



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la
Agrodiversidad Valenciana

Mutagénesis insercional de tomate cv Microtom para la
identificación de genes relacionados con la tolerancia a
estreses abióticos

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Mejora Genética Vegetal

AUTOR/A: Centelles Felici, Livia

Tutor/a: Atarés Huerta, Alejandro

Cotutor/a: Moreno Ferrero, Vicente

Director/a Experimental: MARTIN VASQUEZ, CONSTANZA ANDREA

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Instituto de Conservación y Mejora
de la Agrodiversidad Valenciana

Mutagénesis insercional de tomate cv MicroTom para la identificación de genes relacionados con la tolerancia a estreses abióticos

Realizado en



ibmcp

Instituto de Biología Molecular
y Celular de Plantas

TRABAJO FINAL DE MÁSTER

Autora:

Livia Centelles Felici

Tutores:

Alejandro Atarés Huerta

Vicente Moreno Ferrero

Directora experimental:

Constanza Martin Vásquez

Septiembre, 2023

RESUMEN

Las plantas se ven sometidas a numerosos estreses abióticos, como la salinidad o la sequía, a lo largo de su ciclo vital los cuales producen diversos daños a nivel fisiológico. Las plantas responden ante estos estreses con diferentes cambios metabólicos y estructurales. La identificación de los genes que intervienen en estos procesos es una herramienta fundamental para tratar de paliar los daños que se producen en las plantas que los sufren. Una de las estrategias para identificar estos genes clave es la obtención de mutantes para estos caracteres. Entre las diferentes alternativas, la mutagénesis insercional es una herramienta que puede ayudar a acortar los plazos de identificación de los genes causantes de los fenotipos mutantes previamente identificados.

Mediante el empleo de la variedad Micro-Tom se pretende lograr el acortamiento de los plazos para identificar y caracterizar los mutantes obtenidos. Por otra parte, gracias al poco tamaño que necesita para completar su ciclo de cultivo, podremos manejar una gran cantidad de plantas en un espacio reducido, lo cual es clave en cualquier programa de mutagénesis.

En este trabajo se van a poner a punto las metodologías que permitan la identificación de mutantes de Micro-Tom con alteraciones en su respuesta a estrés salino e hídrico. En paralelo, se pretende obtener plantas transgénicas (TG1) de Micro-Tom y obtener sus descendientes (TG2) para poder identificar tanto mutantes dominantes (TG1) como mutantes recesivos (TG2). Estas metodologías deben permitir identificar mutantes que presenten alteraciones cuando se cultivan bajo estos estreses a lo largo de todo su ciclo de cultivo, desde el desarrollo vegetativo hasta la producción y maduración de los frutos. Por último, también se caracteriza fenotípica y genéticamente los mutantes identificados.

Palabras clave: *Solanum lycopersicum*, T-DNA, Micro-Tom, mutagénesis insercional, estrés abiótico.

ABSTRACT

Plants are exposed to various abiotic stresses, such as salinity or drought, throughout their life cycle, resulting in diverse physiological damage. Plants respond to these stresses through distinct metabolic and structural changes. Identifying the genes involved in these processes is a fundamental approach to mitigate the damage inflicted upon afflicted plants. One strategy to pinpoint these crucial genes involves generating mutants with these traits. Among the available techniques, insertional mutagenesis stands out as a tool capable of expediting the identification of genes responsible for the previously observed mutant phenotypes.

The utilization of the Micro-Tom variety aims to expedite the identification and characterization of obtained mutants. Moreover, due to its compact growth cycle, it facilitates the cultivation of a substantial number of plants within limited space, a pivotal aspect of any mutagenesis program.

This study's objective is to develop methodologies to detect Micro-Tom mutants exhibiting alterations in their response to salinity and drought. Concurrently, the production of transgenic plants (TG1) of Micro-Tom and their subsequent generations (TG2) to detect both, dominant mutants (TG1) and recessive mutants (TG2) will be carried out. These methodologies should enable the identification of mutants manifesting deviations when cultivated under these stressors throughout their life cycle, spanning from vegetative development to fruit maturation. Ultimately, the identified mutants undergo comprehensive phenotypic and genetic characterization.

Key words: *Solanum lycopersicum*, T-DNA, Micro-Tom, insertional mutagenesis, abiotic stress.

ÍNDICE

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE TABLAS	VI
ABREVIATURAS	VI
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Descripción del cultivo	1
1.2 Domesticación del tomate	2
1.3 Importancia en la ciencia	2
1.4 Mejora genética del tomate	3
1.4.1 Transformación genética	5
1.4.2 Mutagénesis insercional	5
1.5 Identificación de mutantes	6
1.6 Salinidad y sequía en el cultivo del tomate	7
2. OBJETIVOS	9
3. MATERIAL Y MÉTODOS	10
3.1 Evaluación de la producción en plantas sometidas a estrés hídrico y estrés salino	10
3.1.1 Análisis del tratamiento idóneo para identificar mutantes de Micro-Tom con alteraciones en su tolerancia a la salinidad	10
3.1.2 Análisis del tratamiento idóneo para identificar mutantes de Micro-Tom con alteraciones en su tolerancia a la sequía	10
3.2 Material vegetal	10
3.3 Técnicas básicas de cultivo <i>in vitro</i>	11
3.3.1 Esterilización de las semillas	11
3.3.2. Pre-germinación y obtención de plantas axénicas	12
3.3.3 Preparación de medios de cultivo	12
3.3.4 Clonación	13
3.4 Transformación genética	13
3.4.1 Obtención de explantes y precultivo	13

3.4.2 Preparación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	13
3.4.3 Cocultivo y eliminación de <i>Agrobacterium</i>	13
3.4.4 Regeneración de plantas transgénicas	14
3.4.5 Determinación del nivel de ploidía en las plantas regeneradas mediante citometría de flujo	14
3.5 Cultivo en invernadero	14
3.5.1 Aclimatación de plantas para cultivo en invernadero	14
3.5.2 Cultivo en invernadero	15
3.6 Análisis de las líneas mutantes	15
3.6.1 Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante	15
3.6.2 Análisis genético del número de inserto T-DNA	16
3.6.3 Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante	16
3.6.4 Test χ^2	16
4. RESULTADOS	17
4.1. Evaluación de la producción en plantas sometidas a estrés hídrico y estrés salino	17
4.2 Transformación genética	20
4.3 Análisis de líneas mutantes	20
4.3.1 Mutante 91 ETMT	20
4.3.2 Mutante 115 ETMT	27
4.3.3 Mutante 76 ETMT	31
5. DISCUSIÓN	35
5.1 Evaluación de la concentración óptima de sal para estudios de la producción de plantas sometidas a estrés salino	35
5.2 Obtención de líneas T-DNA de Micro-Tom	36
5.3 Análisis de líneas mutantes.	37
6. CONCLUSIONES	40
7. BIBLIOGRAFÍA	41

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: VOLUMEN DE TOMATES PRODUCIDOS EN ESPAÑA EN 2021, POR COMUNIDAD AUTÓNOMA (EN MILES DE TONELADAS). FUENTE: MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN, 2023).....	2
FIGURA 2: ESTRUCTURA DE LOS VECTORES TRAMPA POTENCIADORES, GENES Y PROMOTORES. (A) GEN CROMOSÓMICO GENÉRICO CON EXONES (RECUADROS) E INTRONES (LÍNEAS). (B) CONSTRUCCIÓN DE TRAMPA DE POTENCIADORA. (C) CONSTRUCCIÓN TRAMPA DEL PROMOTOR. (D) CONSTRUCCIÓN TRAMPA DEL GEN. LAS FLECHAS DE CADA PANEL REPRESENTAN LOS TRANSCRITOS QUE SE PRODUCEN COMO CONSECUENCIA DE LA INSERCIÓN (SPRINGER, 2000)	7
FIGURA 3: IMPACTO GENERAL DE ESTRÉS POR SEQUÍA EN EL CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS DE TOMATE. IMAGEN ADAPTADA DE KRISHNA ET AL., 2022.	8
FIGURA 4: MAPA GENÉTICO DEL PLÁSMIDO PD991 UTILIZADO PARA LA TRANSFORMACIÓN DE TOMATE.	11
FIGURA 5: ESTERILIZACIÓN DE LAS SEMILLAS EN CABINA. ESCALA: 1CM.	12
FIGURA 6: PATRÓN DE CORTES EN PLÁNTULA DE TOMATE PARA LA OBTENCIÓN DE DIFERENTES EXPLANTES. CORTES DE COTILEDONES Y ÁPICES PARA LOS EXPERIMENTOS. ESCALA: 1CM.	12
FIGURA 7: DESARROLLO A LO LARGO DE 73 DÍAS DE PLANTAS IN VIVO DE MICRO-TOM REGADAS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NACL. EN ORDEN ASCENDENTE: 0, 25, 50, 100, 150, 200 MM.	17
FIGURA 8: CORTE LONGITUDINAL DE LOS FRUTOS OBTENIDOS DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS DE RIEGO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NACL. ESCALA: 1CM.....	19
FIGURA 9: FENOTIPO DE PLANTA AXÉNICA WT Y M DE LA LÍNEA 91 ETMT EN MEDIO MB3 A LOS 30 DÍAS. ESCALAS: 1 CM.....	21
FIGURA 10: MEDIA DE PESO FRESCO DE LAS RAÍCES ADVENTICIAS, LONGITUD Y NÚMERO DE RAÍCES DE WT Y M DE LA LÍNEA 91 ETMT CON ERROR TÍPICO	22
FIGURA 11: DETALLE DE RAÍCES ADVENTICIAS WT Y M DE LA LÍNEA 91 ETMT. ESCALA: 1CM.	23
FIGURA 12: FENOTIPO DE PLANTA AXÉNICA WT Y M A DIFERENTES TIEMPOS DE LA LÍNEA 91 ETMT EN MEDIO IBA02. ESCALA: 1CM	24
FIGURA 13: PROCESO DE REGENERACIÓN ADVENTICIA EN EXPLANTES DE COTILEDONES WT Y M A LOS 30 DÍAS EN MEDIO IZ DE LA LÍNEA 91 ETMT. ESCALA: 1 CM.	25
FIGURA 14: PROCESO DE REGENERACIÓN ADVENTICIA EN EXPLANTES DE HOJA WT Y M DE LA LÍNEA 91 ETMT EN MEDIO IZ A LOS 7 DÍAS. ESCALA: 1 CM	25
FIGURA 15: DESARROLLO IN VIVO DE PLANTA TG2 WT ACLIMATADA DE LA LÍNEA 91 ETMT. ESCALA: 1 CM.....	26
FIGURA 16: FENOTIPO DE PLÁNTULAS A LOS 7 DÍAS EN MG DE LA LÍNEA 115 ETMT. ESCALA 1CM.	27
FIGURA 17: FENOTIPO DE PLANTA AXÉNICA A DIFERENTES TIEMPOS DE CRECIMIENTO DE LA LÍNEA 115 ETMT EN MB3. ESCALA: 1CM	28
FIGURA 18: FENOTIPO DE PLANTA AXÉNICA A DIFERENTES TIEMPOS DE CRECIMIENTO DE LA LÍNEA 115 ETMT EN MEDIO IBA02. ESCALA: 1CM.	28
FIGURA 19: COTILEDONES DEL MUTANTE 115 ETMT EN MEDIO IZ. ESCALA: 1CM.	29
FIGURA 20: PLANTA AXÉNICA WT Y MUTANTE DE LA LÍNEA 76 ETMT EN MEDIO MB3. ESCALA: 1CM.....	31
FIGURA 21: FENOTIPO DE LA RAÍZ ADVENTICIA DE LA LÍNEA 76 ETMT CULTIVADO EN IBA02 DURANTE 20 DÍAS. ESCALA: 1CM	31
FIGURA 22: DESARROLLO IN VIVO DE LA LÍNEA 76 ETMT DE UNA PLANTA MUTANTE. ESCALA: 1CM.	32

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: NOMBRE Y COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS.	13
TABLA 2: NOMBRE Y COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS EN TRANSFORMACIÓN..	14
TABLA 3: COMPOSICIÓN DE LA SOLUCIÓN NUTRITIVA UTILIZADA EN EL RIEGO EN LOS INVERNADEROS DEL IBMCP.	15
TABLA4 : NÚMERO TOTAL DE FRUTOS POR PLANTA PARA CADA TRATAMIENTO SALINO Y EN TOTAL PARA CADA UNO DE LOS TRATAMIENTOS.	18
TABLA5 : PESO PROMEDIO DE LOS FRUTOS DE CADA PLANTA Y PESO PROMEDIO DE FRUTOS POR TRATAMIENTO.	18
TABLA6 : NÚMERO DE SEMILLAS OBTENIDAS EN TOTAL POR CADA TRATAMIENTO DE RIEGO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SALINIDAD.....	19
TABLA 7: EFICIENCIA DE LAS DIFERENTES TRANSFORMACIONES DE LOS EXPLANTES DE MICRO-TOM.	20
TABLA 8: VALOR DE T Y P-VALOR OBTENIDOS PARA CADA UNA DE LAS CONDICIONES.....	22
TABLA 9: ANÁLISIS DEL MODO DE HERENCIA DE LA MUTACIÓN DE LA LÍNEA 91 ETMT.	26
TABLA 10: ANÁLISIS GENÉTICO DEL NÚMERO DE INSERTOS T-DNA CON EL GEN NPTII EN LA LÍNEA 91 ETMT.....	26
TABLA 11: ANÁLISIS DE COSEGREGACIÓN DEL INSERTO T-DNA Y EL FENOTIPO MUTANTE DE LA LÍNEA 91 ETMT.....	27
TABLA 12: ANÁLISIS DEL MODO DE HERENCIA DE LA MUTACIÓN DE LA LÍNEA 115 ETMT.	29
TABLA 13: ANÁLISIS GENÉTICO DEL NÚMERO DE INSERTOS T-DNA CON EL GEN NPTII EN LA LÍNEA 115 ETMT.....	30
TABLA 14: ANÁLISIS DE COSEGREGACIÓN DEL INSERTO T-DNA Y EL FENOTIPO MUTANTE DE LA LÍNEA 115-ETMT.....	30
TABLA 15: ANÁLISIS DEL MODO DE HERENCIA DE LA MUTACIÓN DE LA LÍNEA 76 ETMT.	32
TABLA 16: ANÁLISIS GENÉTICO DEL NÚMERO DE INSERTOS T-DNA CON EL GEN NPTII EN LA LÍNEA 76 ETMT.....	33
TABLA 17: ANÁLISIS DE COSEGREGACIÓN DEL INSERTO T-DNA Y EL FENOTIPO MUTANTE DE LA LÍNEA 76-ETMT.....	33

ABREVIATURAS

- IBA: Ácido Indol-3-butírico
- IAA: Ácido Indol-3-acético
- Kan^S: Susceptible a la Kanamicina
- Kan^R: Resistente a la Kanamicina
- M: Mutante
- WT: Wild type

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Descripción del cultivo

El tomate (*Solanum lycopersicum L.*) es un miembro de la familia Solanaceae, género Solanum L., sección Lycopersicon y está considerada como una de las plantas dicotiledóneas cultivadas mejor estudiadas (Blanca et al., 2015). Las solanáceas son una de las familias de angiospermas de mayor importancia económica dentro de las cuales se encuentran muchas de las plantas que se cultivan habitualmente, como el tomate, el pimiento, la berenjena o el tabaco. Esta familia es la más variable de todas las especies de cultivos en términos de utilidad agrícola, la 3ª familia de cultivos de mayor importancia económica, sólo superada por las gramíneas y las leguminosas, y la más valiosa en cuanto a cultivos hortícolas (Foolad, 2007).

Solanum lycopersicum L. es una variedad estrictamente autógena con un alto grado de homocigosidad. Es una planta perenne, aunque suele cultivarse como planta anual. Sus tallos son vellosos y sus hojas bipinnadas. Sus flores suelen tener 5 pétalos, aunque también es frecuente encontrar flores con 7 o más insertos (Blanca et al., 2015; Liu et al., 2022).

El tomate se cultiva por sus frutos carnosos. Actualmente se comercializa una amplia gama de variedades con frutos de diferentes colores, formas y tamaños. Es considerado un alimento protector por su particular valor nutritivo, ya que aporta nutrientes importantes como licopeno, betacaroteno, flavonoides, vitamina C y derivados del ácido hidroxicinámico. Además, este cultivo ha alcanzado una enorme popularidad especialmente en los últimos años con el descubrimiento de las actividades antioxidantes y las funciones anticancerígenas del licopeno (Gerszberg et al., 2015)

Según el informe de la FAO, la producción total de tomate asciende a 189,13 millones de toneladas en todo el mundo y la superficie de cultivo es de 5,16 millones de hectáreas en 2021. Por otra parte, y en lo que respecta a España, la producción asciende a 4,75 millones de toneladas siendo Extremadura la comunidad con mayor producción (2.218 toneladas), seguido de Andalucía (1763 toneladas) y por último la Región de Murcia (197 toneladas) de tomate (Figura 1). Por otra parte, la superficie de cultivo fue de 56.110 hectáreas en 2021 (FAOSTAT, 2023).

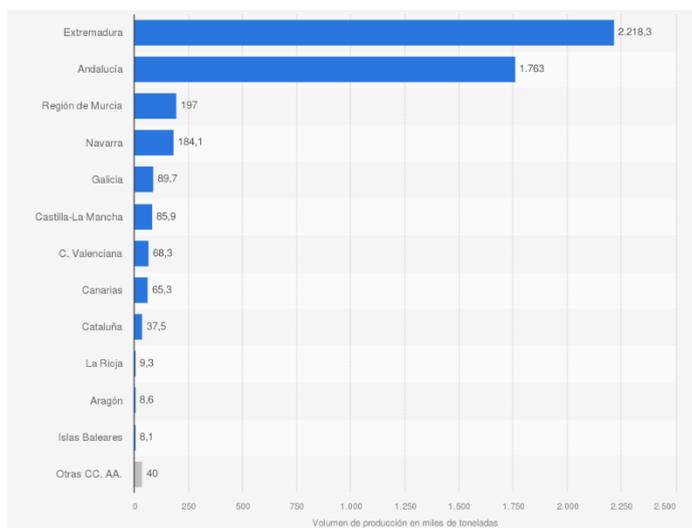


Figura 1: Volumen de tomates producidos en España en 2021, por comunidad autónoma (en miles de toneladas).
Fuente: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2023)

Además de su importancia como producto fresco, el tomate puede ser procesado para obtener diferentes productos como sopas, salsas, pastas o concentrados. Es por ello por lo que su producción va en aumento año a año haciendo que sea uno de los cultivos más producidos. Debido a su importancia económica es una de las especies más estudiadas a nivel científico para su mejora (Blanca et al., 2012; Liu et al., 2022; FAOSTAT, 2023).

1.2 Domesticación del tomate

Originario de los Andes, el tomate fue domesticado en América. Sin embargo, el lugar original de domesticación y los primeros acontecimientos todavía no se tienen claros. Se han propuesto dos hipótesis sobre el lugar original de domesticación del tomate, una peruana y otra mexicana. Aunque faltan pruebas definitivas sobre la época y el lugar de domesticación, se presume que México es la región más probable de domesticación, mientras que Perú es el centro de diversidad de los parientes silvestres. Se cree que *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* es el ancestro del tomate cultivado, basándose en su amplia presencia en América Central y en la presencia de una longitud de estilo más corta en la flor (Bai & Lindhout, 2007; Gerszberg et al., 2015; Razdan, 2006).

La mayoría de los autores sostienen que el tomate llegó a Europa desde México, posteriormente los españoles llevaron el tomate a Europa y, en la primera mitad del siglo XVI, aparecieron claras pruebas de esta introducción en los herbarios europeos. Más tarde, el cultivo se difundió al resto del mundo a través de rutas comerciales y colonias (Blanca et al., 2012). Su domesticación ha experimentado principalmente dos etapas, representadas por *S. pimpinellifolium* y *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* como ancestros, mientras que la cría persistente de cultivares modernos se refiere principalmente a las combinaciones de diversos rasgos para satisfacer las necesidades del mercado (Liu et al., 2022).

Originalmente, el tomate cultivado fue denominado *Solanum lycopersicum*, según la clasificación de Linneo. Miller separó los tomates designando el género *Lycopersicon*, diferenciándolo del género *Solanum*, y especie *esculentum* para el tomate cultivado. Durante años, las relaciones filogenéticas entre ambos géneros han sido discutidas por muchos autores, donde, incluso algunos, los reconocen como géneros distintos y otros, sin embargo, sugieren su fusión (Foolad, 2007; Spooner et al., 1993).

1.3 Importancia en la ciencia

En los últimos años, el interés de los científicos por el tomate como planta modelo ha aumentado significativamente, debido también a que su genoma ha sido secuenciado. El tomate es un buen modelo tanto para programas de investigación básica como aplicada. Esto se debe a que posee una serie de características útiles, como la capacidad que presenta de crecer en diferentes condiciones de cultivo, su ciclo de vida relativamente corto, la capacidad de producción de semillas, su genoma relativamente pequeño (950 Mb), la escasa duplicación de genes, su alta autofertilidad y homocigosidad, la facilidad para controlar la polinización y la hibridación, la capacidad de propagación asexual y la posibilidad de regenerar plantas enteras mediante técnicas de cultivo *in vitro* a partir de diferentes explantes (Bai & Lindhout, 2007;

Gerszberg et al., 2015). Además, los miembros de *Lycopersicon* se pueden transformar genéticamente y los tomates transgénicos de algunos cultivares se producen de forma rutinaria mediante cocultivo con *Agrobacterium tumefaciens* (Foolad, 2007).

A lo largo del tiempo, se han elegido algunos organismos de pequeño tamaño y con un tiempo de generación corto como sistemas modelo en distintas áreas de conocimiento, como *Drosophila* para animales y *Arabidopsis* para plantas. El tomate se ha tomado como especie modelo para estudios relacionados, principalmente, con el desarrollo de frutos carnosos. Desde este punto de vista, el cultivar de tomate en miniatura Micro-Tom se ha utilizado para aunar las ventajas de su pequeño tamaño y corto ciclo de vida con las características del tomate (Kobayashi et al., 2014). Por estos motivos se usa como cultivar modelo para la genómica de esta especie desde hace varios años (Campos et al., 2010). Este cultivar de tomate enano se creó con fines ornamentales y se originó mediante el cruce de dos cultivares (Florida Basket y Ohio 4013-3; Scott & Harbaugh, 1989). Tiene frutos pequeños y rojos, así como hojas de color verde oscuro y rugosas (Gerszberg et al., 2015; Martí et al., 2006). En concreto, esta variedad alberga algunas mutaciones distintivas. Los alelos mutantes más conocidos son: enano (*d*), una mutación relacionada con los brasinoesteroides (*BR*) (Bishop et al., 1999) responsable del pequeño tamaño de la planta y self-pruning (*sp*), el cual es responsable de su hábito de crecimiento determinado (Martí et al., 2006). Otros alelos presentes en Micro-Tom son la maduración uniforme (*u*), la resistencia a *Stemphylium* (*Sm*) y la inmunidad a la marchitez por *Fusarium* (*I*), que confieren la ausencia de hombros verdes en los frutos y la resistencia a los hongos patógenos *Stemphylium solani* y *Fusarium oxysporum f. lycopersici*, respectivamente. Además, se ha sugerido que el alelo miniatura (*mnt*) contribuye también al pequeño tamaño de la planta (Campos et al., 2010).

Micro-Tom puede crecer a alta densidad de forma similar a *Arabidopsis*, lo que permite la evaluación a gran escala de líneas mutagenizadas sin la necesidad de una gran superficie de cultivo. Desde que se publicaron los primeros trabajos de líneas de Micro-Tom mutagenizadas con EMS y líneas transformadas con elementos transponibles se comprobó el potencial que tenía como herramienta genómica (Matsukura et al., 2008). Por tanto, es de esperar que la generación de poblaciones de plantas regeneradas en la que se pueda explotar la variación somaclonal y de plantas transgénicas entre las que se identifiquen mutantes insercionales ayudarán a identificar los genes clave implicados en el desarrollo y la regulación del crecimiento así como otros caracteres de interés como las tolerancias a estreses abióticos (Gerszberg et al., 2015).

1.4 Mejora genética del tomate

El tomate ha sido objeto de una extensa inversión en mejora genética, logrando avances significativos en las últimas décadas. Su mejora se caracteriza principalmente en la modificación de una amplia gama de rasgos morfológicos y fisiológicos del cultivo. Históricamente, los esfuerzos en la mejora genética se han centrado en obtener rendimientos elevados y frutos de excelente calidad organoléptica y nutricional, al mismo tiempo que se busca minimizar los costes de producción. Además, los cultivares disponibles en la actualidad presentan resistencia a numerosos patógenos, muchas de las cuales se han obtenido de especies silvestres relacionadas con el tomate (Bai & Lindhout, 2007).

La mejora también se centra en rasgos como el hábito de crecimiento de la planta o el aumento de la precocidad del cultivo, la reducción/pérdida de la dispersión y latencia de las semillas, el gigantismo y el aumento de la diversidad morfológica en la parte consumida del cultivo (Bergounoux, 2014). Por otro lado, es prioritario desarrollar variedades de tomate tolerantes a estreses abióticos. En nuestro país y en otras regiones productoras, una gran parte del cultivo se lleva a cabo en zonas afectadas por sequía y salinidad. Por lo tanto, los programas de mejora que permitan aumentar la resistencia del tomate a la sequía y la salinidad tendrán un impacto positivo en la economía de los agricultores de estas regiones productoras (Albaladejo Carrasco, 2018).

En términos de mejora genética, existen dos enfoques distintos: la mejora clásica y la mejora biotecnológica. La mejora genética clásica se basa en el cruce selectivo entre cultivares adaptados de alta calidad o entre una variedad élite y especies silvestres estrechamente relacionadas, con el objetivo de introgresar características deseables. Es importante destacar que el proceso de obtener una nueva variedad a través de cruces puede tomar entre 5 y 7 años, mientras que la incorporación de nuevos genes de especies silvestres relacionadas puede llevar alrededor de 20 años. Por lo tanto, la complejidad del programa de mejora aumenta a medida que aumenta la diversidad genética entre los progenitores (Bergounoux, 2014; Causse et al., 2007).

El desarrollo de técnicas moleculares y genómicas ha permitido acelerar y mejorar el proceso de mejora de cultivos. Estas incluyen la creación de mapas genéticos y el uso de selección asistida por marcadores moleculares (MAS). Estas herramientas se han vuelto esenciales para los mejoradores, ya que les permiten ahorrar tiempo y recursos materiales en las etapas de cruzamiento y selección de plantas (Amoroso et al., 2022). Además, el uso de estos marcadores moleculares ha posibilitado la creación de mapas genéticos del ADN del tomate, lo cual ha simplificado el análisis de rasgos cuantitativos en regiones del genoma conocidas como QTLs. Esto, junto con la secuenciación y ensamblaje del genoma completo de esta especie, ha facilitado la localización precisa y el estudio molecular de los genes responsables de dichos rasgos (Albaladejo Carrasco, 2018; Causse et al., 2007).

Por otra parte, con relación a la mejora biotecnológica, el avance de la ingeniería genética ha permitido la introducción de genes pertenecientes a otras especies y superar así las restricciones que, en este sentido, imponen las técnicas de hibridación sexual. De esta manera, características específicas pueden ser introducidas de manera sencilla en variedades agrónomicamente deseables mediante técnicas de transformación genética y regeneración *in vitro* de plantas en condiciones controladas, en períodos de tiempo mucho más cortos en comparación con los requeridos por métodos de mejora clásicos o asistidos por marcadores (Albaladejo Carrasco, 2018; Bergounoux, 2014; Gerszberg & Hnatuszko-Konka, 2017)

El cultivo *in vitro* engloba un conjunto de técnicas con diversas aplicaciones biotecnológicas entre las que destacan la multiplicación del material vegetal, la mejora sanitaria y la mejora genética. Además ha impulsado el desarrollo de nuevas técnicas y aplicaciones, como el rescate de embriones, que posibilita la transferencia de genes relevantes de especies silvestres al tomate cultivado o la manipulación genómica con técnicas como la fusión de protoplastos, lo que ha permitido obtener híbridos somáticos (Gerszberg et al., 2015).

Por otro lado, la variación somaclonal, que se genera durante los procesos de regeneración indirecta o como resultado de la variabilidad preexistente en el material inicial, puede proporcionar una nueva fuente de variación genética para mejorar el tomate u otras especies cultivadas (Bai & Lindhout, 2007; Dagla, 2012). Además, el cultivo *in vitro* permite la obtención de plantas haploides y doble-haploides que acortan en gran medida los tiempos de generación de líneas puras en un programa de mejora (Germana, 2011).

1.4.1 Transformación genética

La transformación genética permite, gracias a que las células vegetales son totipotentes, la introducción de caracteres monogénicos u oligogénicos en especies de gran importancia como el tomate sin alterar el resto de los caracteres. Por tanto, es una técnica idónea para la mejora dirigida a cultivares élite. Las plantas transgénicas se han generado mediante transformación con *Agrobacterium tumefaciens*, biolística o introducción de ADN en protoplastos. La integración de los transgenes con estos métodos es aleatoria y puede producirse en cualquier región del genoma del material transformado. Pese a la potencia que tiene esta técnica su uso por el sector agroalimentario se ha visto limitado por cuestiones regulatorias.

Más recientemente se han desarrollado diferentes técnicas que permiten la edición de regiones concretas del genoma. Estas técnicas son conocidas como ZFNs (Zinc-Finger Nucleasas), TALENs (Transcription Activator-Like Efactor Nucleases) y CRISPR/cas9 (Chetty et al., 2013; Sanagala et al., 2017). En este caso, al no ser necesario la integración de genes foráneos para que se produzca la edición, parece que estas herramientas van a poderse aplicar de forma más generalizada en los programas de mejora.

Tanto para un abordaje de mejora mediante transformación genética como por edición génica es imprescindible conocer de manera previa los genes que controlan los diferentes caracteres que se quieren mejorar. Una de las formas de identificación de la función de un gen es mediante el estudio de mutantes. Como la probabilidad de aparición de mutaciones de forma espontánea es muy baja, habitualmente se obtienen colecciones de plantas mutagenizadas. En el caso de las plantas pueden obtenerse mediante mutágenos físicos como la radiación, mediante agentes químicos como el etilmetanosulfonato (EMS) o mediante la variación somaclonal (variación genética debida a la regeneración mediante cultivo *in vitro*). Todos estos métodos provocan cambios aleatorios en el genoma de las plantas mutagenizadas.

Las mutaciones causadas por este tipo de herramientas requieren de un gran esfuerzo e inversión de tiempo y recursos para llegar a conocer cuál es el gen causante de un fenotipo mutante determinado. Para intentar minimizar estos problemas se han puesto a punto métodos como la mutagénesis insercional en la que el gen mutado queda etiquetado por un fragmento de ADN de secuencia conocida por lo que su identificación es mucho más sencilla y menos costosa (Oladosu et al., 2016; Pérez-Martín et al., 2017; Sanagala et al., 2017).

1.4.2 Mutagénesis insercional

La mutagénesis insercional consiste en la obtención de una colección de plantas transgénicas para la identificación de individuos mutantes (Atarés et al., 2011). La mutación se puede producir por la interrupción del gen endógeno o por la alteración en sus niveles de expresión al integrarse el T-DNA en las regiones reguladoras (Chaudhary et al., 2019; Emmanuel & Levy, 2002). En cualquier caso, el gen endógeno queda etiquetado ya que el T-DNA tiene fragmentos

de secuencia conocida y su identificación es relativamente sencilla mediante técnicas derivadas de la PCR como TAIL-PCR o Anchor-PCR (Okabe & Ariizumi, 2016).

Aunque cualquier T-DNA serviría para llevar a cabo esta estrategia, es habitual que se usen construcciones que aporten un valor añadido a esta metodología. Una posibilidad consiste en usar una construcción que activa la transcripción del gen que queda bajo su influencia (*Activation Tagging*). Esta técnica puede generar, además de los indicados anteriormente, mutantes con una función adicional y de carácter dominante. Otra opción es utilizar el método de "*trapping*" o etiquetado, que implica insertar en la construcción un gen de resistencia a antibióticos para seleccionar las plantas transgénicas junto con un gen delator que solo se active si se encuentra bajo la influencia de las regiones reguladores de un gen endógeno. El gen marcador más comúnmente utilizado es el *uidA*, que codifica la proteína GUS, debido a la alta sensibilidad para su detección. Dentro de estas estrategias hay diferentes alternativas que varían en función de los elementos que se incluyen antes de la región constitutiva del gen delator (Figura 2) (He et al., 2001; Suzuki et al., 2001).

1.5 Identificación de mutantes

En nuestro grupo se ha generado una colección de unas 7.800 líneas T-DNA de *S. lycopersicum* y especies silvestres relacionadas mediante transformación con una cepa de *Agrobacterium tumefaciens* portadora de una trampa de intensificadores (Figura 2B). Esta, consta de un promotor mínimo (caja TATA y sitio inicio de transcripción) fusionado al gen delator. Además, el gen marcador *nptII* bajo control de un promotor constitutivo permite que se seleccione la planta transformada por su resistencia a la kanamicina (Springer, 2000).

Para seleccionar las líneas mutantes se llevan a cabo diferentes escrutinios en función de los caracteres que se pretenden analizar. Para caracteres del desarrollo temprano de la planta se emplea un método de selección *in vitro* que denominamos "*vitrodev*". Gracias a este abordaje se han identificado mutantes alterados en el proceso de germinación, desarrollo de la raíz, desarrollo de la parte aérea, senescencia, capacidad de regeneración, coloración de las hojas, ... También se pueden cultivar plantas en el invernadero para identificar mutaciones en caracteres como la arquitectura de la planta y el desarrollo reproductivo (arquitectura de la inflorescencia, desarrollo de la flor, cuajado, tamaño de flor y fruto, morfología de fruto, maduración, ...). Por último, en el caso de buscar mutantes alterados en la tolerancia a estreses abióticos es habitual realizar escrutinios aplicando, *in vitro* o *in vivo*, el agente estresante que se pretende estudiar (salinidad, sequía...).

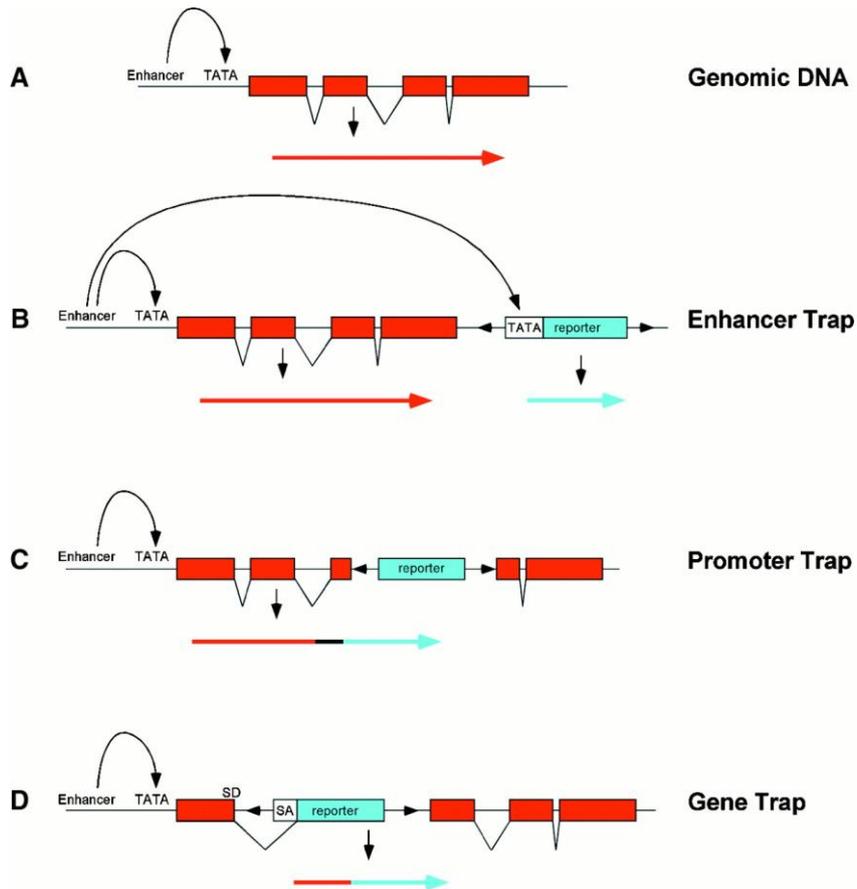


Figura 2: Estructura de los vectores trampa potenciadores, genes y promotores. (A) Gen cromosómico genérico con exones (recuadros) e intrones (líneas). (B) Construcción de trampa de potenciadora. (C) Construcción trampa del promotor. (D) Construcción trampa del gen. Las flechas de cada panel representan los transcritos que se producen como consecuencia de la inserción (Springer, 2000)

1.6 Salinidad y sequía en el cultivo del tomate

Uno de los principales problemas a los que está sometido el cultivo del tomate es la salinidad en los suelos de cultivo y el déficit hídrico provocados, entre otros factores, por el cambio climático global. Ambos son dos de los factores ambientales coexistentes más importantes en la productividad y el rendimiento que, además, limitan el uso de nuevas áreas de cultivo (Albaladejo Carrasco, 2018; Hanin et al., 2016)

Los periodos significativos de sequía y la exposición a condiciones altamente salinas pueden provocar daños permanentes en la planta, como la interrupción del desarrollo del tallo y de la raíz, así como la disminución de la cantidad total de hojas y de su tamaño (Ors et al., 2021). La sequía es responsable de aproximadamente el 45% de las pérdidas de producción agrícola a nivel mundial. El estrés por déficit hídrico se considera como el estrés abiótico más perjudicial para la productividad de los cultivos, así como el más perjudicial para algunos procesos fisiológicos como la fotosíntesis (Foolad, 2007; Nankishore & Farrell, 2016). Durante el periodo al que se somete a la planta a condiciones de sequía, la deshidratación de las células y tejidos provoca una disminución del crecimiento y de la productividad, así como daños en algunos procesos metabólicos (Figura 3). Cuando las plantas se ven sometidas a este tipo de estrés se aceleran los procesos de detoxificación y reparación, entre los que se encuentra alteraciones en

la expresión de enzimas de búsqueda de radicales libres de oxígeno (ROS), genes de embriogénesis tardía y síntesis de chaperonas, proteinasas y otras proteínas de detoxificación (Krishna et al., 2022; Ors et al., 2021; Rai et al., 2013).



Figura 3: impacto general de estrés por sequía en el crecimiento de las plantas de tomate. Imagen adaptada de Krishna et al., 2022.

El estrés por salinidad es uno de los estreses que suelen ocurrir en climas áridos y semiáridos y que reduce de manera significativa el rendimiento de las plantas. Condiciones como bajas precipitaciones, alta evaporación debido al aumento de las temperaturas, riegos con agua altamente salinizada y una mala gestión del uso de esta provocan estrés por salinidad en zonas agrícolas. Afecta principalmente a la fisiología de la planta tanto a nivel general como a nivel celular debido al estrés osmótico e iónico que sufre. Altas concentraciones salinas en el suelo pueden afectar de manera negativa a la germinación de las semillas, crecimiento de las plántulas, crecimiento vegetativo, floración y producción de frutos, lo que puede llevar a la reducción del rendimiento de la calidad y con ello, a la reducción del rendimiento económico (Ors et al., 2021).

Aunque numerosos estudios han demostrado que condiciones de sequía y salinidad afectan negativamente al cultivo del tomate, se sabe que las respuestas y los umbrales de estrés varían entre plantas. Es por ello por lo que la respuesta a ambos estreses es compleja y con niveles variables y específicos para cada planta (Ors et al., 2021; Zhou et al., 2017). Por lo tanto, un aspecto fundamental para estudiar su efecto es conocer el impacto que produce a las plantas de la especie o variedad en estudio en función de los niveles de estrés aplicado. Con todo lo expuesto anteriormente, en el presente trabajo se han planteado los siguientes objetivos.

2. OBJETIVOS

En nuestro grupo se ha generado a lo largo de los años diferentes colecciones de líneas T-DNA de *S. lycopersicum*, principalmente del cv. *Money Maker*, así como de especies relacionadas (*S. pennelli*, *S. galapaguense* y *S. pimpinellifolium*) con el objetivo de obtener una colección de mutantes afectados en diferentes caracteres. Gracias a esta metodología se han podido identificar y clonar más de 40 genes relacionados con diferentes procesos de la planta como puede ser: desarrollo vegetativo, desarrollo reproductivo o tolerancia a diferentes tipos de estrés.

El objetivo principal de este trabajo es la ampliación de la colección de mutantes mediante la obtención y escrutinio de líneas T-DNA generadas a partir de la transformación de tomate cv. Micro-Tom. Además, como se pretende identificar mutantes alterados en la tolerancia a diferentes estreses abióticos como la sequía y la salinidad, en paralelo se van a poner a punto metodologías que permitan su selección.

Para la realización del presente trabajo se han realizado las siguientes etapas:

1. Puesta a punto de métodos de identificación de mutantes de tomate cv Micro-Tom afectados en su tolerancia a estreses abióticos (sequía y salinidad)
2. Obtención de líneas mutantes de tomate cv. Micro-Tom mediante *Agrobacterium tumefaciens*.
3. Identificación de mutantes de líneas T-DNA de tomate cv. Micro-Tom.
4. Caracterización fenotípica *in vitro*.
5. Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante
6. Determinación del número de insertos de T-DNA con el gen *nptII* funcional.
7. Análisis de cosegregación entre fenotipo mutante e inserto T-DNA.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Evaluación de la producción en plantas sometidas a estrés hídrico y estrés salino

En primer lugar, se intentó establecer las condiciones idóneas para identificar mutantes de Micro-Tom alterados en su tolerancia a estos niveles de estrés. Dadas las características de esta variedad se planteó abordar esta evaluación no en etapas iniciales del desarrollo que analicen únicamente caracteres del desarrollo vegetativo sino a nivel de producción de fruto.

3.1.1 Análisis del tratamiento idóneo para identificar mutantes de Micro-Tom con alteraciones en su tolerancia a la salinidad

Se realizó un experimento *in vivo* a partir de semillas de Micro-Tom para evaluar la concentración de NaCl en la que se reducía la producción de frutos de manera significativa. Para ello las semillas se sometieron previamente a un tratamiento de termoterapia (24 horas en estufa a 80°C) para evitar el desarrollo de virus. Tras la germinación de las semillas estas se cultivaron en macetas con fibra de coco y se comenzaron a regar con la solución de fertirrigación habitual en tomate. Posteriormente se estableció el uso de 6 concentraciones diferentes de NaCl para la evaluación: 0, 25, 50, 100, 150 y 200 mM, que se añadían a la solución de fertirrigación.

El riego con sal se inició cuando las plantas presentaban dos hojas verdaderas y, a partir de ese momento, se regaron con las concentraciones correspondientes durante todo el ciclo de cultivo. Se cultivaron 10 plantas por condición. Conforme las plantas producían frutos se iban pesando de forma individual cuando alcanzaban el estado de rojo maduro.

3.1.2 Análisis del tratamiento idóneo para identificar mutantes de Micro-Tom con alteraciones en su tolerancia a la sequía

Las condiciones empleadas en este caso fueron las mismas a excepción de los tratamientos estresantes utilizados. En este caso las condiciones fueron:

- D100: condición control en la que las plantas se regaban con la dosis óptima de solución nutritiva cada 48-72 horas.
- D67: plantas regadas con el 67% la dosis óptima aplicada a D100 cada 48-72 horas.
- D33: plantas regadas con el 33% la dosis óptima aplicada a D100 cada 48-72 horas.
- D0: las plantas se regaban y no se volvían a regar hasta que se observara síntomas evidentes de decaimiento de las hojas (estos ciclos de riego se producían cada 15-20 días).

3.2 Material vegetal

La colección de mutantes de tomate *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom se generó mediante transformación con *Agrobacterium tumefaciens* utilizando el vector pD991 cedido por el Dr. Thomas Jack de la Universidad de Darmouth (Figura 4). Este contiene el gen *nptII* bajo el control de un promotor constitutivo, lo que confiere resistencia a la kanamicina a las células portadoras, y el gen delator *uidA* bajo control de un promotor mínimo. Se denomina como ET debido a sus siglas en inglés *Enhancer Trapping*, ya que el gen *uidA* solo se expresa si el T-DNA se inserta bajo la influencia de algún intensificador endógeno.

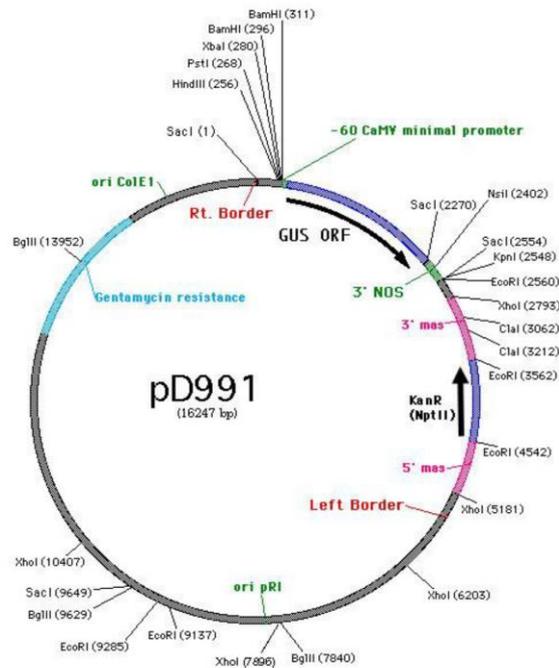


Figura 4: Mapa genético del plásmido pD991 utilizado para la transformación de tomate.

Las plantas obtenidas por transformación con este vector se denominaron con un código que incluye: números correlativos, ET por la trampa y MT por la variedad Micro-Tom. Las plantas obtenidas en primera generación, es decir, aquellas que habían sido obtenidas a partir de la transformación, se denominan TG1. A partir de las plantas TG1 se obtiene por autofecundación la descendencia TG2, en la que se pueden encontrar plantas hemicigóticas, homocigóticas o acigóticas para el inserto de T-DNA. La descendencia de una planta TG2 por autofecundación se denomina TG3 y así sucesivamente. A la numeración de la línea asignada inicialmente se le irán añadiendo números precedidos por un guion los cuales identificarán las diferentes generaciones.

3.3 Técnicas básicas de cultivo *in vitro*

3.3.1 Esterilización de las semillas

Los experimentos de cultivo *in vitro* se iniciaron mediante la esterilización superficial de las semillas para eliminar cualquier fuente de contaminación. Para ello se utilizaron series de agua, las cuales consisten en cuatro botes estériles, uno de ellos vacío y los otros tres con agua destilada estéril (Figura 5). El bote vacío se llena con una solución de hipoclorito de sodio al 2% m/v (lejía comercial al 50%) y unas gotas de Tween20. Las semillas se prepararon en una bolsa de gasa, la cual se cierra mediante una etiqueta en la que se anota la línea que se esteriliza. Las semillas se sumergieron durante 30 minutos en la disolución desinfectante para posteriormente realizar una serie de 3 lavados en el agua estéril de 5, 10 y 15 minutos respectivamente.

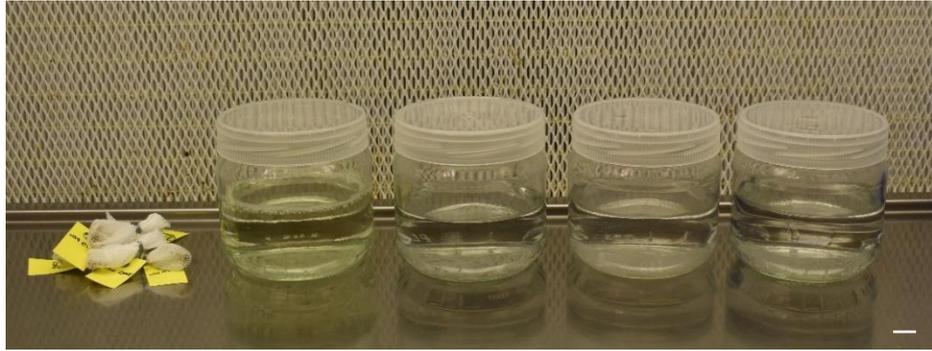


Figura 5: Esterilización de las semillas en cabina. Escala: 1cm.

3.3.2. Pre-germinación y obtención de plantas axénicas

Una vez realizada la esterilización de las semillas, se pasan a una placa Petri estéril con discos de papel de filtro y 9 mL de agua destilada estéril. Estas placas se incubaron a 28°C en oscuridad hasta que emerge la radícula, aproximadamente 2 días. Tras esto, las semillas germinadas se sembraron en botes con medio de germinación (MG) (Tabla1). Tras esto, se dejaron creciendo en la cámara de cultivo *in vitro* con intensidad lumínica de $45 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad a 25°C. Tras 7 días de cultivo en fotoperiodo se obtuvieron las plántulas con un tamaño adecuado para poder realizar el ensayo *vitrodev* (Figura 6). A partir de este momento, comienza la evaluación fenotípica mediante la observación del tamaño de la plántula, el desarrollo de los cotiledones, de las primeras hojas y de la raíz embrionaria.

Para la obtención de plantas axénicas se subcultivó el ápice meristemático en medio básico (MB3) (Tabla 1). Los explantes de cotiledón se cultivaron en medio IZ para la evaluación de la organogénesis adventicia.



Figura 6: Patrón de cortes en plántula de tomate para la obtención de diferentes explantes. Cortes de cotiledones y ápices para los experimentos. Escala: 1cm.

3.3.3 Preparación de medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados para la realización del fenotipado de mutantes son los que muestran en la Tabla 1. Para su preparación, se mezclaron los componentes correspondientes en agua destilada. Una vez obtenida esta solución homogénea, se midió el pH y se ajustó, mediante la adición de hidróxido de sodio (NaOH) o ácido clorhídrico (HCl), hasta un valor de 5,7.

Tras este ajuste, se agregó el agente gelificante. Para este trabajo se utilizó agar bacteriológico de Condalab (6,8 g/L). Para aquellos medios que no tuvieran ningún componente termolábil

(antibióticos u hormonas), se distribuyeron en botes y se autoclavaron a 115°C durante 30 minutos.

Aquellos medios que presentaban componentes termolábiles como la kanamicina (para medios como β y ϵ) o la zeatina (IZ y ϵ) (Tabla 1), se añadieron al medio autoclavado en cabina y posteriormente se distribuyó en placas o botes estériles.

Tabla 1: Nombre y composición de los medios de cultivo utilizados.

	MG	MB3	IBA02	IZ	β	ϵ
Sales minerales ^a	MS/2	MS	MS	MS	MS	MS
Azúcar [g/L]	10,0	30,0	30,0	30,0	20,0	30,0
Inositol [g/L]		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Tiamina-HCl [mg/L]		1	1		1	
Vitaminas ^b				SH		SH
Ácido Indolacético [mg/L]					0,1	4,0
Ácido Indolbutírico [mg/L]			0,2	0,75		
Zeatina [mg/L]				1,0		1,0
Kinetina [mg/L]						4,0
Kanamicina [mg/L]					100	100
Agar bacteriológico (g/L)	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8

^a(Murashige & Skoog, 1962) y ^b(Shahin, 1985).

3.3.4 Clonación

Para el mantenimiento y/o multiplicación del material vegetal del presente trabajo, se realizó la clonación de las plantas. Para esto, se subcultivaron explantes con tejido meristemático como ápices o yemas axilares en medio MB3 o IBA02.

3.4 Transformación genética

En el presente trabajo se siguió el protocolo de transformación desarrollado previamente en el grupo (Atarés et al. 2011), con algunas modificaciones específicas para la variedad Micro-Tom. A continuación, se describen los pasos más importantes de la metodología.

3.4.1 Obtención de explantes y precultivo

Se utilizaron los cotiledones de plántulas axénicas como material para la transformación de Micro-Tom. Las semillas se esterilizaron, germinaron y se cultivaron en medio de germinación. Tras una semana de crecimiento, se cortaron los cotiledones y se utilizaron como explantes para la transformación. Estos explantes se precultivaron en placas Petri de 90 mm de diámetro con medio IZ + acetosyringona (AS).

3.4.2 Preparación de *Agrobacterium tumefaciens*

Las transformaciones genéticas se realizaron con la cepa pD991 de *Agrobacterium tumefaciens* (Figura 4). Para llevar a cabo la transformación se introdujo un inóculo de esta cepa en medio LB con los antibióticos selectivos. Los matraces se colocaron en un agitador orbital para el crecimiento de la bacteria. Para la transformación se distribuyeron varias alícuotas en matraces con medio fresco para continuar el crecimiento durante 24 horas.

3.4.3 Cocultivo y eliminación de *Agrobacterium*

Los explantes de cotiledón, tras un breve precultivo en medio IZ+AS, se sumergieron durante cuatro minutos en la suspensión de *Agrobacterium tumefaciens*. Posteriormente, los explantes se extrajeron con ayuda de una malla sobre un bote (ambos previamente autoclavados) y los

explantos se volvieron a colocar en el mismo medio mencionado anteriormente con el envés en contacto con el medio. El cocultivo se mantuvo durante 48 horas en condiciones de oscuridad. Por último, se realizó el lavado de los explantes en medio líquido con 300 mg/L de cefotaxima para eliminar *Agrobacterium* (MB2 + MES).

3.4.4 Regeneración de plantas transgénicas

Tras el lavado, los explantes se subcultivaron en medio de inducción de organogénesis al que se le añadió timentina para evitar el crecimiento de *Agrobacterium* y kanamicina para impedir el crecimiento de las células no transformadas (IZ+T+Kan) (Tabla 2). Los explantes se pasaron al mismo medio hasta que se formaron las primeras yemas a partir de los explantes de cotiledón. Posteriormente, los callos que presentaban yemas y ápices se individualizaron y se pasaron a medio Z+T+Kan donde se dejaron crecer hasta desarrollar brotes. Los brotes individualizados se transfirieron a medio de enraizamiento suplementado con kanamicina y cefotaxima (β -Cf). La formación de raíces en estas condiciones selectivas sirve para confirmar que la planta generada es transgénica.

Tabla 2: Nombre y composición de los medios de cultivo utilizados en transformación.

	IZ+AS	MB2+MES	IZ+T+Kan	Z+T+Kan	β -Cf
Sales minerales ^a	MS	MS	MS	MS	MS
Azúcar [g/L]	30,0	20	30,0	30,0	20,0
Inositol [g/L]	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Tiamina-HCl [mg/L]		1			1
Vitaminas ^b	SH		SH	SH	
Ácido Indolacético [mg/L]	0,5		1,0		0,1
Zeatina [mg/L]	1,0		0,75	0,1	
Acetosiringona [mg/L]	40				
Timentina [mg/L]			300	300	
Kanamicina [mg/L]			100	100	100
Cefotaxima [mg/L]					200
Agar bacteriológico (g/L)	6,8		6,8	6,8	6,8

^a(Murashige & Skoog, 1962) y ^b(Shahin, 1985)

3.4.5 Determinación del nivel de ploidía en las plantas regeneradas mediante citometría de flujo

Se eliminaron las plantas no diploides mediante el análisis por citometría de flujo. Para ello se llevó a cabo la cuantificación del contenido de ADN nuclear de las células según el método descrito por Smulders y colaboradores (1994). Para ello se troceó una hoja joven con una cuchilla en placas Petri de 50 mm de diámetro. Se añadieron 200 μ L de tampón de extracción de núcleos y 800 μ L de DAPI para la tinción del ADN. Se resuspendió la solución y se filtró a través de una malla de nylon de 50 μ m. Las soluciones se analizaron en un citómetro de flujo para averiguar el nivel de ploidía de las plantas regeneradas.

3.5 Cultivo en invernadero

3.5.1 Aclimatación de plantas para cultivo en invernadero

Cuando las plantas crecidas en condiciones axénicas desarrollaron un sistema radicular apropiado y un ápice que permitiera su clonación, se aclimataron para su cultivo en condiciones de invernadero. Tras la extracción de la planta del bote de cultivo, se lavaron las raíces cuidadosamente para la eliminación del agar adherido a estas. Posteriormente, se plantaron en

macetas de 12 centímetros de diámetro con sustrato húmedo y se cubrieron con un vaso de plástico para conservar la humedad y evitar la deshidratación de la planta. Una vez se observó que las plantas se desarrollaban con normalidad en el invernadero, se retiró el vaso para que siguiera con su crecimiento.

3.5.2 Cultivo en invernadero

Una vez las plantas aclimatadas en el invernadero del IBMCP, se cultivaron con un sistema de refrigeración con aire acondicionado que mantenía la temperatura en 25°C e iluminación artificial de apoyo con lámparas de mercurio (400W). El invernadero de Agrónomos donde se realizaron las evaluaciones de estrés abiótico no disponía de sistema de refrigeración. Por su parte, el sustrato utilizado fue una mezcla de turba (Pekkilä Professional OPM 525W + perlita en una proporción 5:2). Los nutrientes se aportaban mediante fertirrigación con solución nutritiva cuyos componentes se encuentran en la Tabla 3, además de la aplicación de tratamientos y enemigos naturales contra las plagas y enfermedades habituales en estas especies.

Tabla 3: Composición de la solución nutritiva utilizada en el riego en los invernaderos del IBMCP.

Nutriente	Concentración	Nutriente	Concentración
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	885 mg/L	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	9,76 mg/L
KNO_3	381 mg/L	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	29,95 mg/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	367,5 mg/L	CuSO_4	2,23 mg/L
KH_2PO_4	102 mg/L	H_3BO_3	32,55 mg/L
g Fe (quelato)	34,95 mg/L 1	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{21} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,51 mg/L

3.6 Análisis de las líneas mutantes

Para el análisis de las diferentes líneas de Micro-Tom y la observación de fenotipos mutante, tras la germinación de las semillas en medio MG, se cultivaron los ápices de las plántulas en MB3 y los cotiledones se pasaron a medio IZ para la observación del posible fenotipo mutante. Se realizó un seguimiento semanal de los explantes y aproximadamente al cabo de 30 días ya se pudieron fenotipar de manera fiable si la línea en estudio presentaba o no mutación. Una vez se identificó si la línea en estudio podría presentar alguna mutación, tanto recesiva como dominante, se subcultivaron las plantas a medio IBA02 y se utilizó medio ϵ para la observación de la resistencia a kanamicina.

3.6.1 Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante

Para la evaluación del modo de herencia de la mutación, se analizó la descendencia de las plantas TG1 generadas en el laboratorio. En este contexto se pueden observar varias situaciones: si la mutación fuese dominante, las plantas TG1 presentarían fenotipo mutante y la descendencia obtenida por autofecundación (TG2) segregaría $\frac{3}{4}$ para el fenotipo mutante, en las cuales estarían aquellas que fuesen homocigotas y hemicigotas, y $\frac{1}{4}$ para el fenotipo WT, es decir aquellas que fuesen acigotas. Por el contrario, si la mutación fuese recesiva, la descendencia segregaría $\frac{1}{4}$ para el fenotipo mutantes, es decir, aquellas que fuesen homocigotas y $\frac{3}{4}$ para el fenotipo WT, aquellas hemicigotas y acigotas. En este trabajo se utilizaron principalmente semillas TG2 y, en alguna ocasión, semillas TG3. Se evaluó directamente la TG2 por lo que se pudo obtener información acerca de si existía mutación y si esta era dominante o recesiva.

3.6.2 Análisis genético del número de inserto T-DNA

La construcción utilizada para la transformación, como se ha mencionado anteriormente, está formada por el gen *nptII* que le confiere resistencia a kanamicina a aquellas plantas homocigotas y hemicigotas para el T-DNA. La evaluación de la resistencia a este antibiótico se estudió mediante el cultivo de explantes de hoja en medio ϵ o de ápices meristemáticos cultivados en β . Con esto se observó si la planta era o no resistente a kanamicina según si los explantes regeneraban o enraizaban respectivamente.

Con este análisis de resistencia a kanamicina, además de la determinación de si las plantas portan el inserto o no, sirvió también para saber el número de insertos con el gen *nptII* funcional. Esto se sabe gracias a las siguientes segregaciones:

- Si hay un inserto T-DNA, la segregación será 3 Kan^R: 1 Kan^S.
- Si hay dos insertos T-DNA, la segregación será 15 Kan^R: 1 Kan^S.
- Si hay tres insertos T-DNA, la segregación será 63 Kan^R: 1 Kan^S.

3.6.3 Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante

Este análisis se realizó para establecer si el fenotipo mutante observado estaba asociado a la presencia del inserto T-DNA. Para ello se observó la segregación del fenotipo y la resistencia a la kanamicina de las poblaciones segregantes (TG2 en este caso). Si hubiera cosegregación podría realizarse la clonación del gen mediante Anchor-PCR.

Para descartar que existe cosegregación solo se tuvo que obtener un mutante sensible al antibiótico, ya que esto indicaría la ausencia del inserto y que la mutación se pudo obtener por variación somaclonal. En el caso en el que se quisiera saber cuál es el gen causante de la mutación, debería recurrirse a técnicas como el mapeo por secuenciación (NGS).

3.6.4 Test χ^2

Se realizó una prueba χ^2 para el análisis de los datos. Se aceptó la hipótesis de que los datos seguían una segregación de tipo mendeliana con una probabilidad de error del 5%. La prueba χ^2 se aplicó para los datos de: modo de herencia del fenotipo y para el análisis del número de insertos T-DNA.

4. RESULTADOS

A continuación, se muestran los resultados obtenidos de la evaluación de la producción de las plantas sometidas a diferentes estreses. También se muestran los resultados obtenidos a partir de la transformación genética realizada, el cribado realizado y la caracterización fenotípica de los mutantes identificados.

4.1. Evaluación de la producción en plantas sometidas a estrés hídrico y estrés salino

Como se ha comentado anteriormente el experimento *in vivo* se inició cuando las plantas poseían dos hojas verdaderas ya desarrolladas. Estas plantas se regaron con las diferentes concentraciones salinas, hasta el final de su ciclo de cultivo, para la evaluación de la concentración de sal que reduce la producción de la planta de manera significativa.

En la Figura 7 se observa el desarrollo de las plantas a lo largo de los aproximadamente tres meses en las que se mantuvieron con el riego salino.



Figura 7: Desarrollo a lo largo de 73 días de plantas *in vivo* de Micro-Tom regadas con diferentes concentraciones de NaCl. En orden ascendente: 0, 25, 50, 100, 150, 200 mM.

Todas las plantas presentaron un desarrollo similar al principio. A las 4 semanas las diferencias en el desarrollo vegetativo eran evidentes, aunque en todas las condiciones se produjeron flores. En el día 44 se observaron los primeros frutos en las plantas sometidas a niveles de estrés moderado. A medio y largo plazo, como era de esperar, a medida que aumentaba la concentración de salinidad la planta veía más afectado su desarrollo llegando a colapsar en las concentraciones más elevadas de sal a partir de la novena semana de cultivo.

Por otra parte, se observó que las concentraciones de sal moderadas presentaron un desarrollo bastante similar al de las plantas testigo (0 mM), aunque en la planta sometida a una concentración de 50 mM ya se observó algo menos de desarrollo, sobre todo al final del tratamiento. Tras esto, se recolectaron los frutos y se contabilizaron para establecer la producción de cada uno de los tratamientos (Tabla 4).

Tabla 4: Número total de frutos por planta para cada tratamiento salino y en total para cada uno de los tratamientos.

	Número de plantas analizadas	Número de frutos	Número de frutos por planta
0 mM	7	227	32,4
25 mM	6	124	20,7
50 mM	6	90	15,0
100 mM	6	24	6,0
150 mM	6	3	2,0
200 mM	6	1	0,2

De las plantas cultivadas se descartaron aquellas que en el momento inicial del tratamiento no presentaron un fenotipo homogéneo. La disminución en el número de frutos cuajados por planta sufrió un descenso conforme el tratamiento estresante aumentaba. La condición que reducía a la mitad esta variable era la de 50 mM de NaCl.

Además, se realizó el pesaje de cada uno de los frutos de las diferentes plantas por cada tratamiento (Tabla 5).

Tabla 5: Peso promedio de los frutos de cada planta y peso promedio de frutos por tratamiento.

[NaCl]	0 mM	25 mM	50 mM	100 mM	150 mM	200 mM
Peso promedio de frutos (g)	2,82	1,68	1,77	0,66	0,26	0,35

De nuevo, con el incremento de la concentración salina se redujo el peso promedio de los frutos. En la concentración de 50 mM de NaCl, es donde se produjo una disminución cercana a la mitad del peso promedio de los frutos obtenidos sin estrés salino.

Como medida complementaria a las anteriores se analizó el número de semillas obtenidas de los frutos contabilizados y pesados previamente (Tabla 6).

Tabla 6: Número de semillas obtenidas en total por cada tratamiento de riego con diferentes concentraciones de salinidad.

[NaCl]	0 mM	25 mM	50 mM	100 mM	150 mM	200 mM
Nº de semillas	850	200	150	20	0	0

Existe una reducción en el número de semillas considerable entre los tratamientos de 50 mM y el de 100 mM de NaCl (Tabla 6). En nuestras condiciones, con concentraciones superiores a 100 mM las plantas eran incapaces de producir semillas (Figura 8).



Figura 8: corte longitudinal de los frutos obtenidos de los diferentes tratamientos de riego con diferentes concentraciones de NaCl. Escala: 1cm.

Por lo tanto, con todos estos resultados podemos establecer que la concentración idónea de sal para realizar experimentos en condiciones de estrés salino con Micro-Tom y reducir la producción de forma significativa sin que se vea muy afectado el desarrollo vegetativo es de 50 mM de NaCl.

Por otra parte, no se ha podido alcanzar ningún resultado destacable respecto a la producción de frutos en condiciones de estrés hídrico ya que las plantas cultivadas en el invernadero no produjeron una cantidad de frutos normal, ni siquiera, en condiciones de ausencia de sequía. Aunque inicialmente el experimento parecía ir bien y las plantas vegetaban perfectamente, las condiciones extremas de temperatura que se dieron al principio de este verano y la imposibilidad de contrarrestarlas hicieron que las plantas se marchitaran antes de producir frutos. Aun así, inicialmente se observó un mejor comportamiento de las plantas en condiciones de reducción de dosis de riego (D33 y D67) en lugar del establecimiento de ciclo de ausencia de riego prolongado (D0). El problema con este segundo tipo de tratamiento es la variabilidad de respuesta que muestran las plantas tratadas (algunas están prácticamente marchitas mientras que otras apenas tienen síntomas de pérdida de turgencia) lo que dificulta el momento de aplicación del riego. Se va a preparar un nuevo experimento para llegar a alcanzar un resultado similar al obtenido con salinidad y que nos permita conocer las condiciones idóneas para detectar líneas alteradas en la tolerancia al estrés hídrico a nivel de producción de frutos de Micro-Tom.

4.2 Transformación genética

A lo largo de la estancia en el laboratorio se realizaron cuatro transformaciones diferentes. A continuación, se muestran los resultados de la eficiencia de las transformaciones por separado (Tabla 7) donde se especifica el número de explantes a los que se les realizó la transformación, así como el número de brotes que presentaron resistencia a la kanamicina y fueron diploides.

Tabla 7: Eficiencia de las diferentes transformaciones de los explantes de Micro-Tom.

	Número explantes	Explantos organogénicos	Brotos Kan R	Brotos Kan S	Brotos Kan R y 2n	Eficiencia de transformación
Transformación 1	205	48	21	25	14	6,83%
Transformación 2	100	33	7	25	4	4%
Transformación 3	166	83	17	50	11	6,63%
Transformación 4	60	43	6	37	3	5%
TOTAL	546	207	51	137	32	6,03%

Como se observa en la tabla anterior, se muestra la eficiencia de las diferentes transformaciones realizadas, las cuales oscilan entre el 6,83% y el 4%. También se muestra el número de explantes organogénicos en medio con kanamicina. De la mayoría de estos explantes se obtuvieron brotes, pero muchos de ellos fueron sensibles a la kanamicina, es decir, escapes. Posteriormente se analizó el nivel de ploidía de los brotes Kan R para quedarnos únicamente con los diploides. Por lo tanto, la eficiencia de la transformación en tomate, en este caso con *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom en el presente estudio, fue del 6,03%.

4.3 Análisis de líneas mutantes

Tras la aclimatación de estas plantas TG1 y la obtención de las descendencias por autofecundación TG2, en el presente trabajo se ha hecho el cribado de 31 líneas transgénicas de la variedad Micro-Tom, las cuales no se habían evaluado previamente. Para ello se germinaban cerca de treinta semillas de cada genotipo tras su esterilización. Una vez se obtenían las plántulas se llevaba a cabo el cultivo de los explantes de cotiledón por una parte y los de ápice meristemático por otra. Por todo ello en esta parte del trabajo se han manejado cerca de 900 semillas y 2.700 explantes. De las líneas probadas se obtuvieron un total de 3 mutantes, por lo que la probabilidad de encontrar mutaciones en Micro-Tom con este abordaje está alrededor del 10,3%.

A continuación, se detalla la caracterización inicial de estos mutantes.

4.3.1 Mutante 91 ETMT

La mutación en esta línea se detectó *in vitro* en plantas axénicas a los 30 días de cultivo. El carácter principal fue la ausencia de desarrollo de raíces adventicias y un menor crecimiento de

la parte aérea. En algunas ocasiones las plantas etiquetadas como mutantes desarrollaron raíces, pero presentaban ausencia de raíces secundarias (Figura 9).

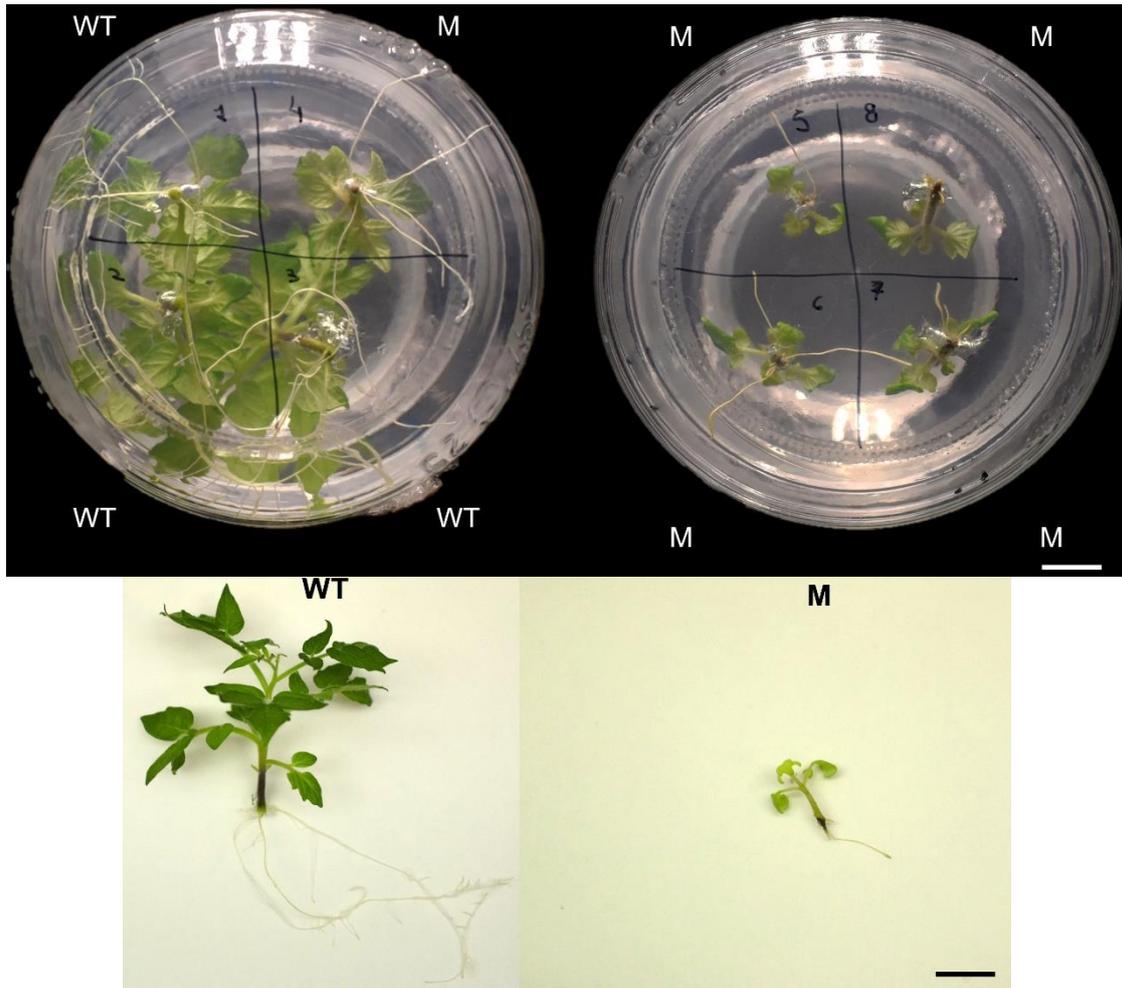


Figura 9: Fenotipo de planta axénica WT y M de la línea 91 ETMT en medio MB3 a los 30 días. Escalas: 1 cm

Tras la observación del fenotipo descrito anteriormente, se subcultivaron las plantas a medio IBA02 para observar su crecimiento con una aportación exógena de auxinas que suele favorecer el enraizamiento. En este paso, se realizaron mediciones del número, longitud y peso de las raíces que producían tanto el WT como el mutante para poder cuantificar las diferencias entre ambas (Figura 10).

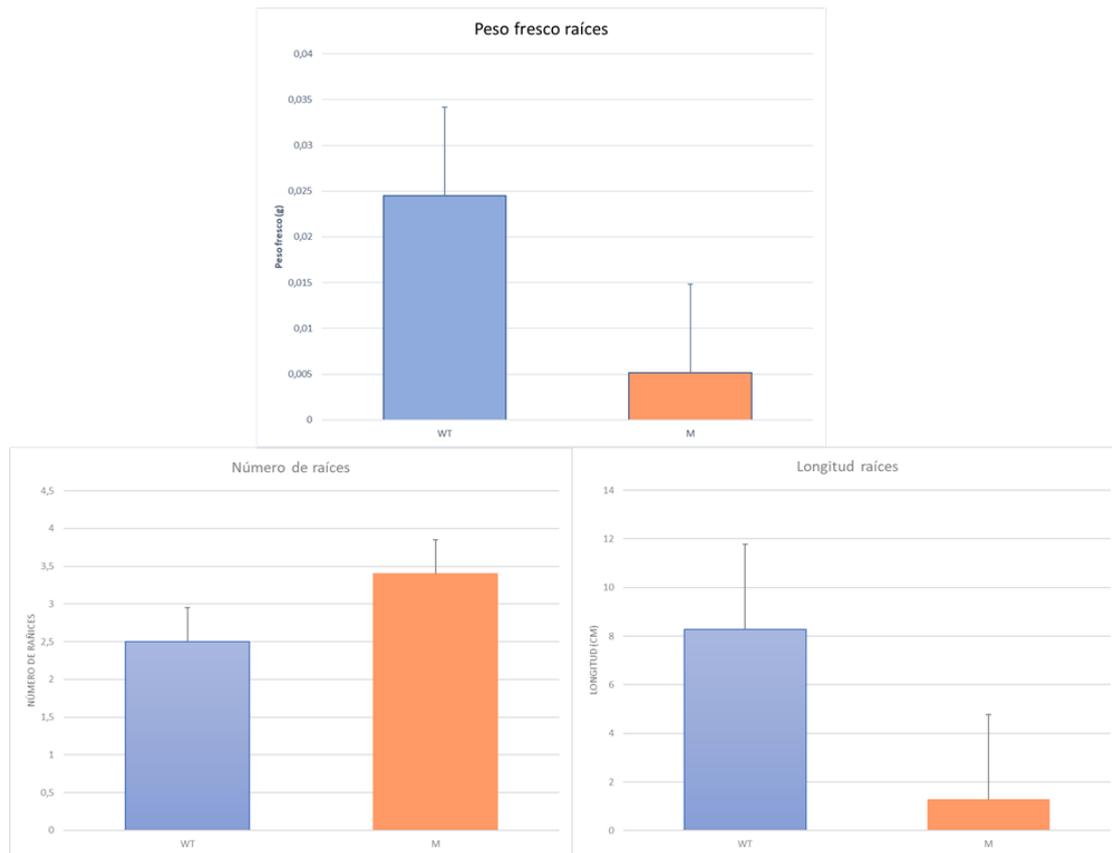


Figura 10: Media de peso fresco de las raíces adventicias, longitud y número de raíces de WT y M de la línea 91 ETMT con su error típico.

Las raíces de las plantas mutantes presentaron un peso medio y una longitud cinco veces inferior al de las plantas WT. En cuanto al número de raíces las plantas WT produjeron un número de raíces algo inferior al que presentaron las plantas mutantes

Se realizó una prueba t-Student para observar si los resultados, tanto de peso fresco ($p=0,016$), longitud de las raíces ($p=0,04$) y número total de estas ($p=0,256$) presentaban diferencias significativas. En este caso, las dos primeras variables eran claramente significativas mientras que en el número de raíces formadas los dos genotipos se comportaron de forma similar (Tabla 8).

Tabla 8: valor de t y p-valor obtenidos para cada una de las condiciones

	Peso fresco raíces	Longitud raíces	Número de raíces
Valor T	2,419	1,94	-0,703
p-valor	0,016	0,04	0,256

Cabe destacar, por otro lado, que no se observó desarrollo de raíces secundarias en las plantas mutantes mientras que en los testigos estaban presentes a lo largo de todas las raíces primarias (Figura 11).

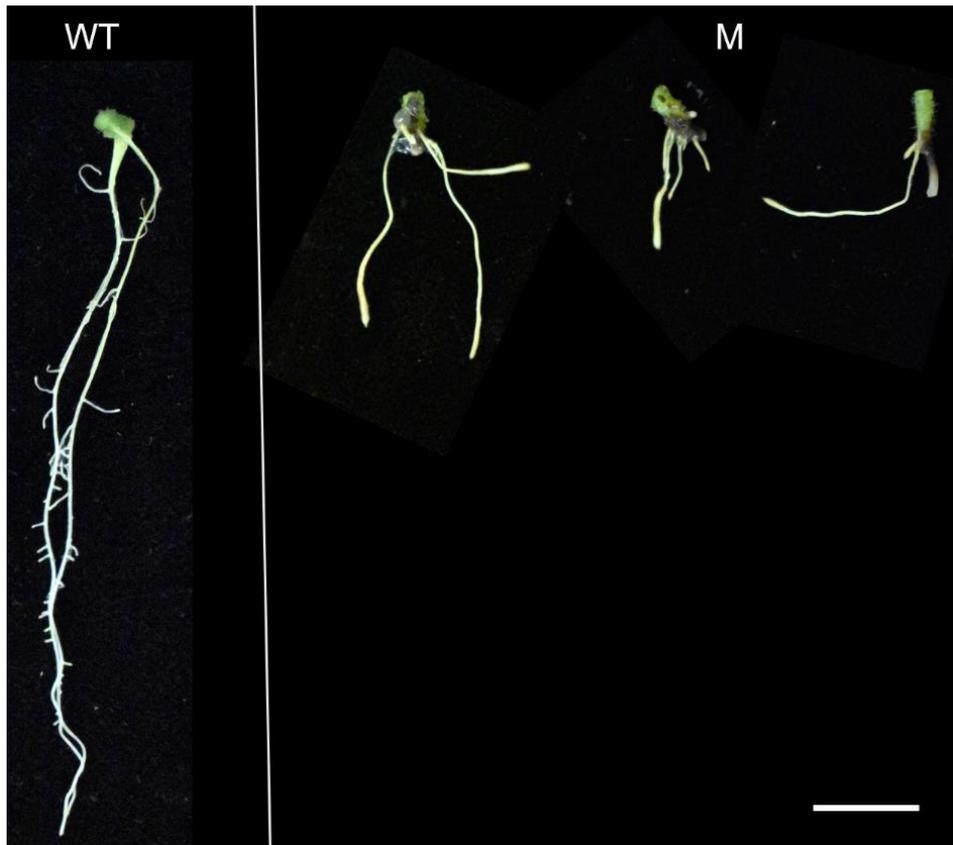


Figura 11: Detalle de raíces adventicias WT y M de la línea 91 ETMT. Escala: 1cm.

Se realizó el seguimiento del fenotipo *in vitro* a lo largo de los días y se observó la falta de crecimiento, tanto de la parte aérea como de las raíces de las plantas mutantes, así como la posterior necrosis y muerte pasados aproximadamente 42 días (Figura 12).

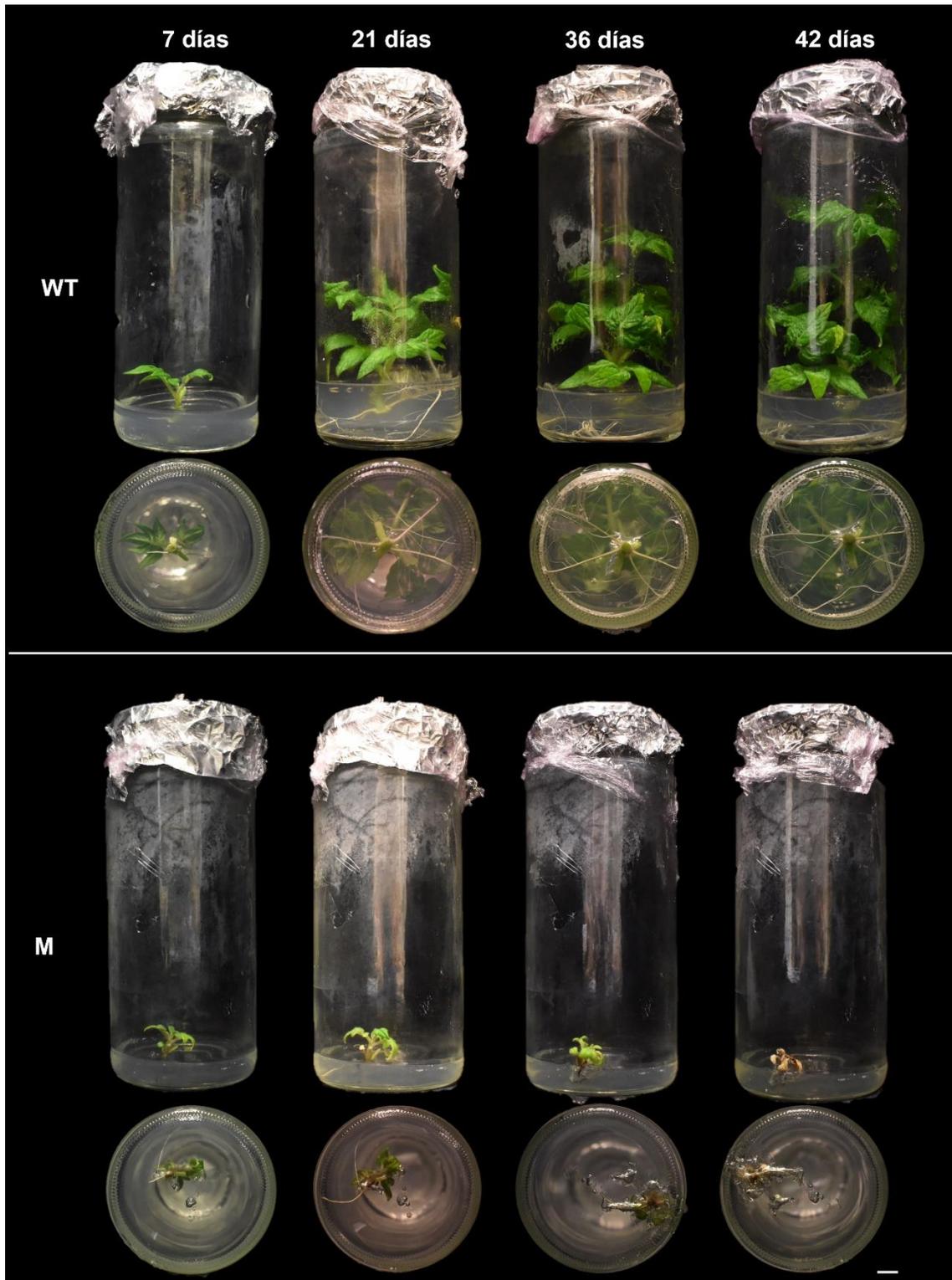


Figura 12: Fenotipo de planta axénica WT y M a diferentes tiempos de la línea 91 ETMT en medio IBA02. Escala: 1cm

Para el estudio de la formación de callo desorganizado, así como de la formación de brotes adventicios, se pusieron explantes de cotiledón de todas las plántulas TG2 en medio IZ para comprobar la regeneración. A los 7 días de estar en este medio, se observó cómo los explantes de las plántulas mutantes comenzaban a necrosarse hasta finalmente morir (Figura 13).

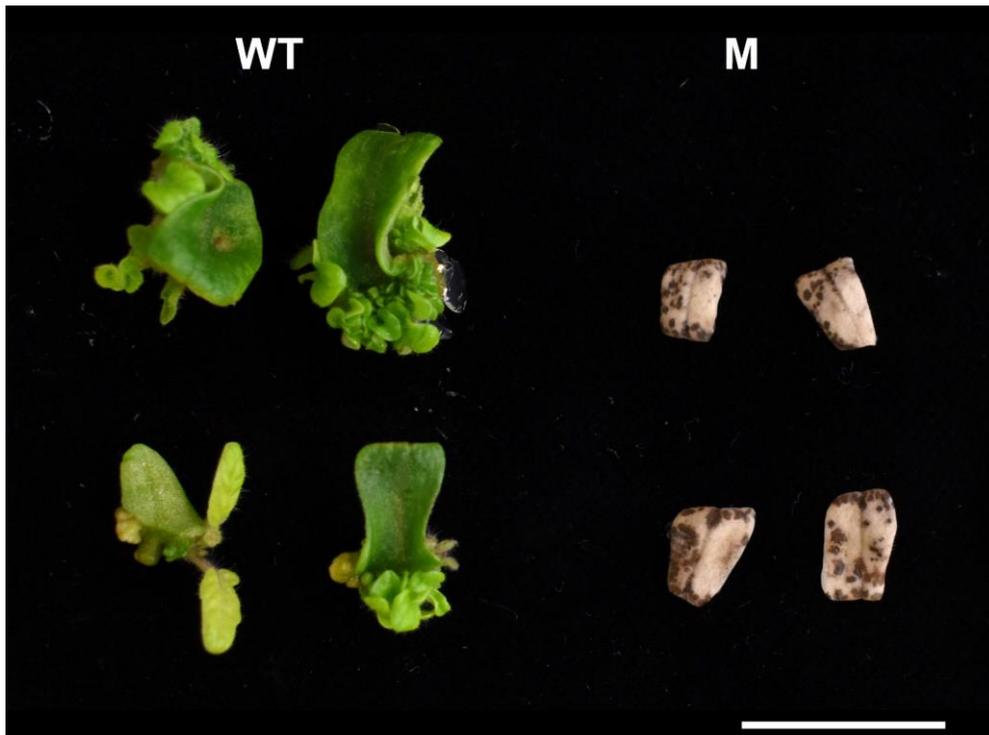


Figura 13: Proceso de regeneración adventicia en explantes de cotiledones WT y M a los 30 días en medio IZ de la línea 91 ETMT. Escala: 1 cm.

Cuando las plantas en medio IBA02 tuvieron un crecimiento suficiente, se cultivaron explantes de hoja en medio IZ para ver si se reiteraba el fenotipo observado en cotiledón (Figura 14). Se observó el mismo fenotipo que con los cotiledones.

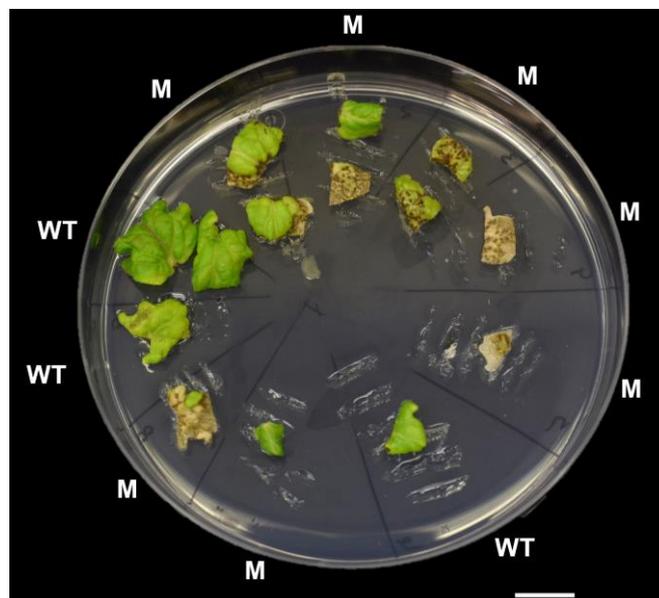


Figura 14: Proceso de regeneración adventicia en explantes de hoja WT y M de la línea 91 ETMT en medio IZ a los 7 días. Escala: 1 cm

Además, se aclimataron plantas TG2 WT para la obtención de descendencia TG3 que será útil para poder estudiar mejor la segregación de la mutación. El desarrollo de la planta fue normal, con la aparición de flores y frutos y con un buen desarrollo foliar (Figura 15).



Figura 15: Desarrollo in vivo de planta TG2 WT aclimatada de la línea 91 ETMT. Escala: 1 cm.

Modo de herencia de la mutación

Se han analizado un total de 16 plantas TG2. En la Tabla 9 se puede observar que la segregación se ajusta a una mutación monogénica recesiva (herencia 3 WT: 1M).

Tabla 9: Análisis del modo de herencia de la mutación de la línea 91 ETMT.

91 ETMT	Segregación	WT	M	Total	χ^2
Experimento 1	Observados	11	5	16	0,33
	Esperados (3:1)	12	4		

Análisis genético del número de insertos T-DNA

Para el análisis del número de insertos se evaluó la resistencia a kanamicina de los diferentes explantes de hoja en medio ϵ . Los datos se ajustan para un inserto *nptII* funcional (3 Kan^R: 1 Kan^S) con χ^2 de 0,33 (Tabla 10).

Tabla 10: Análisis genético del número de insertos T-DNA con el gen *nptII* en la línea 91 ETMT.

91 ETMT	Segregación	KanR	KanS	Total	χ^2
Experimento 1	Observados	13	3	16	0,33
	Esperados (3:1)	12	4		

Análisis de la cosegregación del inserto T-DNA con el fenotipo mutante.

Para el análisis de la cosegregación se evaluó si había plantas mutantes sensibles a kanamicina. Se observó un único mutante sensible a la kanamicina, por lo que nos indica que no había cosegregación entre el fenotipo mutante y el inserto de T-DNA. (Tabla 11).

Tabla 11: Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 91 ETMT.

91 ETMT	WT		M		Total
	Kan ^R	Kan ^S	Kan ^R	Kan ^S	
TG2	9	2	4	1	16

Sin embargo, debido a la naturaleza del fenotipo, se debe aumentar la población estudiada y corroborar la ausencia de cosegregación analizando la descendencia de plantas WT sensibles a kanamicina. Estas tareas están previstas que se realicen en breve para confirmar la ausencia de cosegregación entre un inserto de T-DNA y el fenotipo mutante.

En los casos en los que no existe cosegregación, se pueden realizar una serie de PCR's para analizar si existen insertos parciales de T-DNA o insertos del cuerpo del vector que estén causando la mutación observada. En el caso de que no sea así, deberían realizarse cruces con *S. pimpinellifolium* para, tras obtener plantas F2 e identificar plantas WT y M en esa población, poder identificar el gen afectado responsable de la mutación mediante mapeo por secuenciación.

4.3.2 Mutante 115 ETMT

Se observó un fenotipo alterado ya en plántulas cultivadas en medio MG a los 7 días de la germinación ya que presentaba poco desarrollo en raíz y cotiledones (Figura 16).

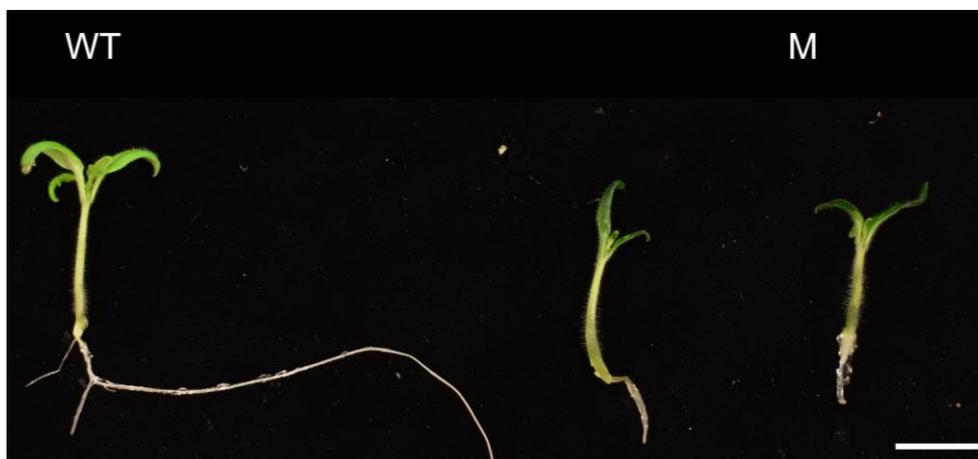


Figura 16: Fenotipo de plántulas a los 7 días en MG de la línea 115 ETMT. Escala 1cm.

Tras la detección, los ápices meristemáticos de las plántulas se pasaron a medio MB3 y los cotiledones a medio de regeneración IZ. En estas condiciones se observó que algunas plantas tardaban más en desarrollar las raíces adventicias (Figura 17).

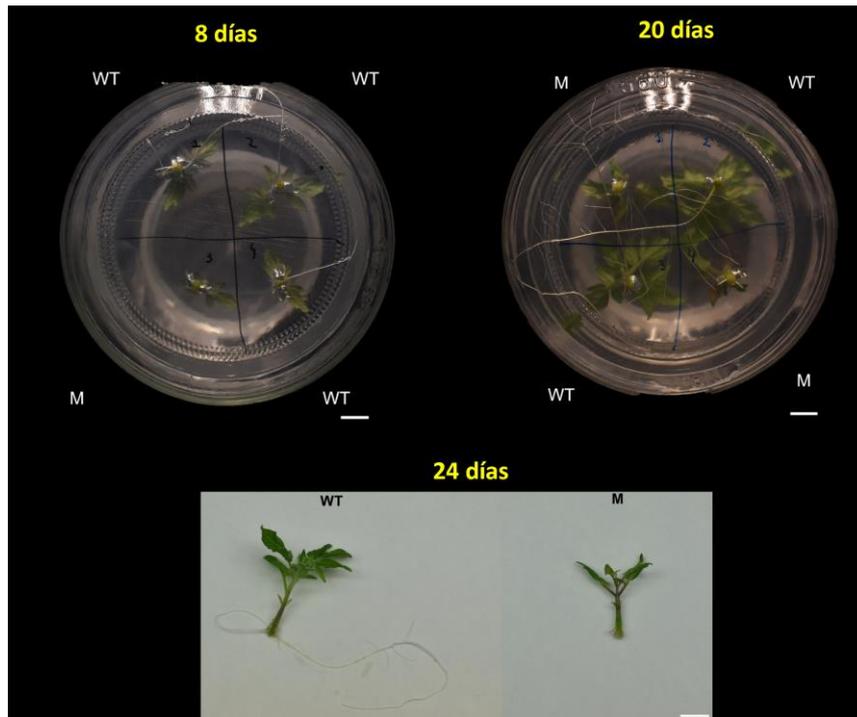


Figura 17: Fenotipo de planta axénica a diferentes tiempos de crecimiento de la línea 115 ETMT en MB3. Escala: 1cm

Tras el paso a medio IBA02, se observó que todas las plantas normalizaban su desarrollo (Figura 18).

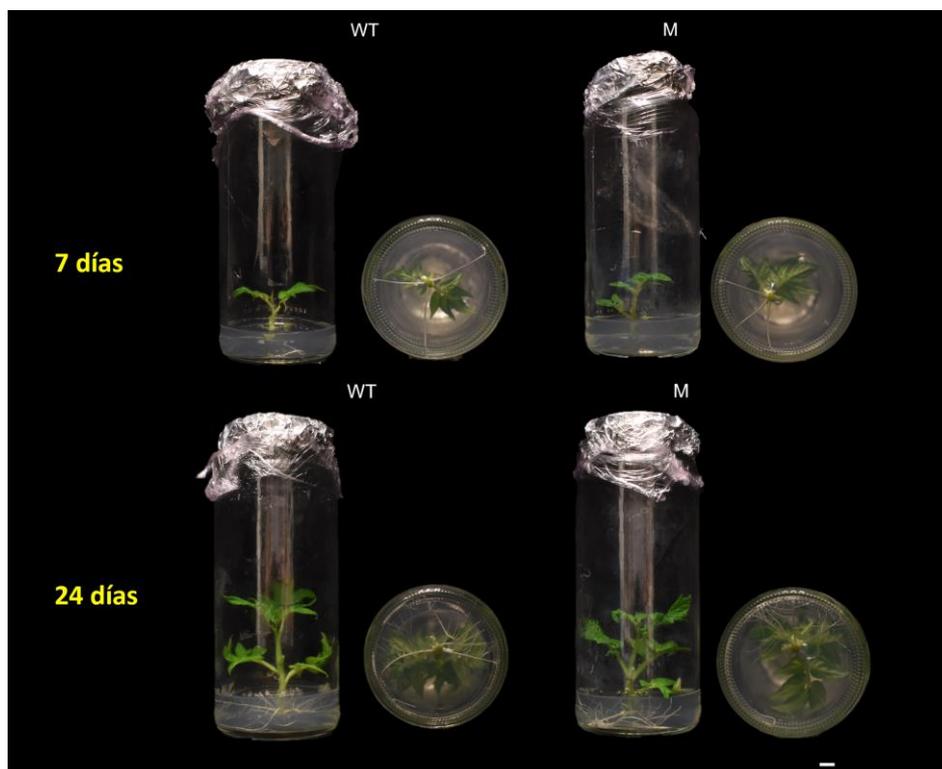


Figura 18: Fenotipo de planta axénica a diferentes tiempos de crecimiento de la línea 115 ETMT en medio IBA02. Escala: 1cm.

Al repetir el experimento con nuevas plantas TG2 y cultivar los ápices en medio MB3 no se detectaron plantas con el enraizamiento diferente al de un WT. Por tanto, se descartó el enraizamiento como carácter alterado en esta línea T-DNA.

Por otro lado, como se ha comentado anteriormente, se comprobó la capacidad organogénica de los cotiledones en medio IZ. Se observó formación de callo desorganizado y brotes adventicios en casi todos los explantes excepto en algunos que fueron marcados como mutantes. Estos explantes presentaban cierta decoloración, así como falta de regeneración (Figura 19).

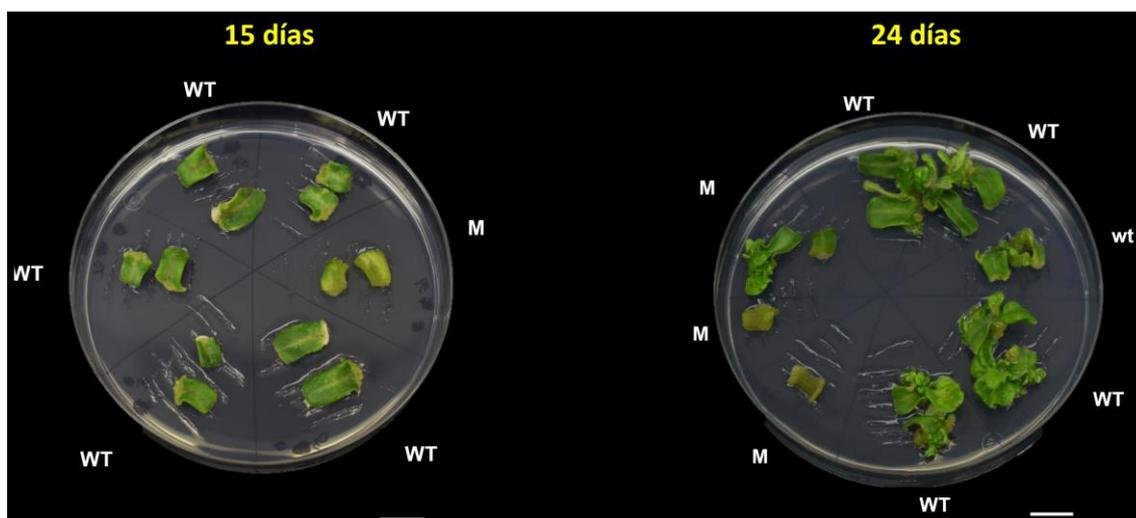


Figura 19: Cotiledones del mutante 115 ETMT en medio IZ. Escala: 1cm.

La caracterización *in vivo* del mutante 115 ETMT no se ha podido realizar de momento ya que las plantas aclimatadas no se adaptaron bien a las condiciones del invernadero y no pudieron desarrollarse normalmente.

Modo de herencia de la mutación.

Con ambos experimentos del análisis de la TG2 del mutante 115 ETMT se pudo determinar el modo de herencia de la misma (Tabla 12).

Tabla 12: Análisis del modo de herencia de la mutación de la línea 115 ETMT.

115 ETMT	Segregación	WT	M	Total	χ^2
Experimento 1	Observados	19	5	24	0,22
	Esperados (3:1)	18	6		
Experimento 2	Observados	17	1	18	3,63
	Esperados (3:1)	13,5	4,5		
Datos Acumulados*	Observados	36	6	42	2,57
	Esperados (3:1)	31,5	10,5		

* Análisis χ^2 de homogeneidad ($\chi^2 H = 1,28$) indica que las muestras son homogéneas.

En el primer experimento de fenotipado realizado, germinaron un total de 24 plantas, entre las cuales se encontraron 5 con fenotipo mutante, es decir, que los cotiledones no mostraban regeneración en medio IZ. Con estos datos, podemos observar que se ajusta a la χ^2 y que, por lo tanto, nos encontramos ante una mutación de tipo monogénico recesiva (con herencia 3 WT: 1M).

Para el segundo experimento se obtuvieron un total de 18 plantas en las que solamente 1 mostró fenotipo mutante. En este caso, como en el anterior, la χ^2 también se ajustó a una segregación monogénica recesiva.

Con todo esto, los resultados de la χ^2 de los datos acumulados, también se ajustan a una segregación del tipo 3 WT: 1M, por lo que nos encontramos ante una mutación monogénica recesiva.

Análisis genético del número de insertos T-DNA

Para el análisis del número de insertos se evaluó la resistencia a kanamicina de los diferentes explantes de hoja en medio ϵ . Los resultados muestran que el primer experimento no se ajusta a un inserto de T-DNA, mientras que el segundo sí (Tabla 13). Aunque los datos no son homogéneos, la χ^2 de los datos acumulados sí que se ajusta a que solo exista un inserto en este mutante.

Tabla 13: Análisis genético del número de insertos T-DNA con el gen *nptII* en la línea 115 ETMT.

115 ETMT	Segregación	KanR	KanS	Total	χ^2
Experimento 1	Observados	23	1	24	5,56
	Esperados (3:1)	18	6		
Experimento 2	Observados	12	6	18	0,67
	Esperados (3:1)	13,5	4,5		
Datos Acumulados*	Observados	35	7	42	1,56
	Esperados (3:1)	31,5	10,5		

* Análisis χ^2 de homogeneidad ($\chi^2H = 4,67$) indica que las muestras no son homogéneas.

Por lo tanto, con los datos obtenidos se piensa que la línea 115 ETMT era portadora de un inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional.

Análisis de la cosegregación del inserto T-DNA con el fenotipo mutante.

Para el análisis de la cosegregación se evaluó si había plantas mutantes sensibles. Se observó un único mutante sensible a la kanamicina, por lo que nos indica que no había cosegregación entre el fenotipo mutante y el inserto de T-DNA (Tabla 14).

Tabla 14: Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 115-ETMT.

115 ETMT	WT		M		Total
	Kan ^R	Kan ^S	Kan ^R	Kan ^S	
TG2	31	5	5	1	42

Tal y como se ha mencionado anteriormente, se pueden realizar una serie de PCR's para analizar si existen insertos parciales de T-DNA o insertos del cuerpo del vector que estén causando la mutación observada. En el caso de que no sea así, deberían realizarse cruces con S.

pimpinellifolium para, tras obtener plantas F2 e identificar plantas WT y M en esa población, poder identificar el gen afectado responsable de la mutación mediante mapeo por secuenciación.

4.3.3 Mutante 76 ETMT

La mutación se detectó en planta axénica cultivada en medio MB3 al desarrollar estas una raíz gruesa y, en muchos casos, con ausencia de raíces secundarias a los 30 días (Figura 20).

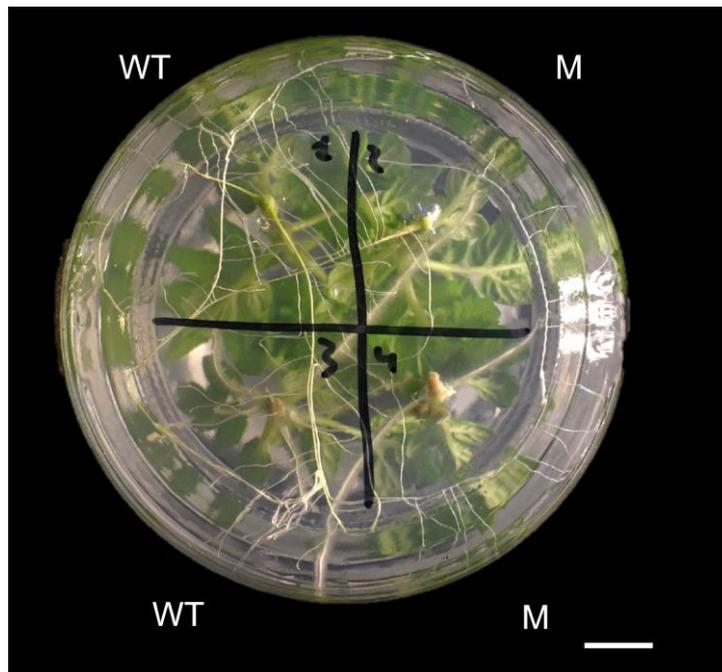


Figura 20: Planta axénica WT y mutante de la línea 76 ETMT en medio MB3. Escala: 1cm.

Pese a esta diferencia en la raíz, no se detectó ninguna diferencia en el fenotipo en cuanto a la parte aérea de la planta. Las plantas que presentaban este fenotipo se etiquetaron como mutantes y se pasaron a medio IBA02, en el que se vio una repetición del fenotipo tras 20 días de cultivo en este medio (Figura 21).

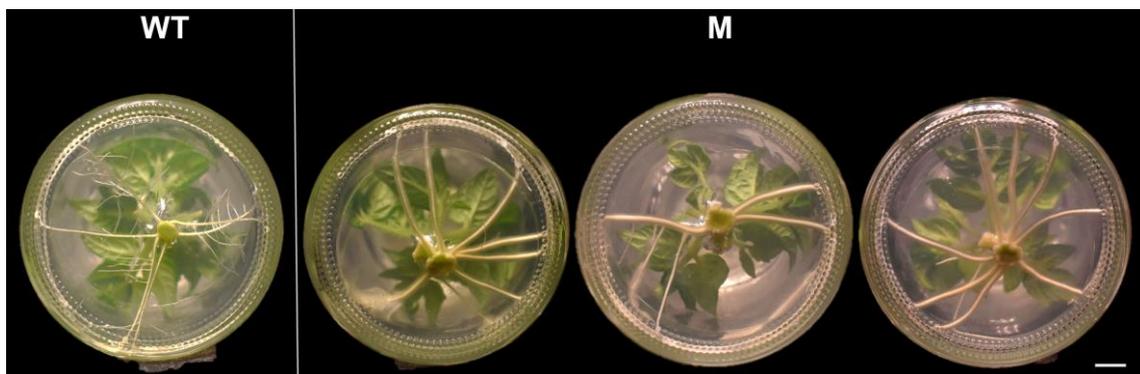


Figura 21: Fenotipo de la raíz adventicia de la línea 76 ETMT cultivado en IBA02 durante 20 días. Escala: 1cm

Tras esto, se clonaron todas las plantas de manera reiterada en el mismo medio para corroborar el fenotipo de estas. Excepto en dos plantas cuyo fenotipo no estuvo claro en uno de los subcultivos, el fenotipo mutante se mantuvo a lo largo del tiempo y de los subcultivos.

En cuanto a la capacidad organogénica de esta línea mutante, no se detectó ninguna diferencia entre las plantas etiquetadas como WT y como M. Ambas llevaron un desarrollo similar del callo desorganizado, así como del desarrollo de brotes adventicios de explantes de cotiledón en medio IZ.

Por último, se aclimataron plantas mutantes para obtener descendencia y poder realizar el estudio de la TG3 de la presente línea mutante. Se observó un buen desarrollo de la parte aérea, así como el crecimiento de flores y frutos similares a las del WT (Figura 22).



Figura 22: Desarrollo in vivo de la línea 76 ETMT de una planta Mutante. Escala: 1cm.

Modo de herencia de la mutación.

Con ambos experimentos del análisis de la TG2 del mutante 76 ETMT se pudo determinar el modo de herencia de la mutación en estudio (Tabla 15).

Tabla 15: Análisis del modo de herencia de la mutación de la línea 76 ETMT.

76 ETMT	Segregación	WT	M	Total	χ^2
Experimento 1	Observados	6	6	12	4,00
	Esperados (3:1)	9	3		
Experimento 2	Observados	9	4	13	0,23
	Esperados (3:1)	9,75	3,25		
Datos Acumulados*	Observados	15	10	25	3,00
	Esperados (3:1)	18,75	6,25		

* Análisis X^2 de homogeneidad ($X^2H = 1,23$) indica que las muestras son homogéneas.

Tal y como observamos con los resultados obtenidos de ambos experimentos, podemos decir que nos encontramos ante una mutación de naturaleza monogénica recesiva. Podemos observar en el primer experimento que la χ^2 no se ajusta a este tipo de segregación. Esto pudo deberse al número reducido de plantas en el experimento (un total de 12). Es por ello por lo que se repitió el experimento, además de para aumentar el número de plantas en el mismo, para poder obtener resultados con consistencia. Como se observa en los resultados de la χ^2 tanto del experimento 2 como de los datos acumulados, ambos presentan valores menores a 3,84. Además, los datos de ambas muestras son homogéneos, por lo que podemos decir que nos encontramos ante una mutación monogénica recesiva.

Análisis genético del número de insertos T-DNA.

Para el análisis del número de insertos se evaluó la resistencia a la kanamicina de explantes de hoja en medio ϵ (Tabla 16).

Tabla 16: Análisis genético del número de insertos T-DNA con el gen *nptII* en la línea 76 ETMT.

76 ETMT	Segregación	KanR	KanS	Total	χ^2
Experimento 1	Observados	7	5	12	1,78
	Esperados (3:1)	9	1		
Experimento 2	Observados	9	4	13	0,23
	Esperados (3:1)	9,75	3,25		
Datos Acumulados*	Observados	16	9	25	1,61
	Esperados (3:1)	18,75	6,25		

* Análisis X^2 de homogeneidad ($X^2H = 0,40$) indica que las muestras son homogéneas.

Como se observa en la tabla anterior, los datos de ambos experimentos, así como los datos acumulados se ajustan a la χ^2 , siendo estas, menores al valor 3,84. Además los datos también indican que las muestras son homogéneas. Por lo tanto, con los datos obtenidos se comprobó que la línea 76 ETMT era portadora de un inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional.

Análisis de la cosegregación del inserto T-DNA con el fenotipo mutante.

Para el análisis de la cosegregación se evaluó si había plantas mutantes sensibles, es decir, plantas que presentaban la mutación pero que eran sensibles a la kanamicina. Se observaron 5 plantas mutantes sensible a la kanamicina, por lo que no había cosegregación entre el fenotipo mutante y el inserto de T-DNA (Tabla 17).

Tabla 17: Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 76-ETMT.

76 ETMT	WT		M		Total
	Kan ^R	Kan ^S	Kan ^R	Kan ^S	
TG2	11	4	5	5	25

Como ya se ha comentado anteriormente, en los casos en los que no existe cosegregación, se pueden realizar una serie de PCR's para analizar si existen insertos parciales de T-DNA o insertos del cuerpo del vector que estén causando la mutación observada. En el caso de que no sea así, deberían realizarse cruces con *S. pimpinellifolium* para, tras obtener plantas F2 e identificar plantas WT y M en esa población, poder identificar el gen afectado responsable de la mutación mediante mapeo por secuenciación.

5. DISCUSIÓN

5.1 Evaluación de la concentración óptima de sal para estudios de la producción de plantas sometidas a estrés salino

La salinidad es uno de los estreses abióticos que afecta en gran medida al crecimiento y desarrollo de los cultivos de interés económico, siendo uno de ellos el tomate, y que por lo tanto constituye una amenaza para la agricultura. Uno de los problemas que presenta la evaluación de estos estreses es que en ocasiones se realiza en sistemas biológicos muy distantes a una planta de interés agronómico. Esto puede dificultar la aplicabilidad de los resultados. Por ejemplo, es habitual que estos caracteres se analicen en especies modelo o de forma que sea rápido y económico detectar posibles alteraciones en los niveles de tolerancia. La variedad Micro-Tom nos permite aplicar tratamientos estresantes a plantas de tomate hasta el final del ciclo productivo y poder analizar su influencia en los caracteres de relevancia agronómica: número de frutos, peso de frutos, ...

En este estudio se ha realizado la evaluación de la tolerancia a la salinidad y a la sequía de la forma más parecida a como sufre una planta estos estreses en el campo. Además, se ha buscado aquellas condiciones de cultivo en las que la planta perdiera producción y resultara dañada, pero que siguiera teniendo capacidad de crecimiento. De esta forma sería posible identificar tanto líneas con mayor como con menor tolerancia a la salinidad entre, en nuestro caso, líneas T-DNA de tomate. Tras la realización de diferentes pruebas a diferentes concentraciones de NaCl, se ha establecido que la concentración óptima de sal para someter las plantas de Micro-Tom a un estrés salino es de 50 mM de NaCl, ya que se ha visto que el número de semillas obtenido es suficiente como para tener descendencia y que el porte, el peso y el número de los frutos obtenido se reduce considerablemente con respecto al control, pero obteniendo buenos resultados.

En algunos estudios se ha observado que las plantas de Micro-Tom pueden resistir a altas concentraciones de NaCl, adaptándose la planta a este estrés reduciendo el área foliar y reduciendo la pérdida de agua por los estomas, así como la reducción del tamaño y número de frutos conforme aumenta la concentración salina (Bacha et al., 2017; Hoffmann et al., 2021; Smith et al., 1992). La mayoría de estos estudios prueban que las concentraciones entre 50 y 100 mM de NaCl son las que aportan más información acerca de los cambios morfológicos de las plantas sometidas a este estrés (Bacha et al., 2017). Esto nos aporta bastante información ya que en nuestro estudio elegimos la concentración de 50 mM en la que se observan estos cambios morfológicos, pero nos permite la obtención de suficiente descendencia y producción para estudios posteriores.

La evaluación de la concentración óptima de sal para la realización de estudios posteriores de estrés salino puede darnos numerosas respuestas acerca de los genes que pueden estar implicados en la resistencia a salinidad ya que se conocen numerosas respuestas morfológicas y celulares a este estrés, pero no se ha llegado a dilucidar genes que puedan aportar resistencia a este factor tan importante en los cultivos (Bai et al., 2018). A partir de los resultados de este trabajo, pueden realizarse experimentos de evaluación de tolerancia a estrés salino para Micro-Tom con las líneas creadas por mutagénesis insercional para poder observar si alguna de ellas presenta una mayor resistencia a este estrés que nos permita entender de una manera más profunda las respuestas de esta planta a la salinidad. Por último, vistas las ventajas de este tipo

de evaluación, esperamos en breve volver a repetir el experimento análogo para estrés hídrico para poder utilizarlo con las nuevas líneas T-DNA obtenidas.

5.2 Obtención de líneas T-DNA de Micro-Tom

El tomate es una especie con gran importancia a nivel económico, científico y nutricional. Los avances en la investigación y en la biotecnología han permitido que se pueda profundizar en mayor medida en el conocimiento de estos organismos, desarrollando así unos programas de mejora mucho más efectivos y en menor tiempo. Una de las técnicas más prometedoras dentro de este ámbito es la mutagénesis insercional, la cual ha facilitado la identificación de genes esenciales para el desarrollo de las plantas y su interacción con el entorno. Debido a estas técnicas, se dispone hoy de colecciones extensas de mutantes que son analizadas para proporcionar información valiosa dentro del ámbito de la genómica funcional.

En nuestro grupo se llevó a cabo un programa de mutagénesis insercional con T-DNA para generar una colección de mutantes de tomate (*Solanum lycopersicum* cv Micro-Tom), además, en el presente trabajo se realizaron seguidas transformaciones para poder aumentar esta colección para la posterior identificación de líneas mutantes que nos permitan la caracterización de diferentes genes. En este caso, se ha obtenido una eficiencia de transformación del 6%, lo que ha permitido aumentar la colección en un total de 32 mutantes, pasando de tener 130 líneas a tener un total de 162 líneas mutantes.

Por una parte, cabe destacar que se obtuvo una baja germinación de las semillas de Micro-Tom puestas en medio MG y que, por lo tanto, no se ha trabajado con el volumen de explantes de cotiledón que estaba establecido. Esta baja eficiencia de la germinación puede ser causada por la edad que tenían las semillas (cosechadas del 2020), y que esto haya podido también influir en la transformación de estas. Independientemente de este problema, el método de transformación que se está utilizando actualmente para Micro-Tom se está intentando mejorar para que produzca eficacias similares a las que se alcanzan con otras variedades de tomate como *Money Maker*. El cambio de medio de regeneración y el ajuste de la edad de las plántulas de las que se extraen los cotiledones son dos aspectos en los que se está trabajando para mejorar estos resultados.

Por otra parte, en estudios como el de Chetty y colaboradores (2013), vieron que diferentes cepas de *Agrobacterium tumefaciens* presentaban diferentes eficiencias en la transformación de explantes de Micro-Tom, ya que obtuvieron una eficiencia del 65% con la cepa GV3101, un 40% con la cepa EHA105 (40%), y un 15% con la cepa MP90 todas ellas con un inserto que presentaba el gen de resistencia a *nptII*. Otros estudios muestran que la utilización de la misma cepa hace variar la eficiencia, ya que en el estudio de Cruz-Mendivil y colaboradores (2011), la utilización de la cepa EHA105, dio una eficiencia de alrededor del 20%. En nuestro caso hemos utilizado la cepa LBA 4404 siendo una de las más utilizadas para la transformación en tomate. En estudios como el de Rao (2010) se muestra una eficiencia muy baja de transformación en Micro-Tom, con un porcentaje del 14% con esta cepa. Otro estudio en el que se evalúa la eficiencia de esta cepa es en el de Park y colaboradores (2003), donde obtuvieron una eficiencia similar a la del estudio previamente mencionado. Otra alternativa para mejorar estos resultados podría ser la utilización de otra cepa diferente a la que ha funcionado bien en otras variedades de tomate.

5.3 Análisis de líneas mutantes.

En un programa de mutagénesis, el primer paso es identificar las líneas que muestran cambios o alteraciones. Si el objetivo es investigar modificaciones en el desarrollo vegetativo, el cultivo *in vitro* ofrece diversas ventajas significativas. Por ejemplo, esta técnica permite estudiar un mayor número de plantas en un espacio reducido, lo que resulta en un fenotipado más eficiente. Además, el cultivo *in vitro* proporciona control total sobre las condiciones ambientales, como la iluminación, temperatura, humedad, disponibilidad de agua y nutrientes, entre otros. Al tener un control preciso, se evita la presencia de estreses bióticos, como plagas y enfermedades, que podrían alterar el aspecto y comportamiento de las plantas bajo estudio. Otra ventaja es que se pueden analizar tanto la raíz embrionaria en plántulas como el sistema radicular adventicio en plantas axénicas, lo que amplía las posibilidades de estudio. Asimismo, permite evaluar la capacidad de regeneración adventicia y de enraizamiento en diferentes tipos de explantes. Por otro lado, facilita el análisis del número de insertos, posibilita la determinación del modo de herencia y de la cosegregación del fenotipo mutante con un inserto de T-DNA.

De las 31 líneas que se estudiaron, se identificaron tres mutantes, lo que resulta en un 10,6% de eficacia. Este valor no difiere del número de mutantes que hemos identificado en *Money Maker* donde ya se han evaluado muchas más líneas T-DNA en el contexto de otros proyectos. En los tres casos se han dado mutaciones recesivas y un único inserto de T-DNA con el gen *nptII* funcional. De las tres líneas que resultaron ser mutantes, ninguna de ellas presentó cosegregación de un inserto con el gen *nptII* funcional y el fenotipo mutante, ya que en todos ellos se han observado plantas mutantes sensibles a la kanamicina. Lo que nos quiere decir esto es que el fenotipo no se debe a un inserto de T-DNA, sino que puede ser que sea debido a la variación somaclonal (Pérez-Martín et al., 2017). De nuevo, estos resultados son coherentes con lo observado en *Money Maker* donde la mayor parte de las mutaciones son monogénicas recesivas, más del 60% de las líneas transgénicas presentan un único inserto de T-DNA y menos del 15% de las líneas en las que se ha observado un fenotipo mutante presentan una naturaleza insercional.

Cabe destacar que, en los casos en los que no existe cosegregación, sería necesario realizar el análisis de la presencia de algún fragmento del inserto o del cuerpo del vector que pudiera ser el causante del fenotipo observado. Las secuencias se detectan por PCR de manera sencilla, ya que estas son conocidas. Por otro lado, si se verificara que es un mutante somaclonal, habría que realizar cruces con *S. pimpinellifolium*, para obtener una F2 en la que se identificarán las plantas WT y mutantes y con las que se realizará el mapeo por secuenciación para detectar el gen causante de la mutación.

Se han identificado mutaciones que afectan a la regeneración de brotes a partir de cotiledones u hojas y a la formación de raíces. Como ya se ha comentado estos fenotipos han sido identificadas mediante el cultivo *in vitro*, que nos ha permitido una caracterización fenotípica más exhaustiva y precisa de las plantas, que en condiciones *in vivo* no se podrían haber dado. Mediante este tipo de cultivo se han encontrado numerosos genes debido a mutaciones como los receptores de embriogénesis somática (*SERK*) en zanahoria (Schmitt et al., 1997), variación de la coloración de las flores de *Saintpaulia* por el salto del trasposón VGS1 en explantes regenerados *in vitro* (Sato et al., 2011) o acumulaciones de la proteína ACT7 en *Arabidopsis* que facilitaban la proliferación celular y la formación de callos (Kandasamy et al., 2001). Además, también se ha utilizado este tipo de estrategias para la selección de plantas tolerantes a herbicidas, a estreses abióticos y resistentes a enfermedades (Lu et al., 2007; Sotirova et al., 1999; Wrather & Freytag, 1991).

En la línea **91 ETMT** los cotiledones mostraban necrosis a los 7 días en medio de regeneración (IZ) y además la planta presentó síntomas de necrosis en las hojas que acabaron extendiéndose a lo largo de 40 días, haciendo que la planta finalmente muriera. En un trabajo de nuestro grupo se analizó otro mutante con alteraciones en la respuesta necrótica en la línea 1421 ET MM Nec (Sánchez, 2017) En este caso la línea tenía fondo *Money Maker* y los explantes que presentaban este fenotipo fueron incapaces de regenerar ya que a los cinco días presentaban esta respuesta necrótica severa. Además, en aquellos explantes en los que se observaba la necrosis, tampoco se daba un buen desarrollo ni de la parte aérea ni de la raíz, por lo que la respuesta morfogénica también se vio afectada. Este fenotipo se ha visto en otros estudios de mutantes, ya que se sabe que alteraciones en la respuesta morfogénica hace que se den mecanismos por respuesta a herida que podrían estar relacionados con la respuesta necrótica (Sanchez-Lopez et al., 2021). Estos resultados también se han visto en estudios como el de (Barker et al, (2006) donde se identificó un mutante de tomate que presentaba marchitez, necrosis progresiva y retraso en el crecimiento. Mediante PCR pudieron ver que varios genes de defensa se encontraban sobreexpresados en comparación con las plantas no mutantes y que, además, confería resistencia a algunas enfermedades comunes en este cultivo. Aunque en estos estudios mencionados la necrosis comenzó a verse en la zona foliar, no se han encontrado estudios en los que se dé necrosis específica en cotiledón, pero en algunos estudios como en el de Barghchi y Alderson (1996) o Sha y colaboradores (2019) se atribuye la muerte temprana de los hipocótilos o de la plántula a falta de minerales, destacando sobre todo el Calcio.

Por otro lado, se ha estudiado la línea **115 ETMT** en la que se observó falta de regeneración en los cotiledones de las plantas etiquetadas como mutantes. En un principio se asoció, además del fenotipo mencionado, una falta de desarrollo radicular en medio MB3, pero este revirtió al pasar los ápices de las plantas a medio IBA02, el cual indujo el desarrollo de las raíces de lo que se pensaba que era fenotipo mutante. Los mutantes afectados en el proceso de regeneración adventicia son muy importantes para intentar dilucidar los genes que regulan este proceso. En nuestro grupo se dispone de un grupo de mutantes afectados en diferentes etapas del proceso de regeneración: formación de callo desorganizado, formación de yemas adventicias y elongación de los ápices. En este caso, esperamos que el mayor entendimiento de estos mecanismos permitan mejorar procesos de obtención de plantas mediante métodos biotecnológicos que se apoyan en la regeneración adventicia (transformación y edición génica, plantas haploides, micropropagación, ...). Cabe destacar en este caso, que debería realizarse de nuevo el experimento ya que, para los resultados del número de insertos, los datos no son homogéneos, ya que no se ajustan a las χ^2 . Por lo que se debería aumentar el número de plantas a estudio y corroborar estos resultados para ver si el fenotipado se ajusta a lo observado en el presente trabajo.

El último mutante identificado en el presente trabajo ha sido la línea **76 ETMT** la cual ha presentado un mayor grosor de raíces, así como ausencia de raíces secundarias. En algunos estudios con otras especies se ha visto mutantes incapaces de desarrollar estas raíces secundarias y que, además, presentaban menor longitud y mayor grosor que las WT. En arroz (*Oryza sativa*), por ejemplo, se vio que en las plantas que presentaban este fenotipo, la mutación se daba en el gen CRL1, el cual codifica como regulador positivo para la formación de las raíces en arroz (Inukai et al., 2005). Otros artículos, en este caso en tomate, caracterizaron algunos mutantes que no presentaban raíces laterales, concluyendo finalmente y tras varios análisis que el gen DGT es el causante de esta mutación y que por lo tanto es esencial para el desarrollo de la raíz lateral (Ivanchenko et al., 2006). Otros estudios en tomate demuestran que el mutante *are*, afectado en el gen F3H, altera la ruta de los flavonoides y presenta ausencia de formación

de raíces laterales (Maloney et al., 2014). Los siguientes pasos que habría que dar para este mutante sería la evaluación del fenotipo en medios con diferentes tipos y concentraciones de hormonas. Además, se deberían llevar a cabo injertos de todas las combinaciones posibles (parte aérea y raíz vs WT y M) lo cual nos ha reportado una información muy valiosa en el estudio de otros mutantes de raíz. Por último, se harían los cortes histológicos que permitan conocer mejor cual es el proceso celular que pueda estar afectado en cada mutante. La identificación de los genes responsables del desarrollo de las raíces laterales podría aportar más información sobre el control genético implicado en el enraizamiento lateral en tomate con las implicaciones tanto básicas como aplicadas que ello conllevaría.

6. CONCLUSIONES

1. Se ha evaluado la influencia del estrés salino e hídrico en el desarrollo y producción de frutos de plantas de Micro-Tom cultivadas en el invernadero. Se ha determinado que el riego con solución fertilizante y NaCl 50 mM es la condición idónea para la detección de mutantes afectados en este carácter. No se ha podido avanzar en el mismo sentido con las condiciones de estrés hídrico por problemas técnicos.
2. Se ha ampliado la colección de líneas T-DNA de mutantes insercionales de tomate variedad Micro-Tom mediante la realización de cuatro transformaciones genéticas con una trampa de intensificadores. La eficiencia total de estas transformaciones (número de plantas transgénicas diploides / número de explantes inoculado) ha sido de un 6%. En comparación con las eficacias alcanzadas con otras variedades de tomate esta eficacia se considera baja por lo que se van a realizar cambios en este protocolo para intentar mejorarla.
3. Se ha realizado el escrutinio *in vitro* de 31 líneas T-DNA de Micro-Tom. Se han identificado tres mutantes, lo que supone una probabilidad de éxito del 10,6%, valor muy parecido a lo que ocurre con nuestra variedad de tomate más estudiada, Money Maker.
4. Se ha realizado la primera caracterización fenotípica de estos tres mutantes. La línea 91 ETMT presentó necrosis temprana en cotiledones en medio de regeneración y en planta axénica. La línea 115 ETMT se caracterizó por la ausencia de regeneración en cotiledones. La línea 76 ETMT presentó raíces adventicias con un mayor grosor, así como ausencia de raíces secundarias en planta axénica. Se va a seguir profundizando en la caracterización fenotípica de estas líneas con diferentes experimentos como el análisis hormonal endógeno, los cortes histológicos, el cultivo en presencia de auxinas o los injertos.
5. Se han caracterizado genéticamente las tres líneas mutantes identificadas. Las tres se ajustan a un modelo de mutación monogénica recesiva, presentan un inserto de T-DNA y no existe cosegregación entre el fenotipo mutante y el inserto con el gen *nptII* funcional que portan. Si se confirma este último aspecto, la forma de identificar el gen alterado es mediante un abordaje de genotipado por secuenciación a partir de poblaciones F2 segregantes procedentes de un cruce con *Solanum pimpinellifolium*. La identificación del gen responsable abrirá la posibilidad de llevar a cabo el análisis funcional del mismo y profundizar en los mecanismos moleculares implicados.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Albaladejo-Carrasco, I. (2018). Caracterización fenotípica, fisiológica y molecular de la respuesta a salinidad y sequía en tomate cultivado (*Solanum lycopersicum*) y silvestre (*S. pennellii*). *Proyecto de investigación*:
- Amoroso, C. G., Panthee, D. R., Andolfo, G., Ramírez, F. P., & Ercolano, M. R. (2022). Genomic Tools for Improving Tomato to Biotic Stress Resistance. En *Genomic Designing for Biotic Stress Resistant Vegetable Crops* (pp. 1-35). Springer.
- 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. (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*, 1865-1879.
- Bacha, H., Tekaya, M., Drine, S., Guasmi, F., Touil, L., Enneb, H., Triki, T., Cheour, F., & Ferchichi, A. (2017). Impact of salt stress on morpho-physiological and biochemical parameters of *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom leaves. *South African Journal of Botany*, *108*, 364-369. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.08.018>
- Bai, Y., Kissoudis, C., Yan, Z., Visser, R. G. F., & van der Linden, G. (2018). Plant behaviour under combined stress: tomato responses to combined salinity and pathogen stress. *The plant journal*, *93*(4), 781-793.
- Bai, Y., & Lindhout, P. (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>
- Barghchi, M., & Alderson, P. G. (1996). The control of shoot tip necrosis in *Pistacia vera* L. *in vitro*. *Plant growth regulation*, *20*, 31-35.
- Barker, C. L., Talbot, S. J., Jones, J. D. G., & Jones, D. A. (2006). A tomato mutant that shows stunting, wilting, progressive necrosis and constitutive expression of defence genes contains a recombinant Hcr9 gene encoding an autoactive protein. *The Plant Journal*, *46*(3), 369-384.
- Beraldi, D., Picarella, M. E., Soressi, G. P., & Mazzucato, A. (2004). Fine mapping of the parthenocarpic fruit (*pat*) mutation in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, *108*(2), 209-216. <https://doi.org/10.1007/s00122-003-1442-6>
- Bergougnoux, V. (2014). The history of tomato: from domestication to biopharming. *Biotechnology advances*, *32*(1), 170-189.
- Bishop, G. J., Nomura, T., Yokota, T., Harrison, K., Noguchi, T., Fujioka, S., Takatsuto, S., Jones, J. D. G., & Kamiya, Y. (1999). The tomato DWARF enzyme catalyses C-6 oxidation in brassinosteroid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *96*(4), 1761-1766.
- Blanca, J., Canizares, J., Cordero, L., Pascual, L., Diez, M. J., & Nuez, F. (2012). Variation revealed by SNP genotyping and morphology provides insight into the origin of the tomato. *PLoS one*, *7*(10), e48198.

- Blanca, J., Montero-Pau, J., Sauvage, C., Bauchet, G., Illa, E., Díez, M. J., Francis, D., Causse, M., van der Knaap, E., & Cañizares, J. (2015). Genomic variation in tomato, from wild ancestors to contemporary breeding accessions. *BMC Genomics*, *16*(1), 257. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1444-1>
- Campos, M. L., Carvalho, R. F., Benedito, V. A., & Peres, L. E. P. (2010). Small and remarkable: the Micro-Tom model system as a tool to discover novel hormonal functions and interactions. *Plant signaling & behavior*, *5*(3), 267-270.
- Castañeda, L., Giménez, E., Pineda, B., García-Sogo, B., Ortiz-Atienza, A., Micol-Ponce, R., Angosto, T., Capel, J., Moreno, V., & Yuste-Lisbona, F. J. (2022). Tomato CRABS CLAW paralogues interact with chromatin remodelling factors to mediate carpel development and floral determinacy. *New Phytologist*, *234*(3), 1059-1074.
- Causse, M., Damidaux, R., & Rousselle, P. (2007). Traditional and enhanced breeding for quality traits in tomato. *Genetic improvement of solanaceous crops: Tomato. Enfield: Science Publ*, 153-192.
- Chaudhary, J., Alisha, A., Bhatt, V., Chandanshive, S., Kumar, N., Mir, Z., Kumar, A., Yadav, S. K., Shivaraj, S. M., & Sonah, H. (2019). Mutation breeding in tomato: advances, applicability and challenges. *Plants*, *8*(5), 128.
- Chetty, V. J., Ceballos, N., Garcia, D., Narváez-Vásquez, J., Lopez, W., & Orozco-Cárdenas, M. L. (2013a). Evaluation of four *Agrobacterium tumefaciens* strains for the genetic transformation of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivar Micro-Tom. *Plant Cell Reports*, *32*(2), 239-247. <https://doi.org/10.1007/s00299-012-1358-1>
- Chetty, V. J., Ceballos, N., Garcia, D., Narváez-Vásquez, J., Lopez, W., & Orozco-Cárdenas, M. L. (2013b). Evaluation of four *Agrobacterium tumefaciens* strains for the genetic transformation of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivar Micro-Tom. *Plant Cell Reports*, *32*(2), 239-247. <https://doi.org/10.1007/s00299-012-1358-1>
- Cruz-Mendivil, A., Rivera-López, J., Germán-Báez, L. J., López-Meyer, M., Hernández-Verdugo, S., López-Valenzuela, J. A., Reyes-Moreno, C., & Valdez-Ortiz, A. (2011). A simple and efficient protocol for plant regeneration and genetic transformation of tomato cv. Micro-Tom from leaf explants. *HortScience*, *46*(12), 1655-1660.
- Dagla, H. R. (2012). Plant tissue culture: Historical developments and applied aspects. *Resonance*, *17*(8), 759-767.
- Emmanuel, E., & Levy, A. A. (2002). Tomato mutants as tools for functional genomics. *Current opinion in plant biology*, *5*(2), 112-117.
- Faostat (2023). Disponible en: <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL> (Accessed: 16 May 2023).
- Foolad, M. R. (2007). Genome mapping and molecular breeding of tomato. *International journal of plant genomics*, 2007.
- Germana, M. A. (2011). Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *104*, 283-300.

- Gerszberg, A., & Hnatuszko-Konka, K. (2017). Tomato tolerance to abiotic stress: a review of most often engineered target sequences. *Plant Growth Regulation*, 83(2), 175-198. <https://doi.org/10.1007/s10725-017-0251-x>
- 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 (PCTOC)*, 120, 881-902.
- Hanin, M., Ebel, C., Ngom, M., Laplaze, L., & Masmoudi, K. (2016). New insights on plant salt tolerance mechanisms and their potential use for breeding. *Frontiers in plant science*, 7, 1787.
- He, Y., Tang, W., Swain, J. D., Green, A. L., Jack, T. P., & Gan, S. (2001). Networking senescence-regulating pathways by using Arabidopsis enhancer trap lines. *Plant Physiology*, 126(2), 707-716.
- Hoffmann, J., Berni, R., Sutera, F. M., Gutsch, A., Hausman, J.-F., Saffie-Siebert, S., & Guerriero, G. (2021). The effects of salinity on the anatomy and gene expression patterns in leaflets of tomato cv. micro-tom. *Genes*, 12(8), 1165.
- Inukai, Y., Sakamoto, T., Ueguchi-Tanaka, M., Shibata, Y., Gomi, K., Umemura, I., Hasegawa, Y., Ashikari, M., Kitano, H., & Matsuoka, M. (2005). Crown rootless1, which is essential for crown root formation in rice, is a target of an AUXIN RESPONSE FACTOR in auxin signaling. *The Plant Cell*, 17(5), 1387-1396.
- Ivanchenko, M. G., Coffeen, W. C., Lomax, T. L., & Dubrovsky, J. G. (2006). Mutations in the Diageotropica (Dgt) gene uncouple patterned cell division during lateral root initiation from proliferative cell division in the pericycle. *The Plant Journal*, 46(3), 436-447.
- Kandasamy, M. K., Gilliland, L. U., McKinney, E. C., & Meagher, R. B. (2001). One plant actin isovariant, ACT7, is induced by auxin and required for normal callus formation. *The Plant Cell*, 13(7), 1541-1554.
- Kobayashi, M., Nagasaki, H., Garcia, V., Just, D., Bres, C., Mauxion, J.-P., Le Paslier, M.-C., Brunel, D., Suda, K., & Minakuchi, Y. (2014). Genome-wide analysis of intraspecific ADN polymorphism in 'Micro-Tom', a model cultivar of tomato (*Solanum lycopersicum*). *Plant and Cell Physiology*, 55(2), 445-454.
- Krishna, R., Ansari, W. A., Soumia, P. S., Yadav, A., Jaiswal, D. K., Kumar, S., Singh, A. K., Singh, M., & Verma, J. P. (2022). Biotechnological Interventions in Tomato (*Solanum lycopersicum*) for Drought Stress Tolerance: Achievements and Future Prospects. *BioTech*, 11(4), 48.
- Liu, W., Liu, K., Chen, D., Zhang, Z., Li, B., El-Mogy, M. M., Tian, S., & Chen, T. (2022). *Solanum lycopersicum*, a Model Plant for the Studies in Developmental Biology, Stress Biology and Food Science. *Foods*, 11(16). <https://doi.org/10.3390/foods11162402>
- Lu, S., Peng, X., Guo, Z., Zhang, G., Wang, Z., Wang, C., Pang, C., Fan, Z., & Wang, J. (2007). *In vitro* selection of salinity tolerant variants from triploid bermudagrass (*Cynodon transvaalensis* × *C. dactylon*) and their physiological responses to salt and drought stress. *Plant Cell Reports*, 26, 1413-1420.

- Maloney, G. S., DiNapoli, K. T., & Muday, G. K. (2014). The anthocyanin reduced tomato mutant demonstrates the role of flavonols in tomato lateral root and root hair development. *Plant Physiology*, *166*(2), 614-631.
- 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.
- Matsukura, C., Aoki, K., Fukuda, N., Mizoguchi, T., Asamizu, E., Saito, T., Shibata, D., & Ezura, H. (2008). Comprehensive resources for tomato functional genomics based on the miniature model tomato Micro-Tom. *Current genomics*, *9*(7), 436-443.
- Mazzucato, A., Taddei, A. R., & Soressi, G. P. (1998). The parthenocarpic fruit (pat) mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) sets seedless fruits and has aberrant anther and ovule development. *Development*, *125*(1), 107-114.
- NAMITHA, K. K. (2013). Morphogenetic potential of tomato (*Lycopersicon esculentum*) cv. 'Arka Ahuti' to plant growth regulators. *Notulae Scientia Biologicae*, *5*(2), 220-225.
- Nankishore, A., & Farrell, A. D. (2016). The response of contrasting tomato genotypes to combined heat and drought stress. *Journal of Plant Physiology*, *202*, 75-82. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.07.006>
- Okabe, Y., & Ariizumi, T. (2016). Mutant resources and TILLING platforms in tomato research. *Functional genomics and biotechnology in Solanaceae and Cucurbitaceae crops*, 75-91.
- Oladosu, Y., Rafii, M. Y., Abdullah, N., Hussin, G., Ramli, A., Rahim, H. A., Miah, G., & Usman, M. (2016). Principle and application of plant mutagenesis in crop improvement: a review. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, *30*(1), 1-16.
- Ors, S., Ekinci, M., Yildirim, E., Sahin, U., Turan, M., & Dursun, A. (2021). Interactive effects of salinity and drought stress on photosynthetic characteristics and physiology of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedlings. *South African Journal of Botany*, *137*, 335-339.
- Pan, I. L., McQuinn, R., Giovannoni, J. J., & Irish, V. F. (2010). Functional diversification of AGAMOUS lineage genes in regulating tomato flower and fruit development. *Journal of Experimental Botany*, *61*(6), 1795-1806. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq046>
- Park, S. H., Morris, J. L., Park, J. E., Hirschi, K. D., & Smith, R. H. (2003). Efficient and genotype-independent *Agrobacterium*-mediated tomato transformation. *Journal of Plant Physiology*, *160*(10), 1253-1257. <https://doi.org/https://doi.org/10.1078/0176-1617-01103>
- Pawar, B. D., Jadhav, A. S., Kale, A. A., Chimote, V. P., & Pawar, S. V. (2012). Zeatin induced direct *in vitro* shoot regeneration in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *The Bioscan*, *7*(2), 247-250.
- 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. (2017). A collection of enhancer trap insertional mutants for functional genomics in tomato. *Plant biotechnology journal*, *15*(11), 1439-1452.

- Rai, A. C., Singh, M., & Shah, K. (2013). Engineering drought tolerant tomato plants over-expressing BcZAT12 gene encoding a C2H2 zinc finger transcription factor. *Phytochemistry*, 85, 44-50.
- Rao, V. (2010). Transformation Studies in Solanaceous Plants.
- Razdan, M. K. (2006). Genetic improvement of solanaceous crops volume 2: tomato. CRC Press.
- Roy, M., Akhtar, S., Atanassova, B., Balacheva, E., Biswas, P., & Hazra, P. (2012). Expressivity of two genes controlling functional male sterility in tomato-positional sterile (ps) and positional sterile-2 (ps-2) during autumn-winter season. *Journal of Crop and Weed*, 8(1), 1-6.
- Sanagala, R., Moola, A. K., & Diana, R. K. B. (2017). A review on advanced methods in plant gene targeting. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(2), 317-321.
- Sanchez-Lopez, J., Atarés, A., Jaquez-Gutierrez, 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.
- Sato, M., Hosokawa, M., & Doi, M. (2011). Somaclonal variation is induced *de novo* via the tissue culture process: a study quantifying mutated cells in Saintpaulia. *PLoS One*, 6(8), e23541.
- Schmitt, F., Oakeley, E. J., & Jost, J. P. (1997). Antibiotics induce genome-wide hypermethylation in cultured *Nicotiana tabacum* plants. *Journal of Biological Chemistry*, 272(3), 1534-1540.
- Scott, J. W., & Harbaugh, B. K. (1989). MICRO-TOM: A Miniature Dwarf Tomato (*Circular*). Agricultural Experiment Station, Institute of Food and Agricultural Sciences.
- Sha, L., McCown, B. H., & Peterson, L. A. (1985). Occurrence and cause of shoot-tip necrosis in shoot cultures. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 110(5), 631-634.
- Smith, M. A. L., Sporaer, L. A., Shibli, R. A., & Knight, S. L. (1992). Effects of NaCl salinity on miniature dwarf tomato 'Micro-Tom': II. Shoot and root growth responses, fruit production, and osmotic adjustment. *Journal of Plant Nutrition*, 15(11), 2329-2341. <https://doi.org/10.1080/01904169209364477>
- Smulders, M. J. M., Rus-Kortekaas, W., & Gilissen, L. J. W. (1994). Development of polysomaty during differentiation in diploid and tetraploid tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants. *Plant Science*, 97(1), 53-60.
- Sotirova, V., Shtereva, L., Zagorska, N., Dimitrov, B., & Bogatsevskaya, N. (1999). Resistance responses of plants regenerated from tomato anther and somatic tissue cultures to *Clavibacter michiganense subsp. michiganense*. *Israel Journal of Plant Sciences*, 47(4), 237-243.
- Spooner, D. M., Anderson, G. J., & Jansen, R. K. (1993). Chloroplast ADN evidence for the interrelationships of tomatoes, potatoes, and pepinos (Solanaceae). *American Journal of Botany*, 80(6), 676-688.
- Springer, P. S. (2000). Gene traps: tools for plant development and genomics. *The Plant Cell*, 12(7), 1007-1020.

- Suzuki, Y., Uemura, S., Saito, Y., Murofushi, N., Schmitz, G., Theres, K., & Yamaguchi, I. (2001). A novel transposon tagging element for obtaining gain-of-function mutants based on a self-stabilizing Ac derivative. *Plant Molecular Biology*, *45*, 123-131.
- Vikram, G., Madhusudhan, K., Srikanth, K., Laxminarasu, M., & Swamy, N. R. (2012). Zeatin induced direct multiple shoots development and plant regeneration from cotyledon explants of cultivated tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Australian Journal of Crop Science*, *6*(1), 31-35.
- Wrather, J. A., & Freytag, A. H. (1991). Selection of atrazine tolerant soybean calli and expression of that tolerance in regenerated plants. *Plant Cell Reports*, *10*, 44-47.
- Zhou, R., Yu, X., Ottosen, C.-O., Rosenqvist, E., Zhao, L., Wang, Y., Yu, W., Zhao, T., & Wu, Z. (2017). Drought stress had a predominant effect over heat stress on three tomato cultivars subjected to combined stress. *BMC Plant Biology*, *17*(1), 1-13.