidad de regeneración adventicia, contrariamente a lo observado en anteriores trabajos. También se ha demostrado la ausencia de cosegregación entre el inserto y la mutación.

- En la línea 2099 ETMM se ha corroborado que los mutantes presentan una capacidad similar de regeneración adventicia que los controles. Además, se ha verificado la ausencia del fenómeno de cosegregación entre inserto y mutación.
- En la línea 125 ETMM se ha confirmado la capacidad inalterada de regeneración adventicia de los mutantes, aunque tras el proceso, estos pierden el fenotipo mutante característico. Se ha demostrado el modo de herencia recesivo de la mutación, aunque no se ha podido corroborar la presencia de más de un inserto *nptII* funcional y el fenómeno de cosegregación por no disponer de semilla segregante para la resistencia a la kanamicina.

7. Referencias bibliográficas

- Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. (2007). *Base de Datos BEDCA*. <https://www.bedca.net/bdpub/index.php>
- Atarés, A., Moyano, E., Morales, B., Schleicher, P., García-Abellán, J. O., Antón, T., García-Sogo, B., Perez-Martin, F., Lozano, R., Flores, F. B., Moreno, V., del Carmen Bolarin, M., & Pineda, B. (2011). An insertional mutagenesis programme with an enhancer trap for the identification and tagging of genes involved in abiotic stress tolerance in the tomato wild-related species *Solanum pennellii*. *Plant Cell Reports*, 30(10), 1865–1879. <https://doi.org/10.1007/S00299-011-1094-Y/FIGURES/7>
- Bai, Y., Im, P., In, L., & Ut, D. O. (2007). Domestication and Breeding of Tomatoes: What have We Gained and What Can We Gain in the Future? *Annals of Botany*, 100(5), 1085–1094. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm150>
- Bairu, M. W., Aremu, A. O., & van Staden, J. (2011). Somaclonal variation in plants: Causes and detection methods. *Plant Growth Regulation*, 63(2), 147–173. <https://doi.org/10.1007/S10725-010-9554-X/TABLES/1>
- Barabaschi, D., Tondelli, A., Desiderio, F., Volante, A., Vaccino, P., Valè, G., & Cattivelli, L. (2016). Next generation breeding. *Plant Science*, 242, 3–13. <https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2015.07.010>
- Bauchet, G., Causse, M., Bauchet, G., & Causse, M. (2012). Genetic Diversity in Tomato (*Solanum lycopersicum*) and Its Wild Relatives. *Genetic Diversity in Plants*. <https://doi.org/10.5772/33073>
- Bergougnoux, V. (2014). The history of tomato: From domestication to biopharming. *Biotechnology Advances*, 32(1), 170–189. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2013.11.003>
- Bhatia, P., Ashwath, N., Senaratna, T., & Midmore, D. (2004). Tissue culture studies of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Review of Plant Biotechnology and Applied Genetics*, 78, 1–21.
- Bhojwani, S. S., & Dantu, P. K. (2013). Somaclonal Variation. *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*, 141–154. https://doi.org/10.1007/978-81-322-1026-9_12
- Blanca, J., Cañizares, J., Cordero, L., Pascual, L., Díez, M. J., & Nuez, F. (2012). Variation Revealed by SNP Genotyping and Morphology Provides Insight into the Origin of the Tomato. *PLOS ONE*, 7(10), e48198. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0048198>
- Blanca, J., Sanchez-Matarredona, D., Ziarsolo, P., Montero-Pau, J., van der Knaap, E., Díez, M. J., & Cañizares, J. (2022). Haplotype analyses reveal novel insights into tomato history and domestication driven by long-distance migrations and latitudinal adaptations. *Horticulture Research*, 9. <https://doi.org/10.1093/HR/UHAC030>
- Carbonell, A., Fahlgren, N., Mitchell, S., Cox, K. L., Reilly, K. C., Mockler, T. C., & Carrington, J. C. (2015). Highly specific gene silencing in a monocot species by

- artificial microRNAs derived from chimeric miRNA precursors. *The Plant Journal*, 82(6), 1061–1075. <https://doi.org/10.1111/TPJ.12835>
- Chaudhary, J., Alisha, A., Bhatt, V., Chandanshive, S., Kumar, N., Sonah, H., Deshmukh, R., Mir, Z., Kumar, A., Yadav, S., & Shivaraj, S. M. S. (2019). Mutation Breeding in Tomato: Advances, Applicability and Challenges. *Plants 2019*, Vol. 8, Page 128, 8(5), 128. <https://doi.org/10.3390/PLANTS8050128>
- Davière, J. M., & Achard, P. (2013). Gibberellin signaling in plants. *Development*, 140(6), 1147–1151. <https://doi.org/10.1242/DEV.087650>
- Durick, K., Mendlein, J., & Xanthopoulos, K. G. (1999). Hunting with traps: Genome-wide strategies for gene discovery and functional analysis. *Genome Research*, 9(11), 1019–1025. <https://doi.org/10.1101/GR.9.11.1019>
- Espinosa-Leal, C. A., Puente-Garza, C. A., & García-Lara, S. (2018). In vitro plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta 2018* 248:1, 248(1), 1–18. <https://doi.org/10.1007/S00425-018-2910-1>
- Fan, M., Gao, S., Ren, J., Yang, Q., Li, H., Yang, C., & Ye, Z. (2016). Overexpression of SIRBZ results in chlorosis and dwarfism through impairing chlorophyll, carotenoid, and gibberellin biosynthesis in tomato. *Frontiers in Plant Science*, 7, 907. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2016.00907/BIBTEX>
- Gerszberg, A., Hnatuszko-Konka, K., Kowalczyk, T., & Kononowicz, A. K. (2015). Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the service of biotechnology. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 120(3), 881–902. <https://doi.org/10.1007/S11240-014-0664-4/TABLES/2>
- Gerszberg, A., Hnatuszko-Konka, K., Kowalczyk, T., & Kononowicz, A. K. (2016). Efficient In Vitro Callus Induction and Plant Regeneration Protocol for Different Polish Tomato Cultivars. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 44(2), 452–458. <https://doi.org/10.15835/NBHA44210530>
- Hedden, P., & Sponsel, V. (2015). A Century of Gibberellin Research. *Journal of Plant Growth Regulation* 2015 34:4, 34(4), 740–760. <https://doi.org/10.1007/S00344-015-9546-1>
- Itoh, H., Tatsumi, T., Sakamoto, T., Otomo, K., Toyomasu, T., Kitano, H., Ashikari, M., Ichihara, S., & Matsuoka, M. (2004). A rice semi-dwarf gene, Tan-Ginbozu (D35), encodes the gibberellin biosynthesis enzyme, ent-kaurene oxidase. *Plant Molecular Biology*, 54(4), 533–547. <https://doi.org/10.1023/B:PLAN.0000038261.21060.47/METRICS>
- Jáquez-Gutiérrez, M., Atarés, A., Pineda, B., Angarita, P., Ribelles, C., García-Sogo, B., Sánchez-López, J., Capel, C., Yuste-Lisbona, F. J., Lozano, R., & Moreno, V. (2019). Phenotypic and genetic characterization of tomato mutants provides new insights into leaf development and its relationship to agronomic traits. *BMC Plant Biology*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1735-9>
- Larkin, P. J., & Scowcroft, W. R. (1981). Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, 60(4), 197–214. <https://doi.org/10.1007/BF02342540/METRICS>

- Li, A. H., Zhang, Y. F., Wu, C. Y., Tang, W., Wu, R., Dai, Z. Y., Liu, G. Q., Zhang, H. X., & Pan, X. B. (2006). Screening for and genetic analysis on T-DNA-inserted mutant pool in rice. *Yi Chuan Xue Bao = Acta Genetica Sinica*, 33(4), 319–329. [https://doi.org/10.1016/S0379-4172\(06\)60057-7](https://doi.org/10.1016/S0379-4172(06)60057-7)
- Li, Z. feng, Guo, Y., Ou, L., Hong, H., Wang, J., Liu, Z. xiong, Guo, B., Zhang, L., & Qiu, L. (2018). Identification of the dwarf gene GmDW1 in soybean (*Glycine max* L.) by combining mapping-by-sequencing and linkage analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 131(5), 1001–1016. <https://doi.org/10.1007/S00122-017-3044-8/FIGURES/5>
- López Marín, L. M. (2017). *Manual técnico del cultivo de tomate*.
- Martí, E., Gisbert, C., Bishop, G. J., Dixon, M. S., & García-Martínez, J. L. (2006). Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom. *Journal of Experimental Botany*, 57(9), 2037–2047. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERJ154>
- Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. (2021). *Superficies y producciones anuales de cultivos*. <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/superficies-producciones-anuales-cultivos/>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497. <https://doi.org/10.1111/J.1399-3054.1962.TB08052.X>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2021). *FAOSTAT*. <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL/visualize>
- Peralta, I. E., Knapp, S., & Spooner, D. M. (2005). New Species of Wild Tomatoes (*Solanum* Section *Lycopersicon*: Solanaceae) from Northern Peru. *Systematic Botany*, 30(2), 424–434. <https://doi.org/10.1600/0363644054223657>
- Peralta, I. E., & Spooner, D. M. (2007). History, origin and early cultivation of tomato (*solanaceae*). *Genetic Improvement of Solanaceous Crops Volume 2: Tomato*, 1–24. <https://doi.org/10.1201/B10744-2/GENETIC-RESOURCES-TOMATO-LYCOPERSICON-ESCULENTUM-MILL-WILD-RELATIVES-LARRY-ROBERTSON-JOANNE-LABATE>
- Peralta, I. E., Spooner, D. M., & Knapp, S. (2008). Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (*Solanum* sect. *Lycopersicoides*, sect. *Juglandifolia*, sect. *Lycopersicon*; Solanaceae). *Systematic Botany Monographs*, 84.
- Peralta, L. F. (2021). *Caracterización in vitro e in vivo de mutantes de tomate (Solanum lycopersicum L.) alterados en la arquitectura de la planta*.
- Pérez-Martín, F., Yuste-Lisbona, F. J., Pineda, B., Angarita-Díaz, M. P., García-Sogo, B., Antón, T., Sánchez, S., Giménez, E., Atarés, A., Fernández-Lozano, A., Ortíz-Atienza, A., García-Alcázar, M., Castañeda, L., Fonseca, R., Capel, C., Goergen, G., Sánchez, J., Quispe, J. L., Capel, J., ... Lozano, R. (2017). A collection of enhancer trap insertional mutants for functional genomics in tomato. *Plant Biotechnology Journal*, 15(11), 1439–1452. <https://doi.org/10.1111/PBI.12728>
- Phillips, G. C. (2004). In vitro morphogenesis in plants-recent advances. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 2004 40:4, 40(4), 342–345. <https://doi.org/10.1079/IVP2004555>

- Praena-Tamayo, J. (2017). *Identificación y Caracterización de Mutantes Afectados en el Desarrollo Temprano en Líneas T-DNA de Tomate y Solanum pimpinellifolium*.
- Prósper-Ortega, L. (2018). *Caracterización de mutantes de tomate con un crecimiento compacto*.
- Razifard, H., Ramos, A., della Valle, A. L., Bodary, C., Goetz, E., Manser, E. J., Li, X., Zhang, L., Visa, S., Tieman, D., van der Knaap, E., & Caicedo, A. L. (2020). Genomic Evidence for Complex Domestication History of the Cultivated Tomato in Latin America. *Molecular Biology and Evolution*, 37(4), 1118–1132. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSZ297>
- Sánchez-López, J., Atarés, A., Jáquez-Gutiérrez, M., Ortiz-Atienza, A., Capel, C., Pineda, B., García-Sogo, B., Yuste-Lisbona, F. J., Lozano, R., & Moreno, V. (2021). Approaching the genetic dissection of indirect adventitious organogenesis process in tomato explants. *Plant Science*, 302, 110721. <https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2020.110721>
- Shahin, E. A. (1985). Totipotency of tomato protoplasts. *Theoretical and Applied Genetics* 1985 69:3, 69(3), 235–240. <https://doi.org/10.1007/BF00662431>
- Tomlinson, L., Yang, Y., Emenecker, R., Smoker, M., Taylor, J., Perkins, S., Smith, J., MacLean, D., Olszewski, N. E., & Jones, J. D. G. (2019). Using CRISPR/Cas9 genome editing in tomato to create a gibberellin-responsive dominant dwarf DELLA allele. *Plant Biotechnology Journal*, 17(1), 132–140. <https://doi.org/10.1111/PBI.12952>
- van Lijsebettens, M., Vanderhaeghen, R., & van Montagu, M. (1991). Insertional mutagenesis in *Arabidopsis thaliana*: isolation of a T-DNA-linked mutation that alters leaf morphology. *TAG. Theoretical and Applied Genetics. Theoretische Und Angewandte Genetik*, 81(2), 277–284. <https://doi.org/10.1007/BF00215734>
- Yamaguchi, S. (2008). *Gibberellin Metabolism and its Regulation*. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092804>

Anexo I. Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la Agenda 2030

Grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).

Objetivos de Desarrollo Sostenible	Alto	Medio	Bajo	No procede
ODS 1. Fin de la pobreza.		x		
ODS 2. Hambre cero.	x			
ODS 3. Salud y bienestar.			x	
ODS 4. Educación de calidad.				x
ODS 5. Igualdad de género.				x
ODS 6. Agua limpia y saneamiento.			x	
ODS 7. Energía asequible y no contaminante.				x
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico.			x	
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras.		x		
ODS 10. Reducción de las desigualdades.			x	
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles.		x		
ODS 12. Producción y consumo responsables.		x		
ODS 13. Acción por el clima.		x		
ODS 14. Vida submarina.				x
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres.		x		
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas.				x
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.			x	

Descripción de la alineación del Trabajo de Fin de Máster con los ODS con un grado de relación más alto.

Este Trabajo de Fin de Máster tiene una alta alineación con el ODS 2 de hambre cero, ya que las mejoras de los cultivos, en especial el tomate, una hortaliza altamente consumida a nivel mundial, favorece una mayor producción, y por tanto, un mejor acceso a los alimentos. Además, la identificación de genes concretos, relacionados con el desarrollo de la planta o la resistencia a diferentes condiciones ambientales puede facilitar que las poblaciones y grupos menos favorecidos tengan un mejor acceso a los recursos, eliminando los problemas de alimentación que suelen tener asociados.

Junto con el ODS anterior también va el ODS 1 de fin de la pobreza, ya que una mejora en los cultivos permite un acceso más justo a todas las personas, en especial para las que pertenecen a los grupos menos favorecidos. Si se proporcionan de forma desinteresada cultivos mejorados para condiciones climáticas adversas y con unas condiciones de crecimiento incrementadas a grupos y poblaciones con menos recursos se puede favorecer su incorporación al sistema económico, al dotarles de herramientas que permitan una competición más justa con los sistemas de producción establecidos.

El Trabajo de Fin de Máster también se puede alinear con los ODS 9 de industria, innovación e infraestructuras, 11 de ciudades y comunidades sostenibles, 12 de producción y consumo responsable y 13 de acción por el clima. La investigación en la mejora de los cultivos es un elemento clave en la agricultura y la innovación para la obtención de nuevas variedades. La caracterización de genes de cultivos tan importantes como el tomate puede ayudar a obtener variedades más sostenibles, que requieran un menor uso de recursos hídricos y aplicación de una menor cantidad de productos fitosanitarios, además de su cultivo en zonas afectadas por el cambio climático. Esto también puede ayudar a crear ciudades y comunidades más sostenibles, en las que se puedan cultivar un mayor número de productos, favoreciendo la aparición de huertos urbanos, por ejemplo, y aumentando el número de cultivos de kilómetro 0, reduciendo también así las emisiones de gases de efecto invernadero.

Finalmente, respecto al ODS 15 de vida de los ecosistemas terrestres, la obtención de variedades de con un menor porte pero una capacidad similar de fructificación puede favorecer un mejor aprovechamiento de las tierras de cultivo, haciendo que se necesiten tierras de cultivo de un tamaño menor para una misma producción. De esta forma, se

pueden respetar mejor los ecosistemas terrestres, al no tener que usar parte de su extensión para tierras de cultivo.