



**UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA**

**Departamento de Biotecnología
Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas**

**Generación de mutantes de inserción de
tomate cultivado y silvestre e identificación
de genes implicados en procesos de
desarrollo y tolerancia a estrés abiótico**

TESIS DOCTORAL

Sibilla Sánchez Martín-Sauceda

Dirigida por:

**Dr. Vicente Moreno Ferrero
Dr. Benito José Pineda Chaza**

FEBRERO 2016

D. Vicente Moreno Ferrero, Doctor en Ciencias Biológicas y Catedrático de Genética del Departamento de Biotecnología de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural de la Universidad Politécnica de Valencia y

D. Benito José Pineda Chaza, Doctor Ingeniero Agrónomo e Investigador contratado del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC)

CERTIFICAN que:

Dña. Sibilla Sánchez Martín-Sauceda, Licenciada en Biología, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo que, con el título *Generación de mutantes de inserción de tomate cultivado y silvestre e identificación de genes implicados en procesos de desarrollo y tolerancia a estrés abiótico*, presenta para optar al grado de Doctor por la Universidad Politécnica de Valencia.

Para que así conste a los efectos académicos oportunos, firman el presente certificado en Valencia a 3 de febrero de 2016.

Dr. Vicente Moreno Ferrero

Dr. Benito José Pineda Chaza

*Poca gente es capaz de prever
hacia dónde les lleva el camino
hasta que llegan a su fin.*

J.R.R.Tolkien

Índice general

Índice	I
Índice de figuras	IX
Índice de tablas	XI
Resúmenes	XVII

Índice

1. Introducción	1
1.1. Origen del tomate.....	1
1.2. Taxonomía.....	3
1.3. Descripción botánica.....	6
1.4. Importancia económica del tomate.....	7
1.5. La salinidad.....	9
1.5.1. Problemática de la salinidad y limitación de las áreas de cultivo....	9
1.5.2. Efectos del estrés salino en plantas.....	12
1.5.3. Mecanismos que determinan tolerancia a la salinidad.....	13
1.5.3.1. El ajuste osmótico.....	14
1.5.3.2. Homeostasis iónica.....	16
1.5.3.2.1 Regulación de la homeostasis iónica a través de la ruta SOS.....	19
1.5.3.3. Defensa frente al estrés oxidativo.....	25
1.5.4. Mejora de la tolerancia a la salinidad mediante transformación genética.....	27
1.5.5. Especies silvestres afines al tomate como fuente de variabilidad genética para la mejora de la tolerancia a la salinidad.....	33

1.5.6. El empleo de mutantes para la identificación de determinantes de la tolerancia a la salinidad.....	37
2. Antecedentes y objetivos.....	43
3. Materiales y Métodos.....	49
3.1. Material vegetal.....	49
3.2. Técnicas básicas de cultivo <i>in vitro</i>	49
3.2.1. Esterilización de semillas.....	49
3.2.2. Germinación y obtención de plántulas axénicas.....	50
3.2.3. Cultivo de explantes primarios.....	50
3.2.4. Regeneración de plantas a partir de explantes primarios.....	50
3.2.5. Determinación del nivel de ploidía de las plantas regeneradas mediante citometría de flujo.....	51
3.3. Transformación genética.....	52
3.3.1. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> : cepa bacteriana, plásmido y genes incluidos en el T-DNA.....	52
3.3.2. Cultivo de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	52
3.3.3. Método de transformación: selección y regeneración de plantas transgénicas.....	53
3.3.4. Enraizamiento de los brotes transgénicos.....	54
3.3.5. Aclimatación y trasplante.....	54
3.4. Escrutinio <i>in vitro</i> de la colección de líneas T-DNA para la identificación de mutantes afectados en el grado de tolerancia a la salinidad.....	55
3.4.1. Esterilización, germinación y siembra de las semillas.....	55
3.4.2. Diseño experimental.....	55
3.4.3. Análisis genético de un mutante identificado <i>in vitro</i> en condiciones salinas.....	55
3.4.4. Metodologías para realizar los análisis de cosegregación.....	61
3.5. Evaluación <i>in vivo</i> del fenotipo mutante.....	63
3.5.1. Esterilización de semillas, germinación y obtención de plántulas axénicas.....	63
3.5.2. Sistema de cultivo.....	63
3.6. Análisis funcional del gen PMS.....	64
3.6.1. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	64

3.6.2. Método de transformación: selección y regeneración de plantas transgénicas.....	64
3.6.3. Enraizamiento de los brotes transgénicos.....	64
3.6.4. Aclimatación y trasplante.....	64
3.6.5. Evaluación del fenotipo mutante.....	64
4. Resultados.....	
4.1. Generación de líneas T-DNA de tomate, <i>Solanum pimpinellifolium</i> y <i>S. cheesmaniae</i>	65
4.2. Identificación de mutantes en condiciones de cultivo <i>in vitro</i>	71
4.3. Mutantes de tomate alterados en caracteres del desarrollo (mutantes Vitro-Dev).....	75
4.3.1. Mutantes que exhiben albinismo: <i>tom2158</i> , <i>tom2297</i> y <i>tom2372</i>	75
4.3.1.1 <i>tom2158</i>	75
4.3.1.1.1. Análisis genético del mutante en cultivo <i>in vitro</i>	75
4.3.1.1.2. Determinación del número de insertos con nptII funcional.....	76
4.3.1.1.3. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto con nptII funcional.....	76
4.3.1.2. <i>tom2297</i>	77
4.3.1.2.1. Análisis genético del mutante en cultivo <i>in vitro</i>	77
4.3.1.2.2. Determinación del número de insertos con nptII funcional.....	78
4.3.1.2.3. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto con nptII funcional.....	78
4.3.1.3. <i>tom2372</i>	79
4.3.1.3.1. Análisis genético del mutante en cultivo <i>in vitro</i>	79
4.3.1.3.2. Determinación del número de insertos con nptII funcional.....	80
4.3.1.3.3. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto con nptII funcional.....	80
4.3.2. Mutantes alterados en el color o la morfología de la hoja: <i>tom1284</i>	83
4.3.2.1. Análisis genético del mutante en cultivo <i>in vitro</i>	83

4.3.2.2. Determinación del número de insertos con nptII funcional.....	84
4.3.2.3. Visualización de los fenotipos mutantes en invernadero.....	85
4.3.2.4. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto con nptII funcional.....	86
4.3.3. Mutantes afectados en la síntesis de clorofila: <i>tom1914</i>	88
4.3.3.1. Análisis genético del mutante en cultivo <i>in vitro</i>	88
4.3.3.2. Determinación del número de insertos con nptII funcional.....	89
4.3.3.3. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto con nptII funcional.....	89
4.3.3.4. Obtención de líneas para el mapeo del gen mutado.....	90
4.3.4. Mutantes que mueren en estadio de plántula (seedling lethal).....	93
4.3.4.1. <i>tom338</i>	93
4.3.4.1.1. Análisis genético del mutante en cultivo <i>in vitro</i>	93
4.3.4.1.2. Determinación del número de insertos con nptII funcional.....	94
4.3.4.1.3. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto con nptII funcional.....	94
4.3.4.2. <i>tom1738</i>	95
4.3.4.2.1. Análisis genético del mutante en cultivo <i>in vitro</i>	95
4.3.4.2.2. Determinación del número de insertos con nptII funcional.....	96
4.3.4.2.3. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto en la progenie TG2.....	96
4.3.4.2.4. Análisis de cosegregación con progenies de retrocruzamiento.....	98
4.3.5. Mutantes con alteración en el sistema radicular.....	101
4.3.5.1. <i>tom1608</i>	101
4.3.5.1.1. Análisis genético del mutante en cultivo <i>in vitro</i>	101
4.3.5.1.2. Determinación del número de insertos con nptII funcional.....	102
4.3.5.1.3. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto con nptII funcional.....	102
4.3.5.2. <i>tom1456</i>	104

4.3.5.2.1. Análisis genético del mutante en cultivo <i>in vitro</i>	104
4.3.5.2.2. Determinación del número de insertos con nptII funcional.....	105
4.3.5.2.3. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto con nptII funcional.....	106
4.3.6. Mutantes con alteraciones en el desarrollo vegetativo: <i>tom1425</i> ..	110
4.3.6.1. Análisis genético del mutante en cultivo <i>in vitro</i>	110
4.3.6.2. Determinación del número de insertos con nptII funcional.....	111
4.3.6.3. Visualización del fenotipo mutante en invernadero.....	111
4.3.6.4. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto con nptII funcional.....	112
4.3.7. Mutantes con alteraciones en el ápice meristemático: <i>tom1310</i> ...	115
4.3.7.1. Análisis genético del mutante en cultivo <i>in vitro</i>	115
4.3.7.2. Determinación del número de insertos con nptII funcional.....	116
4.3.7.3. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto con nptII funcional.....	117
4.3.7.4. Visualización del fenotipo mutante en invernadero.....	117
4.3.7.5. Obtención de líneas para el mapeo del gen mutado.....	119
4.3.8. Mutantes que exhiben manchas foliares. <i>tom2142</i>	120
4.3.8.1. Análisis genético del mutante en cultivo <i>in vitro</i>	120
4.3.8.2. Determinación del número de insertos con nptII funcional.....	121
4.3.8.3. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto con nptII funcional.....	121
4.4. Mutantes Vitro-Dev de <i>Solanum pimpinellifolium</i>	125
4.4.1. Mutante de <i>S. pimpinellifolium</i> alterado en el desarrollo vegetativo.....	125
4.4.1.1. Análisis genético del mutante en cultivo <i>in vitro</i>	125
4.4.1.2. Determinación del número de insertos con nptII funcional.....	126
4.4.1.3. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto con nptII funcional.....	126
4.4.1.4. Visualización del fenotipo mutante en invernadero.....	127
4.4.2. Mutante de <i>S. pimpinellifolium</i> con alteraciones en el sistema radicular.....	129
4.4.2.1. Análisis genético del mutante en cultivo <i>in vitro</i>	129

4.4.2.2. Determinación del número de insertos con nptII funcional.....	130
4.4.2.3. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto con nptII funcional.....	130
4.4.2.4. Visualización del fenotipo mutante en invernadero.....	131
4.5. Mutantes Vitro-Dev de <i>Solanum cheesmaniae</i>	133
4.5.1. Mutante de <i>S. cheesmaniae</i> alterado en el desarrollo vegetativo...	133
4.5.1.1. Análisis genético del mutante en cultivo <i>in vitro</i>	133
4.5.1.2. Determinación del número de insertos con nptII funcional.....	134
4.5.1.3. Visualización de los fenotipos mutantes en invernadero.....	134
4.5.1.4. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto con nptII funcional.....	135
4.5.2. Mutantes de <i>S. cheesmaniae</i> afectados en la síntesis de clorofila.	137
4.5.2.1. Análisis genético de los mutantes <i>ch14</i> , <i>ch27</i> y <i>ch29</i> en cultivo <i>in vitro</i>	137
4.5.2.2. Determinación del número de insertos con nptII funcional.....	138
4.5.2.3. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto con nptII funcional.....	139
4.6. Mutantes afectados en el nivel de tolerancia a la salinidad.....	143
4.6.1. <i>tom1560</i>	143
4.6.1.1. Análisis genético del mutante en cultivo <i>in vitro</i>	143
4.6.1.2. Recuperación del fenotipo silvestre en plantas con fenotipo mutante.....	145
4.6.1.3. Determinación del número de insertos con nptII funcional.....	146
4.6.1.4. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto con nptII funcional.....	146
4.6.1.5. Corroboración de la respuesta hipersensible en invernadero.	147
4.6.2. <i>tom1303</i>	150
4.6.2.1. Análisis genético del mutante en cultivo <i>in vitro</i>	150
4.6.2.2. Determinación del número de insertos con nptII funcional.....	151
4.6.2.3. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto con nptII funcional.....	152
4.6.2.4. Recuperación del fenotipo silvestre en plantas con fenotipo mutante.....	152
4.6.2.5. Corroboración de la respuesta hipersensible en invernadero.	153

4.6.3. <i>pms-916</i>	155
4.6.3.1. Análisis genético del mutante en cultivo <i>in vitro</i>	155
4.6.3.2. Corroboración de la respuesta hipersensible en invernadero.	156
4.6.3.3. Determinación del número de insertos con nptII funcional.....	157
4.6.3.4. Segregación del inserto responsable del fenotipo mutante....	159
4.6.3.5. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto con nptII funcional.....	161
4.6.3.6. Caracterización fenotípica de la respuesta hipersensible en <i>pms-916</i>	163
4.6.3.7. Análisis funcional del gen etiquetado en tomate: caracterización del fenotipo en líneas silenciadas.....	165
5. Discusión	
5.1. Generación de líneas T-DNA de tomate cultivado y silvestre.....	169
5.2. Cribado de la colección de líneas de T-DNA para la identificación de mutantes alterados en el grado de tolerancia a la salinidad.....	173
5.3. Detección <i>in vitro</i> de mutaciones que afectan a caracteres del desarrollo.....	178
5.4. Detección <i>in vitro</i> de mutaciones que promueven mayor sensibilidad a salinidad.....	198
6. Conclusiones	207
7. Bibliografía	209

Índice de figuras

Figura 1	Regulación de la homeostasis iónica a través de la ruta SOS....	23
Figura 2	Cultivo de la línea mutante sin y con sal.....	56
Figura 3	Test de kanamicina en plántulas.....	56
Figura 4	Genotipos y frecuencias en la progenie resultante del cruce entre una planta con dos insertos y el parental silvestre.....	60
Figura 5	Test de kanamicina en planta axénica.....	62
Figura 6	Método ápice-cotiledón.....	63
Figura 7	Transformación genética de <i>S. pimpinellifolium</i> y <i>S. cheesmaniae</i>	70
Figura 8	<i>tom2158</i>	77
Figura 9	<i>tom2297</i>	79
Figura 10	<i>tom2372</i>	81
Figura 11	<i>tom1284</i>	87
Figura 12	<i>tom1914</i>	91
Figura 13	<i>tom338</i>	95
Figura 14	Genotipos y frecuencias en la progenie resultante del cruce entre una planta con tres insertos y el parental silvestre, y segregación de los insertos en la progenie de plantas del retrocruzamiento.....	98
Figura 15	<i>tom1738</i>	100
Figura 16	<i>tom1608</i>	104
Figura 17	Genotipos y frecuencias en la progenie resultante del cruce entre una planta con tres insertos y el parental silvestre, y segregación de los insertos y de la mutación en la progenie de plantas del retrocruzamiento.....	108
Figura 18	<i>tom1456</i>	109
Figura 19	<i>tom1425</i>	114
Figura 20	<i>tom1310</i>	118
Figura 21	<i>tom2142</i>	122
Figura 22	<i>pim93</i>	128

Figura 23	<i>pim15</i>	132
Figura 24	<i>ch47</i>	136
Figura 25	<i>ch14, ch27 y ch29</i>	141
Figura 26	<i>tom1560</i>	149
Figura 27	<i>tom1303</i>	154
Figura 28	Hipersensibilidad al estrés salino del mutante <i>pms-916</i>	158
Figura 29	Análisis de cosegregación entre el inserto funcional y la mutación del mutante <i>pms-916</i>	162
Figura 30	Respuesta hipersensible al estrés salino del mutante <i>pms-916 in vitro</i>	163
Figura 31	Respuesta hipersensible al estrés salino del mutante <i>pms-916 in vivo</i>	165
Figura 32	Respuesta hipersensible al estrés salino de las líneas RNAi- <i>PMS</i> de tomate.....	167

Índice de tablas

Tabla 1	Taxonomía del tomate y especies silvestres relacionadas.....	5
Tabla 2	Producción, superficie y rendimiento de los distintos continentes y principales países productores en el año 2013.....	7
Tabla 3	Producción, superficie y rendimiento de la producción en España de tomate en la última década.....	8
Tabla 4	Principales países exportadores de tomate fresco.....	9
Tabla 5	Distribución regional de suelos con problemas de salinidad en millones de hectáreas.....	10
Tabla 6	Salinización secundaria estimada en las tierras irrigadas de cultivo.....	10
Tabla 7	Caracteres de interés agronómico de las especies silvestres del género <i>Solanum secc. Lycopersicon</i>	34
Tabla 8a	Segregación para el fenotipo (WT o mutante) y para el gen marcador nptII (resistencia o sensibilidad a la kanamicina) en un mutante recesivo insercional.....	57
Tabla 8b	Segregación para el fenotipo (WT o mutante) y para el gen marcador nptII (resistencia o sensibilidad a la kanamicina) en un mutante recesivo no insercional.....	57
Tabla 9a	Segregación para el fenotipo (WT o mutante) y para el gen marcador nptII (resistencia o sensibilidad a la kanamicina) en un mutante recesivo insercional utilizando la progenie TG3.....	58
Tabla 9b	Segregación para el fenotipo (WT o mutante) y para el gen marcador nptII (resistencia o sensibilidad a la kanamicina) en un mutante recesivo no insercional utilizando la progenie TG3...	59
Tabla 10	Fenotipos y resistencia a kanamicina en la autofecundación de las progenies de plantas de cruce.....	60
Tabla 11	Experimentos de transformación genética en tomate (cv MoneyMaker).....	66
Tabla 12	Experimentos de regeneración en <i>S. pimpinellifolium</i> y <i>S. cheesmaniae</i> a partir de explantes de cotiledón y de hoja.....	67
Tabla 13	Experimentos de transformación genética en <i>S. pimpinellifolium</i> y <i>S. cheesmaniae</i>	69

Tabla 14	Mutantes de tomate, <i>Solanum pimpinellifolium</i> y <i>S. cheesmaniae</i> identificados <i>in vitro</i>	74
Tabla 15	Análisis genético del mutante <i>tom2158</i>	75
Tabla 16	Segregación para el carácter resistencia a la kanamicina del mutante <i>tom2158</i>	76
Tabla 17	Segregaciones para el fenotipo y el carácter resistencia a la kanamicina del mutante <i>tom2158</i>	76
Tabla 18	Análisis genético del mutante <i>tom2297</i>	77
Tabla 19	Segregación para el carácter resistencia a la kanamicina del mutante <i>tom2297</i>	78
Tabla 20	Segregaciones para el fenotipo y la resistencia a la kanamicina del mutante <i>tom2297</i>	78
Tabla 21	Análisis genético del mutante <i>tom2372</i>	79
Tabla 22	Segregación para el carácter resistencia a la kanamicina del mutante <i>tom2372</i>	80
Tabla 23	Segregaciones para el fenotipo y la resistencia a la kanamicina del mutante <i>tom2372</i>	80
Tabla 24	Análisis de los datos acumulados correspondientes a los experimentos de identificación y cosegregación del mutante <i>tom2372</i>	81
Tabla 25	Análisis genético del mutante <i>tom1284</i>	83
Tabla 26	Segregación para el carácter resistencia a la kanamicina del mutante <i>tom1284</i>	84
Tabla 27	Análisis genético del mutante <i>Tom1284</i>	85
Tabla 28	Segregaciones para el fenotipo y el carácter resistencia a la kanamicina del mutante <i>tom1284</i>	86
Tabla 29	Análisis genético del mutante <i>tom1914</i>	88
Tabla 30	Segregación para el carácter resistencia a la kanamicina del mutante <i>tom1914</i>	89
Tabla 31	Segregación para el carácter resistencia a la kanamicina en la progenie TG3 procedente de una planta mutante del mutante <i>tom1914</i>	90
Tabla 32	Análisis genético del mutante <i>tom338</i>	93
Tabla 33	Segregación para el carácter resistencia a la kanamicina del mutante <i>tom338</i>	94

Tabla 34	Segregaciones para el fenotipo y el carácter resistencia a la kanamicina del mutante <i>tom338</i>	94
Tabla 35	Análisis genético del mutante <i>tom1738</i>	96
Tabla 36	Segregación para el carácter resistencia a la kanamicina del mutante <i>tom1738</i>	96
Tabla 37	Segregaciones para el fenotipo y el carácter resistencia a la kanamicina del mutante <i>tom1738</i>	97
Tabla 38	Segregaciones para el fenotipo y el carácter resistencia a la kanamicina del mutante <i>tom1738</i>	99
Tabla 39	Análisis genético del mutante <i>tom1608</i>	102
Tabla 40	Segregación para el carácter resistencia a la kanamicina del mutante <i>tom1608</i>	102
Tabla 41	Segregaciones para el fenotipo y la resistencia a la kanamicina del mutante <i>tom1608</i>	103
Tabla 42	Análisis genético del mutante <i>tom1456</i>	105
Tabla 43	Segregación para el carácter resistencia a la kanamicina del mutante <i>tom1456</i>	106
Tabla 44	Segregaciones para el fenotipo y la resistencia a la kanamicina del mutante <i>tom1456</i>	108
Tabla 45	Análisis genético del mutante <i>tom1425</i>	111
Tabla 46	Segregación para el carácter resistencia a la kanamicina del mutante <i>tom1425</i>	111
Tabla 47	Análisis genético del mutante <i>tom1425</i>	112
Tabla 48	Segregaciones para el fenotipo y el carácter resistencia a la kanamicina en cinco progenies TG3 procedentes de plantas TG2 WT o mutantes, del mutante <i>tom1425</i>	113
Tabla 49	Análisis genético del mutante <i>tom1310</i>	116
Tabla 50	Segregación para el carácter resistencia a la kanamicina del mutante <i>tom1310</i>	116
Tabla 51	Análisis genético del mutante <i>tom2142</i>	120
Tabla 52	Segregación para el carácter resistencia a la kanamicina del mutante <i>tom2142</i>	121
Tabla 53	Segregaciones para el fenotipo y la resistencia a la kanamicina del mutante <i>tom2142</i>	121
Tabla 54	Análisis genético del mutante <i>pim93</i>	125

Tabla 55	Segregación para el carácter resistencia a la kanamicina del mutante <i>pim93</i>	126
Tabla 56	Segregaciones para el fenotipo y el carácter resistencia a la kanamicina del mutante <i>pim93</i>	126
Tabla 57	Análisis genético del mutante <i>pim15</i>	130
Tabla 58	Segregación para el carácter resistencia a la kanamicina del mutante <i>pim15</i>	130
Tabla 59	Segregaciones para el fenotipo y la resistencia a la kanamicina del mutante <i>pim15</i>	131
Tabla 60	Análisis genético del mutante <i>ch47</i>	133
Tabla 61	Segregación para el carácter resistencia a la kanamicina del mutante <i>ch47</i>	134
Tabla 62	Segregaciones para el fenotipo y el carácter resistencia a la kanamicina del mutante <i>ch47</i>	135
Tabla 63	Análisis genético del mutante <i>ch14</i>	137
Tabla 64	Análisis genético del mutante <i>ch27</i>	138
Tabla 65	Análisis genético del mutante <i>ch29</i>	138
Tabla 66	Segregación para el carácter resistencia a la kanamicina en el mutante <i>ch14</i>	138
Tabla 67	Segregación para el carácter resistencia a la kanamicina en el mutante <i>ch27</i>	139
Tabla 68	Segregación para el carácter resistencia a la kanamicina en el mutante <i>ch29</i>	139
Tabla 69	Segregaciones para el fenotipo y el carácter resistencia a la kanamicina en el mutante <i>ch14</i>	139
Tabla 70	Segregaciones para el fenotipo y el carácter resistencia a la kanamicina en el mutante <i>ch27</i>	139
Tabla 71	Segregaciones para el fenotipo y el carácter resistencia a la kanamicina en el mutante <i>ch29</i>	140
Tabla 72	Análisis genético del mutante <i>tom1560</i> en medio suplementado con NaCl (100 mM).....	144
Tabla 73	Análisis genético del mutante <i>tom1560</i> en medio sin el suplemento de NaCl.....	144
Tabla 74	Análisis de progenies TG3 del mutante <i>tom1560</i> obtenidas a partir de plantas TG2 que exhibieron el fenotipo Mutante 1.....	145

Tabla 75	Segregación para el carácter resistencia a la kanamicina del mutante <i>tom1560</i>	146
Tabla 76	Segregaciones para el fenotipo y el carácter resistencia a la kanamicina en el mutante <i>tom1560</i>	147
Tabla 77	Análisis genético del mutante <i>tom1560</i> en condiciones de invernadero.....	148
Tabla 78	Análisis genético del mutante <i>tom1303</i> en medio de germinación suplementado con NaCl (100 mM).....	151
Tabla 79	Análisis genético del mutante <i>tom1303</i> en medio de germinación sin el suplemento de NaCl.....	151
Tabla 80	Segregación para el carácter resistencia a la kanamicina del mutante <i>tom1303</i>	151
Tabla 81	Segregaciones para el fenotipo y el carácter resistencia a la kanamicina en el mutante <i>tom1303</i>	152
Tabla 82	Análisis genético del mutante <i>tom1303</i> en condiciones de invernadero.....	153
Tabla 83	Análisis genético del mutante <i>pms-916</i> en medio de germinación suplementado con NaCl (100 mM).....	156
Tabla 84	Análisis genético del mutante <i>pms-916</i> en medio de germinación sin el suplemento de NaCl.....	156
Tabla 85	Análisis genético del mutante <i>pms-916</i> en condiciones de invernadero (solución nutritiva + 100 mM NaCl).....	157
Tabla 86	Segregación para el carácter resistencia a la kanamicina del mutante <i>pms-916</i>	157
Tabla 87	Análisis de segregación del marcador (resistencia o sensibilidad a la kanamicina) y del fenotipo (WT/M) en progenies TG3.....	160

Resumen

Cuando se aborda la disección genética de un carácter complejo, lo que realmente importa es identificar los genes con efectos principales, ya que su alteración puede provocar cambios cualitativos en el fenotipo. Para este propósito, el uso de una aproximación basada en la generación de mutantes tiene dos ventajas: la identificación de un mutante revela que el gen alterado tiene un efecto clave sobre el carácter y, en segundo lugar, el fenotipo del mutante permite hacer una inferencia sobre la función del gen. La mutagénesis insercional con T-DNA aporta una ventaja adicional ya que si el gen queda etiquetado por un inserto su identificación es relativamente fácil, porque basta con amplificar a partir de una secuencia conocida del T-DNA mediante Anchor-PCR.

Con el fin de identificar genes que controlan caracteres del desarrollo y tolerancia a estrés abiótico en tomate y especies silvestres relacionadas, en nuestro laboratorio se está llevando a cabo un programa de mutagénesis insercional en colaboración con los grupos del Dr. Lozano (Universidad de Almería) y la Dra. Bolarín (CEBAS-Murcia). Los objetivos de esta Tesis Doctoral se enmarcan en el contexto de este programa de mutagénesis insercional en tomate y especies relacionadas. En primer lugar, con el fin de ampliar la colección de líneas T-DNA que previamente se generó en nuestro laboratorio, se han obtenido 952 líneas T-DNA de tomate, 405 de *Solanum pimpinellifolium* y 550 de *S. cheesmaniae*. Se ha realizado el escrutinio de las progenies de 1545 líneas T-DNA de tomate, 194 líneas T-DNA de *S. pimpinellifolium* y 149 líneas T-DNA de *S. cheesmaniae*. La evaluación in vitro de estas progenies ha permitido detectar 43 mutantes alterados en caracteres del desarrollo temprano. Además, se han identificado tres mutantes de tomate y uno de *S. cheesmaniae* hipersensibles a estrés salino. El tercer objetivo de la Tesis ha consistido en la caracterización fenotípica y genética de los mutantes seleccionados. Por último, se ha realizado el análisis funcional del gen *PMS* (*PROTECTING MERISTEMS AGAINST SALINITY*) etiquetado en el mutante de inserción *pms-916*. Nuestros resultados sugieren que el gen *PMS* desempeña un papel esencial en la protección del meristemo apical y las hojas jóvenes de la planta de tomate en condiciones de estrés salino.

Summary

When addressing the genetic dissection of a complex trait, what really matters is the identification of the genes with major effects, because their modification may result in qualitative changes in the phenotype. For this purpose, a mutagenesis-based approach has two advantages: first, the identification of a mutant reveals that the altered gene has a key effect on the trait; secondly, the phenotypic characterization of the mutant allows making an inference about the gene function. Insertion mutagenesis by T-DNA provides an additional advantage: a gene tagged by a T-DNA insert can be easily identified using PCR-based techniques (e.g. Anchor-PCR).

In order to identify genes that control developmental traits and abiotic stress tolerance in tomato and wild related species, we are performing a program of insertion mutagenesis in collaboration with the groups of Dr. Rafael Lozano (University of Almeria) and Dr. M^aCarmen Bolarín (CEBAS-Murcia). The objectives of the present Doctoral Thesis are framed in the context of this insertion mutagenesis program in tomato and wild relatives. First, in order to expand the collections of T-DNA lines previously generated in our group, 952 T-DNA lines of tomato, 405 of *Solanum pimpinellifolium* and 550 of *S. cheesmaniae* have been obtained. Secondly we performed the evaluation of progenies from 1545 T-DNA lines of tomato, 194 T-DNA lines of *S. pimpinellifolium* and 149 T-DNA lines of *S. cheesmaniae*. The screening *in vitro* of those progenies allowed us to identify 43 mutants altered in early developmental traits. In addition, we were able to detect three mutants of tomato and another one of *S. cheesmaniae* which are hypersensitive to salt stress. The phenotypic and genetic characterization of selected mutants has been carried out. Finally, we performed the functional analysis of the *PMS* (PROTECTING MERISTEMS AGAINST SALINITY) gene tagged in the *pms-916* tomato mutant. Our results suggest that the *PMS* gene plays an essential role in the protection of the shoot apical meristem and young tissues of the tomato plant under salinity stress conditions.

Resum

Quan s'aborda la dissecció genètica d'un caràcter complex, el que realment importa és identificar els gens amb efectes principals, ja que la seua alteració pot provocar canvis qualitius en el fenotip. Per a este propòsit, l'ús d'una aproximació basada en la generació de mutants té dos avantatges: la identificació d'un mutant revela que el gen alterat té un efecte clau sobre el caràcter i, en segon lloc, el fenotip del mutant permet fer una inferència sobre la funció del gen. La mutagènesi insercional amb T-DNA aporta un avantatge addicional ja que si el gen queda etiquetat per un insert la seua identificació és relativament fàcil, perquè n'hi ha prou amb amplificar a partir d'una seqüència coneguda del T-DNA per mitjà d'Anchor-PCR.

Per tal d'identificar gens que controlen caràcters del desenvolupament i la tolerància a estrés de tipus abiòtic en tomaca i espècies silvestres relacionades, en el nostre laboratori s'està duent a terme un programa de mutagènesi insercional en col·laboració amb els grups del Dr. Lozano (Universidad de Almería) i la Dra. Bolarín (CEBAS-Murcia). Els objectius d'esta Tesi Doctoral s'emmarquen en el context d'este programa de mutagènesi insercional en tomaca i espècies relacionades. En primer lloc, per tal d'ampliar la col·lecció de línies T-DNA que prèviament es va generar en el nostre laboratori, s'han obtingut 952 línies T-DNA de tomaca, 405 de *Solanum pimpinellifolium* i 550 de *S. cheesmaniae*. S'ha realitzat l'escrutini de les progènies de 1545 línies T-DNA de tomaca, 194 línies T-DNA de *S. pimpinellifolium* i 149 línies T-DNA de *S. cheesmaniae*. L'avaluació *in vitro* d'estes progènies ha permés detectar 43 mutants alterats en caràcters del desenvolupament primerenc. A més, s'han identificat tres mutants de tomaca i un de *S. cheesmaniae* hipersensibles a estrés salí. El tercer objectiu de la Tesi ha consistit en la caracterització fenotípica i genètica dels mutants seleccionats. Finalment, s'ha realitzat l'anàlisi funcional del gen *PMS* (*PROTECTING MERISTEMS AGAINST SALINITY*) etiquetat en el mutant d'inserció *pms-916*. Els nostres resultats suggerixen que el gen *PMS* exercix un paper essencial en la protecció del meristem apical i els fulls jòvens de la planta de tomaca en condicions d'estrés salí.

1. Introducción

1.1. Origen del tomate

Los orígenes y primeros pasos de la domesticación del tomate son dudosos, aunque parece que el centro de origen es la región occidental de Sudamérica que se extiende desde Ecuador hasta Chile, donde existe una mayor diversidad fenotípica. La presencia de esta especie más al norte (i.e. México) parece responder a una expansión posterior, posiblemente antrópica.

En su área de distribución, desde las islas Galápagos hasta los valles andinos, las variedades silvestres han sido capaces de crecer tanto a nivel del mar de las costas del Pacífico como en las regiones andinas que se encuentran a 3300 metros sobre el nivel del mar, incluyendo los valles de esta cordillera donde se produjeron fenómenos de aislamiento geográfico. Tal variedad de ecosistemas en los que ha sido capaz de crecer, que incluye diferentes condiciones edafológicas y especialmente

climáticas en lo que respecta a la precipitación anual y la temperatura, explica la amplia diversidad que esta especie presenta en estado silvestre (Peralta & Spooner, 2006; Nakazato *et al.*, 2010).



Esta acuarela de mediados del siglo XVI es la representación más antigua de una planta de tomate en Europa y forma parte de los materiales inéditos de Leonhard Fuchs (1542).

Fuente: Peralta *et al.* (2008).

El momento y el lugar en el que se produjo la domesticación del tomate es todavía objeto de controversia a falta de estudios tanto arqueológicos como filogenéticos en los cuales se tengan presentes todos los cultivares americanos y las variedades silvestres. Dos son las hipótesis que cuentan hoy día con mayor aceptación: la hipótesis peruana y la mexicana.

DeCandolle (1886) y otros autores posteriormente establecieron el origen de la domesticación del tomate en Perú, de donde creyeron procedían los primeros ejemplares que llegaron a Europa debido a que en el Viejo Mundo fueron llamados a principios del siglo XVII “*mala peruviana*” y “*pomi del Peru*” y a que en esa región se encontraba el mayor número de variedades silvestres. De ser así, su domesticación debió ocurrir muy poco tiempo después de la llegada de los europeos al continente ya que no hay registro sobre el cultivo del tomate en la etapa precolombina, no existe un término para identificar a la planta en ninguna de las lenguas nativas y no se conocen representaciones artísticas de la planta al contrario de lo que ocurre con otros vegetales de la región (Peralta & Spooner, 2006).

La hipótesis alternativa, desarrollada por Jenkins (1948), señala un origen mexicano del cultivo atendiendo a varios testimonios europeos de la presencia del vegetal en México a finales del siglo XVI, a la existencia de un mayor número de cultivares de tomate en México que en Perú y al origen etimológico de la palabra *tomate* (que procedería del término “*tomatl*”, el nombre para la planta en lengua nahua). Las citas del vegetal como “*tumatle ex Themistitan*” en Guilandini (1572) donde Jenkins identificó en topónimo Themistitan con Tenochtitlan, capital del imperio azteca, demostrarían para el autor el origen precolombino del cultivo en esta región de Norteamérica (Peralta & Spooner, 2006). Para Jenkins, las plantas cultivadas en México debían proceder de especímenes de *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* originarios del Perú (Labate *et al.*, 2007).

Parece ser que en 1521, tras la llegada de los europeos a México, ya existían tomates cultivados que se utilizaban, junto con diversas variedades de *Capsicum*, para hacer salsas (Labate *et al.*, 2007). En 1577, Fray Bernardino de Sahagún, en su libro *Historia general de las cosas de Nueva España*, señala la presencia en los mercados mexicanos de siete especies vegetales cuyos nombres derivarían directamente del término *tomatl*. No obstante, sólo uno de ellos, el *xitomatl* o jitomate, se corresponde con la especie *Solanum lycopersicum* que según parece

no era tan popular en la cultura culinaria azteca como los cultivares de *Physalis* (Díez & Nuez, 2008).

A pesar de que ya se consumían en México, los primeros tomates que llegaron a Europa en la década de 1540 fueron cultivados como plantas ornamentales debido a que se consideraba que todas las partes de la planta eran venenosas y no pasaban de ser más que curiosidades de jardín (Peralta & Spooner, 2000). En el sur de Europa, la planta se adaptó bien al clima mediterráneo y, aunque se conocen citas muy tempranas en Centroeuropa, fue precisamente en el sur del continente donde comenzó a consumirse por primera vez a mediados del siglo XVII (Peralta & Spooner, 2006). Fue a partir de la popularización de su uso culinario cuando comenzó la expansión del cultivo. El tomate fue rápidamente distribuido por el mundo llegando de la mano de los españoles al Caribe y a Filipinas, y desde allí a Asia a finales del siglo XVI. El cultivo fue asimismo introducido en África a partir de las colonias portuguesas de Mozambique y Angola, y en Oriente Próximo a través de Turquía (Díez & Nuez, 2008). El tomate ya aparece en un libro de recetas de cocina del Reino Unido en 1752 desde donde debió pasar a sus colonias norteamericanas. La primera cita del cultivo en los Estados Unidos de América es de 1781 y en el año 1863 ya existían 23 cultivares diferentes (Labate *et al.*, 2007).

1.2. Taxonomía

El tomate pertenece a la familia de las solanáceas, que contiene más de 3000 especies, incluyendo muchas otras plantas de importancia agronómica como la patata, la berenjena, la petunia, el tabaco y el pimiento. *Solanum* es el género más grande en la familia de las solanáceas, que comprende entre 1250 y 1700 especies. Las especies del género *Solanum* están presentes tanto en continentes templados como tropicales y son notables por su morfología y diversidad ecológica. *Solanum* es probablemente el género de mayor importancia económica, y a él pertenecen no sólo especies de cultivo sino también muchas otras especies que producen compuestos tóxicos o de las que se obtienen medicamentos (Weese & Bohs, 2007).

Desde su introducción en Europa en el siglo XVI se pensaba que el tomate estaba estrechamente relacionada con el género *Solanum* y, por ello, fue descrito como *Solanum pomiferum* (Sabine, 1820; Luckwill 1943; Bergougnoux, 2013). Anguillara (1561) denominó al tomate recién introducido como *lycopersicon*. Sin

embargo, Tournefort (1694) fue el primero en considerar que los tomates cultivados debían pertenecer a un género distinto, al que nombró como *Lycopersicon*, utilizando el carácter multilocular del fruto como criterio para diferenciarlo del género *Solanum*. Este autor designó nueve taxones, pero sólo siete de ellos correspondían a variedades de fruto fasciado (i.e. multilocular), que diferían en color y tamaño, manteniendo a los otros dos taxones (con fruto bilocular) en el género *Solanum* (Luckwill, 1943). Linneo (1753) clasificó por primera vez a los tomates en el género *Solanum* bajo el nombre específico de *Solanum lycopersicum*. Por estar estrechamente relacionado con la belladonna y la mandrágora (plantas del género *Solanum*), el tomate se consideró una planta venenosa. Miller (1754) hizo entonces una distinción asignando al tomate cultivado el género *Lycopersicon* y la especie *esculentum*, lo que ayudó a aceptarlo como planta comestible. El género y la designación de tomate fueron durante mucho tiempo un tema de debate (Foolad, 2007; Peralta & Spooner, 2006). El empleo de datos morfológicos y principalmente de pruebas moleculares hizo factible la revisión de la clasificación filogenética de las solanáceas. Como consecuencia, el género *Lycopersicon* se reintrodujo dentro del género *Solanum* en la sección *Lycopersicon*, es decir, han sido necesarios 200 años de debate para confirmar la descripción de Linneo.

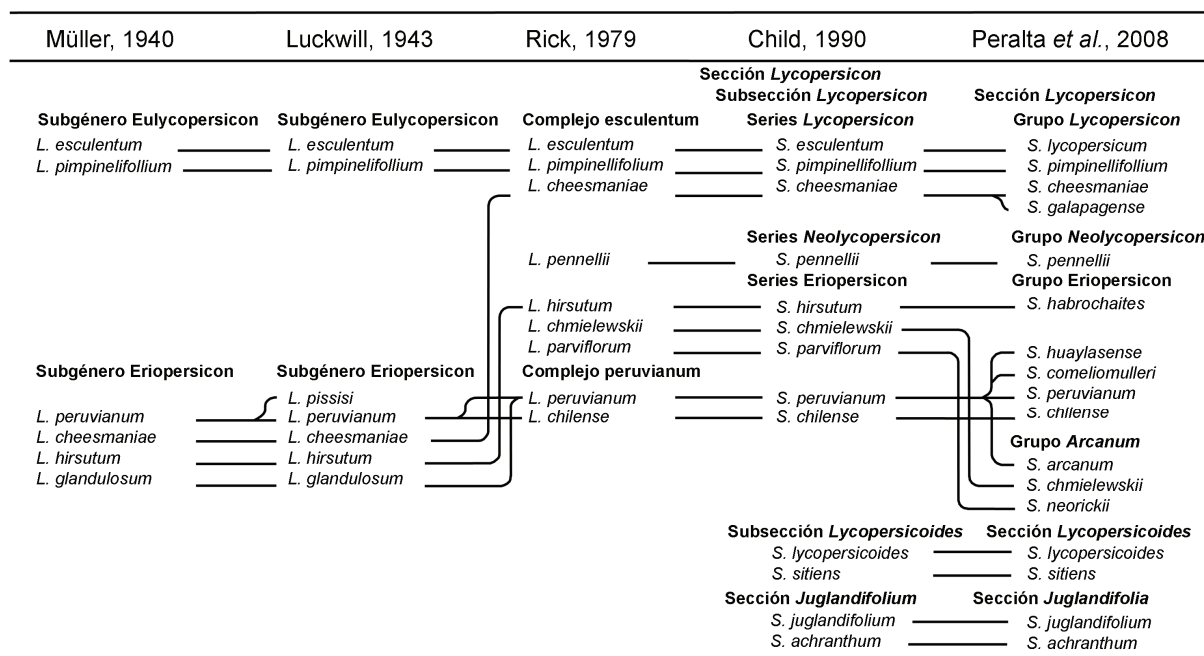
La organización en endogrupos también ha evolucionado desde la primera descripción realizada por Müller (1940), quien identificó seis especies de tomate separadas en dos secciones: subgénero *Eulycopersicon*, que incluía *Lycopersicon esculentum* y *L. pimpinellifolium*; y el subgénero *Eriopersicon*, que reagrupaba *L. peruvianum*, *L. cheesmaniae*, *L. hirsutum* y *L. glandulosum* (Tabla 1). Rick (1960, 1979) propuso una clasificación basándose en la capacidad de las especies silvestres para cruzarse con el tomate cultivado. Reconoció nueve especies silvestres de tomate que se dividían en dos grandes grupos según su capacidad de cruce: el Complejo Esculentum y el Peruvianum. Todas las especies del Complejo Esculentum (*L. esculentum*, *L. pimpinellifolium*, *L. pennellii*, *L. cheesmaniae*, *L. hirsutum*, *L. chmielewskii* y *L. parviflorum*) pueden ser hibridadas con el tomate cultivado y representan fuentes potenciales de resistencia a estrés biótico y abiótico, así como de otros caracteres deseables. Las especies del Complejo Peruvianum (*L. chilense* y *L. peruvianum*), que no se pueden hibridar con el tomate cultivado, son extremadamente diversas y representan un potencial real para la mejora de cultivos (Tabla 1). Child (1990), basándose en caracteres morfológicos, incluyó a los tomates en el subgénero *Potatoe*, sección

Lycopersicum, subsección *Lycopersicum*, y los dividió en tres series *Lycopersicon*, *Neolycopersicon* y *Eriopersicon*. Esta clasificación está respaldada por estudios posteriores basados en datos de caracterización molecular, tanto de DNA cloroplástico como nuclear (Tabla 1) (Palmer & Zamir, 1982; Miller & Tanksley, 1990; Spooner *et al.*, 1993).

En la actualidad se consideran 13 especies de tomate incluyendo al tomate cultivado (*S. lycopersicum*) y a las accesiones silvestres encuadradas en la sección *Lycopersicon*, que a su vez se dividen en cuatro grupos: el grupo *Lycopersicon* (*S. lycopersicum*, *S. pimpinellifolium*, *S. chesmaniae* y *S. galapagense*), el grupo *Neolycopersicon* (*S. pennellii*), el grupo *Eriopersicon* (*S. peruvianum*, *S. corneliomulleri*, *S. huaylasense*, *S. habrochaites* y *S. chilense*) y el grupo *Arcanum* (*S. arcanum*, *S. chmielewskii* y *S. neorickii*) (Peralta *et al.*, 2008).

Según Foolad (2007), la taxonomía aceptada actualmente para el tomate cultivado es la siguiente: **Reino:** Plantae; **Subreino:** Traqueobionta; **Superdivisión:** Spermatophyta; **Clase:** Magnoliopsida; **Subclase:** Asteridae; **Orden:** Solanales; **Suborden:** Solanineae; **Familia:** Solanaceae; **Género:** *Solanum*; **Especie:** *lycopersicum*

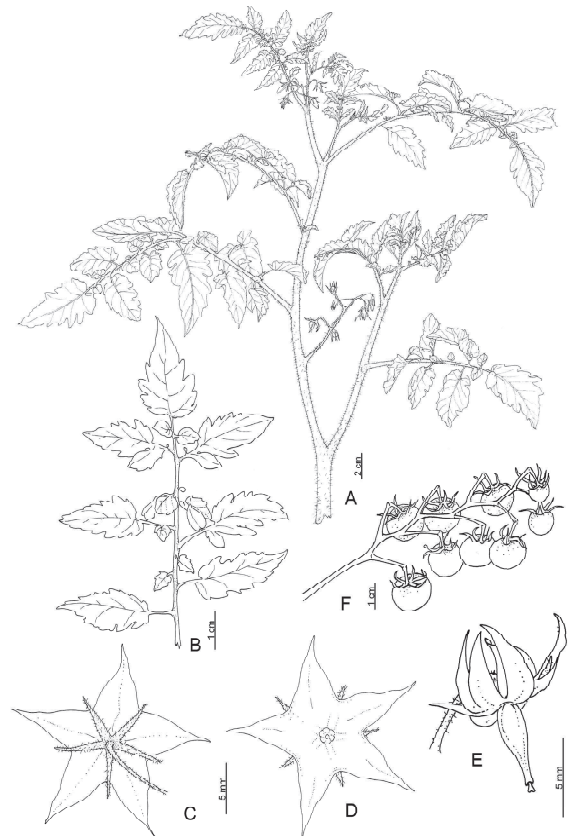
Tabla 1. Taxonomía del tomate y especies silvestres relacionadas.



Fuente: Peralta *et al.* 2008.

1.3. Descripción botánica

Solanum lycopersicum, es una especie autógama, rastrera (a pesar de que se puede desarrollar de forma semierecta o erecta) y perenne (aunque se cultiva como anual). Por lo que respecta al tipo de crecimiento, puede ser determinada o indeterminada, siendo el crecimiento indeterminado el carácter silvestre de la especie. Todos sus órganos aéreos están cubiertos de tricomas (tanto glandulares como no glandulares) que le proporcionan a la planta un olor característico. El sistema radicular está compuesto por una raíz principal, corta y débil, raíces secundarias vigorosas y numerosas, y raíces adventicias. Los tallos son gruesos y clorofílicos, con entrenudos de 1-6 cm de largo y tallos secundarios que se desarrollan a partir de las axilas de las hojas. Las hojas son compuestas, anchas y planas, imparipinnadas, con 7 a 11 folíolos peciolados, lobulados y con bordes enteros o dentados. Las inflorescencias, que comienzan a desarrollarse a partir de la séptima hoja, son generalmente simples, con un número variable de flores (en general menos de 12) que se unen al eje floral por medio de un pedicelo articulado. La transición floral empieza aproximadamente cuando la tercera hoja está completamente expandida. Las flores son hermafroditas, actinomorfas, hipóginas, y compuesta por 4 verticilos. El cáliz pubescente está compuesto por 5-6 sépalos lanceolados y fusionados en la base. La corola tiene un número similar de pétalos amarillos lanceolados y fusionados en la base. El tercer verticilo consta de 6 estambres fusionados a la corola por sus filamentos, con anteras largas de color amarillo unidas lateralmente formando un cono estaminal que envuelve al cuarto verticilo, el gineceo. El pistilo está formado por un ovario bilocular o plurilocular, con estilo delgado y estigma cubierto por una secreción de



Anatomía del tomate. A. Brote, B. Hoja, C. Vista abaxial de la flor, D. Vista adaxial de la flor. D. Vista lateral de la flor. F. Inflorescencia.

Fuente: Peralta *et al.* (2008).

naturaleza lipídica. El fruto es una baya con gran diversidad de tamaños y formas, y con una amplia variedad de colores, aunque el más habitual y conocido es el color rojo. Por lo general posee 2 lóculos, pero es multilocular en muchas variedades y presenta una gruesa placenta con numerosas semillas lenticulares recubiertas de una sustancia mucilaginoso (Darwin *et al.*, 2003; Peralta *et al.*, 2008).

1.4. Importancia económica del tomate

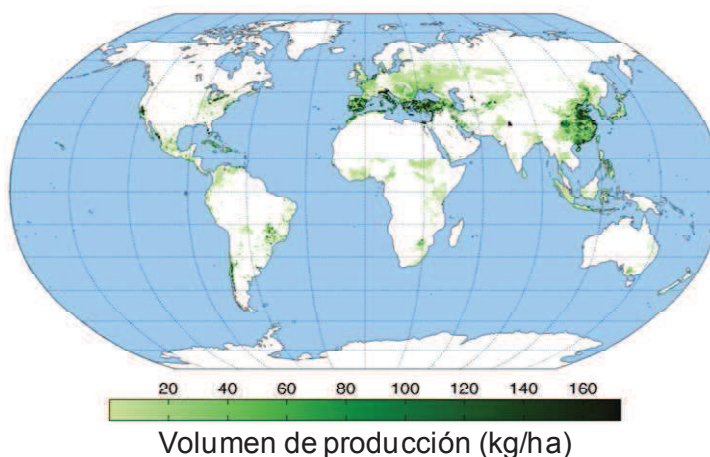
El tomate se ha convertido en una de las especies hortícolas más importantes a nivel mundial por lo que representa su producción y por aspectos relacionados con su distribución y consumo. La cantidad, calidad y diversidad de centros públicos y privados dedicados a la investigación y mejora de esta especie reflejan tanto su importancia económica como social.

Tabla 2. Producción, superficie y rendimiento de los distintos continentes y principales países productores en el año 2013. (Fuente: FAOSTAT)

Países	Producción(t)	Superficie(Ha)	Rendimiento (Kg/ha)
África	18.648.548	939.245	19.855
- Egipto	8.533.803	212.946	40.075
- Marruecos	1.293.319	14.016	92.274
América del N. y Central	17.858.077	324.441	135.966
- EEUU	12.574.550	149.977	83.843
- Méjico	3.282.583	87.165	37.659
América del Sur	6.731.272	131.398	51.228
- Brasil	4.187.646	62.687	66.802
- Argentina	691.383	15.868	43.571
Asia	99.205.498	2.821.820	35.157
- China	50.664.255	984.603	51.456
- India	18.227.000	880.000	20.712
- Turquía	11.820.000	311.000	38.006
Europa	20.965.199	500.872	41.857
- UE	15.368.985	249.988	61.479
- Italia	4.932.463	95.304	51.755
- España	3.683.600	45.300	81.316
Oceanía	555.175	7.640	72.667
Mundo	163.963.770	4.725.416	34.698

Según fuentes de la FAO, en la última década, tanto la producción como la superficie cultivada de tomate han aumentado, pasando de ser de 119,5 millones de toneladas en 4,1 millones de hectáreas en 2003 a 164 millones de toneladas en 4,7 millones de hectáreas en 2013 (tabla 2). En 2013 Asia fue el mayor

productor mundial de tomate con una producción de 99,2 millones de toneladas, lo que equivaldría a un 60,5 % de la producción mundial. El segundo lugar lo ocupó el continente europeo, con una producción de 20,9 millones equivalente a un 12,8% de la producción



En el mapa aparecen marcadas las regiones productoras con mayor o menor intensidad en función del volumen de producción.

Fuente: FAOSTAT

mundial. Por países, China fue el principal productor seguido por India, EEUU y Turquía. España ocupó el noveno puesto. Por lo que respecta a la producción europea, España ocupa el segundo lugar con 3,6 millones de toneladas, y es Italia el principal productor con 4,6 millones de toneladas (tabla 2).

En los últimos 10 años, la superficie de cultivo de tomate en España se ha visto reducida en 24 mil hectáreas, disminuyendo así la producción anual, que pasó de ser de 4,3 millones de toneladas en 2004 a 3,6 millones de toneladas en 2013 (Tabla 3).

Tabla 3. Producción, superficie y rendimiento de la producción en España de tomate en la última década. (FUENTE: FAOSTAT)

Años	Producción (t)	Superficie (Ha)	Rendimiento (Kg/ha)
2004	4.383.202	69.902	62.705
2005	4.810.301	72.285	66.546
2006	3.800.552	56.690	67.041
2007	4.081.477	53.297	76.580
2008	4.049.753	54.868	73.809
2009	4.798.053	63.838	75.160
2010	4.312.709	59.267	72.767
2011	3.864.120	51.204	75.465
2012	4.046.400	48.600	83.259
2013	3.683.600	45.300	81.316

En 2012, las principales comunidades autónomas productoras fueron Andalucía con un 40% de la producción total y Extremadura con un 34,7%, seguidos muy de lejos por Región de Murcia con un 7,1% (Tabla 3).

Las primeras potencias mundiales en exportación de tomate fresco fueron en 2011 México, Países Bajos y en tercer lugar España, a las que les seguían Turquía y Jordania (Tabla 4). Entre los veinte países que más exportaron, los países con mejor precio obtenido por kilo fueron Italia con 1,67 euros por kilo, Canadá con



Las exportaciones de tomate español se dirigen principalmente a países de Europa

1,56 euros por kilo, Alemania con 1,37 euros por kilo, Lituania con 1,31 euros por kilo y Francia con 1,24 euros por kilo, ocupando España el noveno lugar con 0,89 euros por kilo. Los países que peor precio obtuvieron fueron India con 0,27 euros por kilo y Siria con 0,24 euros por kilo (Anuario FAO, 2011).

Tabla 4. Principales países exportadores de tomate fresco (FAOSTAT)

Países	Exportaciones		Importaciones		Saldo (E-I)
	Cantidad	Valor (1000\$)	Cantidad	Valor (1000\$)	Valor (1000\$)
México	1.493.316	2.093.141	23.726	47.439	2.045.702
Países Bajos	1.039.773	1.577.975	207.401	318.148	1.259.827
España	964.054	1.182.956	144.608	63.333	1.119.623
Turquía	576.575	432.461	681	616	431.845
Jordania	434.830	224.847	0	0	224.847

1.5. La salinidad

1.5.1. Problemática de la salinidad y limitación de las áreas de cultivo

La salinidad está considerada en la actualidad como uno de los principales factores limitantes de la productividad agrícola. Los efectos perjudiciales de la acumulación de sales en los suelos agrícolas han afectado a antiguas y modernas civilizaciones (Yamaguchi & Blumwald, 2005). Según Flowers (2004), la salinidad ha sido una amenaza para la agricultura a lo largo de los últimos 3000 años, y en los últimos años esa amenaza ha crecido. Son numerosos los factores que han contribuido durante años a la salinización de los suelos, y entre ellos no debe olvidarse la actividad humana. Sin embargo, hasta hace relativamente pocos años no se era consciente del mismo, quizás debido a que hasta entonces los niveles

de salinidad no eran preocupantes o, más probablemente, no se habían estudiado bien sus efectos.

Tabla 5. Distribución regional de suelos con problemas de salinidad en millones de hectáreas (Mha).

Regiones	Total de área (Mha)	Suelos salinos		Suelos sódicos	
		Mha	%	Mha	%
África	1.899	39	2,0	34	1,8
Asia, el Pacífico y Australia	3.107	195	6,3	249	8,0
Europa	2.011	7	0,3	73	3,6
Latino América	2.039	61	3,0	51	2,5
Oriente Próximo	1.802	92	5,1	14	0,8
Norte América	1.924	5	0,2	15	0,8
Total	12.781	397	3,1	434	3,4

Fuente: FAO 2008

Según la FAO, más del 6% de las tierras de nuestro planeta están afectadas por un exceso de sal o sodio (tabla 5). Por lo que respecta a la agricultura, de los casi 230 millones de hectáreas de las tierras agrícolas de regadío, 45 millones (~20%) están afectadas por un proceso de salinización secundaria (tabla 6), y de los 1500 millones de hectáreas de las tierras agrícolas de secano, 32 millones (2,1%) tienen problemas de salinidad. Según Wang *et al.* (2003), el incremento de la salinización de los suelos podría afectar a casi el 50% de las tierras cultivables en el año 2050.

Tabla 6. Salinización secundaria estimada en las tierras irrigadas de cultivo

Países	Superficie total de tierras cultivadas (mha)	Superficie irrigada		Superficie irrigada afectada por sal	
		mha	%	mha	%
China	97	45	46	6,7	15
India	169	42	25	7,0	17
Unión Soviética	233	21	9	3,7	18
Estados Unidos	190	18	10	4,2	23
Pakistán	21	16	78	4,2	26
Irán	15	6	39	1,7	30
Tailandia	20	4	20	0,4	10
Egipto	3	3	100	0,9	33
Australia	47	2	4	0,2	9
Argentina	36	2	5	0,6	34
Sudáfrica	13	1	9	0,1	9
Resto países	843	159	19	29,6	20
Total	1474	227	15	45,4	20

Fuente: Munns (2003), recopilado de la FAO

La salinización de los suelos puede producirse en condiciones naturales y se debe a la meteorización de rocas sedimentarias con altos contenidos en sales (la meteorización tiene lugar bajo condiciones tales que posibilitan la oxidación de los cristales de los minerales que constituyen la roca). En ocasiones, esas sales son disueltas por el agua de lluvia que al evaporarse las acumula en zonas bajas y depresiones. También puede ser el resultado de una redistribución acelerada de sales en el perfil del suelo, debido principalmente a la escasez de precipitaciones y de reservas de agua en estas regiones. En las áreas costeras, puede darse la intrusión de aguas marinas en los acuíferos.

En cualquier caso, los problemas actuales no se deben tanto a la salinización que se produce por fenómenos naturales como a la acumulación progresiva de sales causada por la acción del hombre, lo que se conoce como salinización secundaria. Las causas más comunes son el desmonte y la sustitución de la vegetación perenne por cultivos anuales, aunque fundamentalmente se debe a un manejo inadecuado del agua de riego, a la excesiva adición de fertilizantes y a las prácticas agrícolas que compactan el suelo y provocan insuficiente lixiviación (Rao *et al.*, 2013). La salinización secundaria es muy frecuente en aquellas zonas donde se utilizan sistemas de irrigación. En la actualidad son muchísimas las zonas donde el bombeo del agua desde los acuíferos subterráneos y desde las cuencas fluviales abastece las necesidades de riego. La salinidad de estas zonas es, simplemente, un reflejo de la cantidad relativa de agua que se transforma en vapor por acción natural o por intervención del hombre.

A nivel global, el problema de la salinidad se acentúa como consecuencia de la gran presión que supone la creciente demanda de alimentos por parte de la población mundial. Para el abastecimiento global de alimentos se hace uso de una agricultura intensiva que está provocando el agotamiento de los acuíferos, la salinización del agua de riego y, en última instancia, la degradación de los suelos. En este sentido, una vasta franja de tierra agrícola se pierde cada año como consecuencia de la salinización y otras formas de degradación del suelo. La degradación del suelo ha reducido en un 13% la producción de alimentos desde la Segunda Guerra Mundial. A pesar de ello, la agricultura mundial debe hacer frente a un incremento de la población de unos 1500 millones de personas en nuestro planeta para las dos próximas décadas y se estima que, para entonces, la producción agrícola debería aumentar en un 20% en países desarrollados y en un

60% en países en vías de desarrollo. Por otra parte, crece cada vez más la demanda de tierras agrícolas para urbanización, y este crecimiento está alcanzando en algunos países en desarrollo proporciones sin precedentes. En muchos lugares las tierras agrícolas de primera calidad son las más susceptibles de invasión urbana.

Estos datos evidencian que los problemas derivados de la salinización del suelo están adquiriendo una magnitud alarmante. Las medidas de tipo agrotecnológico utilizadas hasta el momento, como los lavados del suelo con altas concentraciones de sales, sustitución de suelos por sustratos alternativos, trasplantes en vez de siembras directas, adición de calcio en forma de yeso o nitrato cálcico, la búsqueda de fuentes de agua de mejor calidad, el empleo de plantas desalinizadoras, el acondicionamiento de las plántulas, el tratamiento de las semillas, etc., han dado pocos frutos (Cuartero & Fernández-Muñoz, 1999). Urge, por tanto, encontrar otras soluciones. Una de ellas es la selección de poblaciones genéticamente variables en especies de interés económico. La otra pasa por el empleo de métodos de mejora que conduzcan a un aumento del nivel de tolerancia. En este sentido, la biotecnología ofrece nuevas alternativas para la obtención de variedades mejoradas.

1.5.2. Efectos del estrés salino en plantas.

Los efectos perniciosos de la sal sobre las plantas se pueden separar en dos grandes categorías: 1) el efecto osmótico, que se traduce en una disminución de la entrada de agua en la planta y (2) el efecto iónico, producto de la acumulación de iones a niveles tóxicos.

Por lo que respecta al estrés osmótico, las sales disueltas disminuyen el potencial hídrico del medio, lo que reduce la capacidad de la planta para absorber agua y nutrientes por la raíz, produciendo un efecto similar al provocado por el estrés hídrico. Respecto al estrés iónico, los iones salinos transportados en la cadena de transpiración hasta las hojas pueden llegar a acumularse en los espacios intercelulares y deshidratar la célula, o en el citoplasma e inhibir la mayoría de los enzimas, llegando a producir la muerte de las hojas.

Se deben distinguir, por tanto, dos fases de crecimiento en una planta sometida a estrés salino (Munns, 1993): la primera sería la fase osmótica y la segunda vendría determinada por el daño provocado por la acumulación de los iones salinos. Los efectos de las dos diferentes fases de la salinidad sobre las

plantas no son evidentes si la salinidad es alta o si las especies son particularmente sensibles a Na^+ . Sin embargo, en la mayoría de las plantas las dos fases están claramente separadas en el tiempo (Munns *et al.*, 1995). Distinguir el efecto osmótico del efecto específico de los iones requiere de observaciones a lo largo del tiempo que permitan observar la tasa de producción de hojas nuevas y el aumento de la tasa de lesiones en las hojas adultas. El efecto del estrés osmótico se ve como una rápida inhibición de la tasa de expansión de las hojas jóvenes y una reducción de la conductancia estomática de las hojas maduras. La toxicidad provocada por los iones se ve como un aumento en la tasa de senescencia de las hojas adultas debido a la acumulación de Na^+ (Munns *et al.*, 2006; Yeo & Flowers, 1986).

Conviene, por último, indicar que a estos efectos primarios habría que añadirles el estrés oxidativo que se genera como consecuencia de ambos tipos de estrés (osmótico e iónico) y que se debe a la acumulación de radicales de oxígeno activo.

1.5.3. Mecanismos que determinan tolerancia a la salinidad

El conocimiento de cómo las plantas restablecen la homeostasis osmótica y/o iónica en condiciones de estrés, y posteriormente mantienen un estado fisiológico y bioquímico constante, necesario para el crecimiento y desarrollo en estas condiciones, es fundamental para entender los mecanismos de tolerancia. Diversos autores coinciden en que debe existir una jerarquía funcional necesaria, entre células, tejidos y órganos, para la tolerancia al estrés de la planta (Bohnert *et al.*, 1996; Glenn *et al.*, 1999; Hasegawa *et al.*, 1994; Munns *et al.*, 1986; Serrano, 1996; Yeo, 1998).

La tolerancia al estrés viene determinada tanto por moléculas (metabolitos, proteínas y componentes de las rutas bioquímicas), que conducen a una adaptación de las plantas a las nuevas condiciones, como por reguladores (relacionados con la traducción de señales) que controlan el contenido y la coordinación de las primeras. Los análisis fisiológicos, bioquímicos y moleculares están ayudando a poner en evidencia los distintos mecanismos que deben actuar conjuntamente en el proceso. Estos mecanismos, que deben paliar los efectos negativos de la componente osmótica e iónica, incluyen el ajuste osmótico, la homeostasis iónica, la eliminación de radicales tóxicos y la transducción de señales que actúan a larga distancia.

1.5.3.1. El ajuste osmótico

En condiciones de estrés osmótico las plantas necesitan conseguir un aumento de la presión osmótica en los fluidos celulares que permita la absorción de agua a pesar del reducido potencial hídrico externo, un mecanismo que se ha denominado ajuste osmótico. La reacción de todas las plantas, incluidas las halofitas, cuando se produce un descenso en el potencial osmótico es la pérdida de turgencia acompañada de un ajuste osmótico, (Bernstein, 1961, 1963; Turner & Jones, 1980). El ajuste osmótico en condiciones salinas ocurre como consecuencia de la entrada de iones desde la solución del suelo o a través de la síntesis endógena de solutos orgánicos. Las plantas halofitas mantienen la turgencia celular principalmente mediante la acumulación de iones (Flowers *et al.*, 1977). La mayor parte de las plantas glicofitas, por el contrario, tienen más problemas para adaptarse osmóticamente a las condiciones salinas, ya que restringen la entrada de iones.

Muchas plantas, aunque no todas, responden a los cambios externos de potencial osmótico, tanto en condiciones de estrés hídrico como salino, acumulando compuestos orgánicos que actúan como solutos compatibles (Brown & Simpson, 1972; Ford, 1984; Yancey *et al.*, 1982). Estos ácidos orgánicos, incluso a elevadas concentraciones, no dañan ni a los enzimas ni a otras estructuras celulares; por esta razón se denominan osmolitos o solutos compatibles. En la célula, estos osmolitos se acumulan principalmente en el citosol, cloroplastos y otros compartimentos citoplasmáticos, llegando a alcanzar e incluso superar concentraciones de 200 mM. Tales concentraciones permiten mantener la turgencia celular y el gradiente de entrada de agua en condiciones de estrés (Rhodes & Samaras, 1994).

Algunas de las funciones más importantes de los osmolitos son la protección de estructuras y el mantenimiento del balance osmótico, ya sea permitiendo la entrada de agua en la célula o reduciendo su salida. Pero además de esto, conviene resaltar que los solutos orgánicos protegen a la célula contra el efecto tóxico de ciertos iones y las condiciones de desecación, además de eliminar los radicales de oxígeno reactivo que se producen bajo condiciones de estrés osmótico e iónico. Estos solutos pueden ser polioles lineales (glicerol, manitol o sorbitol), polioles cíclicos (inositol o pinitol y otros derivados mono y dimetilados del inositol), azúcares (principalmente sacarosa y fructosa), aminoácidos

(glutamato y prolina), compuestos de amonio cuaternario (glicinbetaína o alaninbetaína) y otros compuestos (trealosa, rafinosa, fructanos).

Los principales osmolitos en buena parte de las plantas glicofitas son los ácidos orgánicos y los azúcares. Por ejemplo, el malato es un ácido orgánico que está relacionado con la osmorregulación (Salisbury & Ross, 1985) y con el cierre estomático (Allaway, 1973). El oxalato, otro ácido orgánico, es el principal osmolito orgánico de diversas especies del género *Atriplex* y de la familia Chenopodiaceae (Osmond, 1976). Por otra parte, ciertos azúcares, tales como la sacarosa, actúan como osmolitos orgánicos en algunas plantas sometidas a estrés salino (Maas & Nieman, 1978).

Se ha publicado mucho sobre la acumulación de prolina en plantas que crecen en condiciones de elevado estrés salino (Greenway & Munns, 1980; Wyn Jones, 1981). Por ejemplo, en ambientes salinos la acumulación de prolina es muy común en algunas monocotiledóneas (Storey *et al.*, 1977; Wyn Jones & Storey, 1978). También se sabe que la prolina puede regular de forma muy efectiva la acumulación de nitrógeno y, además de no generar problemas de compatibilidad en el citoplasma, puede ser fácilmente convertida a glutamato. Esta conversión es muy importante ya que el glutamato interviene en la síntesis de otros aminoácidos esenciales. De esta forma, la prolina podría actuar en condiciones de estrés salino como reserva de nitrógeno y osmorregulador.

Aunque en principio se pensó que la acumulación de prolina estaba relacionada con la tolerancia a la salinidad, estudios posteriores lo ponen en duda. Según Greenway & Munns (1980), se encuentran niveles importantes de prolina en raíces y vástagos, tanto en plantas sensibles como en tolerantes, cuando éstas sufren una reducción severa del crecimiento a causa de la salinidad. Wyn Jones (1981) indicó que la prolina podría no estar relacionada con la adaptación de las plantas a la salinidad, ya que ésta se acumula en condiciones extremas de estrés. Mofthah & Michel (1987) señalaron que el contenido de prolina no podía ser usado como indicador de la tolerancia a la salinidad. Por todo ello, se ha propuesto que el incremento en el contenido de prolina es una consecuencia del déficit hídrico y no un mecanismo de osmoprotección implicado en la tolerancia a la salinidad.

La acumulación de glicinbetaína en ambientes salinos se ha detectado en muchas especies de la familia de las chenopodiáceas, aunque raramente ocurre en las halofitas. En las chenopodiáceas *Suaeda* y *Salicornia*, la glicinbetaína se

acumula en hojas y parece tener un efecto muy positivo en relación con el crecimiento de las plantas en condiciones salinas. A pesar de lo comentado anteriormente, el posible papel que puede jugar la glicinbetaína en la tolerancia a la salinidad de las plantas también se ha puesto en tela de juicio. En este sentido, a pesar de que se ha obtenido mayor tolerancia a estrés salino en plantas transgénicas que acumulan prolina, manitol, fructanos, trealosa, glicinbetaína y ononitol, no parece probable que la concentración absoluta de estos osmolitos en las plantas transgénicas sea suficiente como para mantener el equilibrio osmótico (Tarczynski *et al.*, 1993; Thomas *et al.*, 1995; Pilon-Smits *et al.*, 1995; Holmström *et al.*, 1996; Karakas *et al.*, 1997; Romero *et al.*, 1997). Por tanto, en estos casos no está claro que la tolerancia se deba, como en principio cabría esperar, a un mejor ajuste osmótico, sino quizás a una acción de tipo osmoprotector o a otros efectos.

En cualquier caso, conviene señalar que a altas concentraciones, los solutos compatibles tienen una función real en el ajuste osmótico. Esto es cierto particularmente en algunas plantas halofitas, capaces de acumular entre 0,5 y 4,0 mol/l de osmolitos compatibles en las células (Zhu, 2001). La alta concentración de osmolitos reside especialmente en el citosol, con el fin de contrarrestar por un lado las altas concentraciones de sal en el exterior, y por el otro la elevada concentración de iones Na⁺ y Cl⁻ en la vacuola.

En definitiva, la acumulación de ciertos osmolitos puede facilitar el ajuste osmótico disminuyendo el potencial osmótico de la célula (Delauney & Verma, 1993; Louis & Galinski, 1997; McCue & Hanson, 1990), lo que podría contribuir a la tolerancia. Además, los solutos compatibles son hidrofílicos y por tanto podrían reemplazar al agua de la superficie de las proteínas, complejos proteínicos o membranas. Asimismo, los solutos compatibles a altas concentraciones pueden reducir el efecto inhibitorio de los iones sobre la actividad enzimática (Brown, 1990; Solomon *et al.*, 1994) al incrementar la actividad térmica de los enzimas (Galinski, 1993) y prevenir la disociación de los complejos enzimáticos (Papageorgiou & Murata, 1995).

1.5.3.2. Homeostasis iónica.

En suelos altamente salinos, sobre todo en aquellos con elevados contenidos en NaCl, se produce una perturbación del contenido iónico, no sólo en lo que respecta al Na⁺ y Cl⁻ sino también en las concentraciones de K⁺ y Ca²⁺ (Hasegawa *et al.*, 2000). La mayor parte de las especies cultivadas en

condiciones de estrés salino son más sensibles a la acumulación de Na^+ que de Cl^- , aunque algunas especies, como los cítricos, presentan una mayor sensibilidad al Cl^- . Por esta razón, la mayoría de los estudios se han centrado en mecanismos relacionados con la exclusión y el transporte de Na^+ (Munns & Tester, 2008).

Uno de los efectos más importantes promovido por las altas concentraciones de Na^+ es el desplazamiento del K^+ de sus funciones. Esto ocurre porque el incremento de Na^+ en la solución del suelo inhibe directamente los sistemas de entrada del K^+ , lo que genera una deficiencia de K^+ (Botella *et al.*, 1997; Kaya *et al.*, 2007). Por lo tanto, entre los mecanismos esenciales de tolerancia se encuentra el control del transporte de Na^+ , sobre la base de la regulación de la expresión de canales y transportadores específicos de iones (Munns & Tester, 2008; Rajendran *et al.*, 2009). De esta forma, se puede minimizar la cantidad de Na^+ que se acumula en el citosol de las células, particularmente cuando las hojas están transpirando.

La exclusión de Na^+ , es decir, la capacidad de restringir el transporte este ión hacia la parte aérea, es uno de los mecanismos asociados a la tolerancia (Richards *et al.*, 2001). La exclusión de Na^+ de las hojas se produce como consecuencia de una baja absorción de Na^+ por parte de las células de la corteza de la raíz y el estricto control de la carga neta del xilema por parte de las células del parénquima (Davenport *et al.*, 2005). Un fallo en la exclusión de Na^+ puede manifestar su efecto tóxico a los pocos días causando la muerte prematura de las hojas más adultas (Munns & Tester, 2008).

La compartimentación de iones tóxicos en la vacuola es otro de los mecanismos que permite contribuir activamente a la homeostasis iónica de la célula. Estos iones compartimentados actúan a su vez como agente osmótico para mantener el flujo de agua en la célula, permitiendo así que las plantas crezcan en suelos que contienen altos niveles de salinidad (Apse *et al.*, 1999). Lauchli & Epstein (1990) señalaron que la compartimentación celular de Na^+ es uno de los mecanismos que permite a las plantas tolerar altas concentraciones salinas. En la compartimentación de sodio en las vacuolas y prevacuolas celulares interviene presumiblemente un antiportador sodio/protón localizado en el tonoplasto. Esta compartimentación se produce gracias al gradiente de protones que genera la bomba de protones (ATPasa) y la pirofosfatasa. La actividad del antiportador sodio/protón parece que se encuentra localizada en las vesículas del tonoplasto (Blumwald & Poole, 1985; Guern *et al.*, 1989; Martínez & Laüchli,

1993), y, al menos parcialmente, es esta actividad la responsable de la alcalinización de la vacuola. *AtNHX1* fue el primer antiportador vacuolar clonado de plantas (Gaxiola *et al.*, 1999; Quintero *et al.*, 2000). Su expresión en *Arabidopsis* indicó que codificaba un antiportador Na^+/H^+ . Además, su sobreexpresión en plantas transgénicas de *Arabidopsis*, tomate y *Brassica* confería tolerancia a NaCl (Apse *et al.*, 1999; Zhang & Blumwald., 2001; Zhang *et al.*, 2001). Posteriormente, Venema *et al.* (2002) demostraron que la proteína NHX1 de *Arabidopsis* tenía la capacidad de transportar tanto Na^+ como K^+ , contribuyendo al balance osmótico y tisular en cualquier condición de crecimiento de la planta. Los estudios realizados con mutantes insercionales para *AtNHX1* sugirieron que este gen desempeñaba un papel importante en la regulación del pH así como en la homeostasis de K^+ (Venema *et al.*, 2002; Apse *et al.*, 2003; Sottosanto *et al.*, 2004; Pardo *et al.*, 2006).

Los transportadores *HKT* son también muy importantes en la regulación del transporte de K^+ y Na^+ desde la raíz a la parte aérea (Laurie *et al.*, 2002). El análisis del gen en líneas de pérdida de función de *Arabidopsis* y trigo demostraron que *HKT1* media en el control de la absorción de Na^+ en la raíz (Rus *et al.*, 2001; Laurie *et al.*, 2002; Mäser *et al.*, 2002; Rus *et al.*, 2004). En recientes estudios parece que se ha determinado que la función primordial de *AtHKT1* es recuperar el Na^+ en la raíz desde el xilema para reducir su transporte hacia la parte aérea (Munns & Tester, 2008; Horie *et al.*, 2009; Plett & Møller, 2010).

El transporte de Na^+ desde la hoja hacia el floema también podría ayudar a mantener bajas concentraciones de iones en las hojas. Medidas de iones en la savia del floema han indicado que las especies más tolerantes excluyen Cl^- y Na^+ por el floema en mayor medida que las menos tolerantes (Munns, 2005). Perez-Alfocea *et al.* (2000) observaron más recirculación de Na^+ en el floema de la especie silvestre tolerante a la sal *Solanum pennellii* Correll que en el tomate cultivado. Asimismo, Matsuschita *et al.* (1991) encontraron mayor recuperación de $^{22}\text{Na}^+$ desde la parte aérea de *Phragmites communis* Trin. que en arroz (*Oryza sativa* L.). Por tanto, el transporte de Na^+ desde las hojas vía floema también puede ser importante en los mecanismos de tolerancia de las plantas a la salinidad (Tester & Davenport, 2003).

Los estudios realizados en *Arabidopsis* han demostrado que la ruta SOS es uno de los mecanismos más estrechamente relacionados con tolerancia a la componente iónica del estrés salino y desempeña un papel crucial en la

homeostasis iónica de las células expuestas a estrés salino. Los principales actores y regulación de esta ruta serán objeto de los siguientes apartados.

1.5.3.2.1 Regulación de la homeostasis iónica a través de la ruta SOS.

a) La ruta SOS en *Arabidopsis thaliana*

La identificación y caracterización de mutantes monogénicos recesivos alterados en un solo mecanismo de adaptación han sido claves para la disección de algunos de los mecanismos moleculares que regulan la tolerancia a sal. Este enfoque permitió el descubrimiento de genes esenciales en los mecanismos que promueven tolerancia a salinidad en levaduras (Mendoza *et al.*, 1994). Posteriormente, la identificación de mutantes hipersensibles a estrés salino en *Arabidopsis* hizo factible el descubrimiento de la ruta SOS (*Salt Overly Sensitive*). Los análisis de complementación genética en los mutantes hipersensibles permitieron identificar tres genes (*SOS1*, *SOS2* y *SOS3*) que son esenciales para la homeostasis del Na^+ y la tolerancia a la salinidad en *Arabidopsis*. Años más tarde se descubrirían otros dos componentes de esta ruta: *SOS4* (Shi *et al.*, 2002) y *SOS5* (Shi *et al.*, 2003)

b) Componentes de la ruta SOS.

La función de *SOS1* parece estar relacionada con los mecanismos que regulan la homeostasis del Na^+ y del K^+ , ya que el mutante *sos1* es hipersensible a Na^+ y Li^+ y su crecimiento se estanca en condiciones de bajos niveles de K^+ (Wu *et al.*, 1996). Estudios más detallados permitieron concluir que *SOS1* es un antiportador Na^+/H^+ localizado en la membrana plasmática (Shi *et al.*, 2002) específico de Na^+ y que no puede transportar Li^+ o K^+ (Qiu *et al.*, 2002). Según Shi *et al.* (2002), la proteína *SOS1* tiene 12 dominios transmembrana y una cola larga de más de 700 aminoácidos que permiten el transporte de Na^+ desde el citosol al espacio extracelular para prevenir su acumulación en el interior de la célula. La larga cola de la proteína *SOS1* sugiere que además de estar involucrada en el transporte de Na^+ le permite actuar como sensor de éste (Zhu, 2002). *SOS1* se detecta de forma ubicua en prácticamente todos los tejidos, aunque tiene más actividad en las células de la epidermis de la raíz (particularmente en el extremo de éstas) y en las células que bordean al xilema, lo que parece indicar que participa en el transporte de Na^+ desde la raíz al mesófilo foliar y que es esencial para la redistribución del Na^+ en los tejidos vegetales (Shi *et al.*, 2003). Con todo, el papel que desempeña *SOS1* revela la complejidad del estrés salino, ya que la

función de este gen parece ser diferente en función del nivel de estrés impuesto. En efecto, a niveles moderados de estrés salino, *SOS1* ejerce su función en el transporte de Na^+ a través del xilema desde la raíz a la parte aérea para almacenarlo en las células del mesófilo. La acumulación de Na^+ en estas células, con suficiente capacidad de compartimentación, facilitaría el ajuste osmótico y el desarrollo de la planta (Shi *et al.*, 2002). Sin embargo, a altos niveles de estrés salino, este transportador restringe la absorción de Na^+ en raíz joven y recupera Na^+ del xilema en raíz adulta. Ambos procesos ayudan a limitar la rápida acumulación de Na^+ en la parte aérea (Shi *et al.*, 2003).

El mutante *sos2* es también hipersensible a Na^+ y Li^+ y asimismo su crecimiento se estanca cuando los niveles de K^+ son bajos (Zhu *et al.*, 1998). *SOS2* (*CIPK24*) codifica para una proteína quinasa del tipo serina/treonina (Ser/Thr) de la familia SNF1/AMPK (Halfter *et al.*, 2000). En condiciones de estrés, *SOS2* es necesaria para que se active la expresión de *SOS1* a través de una interacción directa proteína-proteína (Shi *et al.*, 2002; Qiu *et al.*, 2002; Quintero *et al.*, 2002).

El mutante *sos3*, al igual que *sos1* y *sos2*, es hipersensible a Na^+ , Li^+ e incapaz de crecer a bajas concentraciones de K^+ . Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en *sos1* y *sos2*, en *sos3* el aumento extracelular de Ca^{2+} suprime el defecto de crecimiento en medios de cultivo con baja concentración de K^+ , además de suprimir parcialmente el fenotipo de hipersensibilidad a sal (Liu & Zhu, 1997). *SOS3* (*CBL4*) codifica para una proteína capaz de unirse al ión calcio (Ca^{2+}) previa miristoilación (Ishitani *et al.*, 2000). *SOS3* es capaz de detectar la señal de Ca^{2+} citosólico que se genera en condiciones de estrés salino. La unión con el ión Ca^{2+} conduce a una dramática modificación de la forma global, superficie molecular y propiedades de *SOS3* que son suficientes para transmitir la señal de Ca^{2+} a *SOS2* (Sánchez-Barrena *et al.*, 2005) a través del complejo *SOS3/SOS2* (*CBL4/CIPK24*) (Qiu *et al.*, 2002). *CBL10* es homólogo de *SOS3* y sólo se expresa en la parte aérea formando el complejo *CBL10/CIPK24* (Quan *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007). Además del papel que desempeña en condiciones de estrés salino al participar parcialmente en la ruta SOS (Kim *et al.*, 2007; Quan *et al.*, 2007), *CBL10* participa en la homeostasis de K^+ e inhibe la actividad de *AKT1* en raíces. En condiciones de estrés salino, el mutante *cb10* contiene significativamente menos Na^+ que el WT a pesar de exhibir un claro fenotipo de hipersensibilidad. Este hecho indica que *CBL10* podría estar implicado en una

nueva vía para la tolerancia a la sal desempeñando un papel crucial en la homeostasis de iones bajo condiciones de estrés a través de la regulación de Na^+ y K^+ (captación/translocación) (Ren *et al.*, 2013). Según Quan *et al.* (2007), *CBL10* también podría estar implicado en la compartimentación vacuolar de Na^+ .

El mutante *sos4* es hipersensible a Na^+ , K^+ , Li^+ , y bajo condiciones de estrés por NaCl acumula más Na^+ y retiene menos K^+ . *SOS4* codifica una piridoxal quinasa implicada en la síntesis de piridoxal 5 fosfato (PLP), una forma activa de la vitamina B6. PLP o sus derivados pueden regular canales iónicos y transportadores que son importantes para la tolerancia a la sal. Shi *et al.* (2002) reportaron que *SOS4*, que se expresa en todos los tejidos de la planta, está implicado en la regulación de la homeostasis del Na^+ y K^+ modulando la actividad de los transportadores de iones.

El mutante *sos5* es hipersensible a NaCl , LiCl y KCl , pero no a CsCl . En condiciones de estrés salino, las raíces de *sos5* se hinchan y detienen su crecimiento como consecuencia de una anormal expansión de las células epidérmicas, corticales y endodérmicas. En estas condiciones de estrés también se encuentran afectadas las paredes celulares que son más delgadas y muestran una reducción de la lamela media. *SOS5*, que se expresa de forma ubicua en todos los tejidos y órganos de la planta, codifica para una proteína de adhesión (similar a *AtAGP8*) de la superficie de la membrana plasmática que ayuda al mantenimiento, integridad y arquitectura de la pared celular. También se ha postulado la posibilidad de que actúe como sensor de Na^+ , aunque por el momento la función de la proteína *SOS5* no está muy clara (Shi *et al.*, 2003, Mahajan *et al.*, 2008).

c) Complejos CBL/CPIK

Desde el aislamiento y caracterización del sensor de Ca^{2+} *SOS3* (Liu & Zhu, 1998) y de su diana *SOS2* (Liu *et al.*, 2000), se han identificado otros nueve sensores y veinticinco quinzas que conforman dos nuevas familias de proteínas en *Arabidopsis*: *CBL* (*Calcineurin B-like*) y *CIPK* (*CBL-interacting protein kinases*). Los complejos *CBL/CIPK* son mecanismos de señalización como respuesta a un estímulo específico (Batistic & Kudla, 2004). En *Arabidopsis*, los 10 sensores de calcio (*CBLs*) y las 26 proteínas quinzas (*CPIKs*) pueden interactuar entre ellos permitiendo teóricamente hasta 260 complejos independientes (Weinl & Kudla, 2009).

CBL4/CIPK24 (*SOS3/SOS2*), el complejo más estudiado, fosforila al antiportador Na^+/H^+ de la membrana plasmática (*SOS1*) haciendo activa la extrusión de Na^+ de la célula (Xu *et al.*, 2006). De forma análoga, *CBL10*, homólogo de *SOS3*, interactúa con *CIPK24* para regular la salida de Na^+ a través de la membrana plasmática, pero sólo en las células del mesófilo de hoja. *CBL1/CBL9* interactúan con *CIPK23* y promueven la fosforilación de *AKT1*, lo que conduce a un aumento de la absorción de K^+ a través de este canal (Hedrich & Kudla, 2006). Recientemente se ha sabido que *CBL10* compite con *CIPK23* en el sitio de unión de *AKT1* inhibiendo corrientes de K^+ (Ren *et al.*, 2013).

d) Regulación de la ruta SOS

Las plantas han desarrollado maquinarias de señalización sofisticadas para adaptar su metabolismo celular a los cambios del medio ambiente (figura 1). La señalización es la base de la transducción de señales, proceso mediante el cual las plantas perciben las señales de diversos factores ambientales y las transmiten a la maquinaria celular para activar respuestas de modulación, adaptación y defensa. En condiciones de estrés abiótico se activan numerosas rutas de transducción de señal (Nakashima *et al.*, 2009). En primer lugar, la señal de estrés es percibida por los receptores de membrana. Estos receptores activan una compleja cascada de señalización que conduce a la generación de segundos mensajeros que incluyen, entre otros, al Ca^{2+} (Tuteja, 2007; Mahajan & Tuteja, 2005; Tuteja & Mahajan, 2007). Según Luan *et al.* (2002), la señalización por Ca^{2+} activa los mecanismos necesarios para el inicio de la homeostasis iónica y la desintoxicación de iones tóxicos. Los mecanismos de desintoxicación pueden ocurrir a través de dos vías: expulsar los iones tóxicos a través de la membrana plasmática hacia el exterior de la célula, o compartimentar los iones en orgánulos, especialmente en la vacuola (Hasegawa *et al.*, 2000).

El aumento de Ca^{2+} citosólico es detectado por sensores de Ca^{2+} , como *SOS3* que interactúa con *SOS2* formando el complejo *SOS3/SOS2* (Shi *et al.*, 2000). Este complejo fosforila y activa a *SOS1*, que transporta el Na^+ desde el citosol hacia el espacio extracelular, contribuyendo a la homeostasis de iones Na^+ (Liu & Zhu, 1998; Halfter *et al.*, 2000; Ishitani *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2000; Quintero *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2002). Por otro lado, *SOS2* podría activar los antiportadores Na^+/H^+ del tonoplasto (i.e. *NHX1*), secuestrando Na^+ en la vacuola. A la vez el complejo *SOS3/SOS2* inhibe la actividad del transportador de iones *HKT1* (transportador de baja afinidad de Na^+) restringiendo la entrada de Na^+ al citosol

(Mahajan & Tuteja, 2005). La regulación transcripcional de *NHX1* está mediada parcialmente por ABA a través de la vía *ABI1*¹ (Shi & Zhu, 2002; Yokoi *et al.*, 2002), mientras que *ABI2*¹ interactúa con *SOS2* para desfosforilar las proteínas que han sido fosforiladas por *SOS2* (e.g *NHX1*, *SOS1*) con el fin de restaurar la homeostasis después de una condición de estrés (Zhu, 2002; 2003). Cheng *et al.* (2004) observaron que *SOS2* responde a las señales medioambientales regulando la actividad del antiportador vacuolar $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ *CAX1*. Según estos autores, el principal objetivo de esta regulación vía *SOS2* es restaurar la homeostasis del Ca^{2+} . El hecho de que la activación de *CAX1* a través de *SOS2* sea independiente de *SOS3* sugiere un vínculo mecanicista entre la homeostasis del Na^+ y del Ca^{2+} .

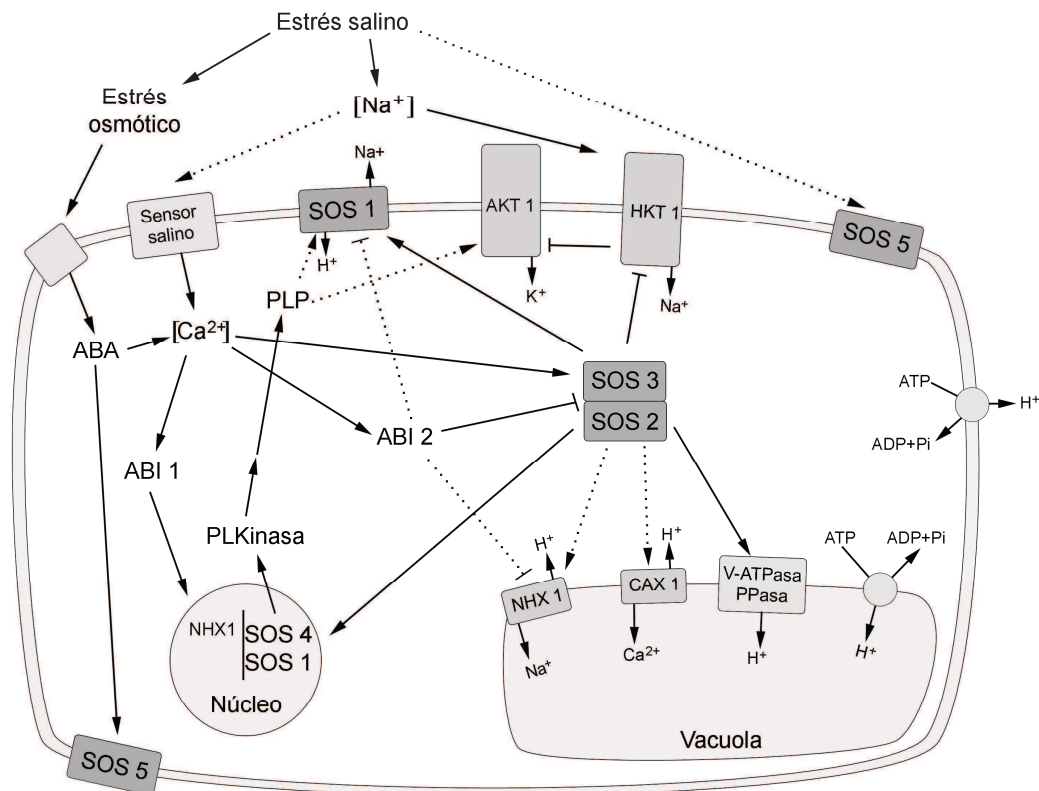


Figura 1. Regulación de la homeostasis iónica a través de la ruta SOS. El estrés salino induce una señal por Ca^{2+} que activa el complejo *SOS3/SOS2*. Este complejo fosforila el antiportador Na^+/H^+ de membrana plasmática *SOS1* y regula la expresión de otros genes. *SOS2* activa el antiportador Na^+/H^+ (*AtNHX1*) del tonoplasto para almacenar Na^+ en la vacuola y regula la actividad del antiportador H^+/Ca^+ *CAX1*. El complejo *SOS3/SOS2* regula negativamente la actividad de *AtHKT1*. *SOS4* (implicado en la biosíntesis de PLP) contribuye a la homeostasis del Na^+ y K^+ a través de la regulación de canales de iones y transportadores. *SOS5* está implicado en el mantenimiento de la expansión celular. Figura modificada a partir de Türkan & Demiral, 2009.

¹ Los genes *ABI1* y *ABI2* (por ABA-INSENSITIVE 1 y 2) codifican para proteínas fosfatasa 2C implicadas en la transducción de señal mediada por ABA

El estrés por sal aumenta la actividad hidrolítica de las ATPasas, responsables de generar la fuerza motriz de H^+ en los antiportadores (Shabala & Cuin, 2008). Batelli *et al.* (2007) reportaron que la interacción directa entre SOS2 y las H^+ -ATPasas de la vacuola promueve el transporte de protones y mejora la tolerancia a la salinidad (Batelli *et al.*, 2007). SOS4, que codifica para una piridoxal (PL) quinasa y cataliza la biosíntesis de piridoxal 5-fosfato (PLP), contribuye en la homeostasis iónica regulando la actividad de transportadores y canales iónicos. De hecho, se ha reportado que SOS4 podría regular a SOS1 (Shi *et al.*, 2002) y el transportador de potasio *AKT1* (Lee *et al.*, 2007) a través de PLP.

e) La ruta SOS en tomate

El descubrimiento de los mutantes *sos* de *Arabidopsis* ha sido crucial para entender los mecanismos de tolerancia a salinidad y homeostasis iónica en plantas. Sin embargo, diversos autores coinciden en el hecho de que este modelo puede que no sea la mejor elección a la hora de estudiar el transporte de Na^+ a larga distancia (Essah, Davenport & Tester, 2003; Tester & Bacic, 2005). Su corto tallo no permite una precisa detección del contenido relativo de Na^+ en tallo frente a la hoja.

Habida cuenta de que tomate puede ser una buena alternativa debido a su estructura anatómica y fisiológica, Olías *et al.* (2009) clonaron el gen *S/SOS1* de *Solanum lycopersicum*, homólogo de *AtSOS1*, con el objeto de evaluar el papel que desempeña en el transporte de Na^+ a larga distancia y en la tolerancia a salinidad. Los autores observaron que las plantas con *S/SOS1* silenciado eran más sensibles a la salinidad. En efecto, las plantas RNAi-*S/SOS1* acumulaban más Na^+ en raíz y hoja, mientras que en tallo la concentración de Na^+ se mantenía estable, al contrario que en el control que acumulaba mayores concentraciones de Na^+ en tallo. El trabajo permitió demostrar que *S/SOS1* resulta esencial para el transporte de Na^+ en raíz y la retención en tallo, impidiendo que el ión alcance los tejidos fotosintéticos. Según Pardo *et al.* (2012) *SOS1* se debe coordinar con *HKT1* para el transporte a larga distancia de Na^+ y su posterior distribución a los tejidos fotosintéticos

Huertas *et al.* (2012), clonaron el homólogo funcional de *AtSOS2* en tomate (*S/SOS2*). Según estos autores, las plantas sobreexpresoras de *S/SOS2* eran más tolerantes a la salinidad. En estas plantas se producía una mayor acumulación de Na^+ en tallo y hoja así como la inducción y sobrerregulación de *S/SOS1*. Además, la sobreexpresión de *S/SOS2* promovía un mayor nivel de

expresión de los antiportadores *LeNHX2* y *LeNHX4* (implicados en la compartimentación vacuolar de H^+ , Na^+ y K^+), las dos isoformas de tomate más activas de las cuatro que se han identificado (Gálvez *et al.*, 2012; Rodríguez-Rosales *et al.*, 2008). Según Belver *et al.* (2012), *SISOS2* parece estar implicado en la tolerancia a la salinidad regulando la extrusión de Na^+ desde la raíz, activando la carga de Na^+ en el xilema y modulando la compartimentación de Na^+ y K^+ .

1.5.3.3. Defensa frente al estrés oxidativo.

Se ha podido demostrar que diversos tipos de estrés abiótico van acompañados de la formación de intermediarios de oxígeno reactivo. La disminución de la disponibilidad de agua conduce a la reducción de la actividad fotosintética. En estas condiciones, los cloroplastos se exponen a un exceso de excitación de energía y se produce la fotorreducción del oxígeno además de una concomitante producción de intermediarios de oxígeno reactivo (ROS). Según Munns & Tester (2008), las plantas responden aumentando la actividad superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa y catalasa, encargadas de neutralizar los intermediarios de oxígeno reactivo. Estas moléculas tóxicas son muy reactivas e interactúan con estructuras celulares y metabolitos provocando procesos destructivos y daños a nivel celular, principalmente en cloroplastos y mitocondrias (Mahajan *et al.*, 2008). Aunque los niveles son mayores en condiciones de estrés, los intermediarios de oxígeno reactivo se producen también en condiciones normales en mitocondrias y cloroplastos. De hecho, se ha comprobado que los intermediarios de oxígeno reactivo desempeñan un papel importante en algunos procesos fisiológicos como por ejemplo la señalización celular, la regulación génica, la senescencia, la muerte celular programada y la defensa de patógenos (Zhu, 2002; Mahajan *et al.*, 2008; Eltelib *et al.*, 2012).

A lo largo de la evolución, las plantas han desarrollado un sistema antioxidante enzimático (superóxido dismutasa, peroxidasas, catalasas) y otro no enzimático (ácido ascórbico, glutatión, otros osmolitos, etc.) (Hossain *et al.*, 2007; Aslam *et al.*, 2011; Eltelib *et al.*, 2012). La superóxido dismutasa (SOD) constituye la primer línea de defensa frente al estrés oxidativo catalizando la dismutación de dos radicales superóxido (O_2^-) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno (O_2). Asimismo, puede obstaculizar la reducción de iones metálicos y la síntesis de radicales hidroxilo (Parida & Das, 2005; Türkan & Demiral, 2009). El ácido abscísico (ABA) es también capaz de inducir una mayor producción de H_2O_2 ,

actuando como un segundo mensajero para regular genes de defensa antioxidante en condiciones de estrés abiótico (Guan *et al.*, 2000; Pei *et al.*, 2000; Roy & Sengupta, 2014). El H_2O_2 , que ocasiona daños a las proteínas y al ADN además de promover la peroxidación de lípidos, es eliminado por mediación de las catalasas y peroxidasas (Hossain *et al.*, 2007). La catalasa (CAT) cataliza la reducción de H_2O_2 en oxígeno y agua. Las peroxidasas se dividen en dos tipos: la ascorbato peroxidasa (APX) localizada en el cloroplasto, citosol, mitocondria, peroxisomas y apoplasto (Türkan & Demiral, 2009), y la glutatión peroxidasa (GPX) que se encuentra en los peroxisomas (Foyer & Noctor, 2005; Türkan & Demiral, 2009; Rai *et al.*, 2011; Eltelib *et al.*, 2012). La actividad coordinada de las múltiples formas de estas enzimas en los diferentes compartimentos celulares permite un equilibrio entre la tasa de formación y eliminación de intermediarios de oxígeno reactivo, y mantiene el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en los niveles requeridos para que la señalización celular tenga lugar (Munns & Tester, 2008).

Respecto a la defensa no enzimática, se ha sugerido que la función de azúcares, polioles, glicinabetaína y posiblemente prolina podría ser la protección celular frente a radicales hidroxilo (Cuartero *et al.*, 2008). Los mejores resultados se han obtenido con polioles lineales tales como el manitol, polioles metilados, el aminoácido ectoína y la glicinabetaína (Sickler *et al.*, 2007). Aunque estos metabolitos son efectivos contra radicales de oxígeno, lo que no parece estar muy claro es su modo de acción. Los mayores avances en este campo se han obtenido mediante ingeniería genética (Bartels y Sunkar, 2005). Así pues, para estudiar el efecto que podría tener la acumulación de ciertos polioles, Tarczynski *et al.* (1993) utilizaron plantas transgénicas de tabaco que expresaban genes relacionados con la síntesis de manitol y sorbitol. A 200 mM de ClNa se observó que la fijación de CO_2 y la eficiencia del fotosistema II en las plantas transgénicas que acumulaban sorbitol era mayor que en las plantas control. Por otro lado, Sheveleva *et al.* (1997) observaron que en plantas transgénicas de tabaco que acumulaban sorbitol se producía una menor inducción de los genes que codifican para superóxido dismutasa y catalasa. Según los autores, esto podría deberse a que las plantas transgénicas producen menos radicales de oxígeno reactivo, o a que el estrés se percibe de una forma menos severa.

1.5.4. Mejora de la tolerancia a la salinidad mediante transformación genética

Las investigaciones encaminadas al aumento de la tolerancia a la salinidad en especies de interés agronómico mediante métodos clásicos de mejora o algunas aproximaciones biotecnológicas (e.g. selección *in vitro*) han dado escasos resultados (Flowers, 2004; Yamaguchi & Blumwald, 2005) y ello explica las expectativas que se generaron en torno al empleo de una aproximación basada en la transformación. Los numerosos trabajos que se han publicado en este campo de investigación muestran la posibilidad de conseguir un aumento de la tolerancia a la salinidad a través de la sobreexpresión de genes endógenos o, más habitualmente, mediante la expresión heteróloga de genes que supuestamente actúan en diferentes mecanismos relacionados con el carácter. Los genes que se han transferido a plantas transgénicas pertenecen, principalmente, a dos categorías: genes estructurales y genes reguladores. El primer grupo incluye genes que codifican proteínas funcionales que, de una u otra forma, confieren una cierta tolerancia, entre las que se encuentran las proteínas LEA, chaperonas y proteínas ligadas al ARNm (revisado por Wang *et al.*, 2003), proteínas relacionadas con canales de agua (revisado por Forrest & Bhave, 2007), transportadores de iones (revisado por Yamaguchi & Blumwald, 2005; Chinnusamy *et al.*, 2005), enzimas implicados en la eliminación de radicales hidroxilo (revisado por Apel & Hirt, 2004) y enzimas implicados en la síntesis de osmolitos (revisado por Chen & Murata, 2002; Penna, 2003; Kishor *et al.*, 2005). El segundo grupo está compuesto por genes que codifican factores de transcripción y proteínas implicadas en la regulación de la transducción o recepción de señales (revisado por Kaur & Gupta, 2005; Agarwal *et al.*, 2006).

En relación con la transferencia de genes estructurales, los primeros trabajos estuvieron relacionados principalmente con la sobreexpresión de genes que codificaban para solutos metabólicamente compatibles (Penna, 2003; Kishor *et al.*, 2005; Chen & Murata, 2002). En este sentido, se pudo comprobar que la biosíntesis de trealosa en plantas transgénicas de tabaco, *Arabidopsis*, patata o arroz mejoraba la tolerancia a salinidad o estrés hídrico (Iordachescu & Imai, 2008). En tomate se utilizó el gen *TPS1* de levadura que codifica para trealosa-6-fosfato sintetasa bajo el control del promotor 35S para mejorar la tolerancia al estrés (Cortina & Culiáñez-Macià, 2005). Se pudo observar que en condiciones de salinidad, sequía y estrés oxidativo las plantas transgénicas de tomate eran más

tolerantes que el WT. Sin embargo exhibían efectos pleiotrópicos (fenotipos anómalos) consecuencia de la acumulación de trealosa-6-fosfato. Se ha propuesto que estos problemas podrían ser solventados utilizando la fusión TPS-TPP (trealosa-6-fosfato sintetasa / trealosa-6-fosfato fosfatasa) bajo el control de un promotor inducible, dirigiendo el producto génico hacia los cloroplastos (Garg *et al.*, 2002; Miranda *et al.*, 2007) o utilizando otros genes implicados en la biosíntesis de trealosa (trealosa fosforilasa) que eviten la acumulación de trealosa-6-fosfato (Han *et al.*, 2005). La glicinbetaína es otro de los osmolitos que parece proteger a las plantas frente a estreses abióticos (Türkan & Demiral, 2009). En tomate, se ha reportado que las plantas transgénicas con el gen BADH de *Atriplex hortensis* mejoran su tolerancia a la salinidad (Jia *et al.*, 2002). También se ha observado que la acumulación de glicinbetaina es más efectiva en cloroplastos que en el citosol (Park *et al.*, 2007), tal y como se había reportado en arroz (Sakamoto *et al.*, 1998).

Como se ha comentado en un párrafo anterior, otra estrategia ha sido el empleo de genes que codifican para proteínas asociadas funcionalmente con la protección de macromoléculas, como proteínas LEA, osmotina, chaperonas, proteínas ligadas al ARNm o con la protección del metabolismo de enzimas clave. Muñoz-Mayor *et al.* (2012) señaló que las plantas transgénicas que sobreexpresan *tas14*, un gen tipo LEA de tomate que se induce en condiciones de estrés osmótico y ABA, exhiben mayor tolerancia a los estreses hídrico y salino sobre la base de mayor tolerancia a estrés osmótico (reducción del potencial osmótico y acumulación de solutos). Las medidas de ABA indicaron que el mecanismo de acción del gen *tas14* estaba relacionado con una rápida y mayor acumulación de ABA en hojas a lo largo de los primeros días de estrés.

La salinidad induce estrés oxidativo. En tomate se ha demostrado que en condiciones de sequía o estrés por frío, la sobreexpresión del gen *KatE* de *Escherichia coli* que codifica para una catalasa incrementa la tolerancia al estrés foto-oxidativo impuesto por estos dos tipos de estrés abiótico (Mohamed *et al.*, 2003). Se ha reportado que la expresión conjunta de más de un gen implicado en la protección frente al estrés oxidativo incrementa la tolerancia a diferentes tipos de estrés abiótico (Zhao *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007).

Una aproximación alternativa para aumentar la tolerancia a estrés salino ha sido el empleo de genes implicados en el transporte de iones (Yamaguchi & Blumwald, 2005; Forrest & Bhave, 2007). Los trabajos realizados por nuestro

grupo han indicado que la expresión del gen *HAL1* de levadura (clonado por el grupo del Dr. Serrano; IBMCP, Valencia) en plantas transgénicas de tomate (Gisbert *et al.*, 2000) conduce a un aumento de la tolerancia a la salinidad, tanto en callos como en plantas cultivadas a distintos niveles salinos. Los trabajos efectuados por el grupo de la Dra. Bolarín (CEBAS, Murcia) han mostrado que el mecanismo de acción del gen en las plantas (Gisbert *et al.*, 2000) simula el que previamente se había observado en levaduras (Serrano, 1996) y que la producción en una familia transgénica (TG2) de tomate se ve menos afectada por el estrés salino (35 mM) que la población original (Rus *et al.*, 2001). Muñoz-Mayor *et al.* (2008) compararon la tolerancia a la salinidad en líneas homocigóticas, hemicingóticas y acigóticas para *HAL1*. Observaron que la menor acumulación de sodio en hojas de plantas homocigóticas no se correlaciona con mayor tolerancia a salinidad ya que, para la homeostasis osmótica, estas plantas sintetizan mayor concentración de solutos orgánicos, lo que resulta más costoso desde un punto de vista energético. Más recientemente, García-Abellan *et al.* (2014) observaron mayor tolerancia a la salinidad en plantas transgénicas de tomate que sobreexpresaban el gen *HAL5*, un gen de levadura que codifica para una proteína kinasa implicada en la regulación de los transportadores *TRKs* y la modulación de la expresión de *HAK1*. Según los autores, las plantas transgénicas acumulan menos Na^+ en hojas en condiciones salinas, lo que parece estar correlacionado con el mayor nivel de expresión de los genes *SIHKT1;2* y *SIHAK5* en estas plantas.

La estrategia basada en la utilización de antiportadores ha generado también grandes expectativas en estos últimos años. En este sentido, conviene hablar de los trabajos publicados por el grupo que dirige el Dr. Eduardo Blumwald en la Universidad de Toronto (Canadá), que están relacionados con la sobreexpresión de un antiportador vacuolar Na^+/H^+ de *Arabidopsis thaliana* (*AtNHX1*). En el primer trabajo, publicado por Apse *et al.* (1999), se describía el efecto de la sobreexpresión del gen *AtNHX1* en la propia planta (*Arabidopsis thaliana*). Los autores observaron que el crecimiento de las plantas transgénicas no se veía afectado por tratamientos de 200 mM de NaCl, mientras que las plantas no transformadas reducían considerablemente su desarrollo, al tiempo que mostraban síntomas progresivos de clorosis con los sucesivos tratamientos. En tomate, Zhang & Blumwald (2001) describen que las plantas transgénicas de tomate que sobreexpresan el gen *AtNHX1* son capaces de crecer, florecer y producir frutos a 200 mM de NaCl, mientras que los controles mueren a estas

concentraciones salinas. Conviene indicar que tanto los resultados de este trabajo como el mecanismo de acción del gen *AtNHX1* han sido cuestionados por diversos investigadores (Cuartero *et al.*, 2006; Flowers, 2004; Pardo *et al.*, 2006). Según Zhang & Blumwald (2001), las hojas de las plantas transgénicas llegaban a acumular hasta casi el 1% de su peso en sodio, en tanto que el fruto mostraba solamente un aumento marginal en el contenido de sodio y un incremento del 25% en el contenido de potasio. Leidi *et al.* (2010) demostraron que la sobreexpresión de *AtNHX1* en tomate puede incrementar la tolerancia a la salinidad sin incrementar la acumulación de Na^+ en la vacuola. Los autores sugieren que esta tolerancia deriva del papel que desempeña el gen en la homeostasis del K^+ . En relación con este mecanismo de tolerancia, se han clonado y caracterizado nuevos genes *AtNHX* y se han identificado sus ortólogos en otras especies, entre ellas *S. lycopersicon*. Así pues, Rodríguez-Rosales *et al.* (2008) estudiaron la función del antiportador K^+/H^+ de tomate *LeNHX2*. Comprobaron que, en presencia de NaCl , las plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresaban *LeNHX2* contenían menor concentración de Na^+ y más de K^+ que los controles no transformados. Asimismo, observaron que el silenciamiento de *LeNHX2* en tomate confería mayor sensibilidad a la salinidad.

Siguiendo con el tema de los transportadores iónicos, los resultados del trabajo realizado por Olías *et al.* (2009) con el antiportador Na^+/H^+ de tomate *S/SOS1* también parecen indicar que el gen está implicado en los mecanismos de tolerancia a la salinidad de esta especie (ver apartado 1.5.3.2.1). Se ha observado que la pirofosfatasa vacuolar *AVP1* confiere mayor tolerancia a la salinidad cuando se sobreexpresa en *Arabidopsis* (Gaxiola *et al.*, 2001). En tomate se ha comprobado que la sobreexpresión de *AVP1* conduce a un mayor transporte de cationes mediado por la pirofosfatasa hacia las vacuolas de la raíz. En las plantas transgénicas se produce además un incremento de la biomasa radicular, lo que mejora la recuperación de las plantas después de un tratamiento de estrés hídrico (Park *et al.*, 2005).

Como se comentaba al principio de este apartado, otras dianas en este campo de investigación han sido los genes reguladores, tales como factores de transcripción o genes que codifican para componentes de las rutas de transducción (Kaur & Gupta, 2005; Agarwal *et al.*, 2006). El empleo de estos reguladores ha generado muchas expectativas ya que pueden activar a muchos genes que se encuentran corriente abajo de los mismos. Se han identificado

factores de transcripción pertenecientes a diferentes familias (e.g. AP2/ERF, bZIP, NAC, MYB, MYC, Cys2His2 o WRKY) que regulan la respuesta frente al estrés en plantas, no sólo en lo que respecta a diferentes tipos de estrés abiótico, sino también en la respuesta de defensa frente a patógenos, varios procesos fisiológicos, rutas de señalización hormonal y procesos del desarrollo (Agarwal *et al.*, 2006; Ham *et al.*, 2006; Sohn *et al.*, 2006; Ogawa *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2007^a, 2007b; Dai *et al.*, 2007; Nakashima *et al.*, 2007). Por ejemplo, se ha documentado que las proteínas ERF integran señales de diferentes rutas hormonales y desempeñan un papel en respuesta a estrés (Gu *et al.*, 2002, Lorenzo *et al.*, 2003). Huang *et al.* (2004) identificó un nuevo gen que codifica para una proteína ERF en tomate (*TERF1*). La sobreexpresión de *TERF1* en tabaco activaba la expresión de genes asociados a patogénesis y daba lugar a la típica triple respuesta al etileno. Los autores del trabajo también observaron que las plantas que sobreexpresaban *TERF1* eran más tolerantes a estrés salino. Seong *et al.* (2007) reportaron que las plantas de tomate que sobreexpresaban el gen *CaKR1*, implicado en la regulación transcripcional de la respuesta a patógenos y estreses abióticos, eran más resistentes a *Phytophthora infestans* y exhibían mayor tolerancia a salinidad y estrés oxidativo. También se ha reportado en tomate mayor tolerancia a estrés hídrico y virus mediante la sobreexpresión del gen de arroz *Osmyb4*, que codifica para un factor de transcripción tipo MYB (Vannini *et al.*, 2007).

Los microRNAs (miRNAs) son pequeñas moléculas de RNA no codificante de 22 nucleótidos que regulan de manera post-transcripcional la expresión génica mediante la degradación de RNAm o la represión transduccional de secuencias específicas. A lo largo de los últimos años diversos trabajos han demostrado la implicación de estas pequeñas moléculas señalizadoras en los procesos de tolerancia a estrés abiótico en plantas. En *Arabidopsis* se han identificado diferentes miRNAs que se inducen (i.e. miR156, miR158, miR159, miR165, miR167, miR168, miR169, miR171, miR319, miR393, miR394, miR396 y miR397) o reprimen (i.e. miR398) en condiciones de estrés salino (Liu *et al.*, 2008). En *Phaseolus vulgaris* se ha observado la inducción de miRS1 y miR159.2 en respuesta a estrés salino (Arenas-Huertero *et al.*, 2009), mientras que en *P. trichocarpa* se vio que se inducían los miRNAs miR530a, miR1445, miR1446a-e, miR1447, y miR171l-n; y que miR482.2 y miR1450 reducían su actividad. Una amplia revisión sobre miRNAs que se activan o reprimen en respuesta a estrés salino se puede encontrar en Mangrauthia *et al.* (2013). Como ya se ha

comentado, la superóxido dismutasa (SOD) desempeña un papel importante en la tolerancia al estrés oxidativo que se genera en condiciones de estrés abiótico (apartado 1.5.3.3). Se ha demostrado que en *Arabidopsis*, la expresión de la SOD citosólica (CSD1) y cloroplástica (CSD2) está regulada por el micro RNA miR398 (Sunkar *et al.*, 2006; Yamasaki *et al.*, 2007; Jagadeeswaran *et al.*, 2009). Sunkar *et al.* (2006) vieron que bajo condiciones de estrés salino, la menor actividad transcripcional de miR398 conduce a una mayor acumulación de CSD1 y CSD2, y, en consecuencia, a una mayor tolerancia a estrés. Empleando una forma mutada de miR398 en plantas transgénicas, Sunkar *et al.* (2006) consiguieron incrementar notablemente la acumulación de CSD2 y, con ello, la tolerancia al estrés. Por otro lado, el microRNA319 (miR319) constituye una familia de microRNAs conservada en plantas y está implicado en la regulación de factores de transcripción (Axtell & Bowman, 2008). Se sabe que miR319 se encuentra regulado por estímulos ambientales, lo que sugiere que debe desempeñar alguna función en la respuesta frente a estrés abiótico. Para verificarlo, Zhou *et al.* (2013) sobreexpresaron el gen *miR319* de arroz (*Osa-miR319*) en *Agrostis stolonifera*. Observaron que las plantas transgénicas exhibían cambios morfológicos (i.e. hojas más gruesas) aunque también mayor tolerancia a salinidad y estrés hídrico como consecuencia de un incremento en el contenido de ceras de la hoja y menor absorción de Na⁺. En el trabajo se demostró que la mayor tolerancia a ambos tipos de estrés estaba correlacionada con la menor actividad de los genes diana de miR319. Según Zhou *et al.* (2013), las plantas transgénicas de arroz que sobreexpresan el gen *miR319* exhiben mayor regulación del transportador de Na⁺ *OsHKT2*. Sunkar & Zhu (2004) reportaron que miR393 es una familia de micro RNAs muy conservada y que se encuentra en especies muy distintas como *Arabidopsis* y arroz. Estos autores comprobaron que el nivel de expresión de alguno de los miembros de la familia miR393 de *Arabidopsis* cambia en condiciones de estrés salino. Recientemente Gao *et al.* (2011) verificaron que el nivel de expresión de uno de los dos miembros de la familia miR393 de arroz, en concreto el denominado *osa-MIR393*, se ve alterado en condiciones salinas. Los autores de este trabajo observaron que en las plantas transgénicas de *Arabidopsis* y arroz que sobreexpresaban *osa-MIR393* eran más sensibles a estrés salino. En definitiva, no se puede descartar que la manipulación de estas nuevas rutas de regulación génica dirigidas por cadenas cortas de ARN constituya una nueva vía para la mejora genética de la tolerancia a la salinidad en plantas.

En conjunto, los resultados conseguidos en este campo de investigación indican que se puede conseguir un cierto incremento de tolerancia a estrés abiótico mediante la sobreexpresión de diferentes tipos de genes implicados en el carácter. Desafortunadamente, no se puede concluir que por el momento se hayan obtenido cultivares de tomate verdaderamente tolerantes (i.e. con un nivel de tolerancia suficiente desde un punto de vista agronómico) utilizando esta estrategia de mejora (Pineda *et al.*, 2012). Desde nuestro punto de vista, el objetivo prioritario en este campo sigue siendo la identificación de genes realmente implicados en el proceso de tolerancia. A la hora de abordar este reto, convendría plantearse si, en lugar de buscarlos en los modelos habituales (sensibles a salinidad), no sería mejor hacerlo en plantas tolerantes. Flowers & Colmer (2008) revisaron los mecanismos de tolerancia en halofitas (plantas capaces de sobrevivir y reproducirse en ambientes donde la concentración salina es igual o mayor a 200 mM) y propusieron que la investigación futura se debería centrar en un número limitado de halofitas 'modelo' que fueran representativas de los distintos mecanismos implicados en la tolerancia. Su propuesta es muy sensata, pero como estas halofitas están muy alejadas evolutivamente de las especies principales de cosecha, quizá sería mejor aprovechar las fuentes de variación relacionadas con tales especies. El tomate es, en este sentido, un excelente candidato porque es una especie cultivada de enorme importancia agronómica y hay accesiones de especies silvestres relacionadas que exhiben un alto grado de tolerancia a la salinidad.

1.5.5. Especies silvestres afines al tomate como fuente de variabilidad genética para la mejora de la tolerancia a la salinidad.

El tomate es la especie que menor variabilidad genética posee dentro del género *Solanum* (Peralta & Spooner, 2005). Posee sólo el 5% de la variabilidad genética total de las especies de la sección *Lycopersicon* como consecuencia de la selección que aconteció durante el proceso de domesticación (Miller & Tanksley, 1990) y de las selecciones posteriores que han dado lugar al desarrollo de los cultivares modernos (Miller & Tanksley, 1990; Ladizinsky, 1998). Es por ello que la transferencia de genes desde las especies silvestres hacia el tomate ha sido y seguirá siendo la base genética fundamental para el logro de cultivares con caracteres mejorados (Foolad, 2007). Uno de los objetivos de los programas modernos de mejora genética de tomate es aumentar la diversidad genética en la

especie cultivada sobre la base de la identificación de caracteres de interés agronómico en las accesiones silvestres.

Entre los caracteres más deseables desde un punto de vista agronómico de las especies silvestres del género *Solanum* secc. *Lycopersicon* destacan la tolerancia a diferentes tipos de estreses bióticos y abióticos (tabla 7). Por ejemplo, *S. pennellii* es muy tolerante a estrés hídrico, *S. habrochaites* lo es al frío y las heladas, además de mostrar resistencia a insectos y enfermedades, algunas accesiones de *S. lycopersicum* L. var. *cerasiforme* son tolerantes a la humedad y los hongos, *S. pimpinellifolium* presenta resistencias a diferentes tipos de enfermedades y *S. cheesmaniae* exhibe una elevada tolerancia a estrés salino (Esquinas-Alcázar & Nuez, 1995).

Tabla 7. Caracteres de interés agronómico de las especies silvestres del género *Solanum* secc. *Lycopersicon*. Fuente: Diez & Nuez, (2008)

Especie	Carácter de interés
<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> L.	Tolerancia humedad, resistencia a hongos y podredumbre de la raíz.
<i>S. cheesmaniae</i> y <i>S. galapagense</i>	Tolerancia a salinidad, genes "jointless" y grosor del pericarpio.
<i>S. pimpinellifolium</i> L.	Color, características de calidad y resistencia a enfermedades.
<i>S. chmielewskii</i>	Alto contenido de azúcares.
<i>S. neorickii</i>	Resistencia a bacterias.
<i>S. pennellii</i>	Resistencia a la sequía.
<i>S. habrochaites</i>	Tolerancia a frío y heladas, resistencia a insectos y enfermedades
<i>S. chilense</i>	Resistencia a sequía y enfermedades
Complejo <i>Peruvianum</i>	Resistencia a virus, hongos y bacterias

Además del tomate, en otras especies como arroz, trigo, cebada, soja, garbanzo o pimienta ya se han llevado a cabo programas de mejora exitosos a través de hibridación con especies silvestres y empleo de QTLs y marcadores moleculares, lo que ha permitido conseguir incrementos en el rendimiento de los cultivos (Bernacchi *et al.*, 1998; Francia *et al.*, 2005; Gur & Zamir, 2004). El uso de marcadores moleculares y técnicas de selección asistida por marcadores ha facilitado la identificación, mapeo y la transferencia de muchos genes de resistencia a enfermedades en tomate. Uno de los primeros genes introgresados en tomate fue el gen *Mi*, que confiere resistencia no completa a varias especies del género *Meloidogyne* (Laterrot, 2000). Otro ejemplo es el gen *Pto*, originalmente descubierto en *S. pimpinellifolium*, que confiere resistencia contra

las cepas de *Pseudomonas syringae* que poseen el gen de avirulencia *avrPto* (Ronald *et al.*, 1992; Martin *et al.*, 1993). En un buen número de variedades de tomate, especialmente las que se cultivan en invernadero, se han introgresado genes de resistencia a hongos (e.g. *Ve* (Cannon & Waddoups, 1952), *I*, *I-2* (Kesavan & Choudhuri, 1997), *Frl* (Berry & Oakes, 1987), *Asc* (Clouse & Gilchrist, 1987), *Cf-serie* (Kerr *et al.*, 1971), *Sm* (Andrus *et al.*, 1942), *Ph-2* (Moreau *et al.*, 1998) y *Lv* (Stamova & Yordanov, 1990)), virus (e.g. *Sw-5* (Stevens *et al.*, 1995) y *Ty-1* (Zamir *et al.*, 1994)), bacterias (*Pto* (Pitblado & MacNeill, 1983)) y nematodos (*Hero* (Ellis & Maxon-Smith, 1971)).

Por lo que respecta a estreses de tipo abiótico, aunque el tomate cultivado está ampliamente adaptado a diferentes climas, es una especie bastante sensible a diferentes tipos de estrés medioambiental, lo que incluye salinidad, estrés hídrico, exceso de humedad, temperaturas extremas, toxicidad y deficiencia de minerales, y polución ambiental. Es decir, la variación genética para la tolerancia a diferentes tipos de estrés abiótico es muy limitada en la especie cultivada, siendo la mayor parte de los cultivares comerciales moderadamente sensibles o muy sensibles a casi todos los estreses de tipo medioambiental. Afortunadamente, existen fuentes genéticas de tolerancia a estreses abióticos en *S. chilense*, *S. peruvianum*, *S. pennellii*, *S. pimpinellifolium*, *S. hirsutum*, *S. cheesmaniae*, *S. chmielewskii*, y *S. parviflorum* (Foolad, 2007). Lyon (1941) fue un pionero en este campo. Sugirió que se podría mejorar la tolerancia a la salinidad en el tomate cultivado a través de la introgresión de genes de *Solanum pimpinellifolium*. Posteriormente, diversos investigadores han tratado de explotar fuentes genéticas relacionadas con la tolerancia a la salinidad utilizando accesiones de especies silvestres (i.e. *S. cheesmaniae*, *S. peruvianum*, *S. pennellii* o *S. hirsutum*) que se podían cruzar con menor o mayor dificultad con el tomate cultivado (Dehan & Tal, 1978; Phills *et al.*, 1979; Rush & Epstein, 1976; Tal, 1971). Rush & Epstein (1981) determinaron que la tolerancia a la salinidad de la accesión LA1401 de *S. cheesmaniae* se podía heredar en poblaciones de retrocruce obtenidas entre esta accesión silvestre y un cultivar sensible a salinidad de tomate. Asimismo, Asins *et al.* (1993), tras evaluar y caracterizar una progenie F2 procedente del cruce entre una línea sensible a salinidad de tomate y una accesión tolerante de *S. pimpinellifolium*, observaron que la producción total y el número de frutos por planta eran criterios de selección útiles para mejorar la tolerancia a la salinidad del tomate cultivado.

Según Ashraf & Akram (2009), a lo largo del siglo XX se han conseguido logros notables en la mejora de la producción y de la calidad mediante estrategias de mejora convencional; sin embargo, existen comparativamente muy pocos resultados sobre mejora de la tolerancia a estreses de tipo abiótico, especialmente estrés salino. La ausencia de resultados podría deberse a la complejidad del carácter (Flowers, 2004), a lo que habría que añadir la dificultad y tiempo requerido para seleccionar adecuadamente los genotipos de interés (Ashraf & Akram, 2009). A esto habría que sumar el hecho de que los genes deseables se transfieren junto con otros no deseables que deben ser eliminados. Además, se ha descrito que ciertas barreras reproductivas entre diferentes fuentes interespecíficas limitan la transferencia de los alelos favorables (Ashraf & Akram, 2009). También se ha señalado que una de las limitaciones a la hora de desarrollar cultivares tolerantes a estrés salino a través de métodos convencionales de mejora es la ausencia de criterios de selección (Ashraf *et al.*, 2008). No se puede descartar, en este sentido, que la dificultad a la hora de seleccionar genotipos tolerantes esté relacionada con la variación de la respuesta al estrés de las plantas en función del estadio de desarrollo. Así pues, Foolad (2004) destaca que puede que la tolerancia al estrés sea un carácter regulado de forma específica para una etapa de desarrollo, es decir, la tolerancia en un estadio de desarrollo de la planta puede que no se correlacione con la tolerancia en otro estadio. Esto querría decir que para obtener una tolerancia global a un estrés ambiental podrían ser necesarios los mecanismos de tolerancia en cada uno de los estadios de desarrollo, lo que incluye, al menos, tolerancia en la etapa de germinación de las semillas, tolerancia en la etapa de desarrollo vegetativo, tolerancia en la etapa de floración y tolerancia en la etapa de producción de frutos.

Por ejemplo, la mayor parte de los cultivares comerciales exhiben una elevada sensibilidad a sal en estadios de germinación y primeros estadios de crecimiento de plántula incluso a bajas concentraciones salinas (Jones, 1986; Foolad & Lin, 1997; Cuartero & Fernandez-Muñoz, 1999). Según Cuartero & Fernandez-Muñoz (1999), en *S. pennellii*, *S. pimpinellifolium* y *S. peruvianum* se han identificado fuentes de tolerancia a salinidad en este estadio de desarrollo. Asimismo, se han identificado algunos QTL asociados a la tolerancia en el estadio de germinación de semillas, aunque la naturaleza genética o los mecanismos fisiológicos que modulan esta tolerancia no han sido determinados (Foolad, 2004).

Para la producción de tomate en condiciones salinas, la tolerancia en los estadios de desarrollo vegetativo y reproductivo puede que sea más importante que la tolerancia en estadio de germinación ya que la mayor parte de los cultivos de tomate se establecen a través del transplante de plántulas ya germinadas. Por lo que respecta al desarrollo vegetativo, se ha identificado variación fenotípica para la tolerancia a la salinidad en *S. peruvianum* (Tal & Gavish, 1973), *S. pennellii* (Dehan & Tal, 1978; Saranga *et al.*, 1991; Perez-Alfocea *et al.*, 1994; Cano *et al.*, 1998), *S. cheesmaniae* (Rush & Epstein, 1976; Asins *et al.*, 1993), y *S. pimpinellifolium* (Bolarin *et al.*, 1991; Cuartero *et al.*, 1992; Asins *et al.*, 1993; Foolad & Chen, 1999) que puede ser potencialmente útil para desarrollar cultivares más tolerantes. En el estadio reproductivo sin embargo, el potencial de las especies silvestres como fuente de tolerancia a salinidad no se ha evaluado adecuadamente según afirma Foolad (2004). Esto se debe principalmente al hecho de que una buena parte de las accesiones silvestres son autoincompatibles o desarrollan frutos de pequeño calibre que no pueden ser comparados con los de la especie cultivada.

En definitiva, la existencia de accesiones silvestres tolerantes a estrés salino entre las que se pueden encontrar diferencias en el grado de tolerancia indica que existe una base genética de respuesta a estrés. La mejora de este carácter a través de técnicas convencionales ha sido muy difícil porque se desconocen los determinantes reales de la tolerancia. La identificación de estos determinantes en las especies silvestres que exhiben un alto grado de tolerancia permitiría abordar programas de mejora de este carácter en tomate y obtener cultivares más tolerantes a salinidad. En este sentido, la biotecnología nos ofrece algunas alternativas para la identificación de estos determinantes.

1.5.6. El empleo de mutantes para la identificación de determinantes de la tolerancia a la salinidad

Como se ha comentado en el apartado anterior, la ausencia de resultados a la hora de obtener cultivares con un nivel de tolerancia aceptable desde un punto de vista agronómico se debe a que aún desconocemos cuáles son los verdaderos determinantes de la tolerancia, es decir, cuáles son los genes clave y cómo se regulan estos genes. Por esta razón, el primer reto en este campo de investigación es identificar los genes que desempeñan un papel esencial en el proceso de tolerancia a la salinidad.

La aproximación bioquímica ha sido típicamente una de las más comunes para la identificación de los genes implicados en la tolerancia a estrés salino. Esta aproximación se basa en el conocimiento previo de un enzima particular o una ruta metabólica que podría estar relacionada con los mecanismos de tolerancia. Por ejemplo, la acumulación de metabolitos compatibles (e.g. prolina, betaína o polialcoholes) es importante para el ajuste osmótico y la protección de estructuras celulares en condiciones de estrés. Por tanto, los genes que codifican los enzimas responsables de su síntesis se podrían considerar como genes que confieren tolerancia.

Más recientemente se ha venido utilizando una aproximación de tipo transcriptómico, que consistiría en la comparación de la expresión de genes en ausencia de estrés y en condiciones de estrés. Este tipo de aproximación está permitiendo determinar qué genes se expresan más o se activan en respuesta a estrés salino. Con todo, esta aproximación tiene algunas limitaciones, como puede ser la sobreestimación del número de genes supuestamente involucrados o que los perfiles de expresión estén limitados al tipo de tejido utilizado o al momento y estadio de desarrollo en el que se aplique el estrés. Además, puede que muchos de los genes detectados no se expresen como respuesta al estrés sino como consecuencia del mismo o, lo que es peor, puede que muchos de los genes que sí que son importantes no alteren su expresión como consecuencia del estrés, y no se tengan en cuenta.

La tercera aproximación es genética y es, desde nuestro punto de vista, la más poderosa. Se basa en el uso de mutantes monogénicos recesivos que tengan alterado un sólo mecanismo de adaptación. Los mutantes identificados se convierten entonces en una herramienta muy útil para identificar qué genes y procesos resultan esenciales para conferir tolerancia.

La detección y análisis de mutantes ha sido una de las aproximaciones más exitosas para llevar a cabo la disección genética de caracteres de interés agronómico. En efecto, ha sido un factor determinante en la aparición de nuevos cultivares, lo que ha tenido una gran trascendencia práctica. En el caso del tomate, y por citar solo algunos ejemplos, el cambio en el hábito de crecimiento (indeterminado a determinado) y el desarrollo de cultivares adaptados a la recolección mecánica, con frutos de larga vida o mayor contenido en licopeno ha sido factible gracias a la detección de mutantes como *self-pruning*, *jointless*, *rin*, *alcobaca* y *high-pigment*.

Al mismo tiempo, la identificación y análisis de mutantes permitió en su día iniciar la disección genética de procesos tan complejos como los que explican la determinación de un órgano (e.g. mutantes homeóticos) o la especificación de los verticilos de una flor (e.g. Coen & Meyerowitz, 1991; Pelaz *et al.*, 2000; Malcomber & Kellogg, 2005). Además, el análisis de mutantes proporcionó un panorama coherente sobre los genes y procesos implicados en la maduración de frutos carnosos (Giovannoni, 2007), e incluso ha sido clave para el descubrimiento de nuevas hormonas vegetales (Gómez-Roldan *et al.*, 2008; Umehara *et al.*, 2008). La ventaja de una aproximación basada en el análisis de mutantes estriba en que permite identificar los genes clave que intervienen en un proceso complejo, ya que la identificación de los mismos no depende de su nivel de expresión, sino del efecto fenotípico que produce su alteración. Por ejemplo, la variación en ciertos genes es capaz de generar un cambio en la forma, tamaño o color del fruto de tomate, pese a tratarse de caracteres complejos. Lo que importa, pues, no es describir los cientos o miles de genes que se expresan o reprimen en el proceso, sino aquellos otros cuya simple variación determina un cambio cualitativo en el carácter en cuestión.

Por lo que respecta al estrés salino, esta aproximación ya se ha empleado con éxito para identificar genes esenciales en la tolerancia a NaCl de levaduras (Mendoza *et al.*, 1994). En *Arabidopsis*, la identificación de mutantes hipersensibles a estrés salino permitió la localización y clonación de genes implicados en la tolerancia a salinidad. Así es, el escrutinio de más de 250.000 semillas mutagenizadas (mediante EMS, neutrones rápidos o T-DNA) de *Arabidopsis* permitió identificar 42 mutantes hipersensibles a NaCl (Zhu *et al.*, 1998). Se pudo comprobar que los mutantes se veían afectados exclusivamente por los efectos específicos de la sal ya que eran hipersensibles al NaCl y LiCl pero no al manitol. También se demostró que los mutantes eran incapaces de crecer en medios con bajas concentraciones de potasio. Los estudios de complementación genética determinaron que esos mutantes formaban tres grupos que venían definidos por tres genes diferentes: *SOS1*, *SOS2* y *SOS3* (se denominaron *SOS* por *Salt Overly Sensitive*). Según Zhu *et al.* (1998), estos tres genes son necesarios para la tolerancia al estrés impuesto por sodio. Posteriormente se descubrirían otros componentes de esta ruta (ver apartado 1.5.3.2.1).

Lee *et al.* (2004) clonaron a partir de un mutante de T-DNA el gen *AtMRP5* (un miembro de la superfamilia de transportadores ABC, posiblemente un receptor a la sulfonilurea), implicado en procesos relacionados con tolerancia a la salinidad. El mutante exhibía respuesta hipersensible a la componente iónica del estrés salino pero no a la osmótica. Los análisis fisiológicos indicaron que, de forma similar a lo que ocurre en los mutantes *SOS*, las plántulas del mutante *atmrp5-2* acumulaban más sodio y menos potasio en condiciones salinas. Los autores sugirieron como hipótesis que *AtMRP5* actúa como un canal de regulación de iones durante el desarrollo radicular y que su función podría estar relacionada con la regulación del transporte de potasio y la homeostasis iónica en condiciones salinas.

A través de una estrategia similar, Mitsuya *et al.* (2005) reportaron que el gen *RCI2A* de *Arabidopsis* estaba implicado en el transporte de sodio en condiciones específicas de estrés salino (i.e. componente iónica). Previamente se había descrito que un mutante de levadura en el que no se expresaba el gen *PMP3* (homólogo del gen *RCI2A*) acumulaba elevadas concentraciones de sodio en condiciones salinas (Navarre & Goffeau, 2000). Para llevar a cabo el estudio, Mitsuya *et al.* (2005) identificaron dos mutantes de inserción en los que el T-DNA había provocado la disrupción del gen *RCI2A* y vieron que en condiciones salinas los mutantes exhibían hipersensibilidad como consecuencia de una acumulación excesiva de sodio. Además observaron que la hipersensibilidad no se manifestaba en condiciones de estrés osmótico, sugiriendo que la función del gen *RCI2A* debía estar relacionada directa o indirectamente con la limitación de la sobreacumulación de sodio en condiciones salinas, mecanismo que contribuye a la tolerancia a la salinidad.

Inan *et al.* (2007) utilizaron la estrategia de mutagénesis insercional para identificar determinantes relacionados con tolerancia a la salinidad sobre la base de dobles mutantes. Para ello, realizaron un escrutinio en líneas de T-DNA generadas a partir de una población del mutante *sos3-1*. La idea era identificar un mutante más extremo que *sos3-1*. Según los autores, el doble mutante *shs1 sos3-1* exhibía mayor sensibilidad al NaCl que *sos3-1*. Por el momento no se ha descrito la función del gen etiquetado, aunque los autores indican que el T-DNA responsable de la mutación se encuentra insertado 62 pares de bases corriente arriba del codón de iniciación de un gen tipo translocador de adenilato.

Por lo que respecta a tomate, que nosotros sepamos, sólo se han identificado tres mutantes sensibles al estrés salino: *tss1*, *tss2* y *tos1* (Borsani *et al.*, 2001; 2002). El mutante *tss1* es hipersensible a la componente iónica del estrés salino (i.e. a Na^+ y Li^+) pero no a la componente osmótica (Borsani *et al.*, 2001). Según los autores, el *locus* TSS1 es esencial para la absorción de K^+ ya que el mutante *tss1* es incapaz de crecer en medios de cultivo con bajas concentraciones de K^+ . Sobre la base de estos resultados indican que este *locus* podría estar implicado en el mantenimiento del balance nutricional Na^+/K^+ , uno de los caracteres que se suelen analizar para determinar tolerancia a la salinidad. Según Borsani *et al.* (2001), el mutante *tss1*, que no es capaz de crecer en medios con bajas concentraciones de K^+ , sí que lo hace cuando estos medios están suplementados con elevadas concentraciones de Ca^{2+} , una característica que se observó en el mutante *sos3* de *Arabidopsis*. Por ello, los autores han llegado a sugerir que el gen *TSS1* codifica, al igual que el gen *SOS3* de *Arabidopsis*, para un sensor de Ca^{2+} .

Según Borsani *et al.* (2001), el mutante *tss2* es hipersensible tanto a la componente iónica (Na^+ y Li^+) como a la componente osmótica, toda vez que el mutante no es capaz de crecer ni en medio salino ni en medio suplementado con manitol. Según los autores, la mayor sensibilidad al estrés osmótico se debe a una mayor hipersensibilidad a ácido abscísico (ABA), lo que sugiere que el gen *TSS2* es un regulador negativo de la vía de transmisión de señal de ABA. Los autores sugieren que el gen *TSS2* debe de ser un nexo de unión entre las vías de ABA y etileno ya que la inhibición de la acción de etileno hace que el mutante *tss2* deje de ser hipersensible a estrés osmótico y ABA.

Por lo que respecta a *tos1*, Borsani *et al.* (2002) indicaron que se trata de un mutante que es específicamente hipersensible al estrés osmótico, y sólo es hipersensible a estrés salino cuando se emplean elevadas concentraciones de NaCl. Según los autores, *tos1* es menos sensible al ABA intracelular, una característica que se observa en todas las etapas del desarrollo de la planta. También señalaron que la menor sensibilidad a ABA no se debe a una menor síntesis de esta hormona, puesto que el mutante acumula más ABA que el WT en condiciones de estrés osmótico. Por tanto, Borsani *et al.* (2002) sugirieron que el alelo silvestre *TOS1* es necesario para una señalización correcta de ABA así como para la tolerancia al estrés osmótico siendo, muy probablemente, un componente positivo de la vía de transmisión de señal de ABA.

En definitiva, la disponibilidad de mutantes hipersensibles a salinidad podría conducir a la identificación de los determinantes que confieren mayor tolerancia, más aún si estos mutantes se obtienen a partir de las fuentes de variación adecuadas.

2. Antecedentes y objetivos

Con el fin de identificar genes que controlan caracteres del desarrollo de relevancia agronómica, así como determinantes de la tolerancia a la salinidad en tomate y especies silvestres relacionadas, en nuestro laboratorio se está abordando un programa de mutagénesis insercional en colaboración con los grupos del Dr. Lozano (Universidad de Almería) y la Dra. Bolarín (CEBAS-Murcia). Al inicio de esta Tesis Doctoral, nuestro grupo de investigación había generado 3000 líneas de T-DNA de tomate y 2500 líneas de T-DNA de *Solanum pennellii*. En tomate, el escrutinio de esta colección en invernadero ha permitido detectar 342 mutantes que exhiben alteraciones en diversos caracteres: desarrollo del embrión; crecimiento y arquitectura de la parte aérea; desarrollo radicular; organización de haces vasculares, epidermis o tricomas; viviparidad; arquitectura o color de las hojas; senescencia prematura o retrasada; hábito de crecimiento, tiempo de floración; arquitectura de la inflorescencia; arquitectura, tamaño o color de la flor; zonas de abscisión; desarrollo iterativo del fruto; cuajado ectópico de fruto; tasa de cuajado; tamaño o forma del fruto; partenocarpia; maduración; y textura o firmeza del fruto.

Uno de los primeros mutantes identificados en el contexto del programa de mutagénesis insercional fue *Arlequín (Alq)*, cuyo carácter más relevante es la conversión homeótica de los sépalos en órganos análogos a un fruto (Pineda *et al.*, 2010; Antón, 2012). En colaboración con el grupo del Dr. Lozano, se demostró que el gen etiquetado en el mutante insercional *Arlequín* era *TAGL1 (TOMATO AGAMOUS LIKE 1)* y se comprobó que la mutación promueve un fenotipo de ganancia de función como consecuencia de la expresión ectópica de *TAGL1 (ALQ/TAGL1)*. El análisis funcional de este gen indicó su participación en el

control genético del desarrollo reproductivo de tomate y su papel esencial como regulador positivo de la maduración del fruto (Giménez *et al.*, 2010). La caracterización fisiológica del mutante *Arlequín* permitió descubrir que tanto sus frutos como sus sépalos exhiben caracteres excepcionales de calidad tanto para el consumo en fresco (mayor contenido de glucosa, fructosa y licopeno) como sobre todo para procesado industrial (el contenido en sólidos solubles duplica al del WT). Por esta razón, además de publicar el trabajo, se patentaron todas las aplicaciones derivadas del uso del mutante (WO 2010/070166 A1). Más recientemente, se ha demostrado que es necesaria la actividad transcripcional de *ALQ/TAGL1* para el adecuado desarrollo de la cutícula del fruto de tomate (Giménez *et al.*, 2015). Asimismo, se ha investigado sobre la función divergente de los genes *TAG1* y *TAGL1/ALQ* y el papel que desempeñan a lo largo del desarrollo del fruto (Giménez *et al.*, remitido).

Como se comentaba en un párrafo anterior, el escrutinio de la colección de líneas T-DNA de tomate ha hecho factible la identificación de mutantes afectados en distintos caracteres (Angarita, 2009). Por su relevancia agronómica, los mutantes afectados en tamaño de fruto adquieren un enorme interés. Uno de los más interesantes en este sentido es *eno* (*excessive number of floral organs*), un mutante recesivo que desarrolla frutos acostillados de enorme calibre. La mutación *eno* promueve un incremento significativo del tamaño del meristemo floral, lo que acontece a lo largo de los primeros estadios de la morfogénesis de la flor. Como consecuencia, las flores del mutante experimentan un aumento en el número de pétalos, estambres y carpelos. El aumento en el número de carpelos hace que los frutos de *eno* tengan tres veces más lóculos que los del WT (de 4,3 se pasa a 12,9), lo que a su vez conduce a un incremento del 40 % en el peso del fruto (Fernández-Lozano *et al.*, 2015). Un aspecto importante que conviene destacar es que el gen responsable de la mutación *eno* es el que mayor impacto tiene sobre el tamaño del fruto de tomate de todos los que se han descrito. El gen *ENO* se ha clonado recientemente en el laboratorio del Dr. Lozano y en el momento actual se está llevando a cabo su análisis funcional, lo que sin duda proporcionará avances en el conocimiento de la base genética de los procesos que regulan el tamaño del fruto de tomate.

En el contexto del programa de Mutagénesis se han identificado otros mutantes insercionales afectados en caracteres del desarrollo reproductivo que por su fenotipo suscitan un enorme interés. Por ejemplo, el mutante *vin*

(*vegetative inflorescence*) tiene alterada la identidad del meristemo inflorescente, de forma que a lo largo del eje de la inflorescencia, que exhibe un crecimiento indeterminado, se desarrollan tanto flores como estructuras vegetativas (i.e. hojas). El crecimiento indeterminado de estas inflorescencias se debe a la presencia de meristemos vegetativos en los extremos de las mismas. Además, los sépalos de las flores de este mutante se encuentran transformados en hojas. Los análisis moleculares realizados por el grupo del Dr. Lozano (UAL) han confirmado que el gen etiquetado por el T-DNA es *Macrocalyx (LeMADS-MC)*. A pesar de que este gen ya ha sido clonado a partir del mutante *RIN* (Vrebalov *et al.*, 2002), el mutante *vin* tiene la ventaja de que sólo tiene alterada la función de *LeMADS-MC*. La caracterización fenotípica y molecular de este nuevo mutante ha permitido clarificar el papel que desempeña *LeMADS-MC* en la regulación del desarrollo de la inflorescencia (Yuste-Lisbona *et al.*, remitido). En otro mutante insercional afectado en el desarrollo reproductivo (*sus: succulent stamens*) las flores muestran alteraciones homeóticas que afectan al desarrollo de pétalos y estambres (verticilos 2 y 3), consecuencia de cambios en la identidad celular en dichos órganos. Se ha visto que el mutante desarrolla frutos pequeños sin semilla y tiene alterado el tiempo de floración. El grupo del Dr. Lozano (UAL) ha identificado la región genómica flanqueante al T-DNA responsable de la mutación. El análisis de esa región ha indicado que el T-DNA se ha insertado en una secuencia que regula la expresión de dos genes contiguos, a saber, un gen que codifica para un factor de transcripción de la familia Zinc-finger y, en la orientación contraria, un gen que codifica para un mediador de la RNA Polimerasa. Como consecuencia de la inserción del T-DNA, la expresión de ambos genes disminuye significativamente. Los resultados del análisis funcional indican que el gen *SUS* participa en el control de la identidad de los estambres interactuando con otros genes MADS-box implicados en el desarrollo de la flor de tomate (Pérez-Martín *et al.*, 2013; Pérez Martín *et al.*, *en prep.*). Además de estos resultados, actualmente se está concluyendo el análisis funcional de dos genes que intervienen en el cuajado partenocárpico del fruto y el desarrollo iterativo de carpelos respectivamente.

Por lo que respecta al apartado del estrés abiótico, en nuestro laboratorio se desarrolló un método de cultivo *in vitro* que ha permitido identificar algunos mutantes de tomate hipersensibles a la salinidad. Por ejemplo, el mutante *sog-698 (sodium gatherer)* se caracteriza por exhibir mayor clorosis foliar y síntomas de hiperhidratación *in vitro*. Tras realizar varios experimentos *in vivo* se vio que el

fenotipo de clorosis foliar aparecía a los pocos días del inicio del tratamiento salino y que en estas condiciones las plantas mutantes acumulaban más agua que las WT, acorde con los síntomas de hiperhidratación observados *in vitro* (Garrido, 2009). Un análisis más exhaustivo ha permitido comprobar que el mutante acumula significativamente más agua que el WT en folíolos, donde también se acumulan elevadas concentraciones de Na⁺ (lo que explica la elevada clorosis). Sin embargo, en peciolo ocurre todo lo contrario, es decir, se acumula menos agua y Na⁺ (Pineda *et al.*, 2011). También se ha comprobado que en condiciones salinas el mutante exhibe mayor tasa de transpiración y conductancia estomática, lo que explicaría el mayor flujo de agua desde la raíz hacia la parte aérea (Egea *et al.*, 2014). Estos resultados sugieren que el mutante podría tener alterado algún mecanismo relacionado con el transporte de agua desde la raíz hacia la parte aérea, así como alguno de los mecanismos naturales que utiliza el tomate para protegerse de la acumulación de iones tóxicos en hoja (Pineda *et al.*, 2011). Aunque por el momento se desconoce el origen de la mutación, se han iniciado los análisis moleculares para abordar la clonación del gen mutado.

Por lo que respecta al programa de mutagénesis insercional en especies silvestres afines a tomate, los resultados relacionados con la detección de mutantes de *Solanum pennellii* hipersensibles a estrés hídrico o salino ya se han publicado (Atarés *et al.*, 2011) y actualmente se está llevando a cabo una caracterización de los mutantes más relevantes. Con todo, el programa de mutagénesis insercional en especies silvestres halotolerantes podría resultar más eficaz con *S. cheesmaniae* ya que no sólo comparte con el tomate el color rojo del fruto sino, sobre todo, el modo de reproducción. En efecto, al ser autógama, no requiere de polinización manual para obtener las progenies TG2, una tarea obligada en *S. pennellii* por tratarse de una alógama facultativa. De forma similar, el inicio de un programa de mutagénesis insercional en *S. pimpinellifolium* podría tener un enorme interés no sólo en relación al tema del estrés abiótico, sino también en el contexto de nuestra línea de investigación sobre el desarrollo. Esta especie silvestre está considerada como el ancestro del tomate (Qi *et al.*, 2013). En contraste con el extremo polimorfismo en caracteres relacionados con el tamaño, forma y color del fruto del tomate, en *S. pimpinellifolium* no hay variación para estos caracteres: sus frutos son siempre pequeños, esféricos y de color rojo (Tanksley, 2004). Por tanto, la identificación de mutantes de *S. pimpinellifolium* con cambios en el tamaño, forma o color del fruto podría ayudarnos a identificar los genes que fueron seleccionados en el proceso de domesticación. Por otro

lado, se sabe desde hace tiempo que en *S. pimpinellifolium* hay accesiones muy tolerantes a la salinidad (Sun *et al.*, 2010). Por tanto, la identificación de mutantes hipersensibles a la salinidad podría permitirnos identificar los genes que determinan el mayor grado de tolerancia en esta especie silvestre. Esta Tesis Doctoral se enmarca en el contexto de este programa de mutagénesis insercional y tiene como objetivo central seguir profundizando en la disección genética de caracteres relevantes desde un punto de vista agronómico a través de la generación y caracterización de líneas T-DNA de tomate cultivado y silvestre.

En este marco general, los objetivos concretos de esta Tesis Doctoral han sido los siguientes.

1. Generación de líneas T-DNA de tomate cultivado y silvestre (*Solanum cheesmaniae* y *S. pimpinellifolium*).
2. Escrutinio de progenies TG2 de tomate, *Solanum cheesmaniae* y *S. pimpinellifolium* para la detección de mutantes afectados en el grado de tolerancia a la salinidad.
3. Caracterización fenotípica y genética de mutantes de tomate, *Solanum cheesmaniae* y *S. pimpinellifolium*.
4. Caracterización fenotípica de plantas que portan el gen *PMS*, clonado a partir de un mutante insercional hipersensible a estrés salino.

3. Material y Métodos

3.1. Material vegetal

Como material vegetal de partida se ha utilizado el cv. de tomate MoneyMaker, la accesión TO-937 de *Solanum pimpinellifolium* (cedida amablemente por el Dr. Rafael Fernández, IHSM La Mayora UMA-CSIC) y la accesión de *S. cheesmaniae*¹ UPV-19040 GLP-46 (cedida amablemente por la Dra. M^a José Díez, UPV-COMAV), así como líneas T-DNA de tomate (cv. MoneyMaker) obtenidas previamente por el grupo.

3.2. Técnicas básicas de cultivo *in vitro*.

3.2.1. Esterilización de semillas

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

¹ Cabe la posibilidad de que la accesión UPV-19040 GLP-46 sea *Solanum galapagense* y no *S. cheesmaniae*. A pesar de ello, en esta Tesis mantendremos la denominación que se le dio en el centro que amablemente nos cedió la semilla.

3.2.2. Germinación y obtención de plántulas axénicas

Las semillas esterilizadas (apartado 3.2.1) se transfieren a placas petri con dos capas de papel filtro saturado de agua destilada estéril. Las placas, selladas con parafilm, se mantienen en oscuridad a 28°C hasta la germinación de las semillas, periodo que oscila entre las 48 y 72 horas. Después de la nascencia, es decir, en el momento en el que emerge la radícula, las semillas se transfieren directamente a recipientes de vidrio de 105 mm de altura x 95 mm de diámetro que contienen 50 ml de medio de cultivo MG. Este medio está compuesto por solución mineral MS (Duchefa Biochemie), 20 g/L de sacarosa y 8 g/L de agar bacteriológico europeo (Sumilab, s.l.). El pH del medio se ajusta a 5.7 con KOH y HCl antes de añadir el agente gelificante. Los medios de cultivo se esterilizan por calor húmedo en autoclave, a 115° C durante 30 minutos. El cultivo de las plántulas tiene lugar en una cámara de cultivo en condiciones de luz, temperatura y humedad controladas: fotoperiodo de 16 horas luz con una intensidad luminosa de 2000 luxes - equivalente a 34 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ - suministrada por una fuente de luz fría y una temperatura / humedad relativa de $26 \pm 2^\circ \text{C}$ / 40% durante el periodo luminoso y $22 \pm 2^\circ \text{C}$ / 70% durante el periodo oscuro. Las plantas se cultivan en invernadero para obtener progenies, tras la germinación, las semillas se siembran en macetas de plástico (65 mm de altura x 95 mm de diámetro) con fibra de coco estéril.

3.2.3. Cultivo de explantes primarios

A los 7-10 días del inicio de la germinación se procede a la extracción de los explantes de cotiledón. Una vez separados los dos cotiledones de la plántula se eliminan los extremos para incrementar la superficie de corte obteniéndose 2 explantes por genotipo individual. Una vez cortados, los explantes se cultivan con el envés en contacto con el medio de cultivo. Para el cultivo de explantes se emplean placas petri (90 mm de diámetro x 30 mm de altura) con 30 ml de medio de cultivo, selladas con parafilm. Las condiciones de incubación son las mismas que las descritas en el apartado 3.2. 2.

3.2.4. Regeneración de plantas a partir de explantes primarios

Inducción de organogénesis

El medio de cultivo que se utiliza para inducir organogénesis en los explantes de tomate es el IKZ 4.0/4.0/1.0 compuesto por solución mineral MS (Duchefa Biochemie), 30 g/L de sacarosa, 10 m/L vitaminas SH, 0,1 g/L de inositol, 4.0 mg

ácido indolacético, 4,0 mg/L de quinetina 1,0 mg/L zeatina y 8 g/L de agar bacteriológico europeo (Sumilab, s.l.). Este medio de cultivo da lugar a la formación de callos que presentan zonas compactas de color verde a partir de las cuales se desarrollan yemas, yemas-ápice y brotes. Estos callos se subcultivan cada 21 días para favorecer el desarrollo y amplificación de las estructuras organogénicas. Una vez formado el callo, se suele eliminar la zeatina del medio de cultivo para favorecer la elongación de los brotes.

Enraizamiento de los brotes y clonación de las plantas

Los brotes se separan del callo organogénico y se siembran en un medio de clonación (I 0.1) compuesto por solución mineral MS (Duchefa Biochemie), 20 g/L de sacarosa, 0,1 g/L de inositol, 0,001 g/L de T-CLH y 0,1 mg/L de ácido indolacético para favorecer la emisión de raíces. El pH del medio se ajusta a 5.7 con KOH y HCl antes de añadir el agente gelificante. El medio de cultivo se esteriliza por calor húmedo en autoclave, a 115° C durante 30 minutos. Las primeras raíces suelen aparecer aproximadamente a los 7 días de la siembra. A los 30 días la planta suele tener un sistema radicular bien desarrollado, y la parte aérea presenta una yema caulinar y varias yemas axilares, a partir de las cuales se pueden obtener nuevas plantas mediante propagación por vía axilar. El tipo de recipiente que utilizamos (150 mm de altura x 60 mm de diámetro) favorece la elongación de entrenudos, lo que facilita la propagación clonal. Ésta se realiza a través del cultivo del brote terminal y las yemas axilares en el medio de clonación descrito anteriormente.

3.2.5. Determinación del nivel de ploidía de las plantas regeneradas mediante citometría de flujo

El nivel de ploidía de las plantas se determina en fragmentos de hoja joven. El análisis se realiza mediante la cuantificación del contenido de ADN nuclear de las células según el método de Smulders *et al.* (1994). El tejido vegetal (un fragmento de cotiledón u hoja de aproximadamente 1cm²) se trocea finamente con una cuchilla en una placa petri de 50mm de diámetro. Se añaden 2 gotas de tampón de extracción de núcleos (Partec, Münster, Germany) y 800µL de una solución que contiene 1mg/L de fluorocromo DAPI (4,6-diamino-2phenyl-indole) (DAPI staining solution, Partec) cuya función es teñir el ADN. Tras resuspender la mezcla, se filtra a través de una malla de nylon de 50µm. La suspensión de núcleos se hace circular por el circuito de microtubos de un analizador de ploidía

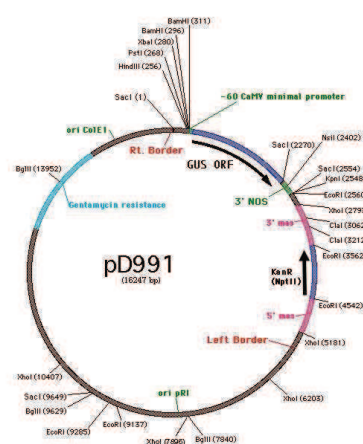
(Partec PA-II Ploidy Analyser), equipado con una lámpara de mercurio que emite luz ultravioleta de 366nm. La corriente de núcleos en suspensión pasa por una cámara de cuarzo (conducto de 10µm que no permite el paso simultáneo de dos unidades), donde es iluminada por una fuente de luz ultravioleta. Como consecuencia, el fluorocromo DAPI fijado al ADN emite una fluorescencia proporcional a la cantidad de ADN del núcleo, que es reconocida y captada por un fotorreceptor. El sistema informático que lleva incorporado el citómetro convierte cada señal fluorescente en un punto sobre la pantalla que se sitúa en distintas posiciones de acuerdo con su intensidad. El gráfico resultante ordena los datos según el contenido nuclear de ADN en el eje de abscisas y contabiliza el número de núcleos de cada tipo en el eje de ordenadas.

3.3. Transformación genética

El protocolo que se ha empleado para llevar a cabo los experimentos de transformación genética es básicamente el descrito en Atarés et al. (2011). En el caso de tomate, se utilizan explantes de cotiledón de 7-10 días mientras que en las dos especies afines se emplean explantes de hoja de plántula de 20-30 días.

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

Se ha utilizado la cepa desarmada de *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 y el plásmido pD991 (cedido amablemente por el Dr. Tomas Jack, Dpto. de Ciencias Biológicas, Universidad de Dartmouth). El T-DNA contiene el gen marcador *nptII* bajo el control del promotor mas con el terminador mas, así como un promotor mínimo (caja TATA + inicio de transcripción) al que se encuentra fusionada la región estructural del gen *UidA*.



3.3.2. Cultivo de *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens se cultiva a partir de un inóculo glicerinado (mantenido en congelador a -80° C) en medio sólido selectivo LB (Maniatis et al., 1982) suplementado con 100 mg/L de gentamicina y 40 mg/L de rifampicina. Las colonias que crecen en este medio se utilizan de inóculo para el cultivo en medio LB líquido que se realiza en matraces adecuados para el cultivo de bacterias. Los

matraces se tapan con algodón graso (o hidrofóbico) para favorecer la aireación y se incuban en oscuridad a 28° C en agitador orbital a 230 r.p.m. El 'caldo nutritivo' utilizado para el crecimiento bacteriano está suplementado con 100 mg/L de gentamicina y 40 mg/L de rifampicina. El medio líquido para la inoculación de los explantes se suplementa con 200 µM de acetosyringona (3'5'-dimethoxy-4'-hydroxyacetophenone) esterilizada por microfiltración (Millipore 0,45 µm). La acetosyringona es una sustancia inductora de los genes *vir* en cepas productoras de octopina de *Agrobacterium tumefaciens* (Stachel et al., 1985).

3.3.3. Método de transformación: selección y regeneración de plantas transgénicas

Los explantes de cotiledón de plántulas axénicas de 7-10 días (ver apartados 3.2.2 y 3.2.3) se transfieren a placas petri que contienen medio IK 4.0/4.0 (24 explantes/placa) en el que permanecen 24 horas en estufa de oscuridad a 28°C. A las 24 horas, los explantes se sumergen durante 10 minutos en el cultivo de *Agrobacterium tumefaciens*. Tras la inoculación, los explantes se secan sobre papel de filtro estéril para eliminar el exceso de bacterias y, a continuación, se colocan sobre un medio de cocultivo con el envés en contacto con el medio. El medio de cocultivo es el IK 4.0/4.0 al que se le añade 200 µM acetosyringona. Las bacterias se incuban con el tejido durante 24-48 horas en oscuridad a 28° C, periodo durante el cual se va a producir la transferencia del T-DNA. Para la eliminación de la bacteria, los explantes se tratan durante 10-12 minutos con una solución líquida ajustada a un pH de 5,7 que contiene solución mineral MS (Duchefa Biochemie), 20 g/L de sacarosa, 0,1 g/L de inositol, 0,001 g/L de T-CIH y 500 mg/L de cefotaxima (antibiótico utilizado para detener el crecimiento bacteriano). Tras el lavado, los explantes se secan sobre papel de filtro y se colocan sobre el medio IK 4.0/4.0 (apartado 3.2.4) + cefotaxima (300 mg/L), permaneciendo 2-3 días en la cámara de cultivo bajo las condiciones de incubación descritas en el apartado 3.2.2. Finalmente, los explantes se transfieren al medio selectivo IKZ 4.0/4.0/1.0 que contiene, además de los componentes descritos para el medio (apartado 3.2.4), 100 mg/L de kanamicina (antibiótico utilizado para la selección de células transgénicas) y 300 mg/L de cefotaxima (antibiótico utilizado para detener el crecimiento bacteriano). Los medios de cultivo se esterilizan por calor húmedo en autoclave, a 115° C durante 30 minutos. La zeatina, kanamicina y cefotaxima se esterilizan por microfiltración (Millipore 0.45 µm) y se añaden al medio de cultivo en la cabina de flujo (condiciones de

asepsia). Los explantes se cultivan en la cámara de cultivo bajo las condiciones de incubación descritas en el apartado 3.2.2. La combinación de reguladores del medio IKZ 4.0/4.0/1.0 da lugar a la formación de callos que presentan zonas compactas de color verde en las que se desarrollan yemas, yemas-ápice y brotes. Se precisan varias transferencias al mismo medio selectivo para conseguir el desarrollo de ápices individualizables. Estas transferencias se realizan cada 2-3 semanas. A los 3-4 subcultivos en medio selectivo se elimina la zeatina para favorecer la elongación de los brotes, que ulteriormente se separan y cultivan en un medio de clonación (siguiente apartado). Las condiciones de incubación son las descritas en el apartado 3.2.2.

3.3.4. Enraizamiento de los brotes transgénicos

Los brotes elongados se separan del callo organogénico y se cultivan como se describe en el apartado 3.2.4. Durante la etapa de propagación clonal, una de las copias se utiliza para realizar el test de enraizamiento en medio selectivo (medio I 0.1 con 100 mg/L de kanamicina), lo que nos aporta una información muy fiable sobre el carácter transgénico de la planta en cuestión sobre la base de la expresión del gen marcador seleccionable *nptII*. Las condiciones de incubación para el enraizamiento de los brotes son las descritas en el apartado 3.2.2. El nivel de Ploidía de las plantas transgénicas se analiza tal y como se describe en el apartado 3.2.5.

3.3.5. Aclimatación y trasplante

A los 15-20 días de la siembra en medio de enraizamiento, las plantas se encuentran en el estadio adecuado para llevar a cabo la aclimatación. Tras extraer la planta del bote, se aplica un lavado a la raíz para eliminar los restos de agar, procurando no dañarla. A continuación se trasplanta a una maceta pequeña (polietileno negro Ø: 9 cm, Os-plastic) que contiene fibra de coco estéril (fibra de ¾ de Cocoterra) y se cubre con un vaso de plástico transparente. Las plantas se trasladan a un invernadero tipo capilla en las siguientes condiciones de cultivo: i) fotoperiodo: 16 horas luz / 8 horas oscuridad, ii) temperatura: 24° C ± 2° C (diurna), 20° C ± 2° C (nocturna), humedad relativa: 45-65% (diurna), 75-90% (nocturna), y iii) luz natural suplementada con lámparas de mercurio de 400 w para mantener un fotoperiodo de día largo (16 h de luz y 8 h de oscuridad). Se riega a demanda con la siguiente solución nutritiva: 0,15 g/L de PO₄H₃, 0,82 g/L de Ca(NO₃)₂, 0,20 g/L de NO₃K, 0,35 g/L de SO₄K₂, 0,24 g/L de SO₄Mg y 0,1 g/L

de BMX (micronutrientes). A los 15 días se puede retirar el vaso de plástico y transferir la planta a un recipiente de cultivo de mayor calibre (polietileno negro Ø: 28 cm, capacidad 12 L, Maceflor). A partir de este momento, las necesidades de riego se cubren mediante fertirrigación con la solución nutritiva descrita anteriormente, colocando 2 goteros por maceta (el número y duración de los riegos varía con el estadio de desarrollo de la planta, incrementándose el número y la extensión de los mismos en función de los requerimientos hídricos). A los 3-4 meses se realiza la recolección de los frutos en estadio maduro para la extracción de las semillas.

3.4. Escrutinio *in vitro* de la colección de líneas T-DNA para la identificación de mutantes afectados en el grado de tolerancia a la salinidad.

3.4.1. Esterilización, germinación y siembra de las semillas

Se realiza tal y como se ha descrito en los apartados 3.2.1 y 3.2.2., pero en este caso, el medio de cultivo (MG) se suplementa con 100 mM de NaCl.

3.4.2. Diseño experimental

Se utilizan progenies TG2 de líneas T-DNA (segregantes para el T-DNA y para la mutación y la hubiera). El número de plántulas evaluadas por experimento es de 32 a razón de 8 plantas por recipiente y 4 recipientes por línea. El tipo de recipiente empleado es el que se describe en el apartado 3.2.2. El periodo de cultivo en la cámara es de 30-40 días y las condiciones de incubación son las descritas en el apartado 3.2.2. A los 30-40 días se contabiliza el número de plántulas de fenotipo WT y el de plántulas mutantes (i.e. clorosis, malformaciones, menor crecimiento etc.). Las segregaciones se analizan mediante el test χ^2 , cuya fórmula es la siguiente: $\chi^2 = \sum [(O_i - E_i)^2 \div E_i]$, donde O_i hace referencia a cada valor observado y E_i a cada valor esperado.

*3.4.3. Análisis genético de un mutante identificado *in vitro* en condiciones salinas*

Tras la identificación de un mutante en medio con sal se evalúa si el fenotipo detectado es específico de este estrés. Para ello, se siembran semillas (i.e. 32 semillas TG2, ver apartado anterior) en medio de germinación (MG) sin el suplemento de NaCl. Asimismo, con el fin de corroborar el fenotipo detectado en el primer experimento, se vuelven a sembrar semillas en el medio de germinación suplementado con NaCl (100 mM). Si el mutante es específico de estrés salino en el medio que no contiene NaCl todas las plantas van a exhibir fenotipo WT, es decir, no aparecerá el fenotipo mutante. En cambio, si se trata de un mutante

afectado en algún carácter relacionado con el desarrollo, el fenotipo también se verá en medio sin NaCl (figura 2).

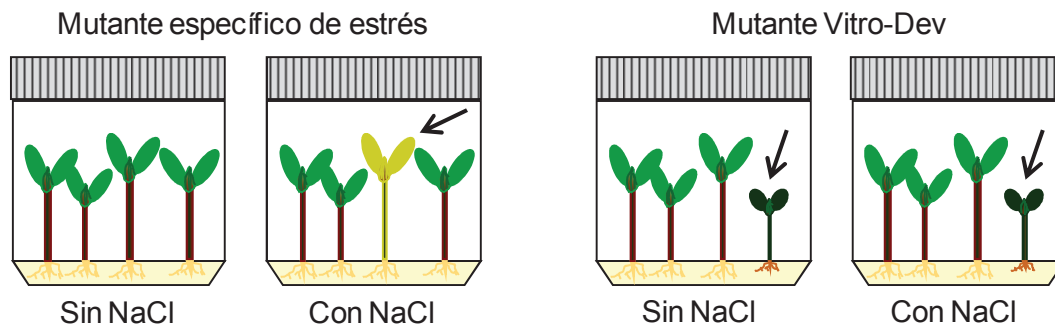


Figura 2. Cultivo de la línea mutante sin y con sal. Tras la detección de un mutante en medio con NaCl, la línea se vuelve a cultivar en medio con NaCl para corroborar el fenotipo mutante y en medio sin NaCl para comprobar si se trata de un mutante específico de estrés. En un mutante específico de estrés salino, el fenotipo sólo se ve en medio con NaCl (izda.). En un mutante alterado en caracteres del desarrollo (Vitro-Dev), el fenotipo se ve en medios con y sin sal (dcha.).

El siguiente paso consiste en determinar el número de copias funcionales (i.e. copias de T-DNA que expresan el gen marcador *nptII*) que posee la línea que se ha identificado. Para ello se siembran 40-50 semillas en medio de germinación (MG) suplementado con 100 mg/l de kanamicina. A los 30 días se contabiliza el número de plantas resistentes y sensibles a la kanamicina (figura 3) y se analiza si la segregación se ajusta a una proporción acorde con la integración de 1, 2 o más insertos con un *nptII* funcional (test χ^2).

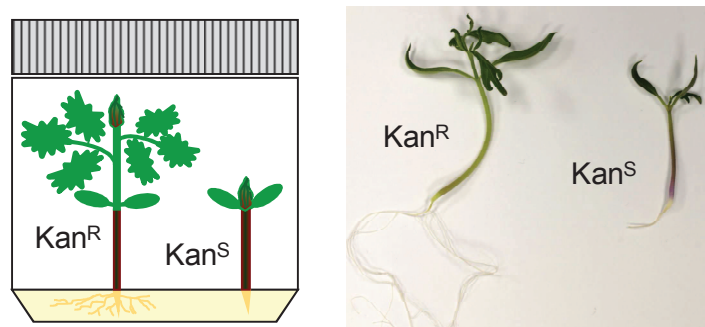


Figura 3. Test de kanamicina en plántulas. Las plántulas que expresan el gen *nptII* presentan un desarrollo normal en medio selectivo (Kan^R); en cambio, las plántulas que no lo expresan (Kan^S) detienen su crecimiento cuando comienzan a nutrirse del medio con antibiótico y no desarrollan hojas verdaderas o raíces secundarias

El número de copias funcionales que segregan en la línea identificada permite calcular el número de plantas que se deben analizar para establecer la existencia

o no de cosegregación entre un inserto funcional y la mutación. Por ejemplo, en líneas de simple copia (1 inserto con *nptII* funcional), es necesario analizar un mínimo de 47 plantas TG2. En efecto, se debe comprobar si el fenotipo mutante se debe a la alteración de un gen por un inserto de T-DNA (cosegregación fenotipo-*nptII*) o si la mutación se debe a un cambio de tipo somaclonal o a la inserción de un T-DNA truncado que no expresa el *nptII* (no cosegregación fenotipo-*nptII*). En el primer caso, las segregaciones serían las que aparecen en la Tabla 8a. En cambio, si la mutación no está ocasionada por el inserto funcional, los dos *loci* en los que se sitúan el inserto de T-DNA y el gen alterado que provoca el fenotipo mutante segregarían de manera independiente, tal y como se muestra en el modelo de la tabla 8b, o darían una segregación acorde a la existencia de ligamiento incompleto. En cualquier caso, al tratarse de distintos *loci*, la segregación sería diferente a la esperada en el caso de cosegregación (Tabla 8a).

Tabla 8a. Segregación para el fenotipo (WT o mutante) y para el gen marcador *nptII* (resistencia o sensibilidad a la kanamicina) en un mutante recesivo insercional.

Frecuencia	Fenotipo	KAN ^R / kan ^S	
1	A ^m A ^m	M	KAN ^R
2	A ^m a	WT	KAN ^R
1	a a	WT	kan ^S

Siendo: A^m = T-DNA con *nptII* funcional, a = alelo nulo. WT = wild-type, M = mutante, KAN^R = resistencia a kanamicina y kan^S = sensibilidad a kanamicina.

Tabla 8b. Segregación para el fenotipo (WT o mutante) y para el gen marcador *nptII* (resistencia o sensibilidad a la kanamicina) en un mutante recesivo no insercional.

Frecuencia	Genotipo	Fenotipo	KAN ^R / kan ^S
1	A A B B	WT	KAN ^R
2	A A B b ^m	WT	KAN ^R
2	A a B B	WT	KAN ^R
4	A a B b ^m	WT	KAN ^R
1	A A b ^m b ^m	M	KAN ^R
2	A a b ^m b ^m	M	KAN ^R
1	a a B B	WT	kan ^S
2	a a B b ^m	WT	kan ^S
1	a a b ^m b ^m	M	kan ^S

Siendo: A = T-DNA con *nptII* funcional, a = alelo nulo, b^m = alelo mutado y B = alelo silvestre del gen mutado. WT = wild-type, M = mutante, KAN^R = resistencia a kanamicina y kan^S = sensibilidad a kanamicina.

En el modelo que aparece en la tabla 8a, '**A^m**' es el inserto con *nptII* funcional que determina el fenotipo. La segregación fenotípica es 3 WT : 1 **M** y, por lo que respecta al gen marcador, la segregación es 3 KAN^R : 1 kan^S. Si se consideran ambos caracteres al mismo tiempo, la segregación conjunta es: 1 **M** / KAN^R : 2 WT / KAN^R : 1 WT / kan^S. En este caso, las plantas mutantes (**M**) siempre son resistentes a la kanamicina (KAN^R).

En el modelo que se muestra en la Tabla 8b, '**A**' sería el inserto con *nptII* funcional que no es responsable del fenotipo, siendo '**a**' un alelo nulo (i.e. la zona donde se ha insertado A que no está ocupada por un gen). Evidentemente, '**A**' sería dominante ($A > a$) respecto a la resistencia a la kanamicina. Por otro lado, '**b^m**' sería el alelo mutado responsable del fenotipo consecuencia de la integración de un inserto sin *nptII* en un gen endógeno '**B**' o de una mutación de tipo somaclonal, siendo recesivo ($b^m < B$) respecto al fenotipo.

Como se puede ver en la tabla 8b, la segregación para el fenotipo es 3 WT : 1 **M**, para la resistencia a la kanamicina es 3 KAN^R : 1 kan^S y para ambos caracteres 9 WT / KAN^R : 3 **M** / KAN^R : 3 WT / kan^S : 1 **M** / kan^S. La probabilidad asociada a las plantas mutantes que no contienen el *nptII* funcional es, por tanto, de 1/16. En consecuencia, el tamaño de familia² para detectar una planta **M** - Kan^S (a a **b^m b^m**) con una probabilidad de fallo (PF) del 5 % es de 47 plantas.

En definitiva, para demostrar cosegregación entre el inserto con *nptII* y la mutación en términos estadísticos (con una probabilidad de fallo del 5%), basta con analizar 47 plantas y comprobar que ninguna de las plantas mutantes es sensible a la kanamicina.

De manera alternativa, si las plantas **M** son fértiles, se puede confirmar que se trata de un mutante insercional evaluando la segregación para la resistencia a la kanamicina en progenies TG3 procedentes de plantas mutantes (Tabla 9a y 9b).

Tabla 9a. Segregación para el fenotipo (WT o mutante) y para el gen marcador *nptII* (resistencia o sensibilidad a la kanamicina) en un mutante recesivo insercional utilizando la progenie TG3.

Plantas TG2 M en caso de COSEGREGACIÓN				⇒	TG3 de plantas TG2 M	
Frecuencia	Genotipo	Fenotipo	Marcador		Fenotipo	Marcador
1	A^m A^m	M	KAN ^R		M	R

² Siendo N el tamaño de familia, P_F la probabilidad de fallo y p la frecuencia genotípica, el cálculo del tamaño de familia viene determinado por la siguiente fórmula: $N \geq \lg P_F / \lg (1-p)$.

Tabla 9b. Segregación para el fenotipo (WT o mutante) y para el gen marcador *nptII* (resistencia o sensibilidad a la kanamicina) en un mutante recesivo no insercional utilizando la progenie TG3.

Plantas TG2 M en caso de NO cosegregación					⇒	TG3 de plantas TG2 M			
Frecuencia	Genotipo		Fenotipo	Marcador		Fenotipo	Marcador		
1	A	A	s^m	s^m	M	KAN ^R	⇒	M	R
2	A	a^0	s^m	s^m	M	KAN ^R		M	3 R : 1 S
1	a^0	a^0	s^m	s^m	M	kan ^S		M	S

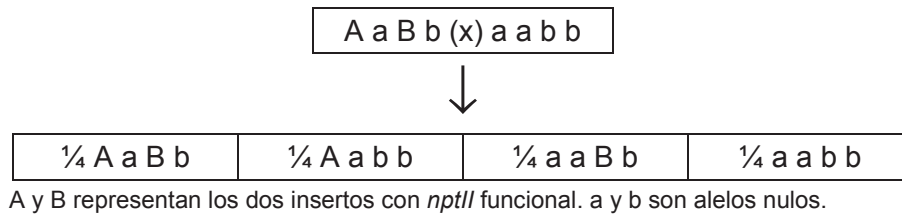
Como se puede ver en la tabla 9a y 9b, en el caso de que haya cosegregación, las progenies TG3 de las plantas **M** son siempre homocigóticas (KAN^R). En cambio, si no hay cosegregación, 1/4 de las progenies TG3 son homocigóticas (KAN^R), 2/4 segregarían para el gen marcador ($\frac{3}{4}$ KAN^R : $\frac{1}{4}$ kan^S) y 1/4 serían acigóticas (kan^S). Por tanto, si se encuentra una TG3 que segregue o que sea acigótica es que no hay cosegregación. Como la probabilidad (p) asociada a este tipo de progenies (segregantes o acigóticas) es de 3/4, basta con evaluar más de 2 progenies TG3 para concluir que hay cosegregación con una probabilidad de fallo del 5%. En concreto, si se evalúan 3 progenies TG3 la probabilidad de fallo es del 1,5%.

De forma análoga, en líneas que tienen 2 insertos con *nptII* funcional (i.e. 15 KAN^R : 1 kan^S) se tendrían que analizar como mínimo 191 plantas para detectar alguna planta mutante sensible a la kanamicina con una probabilidad de fallo del 5% (i.e. una planta de genotipo “a a b b c^m c^m ” [p = 1/64], siendo A y B los dos insertos con *nptII* funcional y c^m una mutación somaclonal u ocasionada por un inserto truncado que no expresa el *nptII*).

En el caso de que en esa población todas las plantas mutantes fueran resistentes a la kanamicina, cabe esperar que alguno de los dos insertos funcionales sea el responsable de la mutación. A partir de ahí, habría que segregar los dos insertos para identificar cuál es el responsable del fenotipo mutante.

A pesar de que en condiciones de cultivo *in vitro* este reto (analizar 191 plantas para ambos caracteres) es abordable, en plantas con dos insertos funcionales resulta más práctico cruzar el genotipo de partida (i.e. TG1) con el parental silvestre, ya que ésta es la vía más rápida para segregar los dos insertos funcionales. De resultados de este cruzamiento, se obtendría una progenie en la que podemos encontrar en las mismas proporciones plantas con las dos copias (A y B), con una de las dos copias (A o B), o sin copias de T-DNA (figura 4).

Figura 4. Genotipos y frecuencias en la progenie resultante del cruce entre una planta con dos insertos y el parental silvestre.



Para determinar si existe cosegregación entre uno de los insertos y el fenotipo mutante bastaría con evaluar el fenotipo en progenies de plantas sensibles a la kanamicina y comprobar que no segregan para el fenotipo. Si alguna de esas progenies segrega para el fenotipo (3/4 WT : 1/4 M) querrá decir que no existe cosegregación entre ninguno de los dos insertos y la mutación, siendo posible llegar a un resultado fiable con, al menos, 5 progenies de plantas WT sensibles a la kanamicina ($P_F = 5\%$ y $p = 1/2 \Rightarrow N > 4,32$).

En el caso de que exista cosegregación entre alguno de los insertos y la mutación hay que identificar cuál de los dos es el responsable del fenotipo (tabla 10). Asumiendo que sea el inserto A, como la mutación es recesiva y todas las plantas del retrocruce son WT, deberíamos identificar la progenie de la planta **Aabb**, la única que segrega 3 WT : 1 M y 3 KAN^R : 1 kan^S. Lo más eficaz es obtener las progenies de las plantas resistentes a la kanamicina (AaBb, Aabb y aaBb). Como la frecuencia del genotipo en cuestión (Aabb) entre las plantas resistentes es de 1/3, tendríamos que obtener las progenies de 8 plantas resistentes a la kanamicina ($P_F = 5\%$ y $p = 1/3 \Rightarrow N > 7,38$). A partir de aquí, el análisis de la segregación para la resistencia a la kanamicina junto con el análisis de la segregación para el fenotipo permitirá identificar la línea de interés, es decir, aquella que exhibe una segregación simple mendeliana para ambos caracteres (i.e. 3 KAN^R : 1 kan^S y 3 WT : 1 M).

Tabla 10. Fenotipos y resistencia a kanamicina en la autofecundación de las progenies de plantas de cruce (ver figura 4).

Plantas del retrocruce en caso de cosegregación					⊗ de retrocruce		
Frec.	Genotipo		Fenotipo	Marcador	Fenotipo	Marcador	
1	A ^m	a B b	WT	R	⇒ ⇒ ⇒	3 WT : 1 M 3 WT : 1 M WT WT	
1	A ^m	a b b	WT	R			15 R : 1 S
1	a	a B b	WT	R			3 R : 1 S
1	a	a b b	WT	S			3 R : 1 S
						S	

En el caso de que la línea T-DNA segregue para más de dos insertos funcionales, no habría más remedio que separar las copias mediante cruzamiento

con plantas silvestres. Por ejemplo, en plantas con 3 insertos funcionales (64 $KAN^R : 1 kan^S$) habría que evaluar más de 382 plantas TG2 para detectar alguna planta mutante sensible a la kanamicina con una probabilidad de fallo del 5% (i.e. una planta de genotipo “a a b b c c $d^m d^m$ ”). En definitiva, a partir de 3 insertos funcionales resulta más práctico segregar las copias mediante retrocruzamiento con el *wild-type* que realizar el análisis directamente con la TG2.

La conclusión obtenida en este tipo de experimentos es crucial a la hora de determinar la vía a través de la cual se va a clonar el gen alterado en el mutante. En el caso de un mutante insercional, la identificación del gen se lleva a cabo mediante técnicas basadas en Anchor-PCR. En cambio, cuando el mutante no es insercional, hay que cruzar plantas mutantes acigóticas (i.e. sin insertos de T-DNA) con plantas de *Solanum pimpinellifolium*, y tras hacer la asignación de los fenotipos WT y mutante en la F2, se lleva a cabo la identificación del gen mutado mediante técnicas de cartografiado genético. En este contexto, en el laboratorio del Dr. Lozano (UAL-Almería) ya se han clonado genes utilizando ambas técnicas.

3.4.4. Metodologías para realizar los análisis de cosegregación

Desde un punto de vista metodológico, los análisis de cosegregación de los mutantes que se detectan *in vitro* (tanto los específicos de estrés como los Vitro-Dev) se llevan a cabo a través de tres tipos de experimentos.

1) Análisis de plántulas en medio de germinación suplementado con kanamicina.

Los análisis se realizan al mismo tiempo que se determina el número de copias funcionales, siempre y cuando el fenotipo mutante resistente y sensible a la kanamicina sea fácilmente distinguible del fenotipo WT resistente y sensible a la kanamicina (e.g. ver mutantes albinos, apartado 4.3.1, páginas 75-82).

2) Análisis de plantas en medio de clonación suplementado con kanamicina.

En la mayor parte de los mutantes el análisis de cosegregación no se puede llevar a cabo en el medio de germinación con kanamicina, ya que no es posible distinguir entre una plántula mutante y WT sensible a la kanamicina. En estos casos, una vez que se detecta el mutante en el medio de germinación, se transfieren los ápices a medio de clonación suplementado con kanamicina. Desde el momento en el que los ápices meristemáticos se transfieren al medio de clonación se asigna un número a la planta y se anota el fenotipo de esa planta (figura 5).

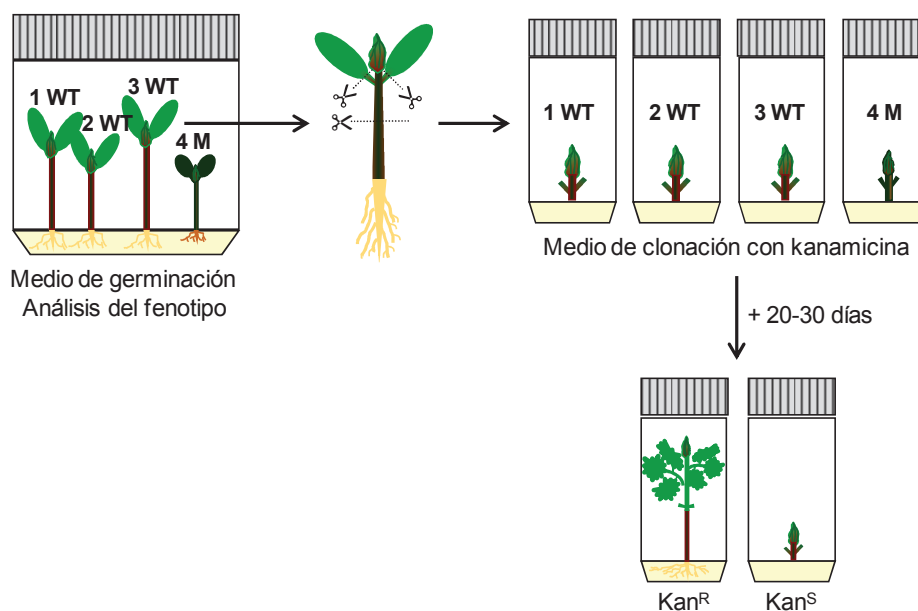


Figura 5. Test de kanamicina en planta axénica. Método basado en la transferencia de ápices a medio de clonación con kanamicina tras la visualización del fenotipo en el medio de germinación.

A los 20-30 días de cultivo se evalúa el enraizamiento y desarrollo de hojas verdaderas en las plantas WT y mutantes. En medio con kanamicina, los ápices meristemáticos que no expresan el *nptII* no son capaces de desarrollar ni raíces ni hojas verdaderas, a diferencia de las plantas que lo expresan, que se desarrollan con completa normalidad.

3) Análisis mediante el 'método ápice-cotiledón'. Este método se emplea en líneas que, por la peculiaridad del fenotipo mutante, no se pueden analizar de forma clara con los métodos descritos anteriormente. Por ejemplo, algunas plantas mutantes exhiben un porte tan débil y un ritmo de crecimiento tan lento que sus ápices, aún siendo resistentes a la kanamicina, no se desarrollan claramente en un medio de clonación con kanamicina. En otros casos, alteraciones en el ápice meristemático o, más comúnmente, en la parte radicular conducen a resultados confusos cuando los brotes se transfieren a medio con kanamicina. Para efectuar el análisis en estos casos, se ha desarrollado un método que consiste en transferir el ápice meristemático a medio de clonación (sin kanamicina), donde se corrobora el fenotipo mutante detectado a nivel de plántula, y los cotiledones de las plántulas a medio organogénico selectivo (i.e. con kanamicina), donde se evalúa la resistencia o sensibilidad a la kanamicina de cada planta. Respecto a la respuesta en medio organogénico selectivo, los explantes de cotiledón de plantas resistentes son capaces de desarrollar callos mientras que los de plantas

sensibles no experimentan crecimiento en este medio y terminan marchitando (figura 6).

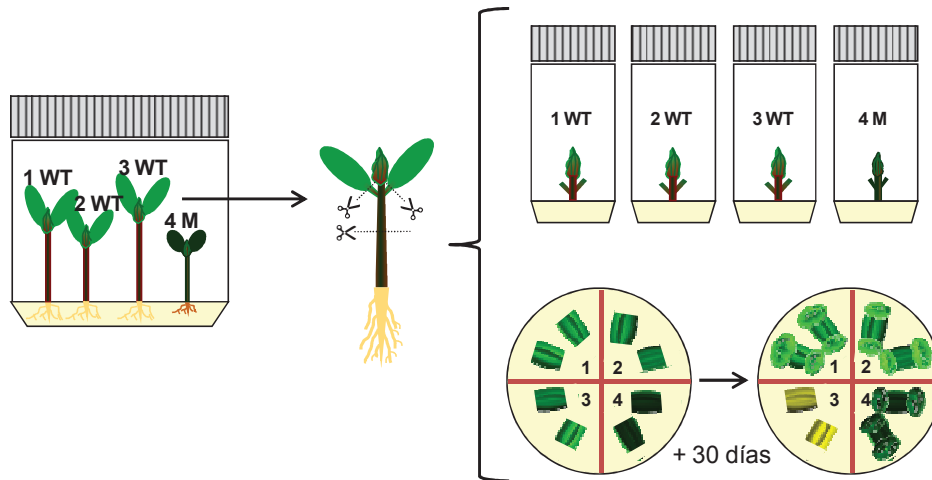


Figura 6. Método ápice-cotiledón. Método basado en la transferencia de los ápices a medio de clonación y los cotiledones a medio organogénico con kanamicina. En el esquema, las plantas 1, 2 y 4 son resistentes a la kanamicina puesto que sus cotiledones forman callo en medio organogénico selectivo. La planta 3 es sensible a la kanamicina ya que sus explantes no han sido capaces de crecer en el medio organogénico selectivo.

3.5. Evaluación *in vivo* del fenotipo mutante

3.5.1. Esterilización de semillas, germinación y obtención de plántulas axénicas

Se realiza tal y como se describe en los apartados 3.2.1 y 3.2.2. Una vez germinadas, las semillas se transfieren a los contenedores de cultivo (ver apartado 3.5.2).

3.5.2. Sistema de cultivo

Se realiza en un invernadero de cristal tipo capilla con refrigeración por aire acondicionado e iluminación artificial (ver apartado 3.3.5). Las semillas se siembran en maceta pequeña (polietileno negro Ø: 9 cm, Os-plastic) o de mayor calibre (15 x 15 cm de base y 20 cm de altura) en función del objetivo o duración del experimento. Como soporte de cultivo se utiliza fibra de coco. El riego se realiza manualmente en función de las necesidades de las plantas. En el caso de evaluar el fenotipo hipersensible a salinidad de un mutante, la solución de riego contiene además de los fertilizantes (ver apartado 3.3.5) 100 mM de NaCl. El tratamiento salino se inicia cuando las plántulas han desarrollado 1-2 o 3-4 hojas verdaderas en función del objetivo o la duración del experimento.

3.6. Análisis funcional del gen *PMS*.

La construcción correspondiente se obtuvo en los laboratorios del Dr. Bowler (Ecole Normale Supérieure-Paris, Francia) y Dr. Lozano (UAL, Almería). La construcción se obtuvo tras clonar un fragmento de cDNA del gen *PMS* en el vector pK7WG2D.1 y posterior subclonaje en el vector binario pART27 (Gleave, 1992).

3.6.1. Agrobacterium tumefaciens

Se utilizó la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 y el plásmido pART27. En este plásmido el gen marcador *nptII* se encuentra bajo el control del promotor nos y terminador nos. El cultivo de *Agrobacterium* se realizó como se indica en el apartado 3.3.2 con la diferencia de que el medio LB selectivo se suplementa con 50 mg/L de espectinomicina en vez de con gentamicina.

3.6.2. Método de transformación: selección y regeneración de plantas transgénicas

Como se describe en el apartado 3.3.3.

3.6.3. Enraizamiento de los brotes transgénicos

Como se describe en el apartado 3.3.4.

3.6.4. Aclimatación y trasplante

Como se describe en el apartado 3.3.5.

3.6.5. Evaluación in vivo del fenotipo mutante

Una vez a las plantas se les ha retirado el vaso de plástico, la evaluación de la sensibilidad a la salinidad se realiza como se ha descrito en el apartado 3.5.2.

4. Resultados

4.1. Generación de líneas T-DNA de tomate, *Solanum pimpinellifolium* y *S. cheesmaniae*

En el contexto del programa de Mutagénesis Insercional que se está abordando en nuestro laboratorio en colaboración con los grupos del Dr. Rafael Lozano (Universidad de Almería) y de la Dra. M^a Carmen Bolarín (CEBAS; Murcia) se han obtenido en torno a 3000 líneas T-DNA de tomate y más de 2000 de la especie silvestre *Solanum pennellii* (Atarés *et al.*, 2011). El objetivo central de la colaboración entre los tres grupos es la identificación de mutantes alterados en procesos del desarrollo vegetativo y reproductivo, así como en dos tipos de estrés abiótico (salinidad y estrés hídrico).

Con el fin de seguir profundizando en la disección genética de caracteres relevantes a nivel agronómico, uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral ha sido ampliar la colección de líneas T-DNA de tomate. Por lo que respecta a este objetivo, en nuestro laboratorio disponemos de un método de transformación genética que da resultados satisfactorios en distintos cultivares de tomate. A título de ejemplo, el método de transformación en el cv. Moneymaker de tomate proporciona una eficacia útil del 20-25%, es decir, entre 20 y 25 plantas transgénicas diploides derivadas de eventos independientes de transformación por cada 100 explantes que se inoculan con *Agrobacterium tumefaciens*. Como puede verse en la tabla 11, empleando este método y después de realizar 5 transformaciones genéticas, se obtuvieron 952 nuevas líneas T-DNA de tomate (cv. Moneymaker).

Tabla 11. Experimentos de transformación genética en tomate (cv Moneymaker).

Se indica el número de explantes inoculados en cada transformación, así como el número total de plantas regeneradas y el número de plantas diploides obtenidas (entre paréntesis el porcentaje respecto al total). Con estos valores se obtienen la eficacia real y la eficacia útil.

Explantes	Nº plantas	Eficacia real (%)*	Plantas diploides número + (%)	Eficacia útil (%)**
768	227	29,6	184 (81,1%)	23,9
720	216	30,0	173 (80,1%)	24,0
864	232	26,8	197 (84,9%)	22,8
816	244	29,9	190 (77,9%)	23,3
912	249	27,3	208 (83,5%)	22,8
4080	1168	28,7%	952 (81,5%)	23,4

*Eficacia real = Porcentaje de plantas regeneradas respecto al número de explantes inoculados
 **Eficacia útil = Porcentaje de plantas diploides respecto al número de explantes inoculados

La eficacia real de las transformaciones que se realizaron en el cultivar Moneymaker de tomate rondó el 30%. De estas plantas, en torno al 80% fueron diploides. En promedio, la eficacia útil de transformación genética fue del orden del 23% (tabla11).

Por otro lado, el programa de mutagénesis insercional con accesiones halotolerantes de especies silvestres se inició en nuestro laboratorio con *Solanum pennellii*. Aunque se puso a punto un método de transformación genética que proporcionó una elevada eficacia de transformación (ver Atarés *et al.*, 2011), la obtención de progenies TG2 de *S. pennellii* requería un enorme esfuerzo ya que, al tratarse de una alógama facultativa, había que realizar polinizaciones manuales. El grupo estaba interesado en obtener colecciones de líneas T-DNA en *S. cheesmaniae* y *S. pimpinellifolium*, ya que estas especies silvestres comparten con la especie cultivada el color rojo del fruto y, lo que es más importante, son autógamias. Además, en el caso de *S. pimpinellifolium*, considerada como el ancestro del tomate (Qi *et al.*, 2013), la identificación de mutantes del desarrollo reproductivo (i.e. morfología de la flor, arquitectura de la inflorescencia, tamaño, forma o color del fruto) podría ayudarnos a identificar los genes que fueron seleccionados en el proceso de domesticación. Alternativamente, la identificación de mutantes alterados en caracteres del desarrollo vegetativo (i.e. morfología y/o textura de la hoja, alteración en la densidad y/o tipos de tricomas, desarrollo radicular, etc.) podría permitirnos identificar genes potencialmente interesantes para su empleo en el contexto de programas de mejora genética del tomate.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, otro de los objetivos de esta Tesis Doctoral fue iniciar la generación de líneas T-DNA de *S. cheesmaniae* y *S. pimpinellifolium*. Antes de iniciar los experimentos de transformación genética realizamos un ensayo preliminar de regeneración con cotiledones y hojas de ambas especies. El objetivo era evaluar tanto el potencial morfogénico del material de partida como el porcentaje de plantas diploides que se regeneraban a partir de cada tipo de explante. Conviene indicar que en los experimentos de transformación genética sólo se individualiza una planta de cada callo morfogénico, a pesar de que a partir de un callo se podrían regenerar muchas más. Lo hacemos de esta forma para asegurarnos de que cada planta transgénica (cada línea T-DNA) procede de un evento independiente de transformación genética. Así pues, para que el experimento de regeneración fuese lo más parecido a lo que hacemos en un experimento de transformación genética, decidimos individualizar sólo una planta de cada callo morfogénico que se generaba en el explante. A continuación, una vez individualizadas y transferidas a medio de clonación (donde crece la planta axénica) se analizó el nivel de ploidía mediante citometría de flujo. El protocolo de regeneración fue el mismo que el empleado para *S. pennellii* (Atarés *et al.*, 2011).

Tabla 12. Experimentos de regeneración en *S. pimpinellifolium* y *S. cheesmaniae* a partir de explantes de cotiledón y de hoja.

Se indica el tipo de explante (cotiledón u hoja) y número de explantes, así como el número total de plantas regeneradas (una por cada callo morfogénico) y el número de plantas diploides obtenidas (entre paréntesis el porcentaje respecto al total). Con estos valores se obtienen la eficacia real de regeneración y la eficacia útil de regeneración.

Regeneración a partir de explantes de <i>S. pimpinellifolium</i>					
Explantes		Nº plantas regeneradas	Eficacia real regeneración (%)*	Plantas diploides Número + (%)	Eficacia útil regeneración (%)**
C	24	10	41,6%	3 (30,0%)	12,5%
H	24	11	45,8%	8 (72,7%)	33,3%
Regeneración a partir de explantes de <i>S. cheesmaniae</i>					
Explantes		Nº plantas regeneradas	Eficacia real regeneración (%)*	Plantas diploides Número + (%)	Eficacia útil regeneración (%)**
C	24	19	79,2%	2 (10,5%)	8,3%
H	24	18	75,0%	15 (83,3%)	62,5%

C = cotiledón, H = hoja
 *Eficacia real = Porcentaje de plantas regeneradas respecto al número de explantes
 **Eficacia útil = Porcentaje de plantas regeneradas diploides respecto al número de explantes

En ambas especies la eficacia de regeneración es similar en hojas y cotiledón. En el caso de *S. pimpinellifolium* ronda el 40-45%, mientras que en *S. cheesmaniae* oscila en torno al 75-80%.

Sin embargo, cuando se parte de explantes de cotiledón, la mayor parte de las plantas regeneradas es tetraploide (tabla 12). En el caso de *S. pimpinellifolium*, el porcentaje de plantas tetraploides es del 70 %, mientras que en *S. cheesmaniae* el porcentaje es aproximadamente del 90%.

En cambio, las plantas regeneradas a partir de explantes de hoja son mayoritariamente diploides. En efecto, más del 70% de las plantas regeneradas de *S. pimpinellifolium* fue diploide y, en el caso de *S. cheesmaniae* el porcentaje de plantas diploides asciende al 83%. Teniendo en cuenta estos resultados, los experimentos de transformación genética en ambas especies se realizaron con explantes de hoja.

Empleando el método de transformación descrito en Atarés *et al.* (2011), se realizaron 5 transformaciones en *S. pimpinellifolium* y 6 en *S. cheesmaniae* que hicieron factible la generación de 405 y 550 líneas T-DNA respectivamente (tabla 13). En la figura 7 se pueden ver algunas de las etapas del proceso de transformación genética en estas dos especies silvestres.

Como se puede ver en la tabla 13, en *S. pimpinellifolium*, la eficacia útil fue del 20% por término medio, aunque este valor puede que esté subestimado. En las primeras dos transformaciones la eficacia útil fue del 7% y el 14% respectivamente, mientras que en las últimas tres transformaciones se lograron eficacias que giran en torno al 25% y el 30%, es decir, casi el doble. No cabe duda de que los resultados fueron más satisfactorios a medida que fuimos familiarizándonos con el material vegetal de partida. En este sentido, en las primeras transformaciones se emplearon los explantes de todas las hojas que se habían desarrollado en las plántulas axénicas. Sin embargo, en estos dos primeros experimentos pudimos comprobar que lo más efectivo era utilizar los folíolos de las 3 hojas completamente expandidas más cercanas al ápice meristemático, ya que observamos que las que se encuentran próximas al hipocotilo parecen menos competentes para la transformación. De esta forma, en las tres últimas transformaciones se seleccionó este tipo de hoja, lo que permitió duplicar la tasa de transformación.

Por lo que respecta a *S. cheesmaniae*, los resultados son similares a los de *S. pimpinellifolium*, o incluso mejores. En este caso, la eficacia útil de transformación es, en promedio, del 30% (tabla 13), lo que significa que se pueden obtener unas 30 líneas T-DNA diploides a partir de 100 explantes inoculados.

Tabla 13. Experimentos de transformación genética en *S. pimpinellifolium* y *S. cheesmaniae*.

Se indica el número de explantes inoculados en cada transformación, así como el número total de plantas regeneradas y el número de plantas diploides obtenidas (entre paréntesis el porcentaje respecto al total). Con estos valores se obtiene la eficacia real y la eficacia útil.

Transformación genética en <i>S. pimpinellifolium</i>				
Explantes	Nº plantas	Eficacia real (%)*	Plantas diploides número + (%)	Eficacia útil (%)**
470	56	11,9	35 (62,5%)	7,4
336	60	17,9	49 (81,7%)	14,6
528	233	44,1	166 (71,2%)	31,4
360	122	33,9	90 (73,8%)	25,0
240	91	37,9	65 (71,4%)	27,1
1934	562	29,1	405 (72,1%)	21,1
Transformación genética en <i>S. cheesmaniae</i>				
Explantes	Nº plantas	Eficacia real (%)*	Plantas diploides número + (%)	Eficacia útil (%)**
120	48	40,0	38 (79,2%)	31,7
120	50	41,7	32 (64,0%)	26,7
288	92	31,9	70 (76,1%)	24,3
384	148	38,5	124 (83,8%)	32,3
336	188	55,9	140 (74,5%)	41,7
528	181	34,3	146 (80,7%)	27,6
1776	707	39,8	550 (77,8%)	30,9

*Eficacia real = Porcentaje de plantas regeneradas respecto al número de explantes inoculados
 **Eficacia útil = Porcentaje de plantas regeneradas diploides respecto al número de explantes inoculados

Habida cuenta de que las eficacias son muy similares a las que obtenemos actualmente en tomate (cv MoneyMaker), los resultados demuestran que es factible abordar la generación de líneas T-DNA en estas dos especies para abordar un programa de mutagénesis insercional.

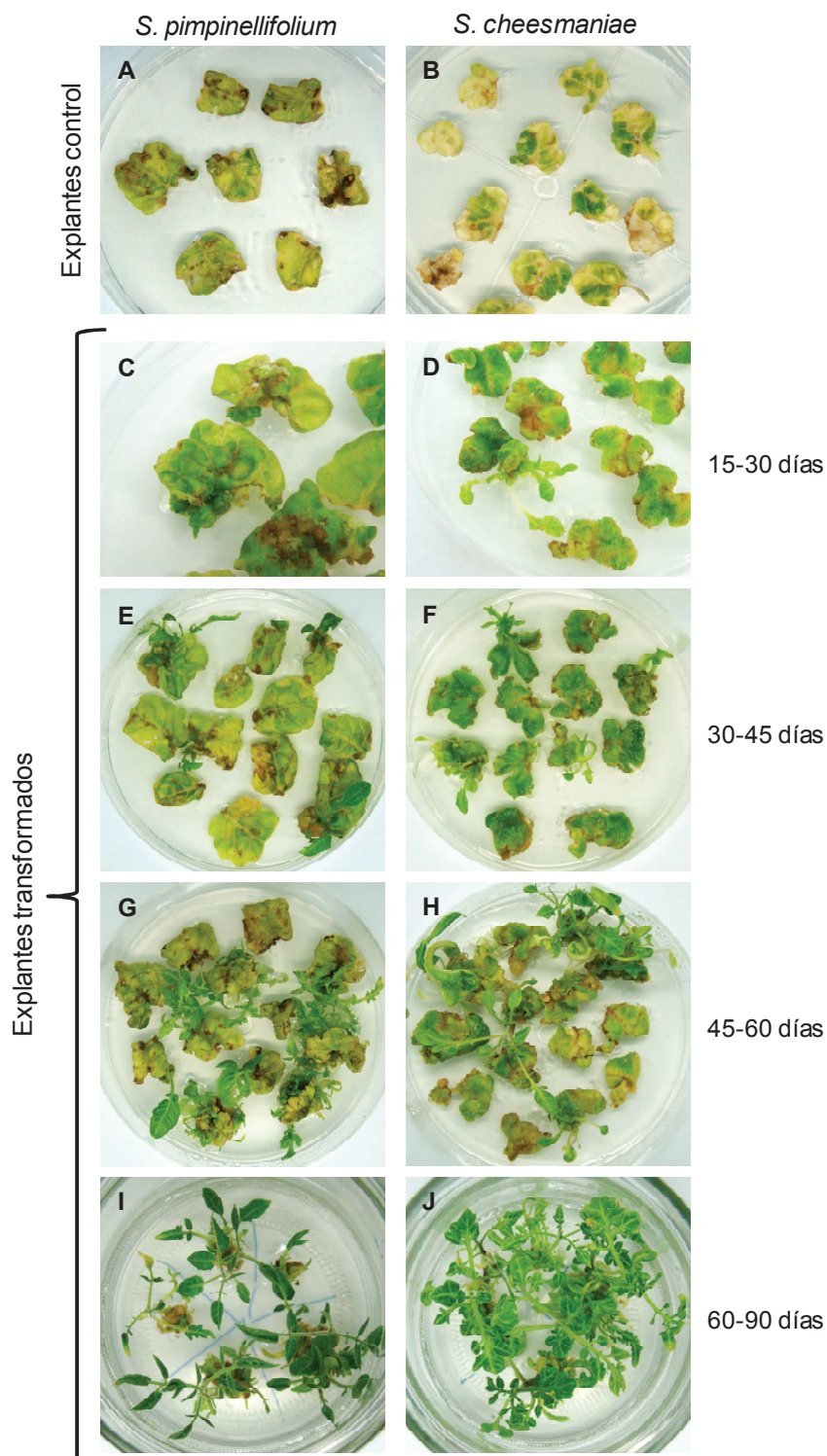


Figura 7. Transformación genética de *S. pimpinellifolium* y *S. cheesmaniae*.

A-B) Los explantes no inoculados con *Agrobacterium tumefaciens* no dan lugar a respuesta morfogénica en el medio selectivo (i.e. con kanamicina). C-D) En explantes inoculados con *Agrobacterium tumefaciens*, las primeras estructuras organogénicas aparecen a los 25-30 días de la transformación en *S. pimpinellifolium* y a los 15-20 días en *S. cheesmaniae*. E-H) La morfogénesis se amplifica con el paso del tiempo en el medio de morfogénesis. I-J) A los 60-90 días, las estructuras organogénicas se cultivan sobre el medio de elongación. Transcurridos 15-20 días, las plantas se pueden transferir a medio de clonación. Una vez alcanzan un determinado tamaño en este medio de cultivo, las plantas se pueden aclimatar y transferir a invernadero para obtener la progenie TG2.

4.2. Identificación de mutantes en condiciones de cultivo *in vitro*

Uno de los objetivos del programa de mutagénesis insercional en tomate y accesiones halotolerantes de especies silvestres (*Solanum cheesmaniae* y *S. pimpinellifolium*) es la identificación de genes que determinan tolerancia a la salinidad. Nuestro laboratorio está abordando este objetivo a través de la identificación de mutantes con alteraciones en este carácter (i.e. mutantes hipersensibles a la salinidad). Para identificar este tipo de mutantes, se está llevando a cabo el escrutinio en condiciones de estrés salino de las líneas T-DNA que se han ido generando a lo largo de los años en el laboratorio. Cuando se inició el proyecto, el grupo era consciente de que la detección de mutantes más sensibles a la salinidad mediante el escrutinio *in vivo* de las líneas T-DNA iba a requerir de mucho esfuerzo, tiempo y espacio de invernadero. Asimismo, podría ser complicado ya que ciertos factores presentes en condiciones de cultivo *in vivo* (e.g. la temperatura a la que se ven expuestas las plantas durante el proceso de evaluación, la concentración salina real que perciben las plantas, el estadio de desarrollo en el que se realiza el tratamiento salino o la incidencia de plagas o virus) pueden afectar en mayor o menor medida el comportamiento de las plantas a lo largo del proceso de evaluación. Como se ha comentado antes, otro aspecto a tener en cuenta para poder abordar este objetivo es el espacio requerido para llevar a cabo las evaluaciones. En condiciones de cultivo *in vivo*, para evaluar varios miles de líneas T-DNA, sería necesario disponer de un enorme espacio de invernadero.

Teniendo en cuenta estos aspectos, en nuestro laboratorio se puso a punto un método de escrutinio en condiciones salinas *in vitro* que resultó rápido y sencillo. Una de las ventajas del método es que las condiciones de cultivo *in vitro* permiten un mayor control sobre los diferentes factores que pueden afectar al crecimiento de las plantas. En este sentido, en una cámara de cultivo *in vitro* se controlan perfectamente los parámetros medioambientales (e.g. fotoperiodo, temperatura o humedad relativa), lo que permite llevar a cabo la evaluación a lo largo de todo el año. Por otro lado, la sal (NaCl) se disuelve a la concentración exacta en un medio de cultivo que lleva los componentes necesarios para el correcto desarrollo de la planta, por lo que todas las plantas quedan expuestas a la misma concentración de sal. Además, el método se diseñó para tener un control preciso del estadio de desarrollo a partir del cual las plantas perciben la sal. En relación con este punto, se siembran semillas pregerminadas en un medio

básico de cultivo con una concentración determinada de NaCl (100 mM), lo que quiere decir que las plántulas perciben el estrés salino desde el momento en el que empiezan a nutrirse del medio de cultivo. Por lo que se refiere al espacio requerido para llevar a cabo el escrutinio de las líneas T-DNA, la evaluación se puede llevar a cabo en un espacio relativamente reducido. A título de ejemplo, en un estante de la cámara de cultivo *in vitro* de 1,4 m de longitud por 0,5 m de profundidad se pueden evaluar 14 líneas T-DNA a razón de 32 plantas por línea (448 plantas). También se conoce con relativa precisión el tiempo requerido para detectar una línea con menor grado de tolerancia a la salinidad, que viene a ser de unos 35 a 50 días en función del grado de sensibilidad que la línea exhiba. Además, la experiencia adquirida a lo largo de estos últimos años analizando mutantes identificados con este método nos ha proporcionado evidencias claras que indican la existencia de correlación entre el fenotipo observado *in vitro* y el que se ve *in vivo* (Pineda *et al.*, 2011). En definitiva, la metodología para el escrutinio *in vitro* de las líneas T-DNA es efectiva y simplifica enormemente el proceso de preselección.

Respecto al método, la evaluación de cada línea se lleva a cabo en recipientes de cultivo de plántulas que contienen un medio básico de germinación suplementado con 100 mM de NaCl (ver apartado 3.4 de Material y Métodos, pág. 55). Tras la identificación del mutante en condiciones salinas se evalúa la especificidad del fenotipo para ese carácter, es decir, si el gen alterado sólo es requerido en condiciones de estrés y no es esencial para el desarrollo de la planta en condiciones normales de cultivo, es decir, en ausencia de estrés.

En el contexto de este trabajo, hemos visto que la mayor parte de los fenotipos observados en condiciones salinas también se detectan en ausencia de estrés. Es decir, no son mutantes específicos de estrés sino que se trata de mutantes que exhiben alteraciones en diferentes caracteres del desarrollo. A medida que los íbamos identificando, nos dimos cuenta de que algunos fenotipos podrían ser difíciles de identificar o caracterizar *in vivo* por el dramático efecto que producía la mutación. Caímos entonces en la cuenta de que el método que estábamos utilizando no sólo era eficaz para identificar mutantes de estrés sino que también era apropiado para identificar este tipo de mutantes del desarrollo. Además, como se ha comentado anteriormente, algunas mutaciones que eran difíciles de detectar o mantener *in vivo* podían ser mantenidas *in vitro* utilizando técnicas de propagación clonal. En definitiva, la metodología que se ha venido

utilizando para identificar mutantes más sensibles a estrés salino también nos ha permitido identificar mutantes muy valiosos que habrían pasado desapercibidos o que no se habrían podido caracterizar adecuadamente *in vivo*. A este tipo de mutantes alterados en caracteres del desarrollo que detectamos *in vitro* los hemos denominado Vitro-Dev.

En el contexto de esta Tesis Doctoral se ha realizado el escrutinio de 1545 líneas T-DNA de tomate, 194 líneas T-DNA de *Solanum pimpinellifolium* y 149 líneas T-DNA de *S. cheesmaniae*, y se han identificado 47 mutantes. Cada uno de estos mutantes exhibe una segregación mendeliana que ha sido contrastada con, al menos, 3 experimentos. Por otro lado, en función de la alteración observada, los mutantes se han clasificado sobre la base de diferentes descriptores fenotípicos. En la tabla 14 se concreta el número de mutantes que se han identificado por especie y fenotipo.

Tabla 14. Mutantes de tomate, *Solanum pimpinellifolium* y *S. cheesmaniae* identificados *in vitro*.

Especie	Descriptor fenotípico	Nº de mutantes
Tomate	Albinismo	3
	Color o morfología de la hoja	1
	Deficiencia en clorofila	10
	Letalidad en estadio de plántula	6
	Desarrollo radicular	2
	Desarrollo vegetativo	6
	Desarrollo del ápice meristemático	3
	Otros (crecimiento, necrosis, etc.)	2
	Salinidad	3
<i>S. pimpinellifolium</i>	Desarrollo radicular	1
	Desarrollo vegetativo	1
<i>S. cheesmaniae</i>	Letalidad en estadio de plántula	2
	Deficiencia en clorofila	3
	Desarrollo vegetativo	2
	Salinidad	1

Para hacer la exposición de los resultados lo más sucinta posible, hemos optado por describir sólo algunos de los mutantes más representativos de cada una de las clases fenotípicas (ver tabla 14). En primer lugar se describirán los mutantes tipo Vitro-Dev. En concreto, y por lo que respecta a tomate, los mutantes *tom2158*, *tom2297* y *tom2372* que exhiben albinismo; *tom1284* con alteraciones en el color y la morfología de la hoja; *tom1914* que manifiesta

deficiencia en clorofila; *tom338* y *tom1738* que sufren letalidad en estadio de plántula; *tom1608* y *tom1456* que tienen alterado el desarrollo radicular; *tom1425* con alteraciones en el desarrollo vegetativo; *tom1310* que tiene alterado el ápice meristemático; y, por último, *tom2142* que exhibe una respuesta necrótica. En relación con *Solanum pimpinellifolium*, se van a describir los mutantes *pim15* y *pim93*, alterados en el desarrollo radicular y vegetativo respectivamente. Finalmente, y por lo que respecta a los mutantes de *Solanum cheesmaniae*, se describen los mutantes *ch14*, *ch27* y *ch29* que son deficientes en clorofila, y *ch47*, en el que confluyen dos mutaciones relacionadas con el desarrollo vegetativo

Respecto a los mutantes tipo Vitro-Dev, habida cuenta de que el fenotipo se detecta tanto en condiciones salinas como en ausencia de estrés, para que la lectura resulte más ágil sólo se describirán los resultados de las segregaciones observadas y el análisis de los datos en el medio sin sal.

Finalmente, por lo que respecta a los mutantes alterados en el grado de tolerancia a la salinidad, se describirán los mutantes *tom1303* y *tom1560*, así como el mutante *pms-916* en el que ya se ha realizado el análisis funcional del gen etiquetado en colaboración con los grupos del CEBAS de Murcia y de la Universidad de Almería.

4.3. Mutantes de tomate alterados en caracteres del desarrollo (mutantes Vitro-Dev)

4.3.1. Mutantes que exhiben albinismo: *tom2158*, *tom2297* y *tom2372*

Resumen

Tres de los mutantes que se han identificado a lo largo del cribado de líneas T-DNA de tomate, a saber, *tom2158*, *tom2297* y *tom2372*, exhiben albinismo. En los tres casos, el fenotipo de las plántulas mutantes se detecta desde los primeros estadios de la germinación. En efecto, los cotiledones de las plántulas tienen un color blanquecino o amarillento desde que emergen y el hipocotilo exhibe un tono violáceo. En ninguno de los tres casos las plántulas mutantes son capaces de desarrollar hojas verdaderas en los medios que empleamos para la germinación de la semilla, ya que se marchitan pocos días después de expandir los cotiledones. Tampoco es posible mantener las plántulas transfiriendo el ápice al medio que rutinariamente utilizamos para la clonación de plantas de tomate. Los análisis genéticos han determinado que las tres líneas contienen 1 sólo inserto con nptII funcional. Por lo que respecta a la cosegregación entre la mutación y el inserto funcional, los análisis que se han realizado han permitido concluir que en uno de los mutantes (i.e. *tom2158*) no existe cosegregación mientras que el fenotipo mutante de los otros dos (i.e. *tom2297* y *tom2372*) está ocasionado por la inserción del T-DNA.

4.3.1.1 *tom2158*

4.3.1.1.1. Análisis genético del mutante en cultivo *in vitro*

El fenotipo mutante (i.e. albinismo) se observó con claridad en el experimento de identificación *in vitro*. Como se puede ver en la tabla 15, el análisis de los resultados indicó que se trataba de un mutante recesivo.

Tabla 15. Análisis genético del mutante *tom2158*

	Segregación observada		χ^2 ^a
	Wild-type	Mutante	
<i>In vitro</i> – Identificación	29	6	1,15

^a El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 3 plantas WT y 1 planta mutante (P>0,05; $\chi^2_{1\text{ g.l.}} = 3,84$)

4.3.1.1.2. Determinación del número de insertos con *nptII* funcional

Para determinar el número de insertos funcionales se sembraron 75 semillas en medio de germinación con kanamicina. El análisis de los resultados indicó que la línea segregaba para 1 inserto con *nptII* funcional (tabla 16).

Tabla 16. Segregación para el carácter resistencia a la kanamicina del mutante *tom2158*

	Kan ^R	Kan ^S	χ^2 ^a
Segregación observada	55	20	0,11

^a El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 3 plantas resistentes a kanamicina y 1 planta sensible ($P > 0,05$; $\chi^2_{1 \text{ g.l.}} = 3,84$)

4.3.1.1.3. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto con *nptII* funcional

El análisis de cosegregación entre el fenotipo mutante y el inserto con *nptII* funcional se pudo llevar a cabo con los resultados del experimento en el que se determinó el número de insertos funcionales. Esto es así porque en medio suplementado con kanamicina, las plántulas *wild-type* de tomate (sensibles a la kanamicina) no son capaces de desarrollar raíces laterales ni hojas verdaderas pero mantienen el color verde de los cotiledones. Las albinas, sin embargo, son claramente distinguibles de las silvestres ya que sus cotiledones son de color blanquecino. Por tanto, se puede saber cuál es el fenotipo de las plantas por el color de los cotiledones mientras que la capacidad de la planta para desarrollar o no raíces laterales determina si ésta es resistente o sensible a la kanamicina.

En el caso del *tom2158*, se pudo ver que algunas plantas mutantes eran resistentes a la kanamicina, mientras que otras eran sensibles (figura 8). En concreto, 7 de las 19 plantas mutantes fueron sensibles a la kanamicina (tabla 17). Este resultado indica la ausencia de cosegregación entre el inserto funcional y el fenotipo mutante.

Tabla 17. Segregaciones para el fenotipo y el carácter resistencia a la kanamicina del mutante *tom2158*

	Kan ^R		Kan ^S		χ^2 ^a
	WT	Mutante	WT	Mutante	
Segregación observada	43	12	13	7	-

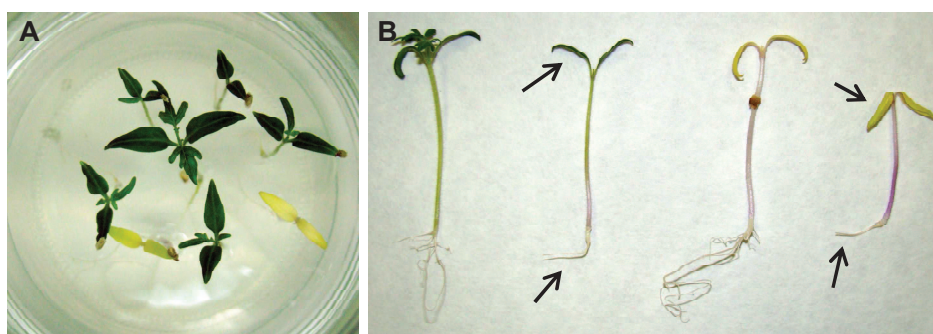


Figura 8. *tom2158*. A) Plantas de fenotipo silvestre y mutante en cultivo *in vitro*. B) De izquierda a derecha, planta WT resistente a la kanamicina, WT sensible a la kanamicina, mutante resistente a kanamicina y mutante sensible a la kanamicina. El fenotipo se distingue claramente por el color de los cotiledones mientras que la resistencia o sensibilidad a la kanamicina viene determinada por el desarrollo radicular.

4.3.1.2. *tom2297*

4.3.1.2.1. Análisis genético del mutante en cultivo *in vitro*

El fenotipo mutante se observó en dos experimentos (E1 y E2). Los resultados de ambos experimentos indicaban que se trataba de un mutante de tipo recesivo. El análisis de los datos acumulados (χ^2 datos acumulados) confirmó este resultado y el análisis de homogeneidad indicó que las muestras eran homogéneas (tabla 18).

Tabla 18. Análisis genético del mutante *tom2297*

	Segregación observada		χ^2 ^a
	Wild-type	Mutante	
<i>In vitro</i> – 1 ^{er} experimento (E1)	11	8	2,96
<i>In vitro</i> – 2 ^o experimento (E2)	66	22	0,00
<i>In vitro</i> – Datos acumulados (E1+E2) ^b	77	30	0,70

^a El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 3 plantas WT y 1 planta mutante ($P > 0,05$; $\chi^2_{t 1 g.l.} = 3,84$)

^b El análisis de la χ^2 de homogeneidad ($\chi^2_H = 2,44$) indica que las muestras son homogéneas.

4.3.1.2.2. Determinación del número de insertos con *nptII* funcional

Para determinar el número de insertos funcionales se sembraron 88 semillas en medio de germinación con kanamicina. Los resultados indicaron que la línea segregaba para 1 inserto con *nptII* funcional (tabla 19).

Tabla 19. Segregación para el carácter resistencia a la kanamicina del mutante *tom2297*

	Kan ^R	Kan ^S	χ^2 ^a
Segregación observada	63	25	0,55

^a El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 3 plantas resistentes a kanamicina y 1 planta sensible ($P > 0,05$; $\chi^2_{1 \text{ g.l.}} = 3,84$)

4.3.1.2.3. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto con *nptII* funcional

Como en el caso anterior, el análisis de cosegregación entre el inserto funcional y la mutación se llevó a cabo examinando la resistencia o sensibilidad a la kanamicina de las plántulas WT y mutantes del anterior experimento (tabla 20). Pudimos comprobar que todas las plantas mutantes eran resistentes a la kanamicina (figura 9). Además, entre las plantas de fenotipo WT, 2/3 eran resistentes a la kanamicina y 1/3 sensible. En conjunto, los datos se ajustaron a una segregación 1:2:1, es decir, 1 planta mutante resistente a la kanamicina, 2 plantas WT resistentes a kanamicina y 1 planta WT sensible a kanamicina, acorde con la segregación esperada para un mutante insercional de simple copia.

Tabla 20. Segregaciones para el fenotipo y la resistencia a la kanamicina del mutante *tom2297*

	Kan ^R		Kan ^S		χ^2 ^a
	WT	Mutante	WT	Mutante	
Segregación observada	41	22	25	0	0,61

^a El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 1 planta mutante resistente a kanamicina, 2 plantas WT resistentes a kanamicina y 1 planta WT sensible a kanamicina ($P > 0,05$; $\chi^2_{2 \text{ g.l.}} = 5,99$)

Teniendo en cuenta que en la muestra de 88 plantas no se detecta ninguna planta mutante sensible a la kanamicina, no hay motivo para dudar ($PF = 0,3 \%$) de que el fenotipo mutante se deba a la presencia en homocigosis de un inserto con *nptII* funcional. En definitiva, no hay motivos para dudar de que hay cosegregación entre el fenotipo mutante y el único inserto con *nptII* funcional.

Actualmente se está llevando a cabo la clonación del gen etiquetado en el laboratorio del Dr. Lozano.

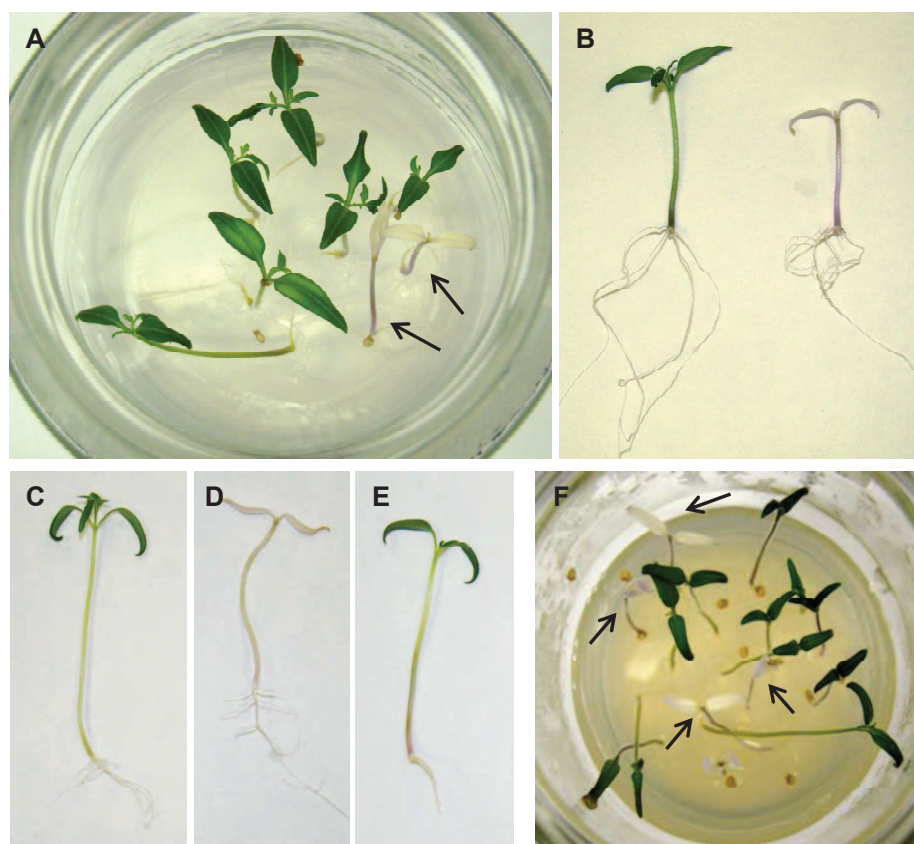


Figura 9. *tom2297*. A) Plantas WT y mutantes *in vitro*. B) WT vs mutante en el estadio de cotiledón expandido. C) Plántula WT resistente a la kanamicina. D) Plántula mutante resistente a la kanamicina. E) Plántula WT sensible a la kanamicina. F) Plántulas WT y mutantes en medio con kanamicina.

4.3.1.3. *tom2372*

4.3.1.3.1. Análisis genético del mutante en cultivo *in vitro*

Como en los otros dos mutantes albinos, el fenotipo se apreciaba claramente desde los primeros estadios de desarrollo de las plántulas. El análisis de los resultados indicó que se trataba de un mutante de tipo recesivo (tabla 21).

Tabla 21. Análisis genético del mutante *tom2372*

	Segregación observada		χ^2 ^a
	Wild-type	Mutante	
<i>In vitro</i> – Identificación	18	4	0,55

^a El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 3 plantas WT y 1 mutante ($P > 0,05$; $\chi^2_{1 \text{ g.l.}} = 3,84$)

4.3.1.3.2. Determinación del número de insertos con *nptII* funcional

Para la determinación del número de insertos funcionales se sembraron 48 semillas en medio con kanamicina. Los resultados indicaron que la línea segregaba para 1 inserto con *nptII* funcional (tabla 22).

Tabla 22. Segregación para el carácter resistencia a la kanamicina del mutante *tom2372*

	Kan ^R	Kan ^S	χ^2 ^a
Segregación observada	36	12	0,44

^a El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 3 plantas resistentes a kanamicina y 1 planta sensible ($P > 0,05$; $\chi^2_{t 1 g.l.} = 3,84$)

4.3.1.3.3. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto con *nptII* funcional

El análisis de cosegregación se realizó como en los otros dos mutantes albinos, es decir, examinando la resistencia o sensibilidad a la kanamicina de las plántulas WT y mutantes del anterior experimento (tabla 23).

Tabla 23. Segregaciones para el fenotipo y la resistencia a la kanamicina del mutante *tom2372*

	Kan ^R		Kan ^S		χ^2 ^a
	WT	Mutante	WT	Mutante	
Segregación observada	28	6	14	0	4,00

^a El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 1 planta mutante resistente a kanamicina, 2 WT resistentes a kanamicina y 1 planta WT sensible a kanamicina ($P > 0,05$; $\chi^2_{t 2 g.l.} = 5,99$)

Se comprobó que todas las plantas mutantes eran resistentes a la kanamicina. Asimismo, se vio que entre las plantas de fenotipo WT, 2/3 eran resistentes a la kanamicina y 1/3 sensible ($\chi^2 = 0,00 < \chi^2_{t 1 g.l.} = 3,84$). También se comprobó que los datos se ajustaron a una segregación 1:2:1, es decir, 1 planta mutante resistente a la kanamicina, 2 plantas WT resistentes a kanamicina y 1 planta WT sensible a kanamicina, acorde con la segregación esperada para un mutante insercional de simple copia ($\chi^2 = 4,00 < \chi^2_{t 2 g.l.} = 5,99$). Sin embargo, el análisis de la segregación para el fenotipo (42 WT : 6 M) indicó que los datos no se ajustaban a una segregación recesiva ($\chi^2 = 4,00 > \chi^2_{t 1 g.l.} = 3,84$).

Estos mismos resultados se obtienen cuando se analizan conjuntamente los datos de los dos experimentos (i.e. identificación y cosegregación). De nuevo, el

análisis de los datos acumulados indica que hay razones para dudar de una segregación recesiva (tabla 24). El análisis de los datos de ambos experimentos indica que existe una distorsión de la segregación en el segundo experimento. Esta distorsión se debe a que aparecen muy pocas plantas de fenotipo mutante (i.e. tan sólo 6, cuando deberían ser 12). Teniendo en cuenta que en el segundo experimento las semillas se siembran en un medio de germinación suplementado con kanamicina, pensamos que las mutantes, aún siendo resistentes a la kanamicina (figura 10), tienen mayor dificultad para desarrollarse en presencia del antibiótico, lo que podría explicar que aparezcan menos plantas mutantes en el medio de germinación suplementado con kanamicina respecto al que no contiene kanamicina. Alternativamente, puede ser que haya un cierto grado de subletalidad asociado al fenotipo albino, lo que no sería extraño. De hecho, el número observado de plantas albinas es menor que el esperado en ambos experimentos.

Tabla 24. Análisis de los datos acumulados correspondientes a los experimentos de identificación y cosegregación del mutante *tom2372*

	Segregación observada		χ^2 ^a
	Wild-type	Mutante	
<i>In vitro</i> – Identificación (E1)	18	4	0,55
<i>In vitro</i> – Cosegregación (E2)	42	6	4,00
<i>In vitro</i> – Datos acumulados (E1+E2) ^b	60	10	4,29

^a El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 3 plantas WT y 1 mutante ($P > 0,05$; $\chi^2_{t-1, g.l.} = 3,84$)

^b El análisis de la χ^2 de homogeneidad ($\chi^2_H = 0,26$) indica que las muestras son homogéneas.

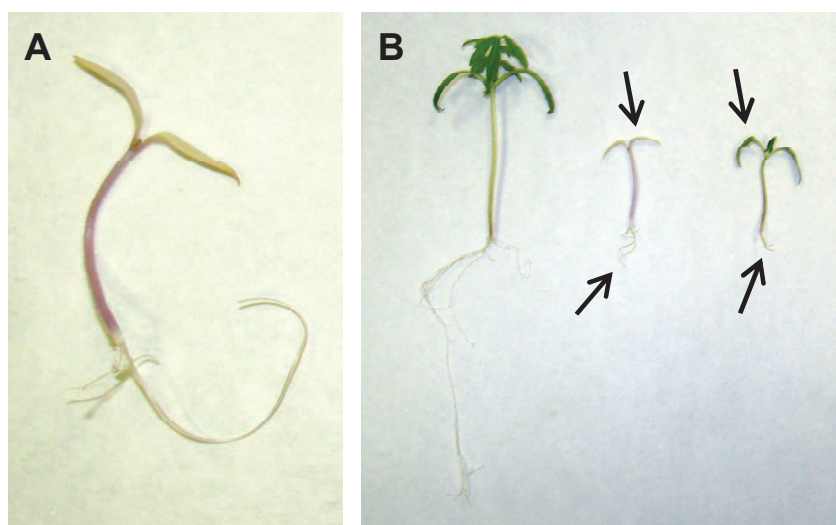


Figura 10. *tom2372*. A) Planta mutante en medio de germinación con 100 mg/l de kanamicina. B) De izquierda a derecha, plántula WT resistente a la kanamicina, mutante resistente a la kanamicina y WT sensible a la kanamicina

Recientemente este mutante se ha cultivado en el laboratorio del Dr. Lozano (UAL – Almería) en condiciones normales y los resultados indican que *tom2372* exhibe una segregación recesiva para un fenotipo de albinismo. Asimismo, se ha llevado a cabo un análisis de cosegregación molecular que indica que todas las plantas mutantes poseen T-DNA (Dr. Lozano, comunicación personal). Actualmente, están llevando a cabo la clonación del gen etiquetado mediante técnicas de Anchor PCR.

4.3.2. Mutantes alterados en el color o la morfología de la hoja: *tom1284*

Resumen

En la línea *tom1284* confluyen dos mutaciones en situación de epistasia simple recesiva. El alelo hipostático (mutación 1), es decir, el suprimido por el alelo epistático, determina la aparición de hojas variegadas, pero los restantes caracteres (e.g. morfología o tamaño de la hoja, morfología o tamaño de la flor, morfología o tamaño del fruto), no difieren con respecto al WT. El alelo epistático (mutación 2), es decir, el que predomina sobre el anterior, determina hojas con severas alteraciones morfológicas (i.e. más pequeñas, arrugadas y curvadas hacia el envés). En las plantas con la mutación 2 las flores también tienen una morfología distinta y los pocos frutos que se desarrollan carecen de semilla.

El análisis en medio suplementado con kanamicina ha indicado que la línea sólo contiene un inserto con *nptII* funcional y el análisis de cosegregación ha permitido concluir la existencia de cosegregación entre el inserto y el fenotipo mutante 1, es decir, el que determina variegación en sus hojas.

4.3.2.1. Análisis genético del mutante en cultivo *in vitro*

Los dos fenotipos mutantes (1 y 2) se vieron en tres experimentos (E1, E2 y E3). Los resultados de estos experimentos indicaron que la segregación se ajustaba a un modelo de epistasia simple recesiva (tabla 25).

Tabla 25. Análisis genético del mutante *tom1284*

	Segregación observada			χ^2 ^a
	Wild-type	Mutante 1	Mutante 2	
<i>In vitro</i> – 1 ^{er} experimento (E1)	17	6	5	0,78
<i>In vitro</i> – 2 ^o experimento (E2)	26	11	12	0,45
<i>In vitro</i> – 3 ^{er} experimento (E3)	21	10	20	6,20
<i>In vitro</i> – Datos acumulados (E1+E2+E3) ^b	64	27	37	2,05

^a El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 9 plantas WT, 3 plantas con la mutación 1 y 4 plantas con la mutación 2 ($P > 0,05$; $\chi^2_{t\ 2\ g.l.} = 5,99$)

^b El análisis de la χ^2 de homogeneidad ($\chi^2_H = 5,39$) indica que las muestras son homogéneas ($P > 0,05$; $\chi^2_{t\ 4\ g.l.} = 9,48$).

Conviene indicar que los datos del tercer experimento (E3) se desvían un poco de los valores esperados ($\chi^2 = 6,20 > \chi^2_{t\ 2\ g.l.} = 5,99$) porque se observaron menos plantas de fenotipo WT (21 observadas respecto a 28,68 esperadas) y más plantas de fenotipo mutante 2 (20 observadas respecto a 12,75 esperadas). Con todo, el análisis de los datos acumulados indicó que no había motivos para

rechazar la hipótesis y el análisis de homogeneidad indicó que las muestras eran homogéneas (tabla 25).

4.3.2.2. Determinación del número de insertos con *nptII* funcional

Para estimar el número de insertos funcionales se realizaron 3 experimentos consistentes en la siembra de un total de 128 semillas en el medio selectivo.

Tabla 26. Segregación para el carácter resistencia a la kanamicina del mutante *tom1284*

	Segregación observada		χ^2 ^a
	Kan ^R	Kan ^S	
Experimento 1 (E1)	16	12	4,76
Experimento 2 (E2)	32	17	2,46
Experimento 3 (E3)	37	14	0,16
Datos acumulados (E1+E2+E3) ^b	85	43	5,04

^a El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 3 plantas resistentes a kanamicina y 1 planta sensible ($P > 0,05$; $\chi^2_{1 \text{ g.l.}} = 3,84$).

^b El análisis de la χ^2 de homogeneidad ($\chi^2_{\text{H}} = 2,34$) indica que las muestras son homogéneas ($P > 0,05$; $\chi^2_{4 \text{ g.l.}} = 5,99$).

Los resultados parecen indicar que la línea segrega para 1 inserto con *nptII* funcional (tabla 26). Sin embargo, los datos del experimento 1 se desvían un poco de los valores esperados, y lo mismo ocurre cuando se lleva a cabo el análisis de los datos acumulados. La causa estriba en que en todos los experimentos, especialmente en el experimento 1, aparecieron más plantas sensibles a la kanamicina de lo que cabría esperar para una segregación 3:1. De hecho, los resultados del experimento 1 se ajustan también a una segregación 2:1 ($\chi^2 = 1,14 > \chi^2_{1 \text{ g.l.}} = 3,84$), situación que implicaría la letalidad de las plantas que portan el inserto en homocigosis, y a una segregación 1:1 ($\chi^2 = 0,57 > \chi^2_{1 \text{ g.l.}} = 3,84$), lo que podría deberse a un silenciamiento del *nptII* en las plantas homocigóticas para el inserto o a letalidad de alguno de los dos gametos portadores del inserto.

La anomalía de estos resultados nos llevó a realizar dos nuevos experimentos. Los resultados indicaron que los datos se ajustan tanto a una segregación 3:1 como a una 2:1, pero no a una segregación 1:1.

Para averiguar lo que ocurre, decidimos obtener progenies TG3 y analizar la segregación para resistencia a la kanamicina en algunas de estas progenies. En el caso de una situación de letalidad de las plantas portadoras del inserto en

homocigosis (segregación 2:1) no se podrían obtener progenies TG3 homocigóticas para el inserto. Sin embargo, en el caso de una segregación 3:1 sí que se pueden obtener este tipo de progenies.

Los ensayos con progenies TG3 (ver apartado 4.3.2.4) permitieron identificar líneas homocigóticas para el T-DNA, lo que descarta que la descendencia TG2 exhiba una segregación 2:1.

La explicación de lo qué pudo haber ocurrido en el primer experimento (que es el que distorsiona la segregación esperada) se obtuvo más tarde. En concreto, las evaluaciones ulteriores indicaron que las plantas mutantes (en especial las que exhiben la mutación 2) necesitan más tiempo para desarrollarse que las plantas WT. Es posible por tanto que en el primer experimento algunas plantas resistentes a la kanamicina se consideraran como sensibles ya que no habían tenido tiempo suficiente para desarrollarse.

4.3.2.3. Visualización de los fenotipos mutantes en invernadero

Para comprobar que los fenotipos mutantes también se veían en invernadero se cultivaron 22 plantas TG2 de la línea 1284. Se observaron los mismos fenotipos que se habían visto *in vitro* (figura 11) y los resultados volvieron a indicar que la segregación se ajustaba a una situación de epistasia simple recesiva (tabla 27). Teniendo en cuenta esto, completamos el análisis genético incluyendo los resultados observados tanto *in vivo* como *in vitro*.

Tabla 27. Análisis genético del mutante *tom1284*

	Segregación observada			χ^2 ^a
	Wild-type	Mutante 1	Mutante 2	
<i>In vivo</i> – 4 ^o experimento (E4)	9	7	6	2,97
<i>In vitro</i> – 1 ^{er} experimento (E1)	17	6	5	0,78
<i>In vitro</i> – 2 ^o experimento (E2)	26	11	12	0,45
<i>In vitro</i> – 3 ^{er} experimento (E3)	21	10	20	6,20
<i>In vitro</i> – Datos acumulados (E1+E2+E3+E4) ^b	71	34	43	3,57

^a El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 9 plantas WT, 3 plantas con la mutación 1 y 4 plantas con la mutación 2 ($P > 0,05$; $\chi^2_{t\ 2\ g.l.} = 5,99$)

^b El análisis de la χ^2 de homogeneidad ($\chi^2_H = 6,06$) indica que las muestras son homogéneas ($P > 0,05$; $\chi^2_{t\ 6\ g.l.} = 12,59$).

El análisis de los datos acumulados indicó que no había motivos para rechazar esta hipótesis y el análisis de homogeneidad indicó que las muestras eran homogéneas (tabla 27).

4.3.2.4. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto con *nptII* funcional

Para llevar a cabo el análisis de cosegregación del fenotipo mutante con el inserto funcional se utilizaron las plantas de los tres experimentos realizados *in vitro* (i.e. E1, E2 y E3). Para ello, los ápices meristemáticos de las plantas se transfirieron a medio de clonación suplementado con 100 mg/l de kanamicina. Tras 30 días de cultivo en este medio de cultivo selectivo se pudo diferenciar entre las plantas resistentes a la kanamicina (enraízan y desarrollan hojas verdaderas) de las sensibles al antibiótico (no son capaces de enraizar y el ápice marchita). Los resultados se pueden ver en la tabla 28.

Tabla 28. Segregaciones para el fenotipo y el carácter resistencia a la kanamicina del mutante *tom1284*

	Kan ^R			Kan ^S		
	WT	Mutante 1	Mutante 2	WT	Mutante 1	Mutante 2
Segregación observada (E1)	8	6	2	9	0	3
Segregación observada (E2)	13	11	8	13	0	4
Segregación observada (E3)	12	10	15	9	0	5
(E1+E2+E3)	33	27	25	31	0	12

Los resultados indican que hay cosegregación entre el fenotipo mutante 1, es decir, el que exhibe variegación, y el inserto con *nptII* funcional. Nosotros sabíamos que, dado que la línea sólo segregaba para un inserto funcional, sólo se detectaría cosegregación con uno de los dos fenotipos mutantes. Por el momento no sabemos si el fenotipo mutante 2 se debe a un evento de variación somaclonal o a la integración de un inserto truncado que no expresa el gen marcador. El análisis molecular de las plantas que exhiben la mutación 2 y que no expresan el *nptII* permitirá conocer cuál es el origen de esta mutación. Por ahora nos estamos centrando en la mutación que cosegrega con el inserto funcional. En este sentido, ya se han obtenido progenies TG3 procedentes de plantas con el fenotipo mutante 1. El objetivo es doble. Por un lado, estamos verificando que se trata realmente de un mutante insercional. Para ello, teniendo en cuenta que el fenotipo mutante se debe a la integración de un inserto funcional en homocigosis, las progenies TG3 que derivan de estas plantas deben ser resistentes a la kanamicina. En este sentido, ya se han evaluado 2 progenies TG3 y se ha observado que todas las plantas son resistentes a la kanamicina, es decir, homocigóticas para el inserto funcional. Por otro lado, queremos identificar una

progenie TG3 que sólo exhiba el fenotipo mutante 1, es decir, queremos segregar ambas mutaciones. Los experimentos realizados hasta la fecha indican que las dos progenies TG3 evaluadas segregan para la mutación 2. Con todo, aún quedan varias progenies TG3 que derivan de plantas mutantes que deben ser analizadas. Es, por tanto, previsible que se identifique alguna que sólo porte la mutación 1.

Los resultados obtenidos hasta la fecha indican la existencia de cosegregación entre el fenotipo mutante 1, es decir, el que exhibe variegación, y el inserto funcional. En los próximos meses se llevará cabo la identificación del gen etiquetado mediante técnicas de Anchor-PCR en el laboratorio del Dr. Lozano (UAL-Almería).

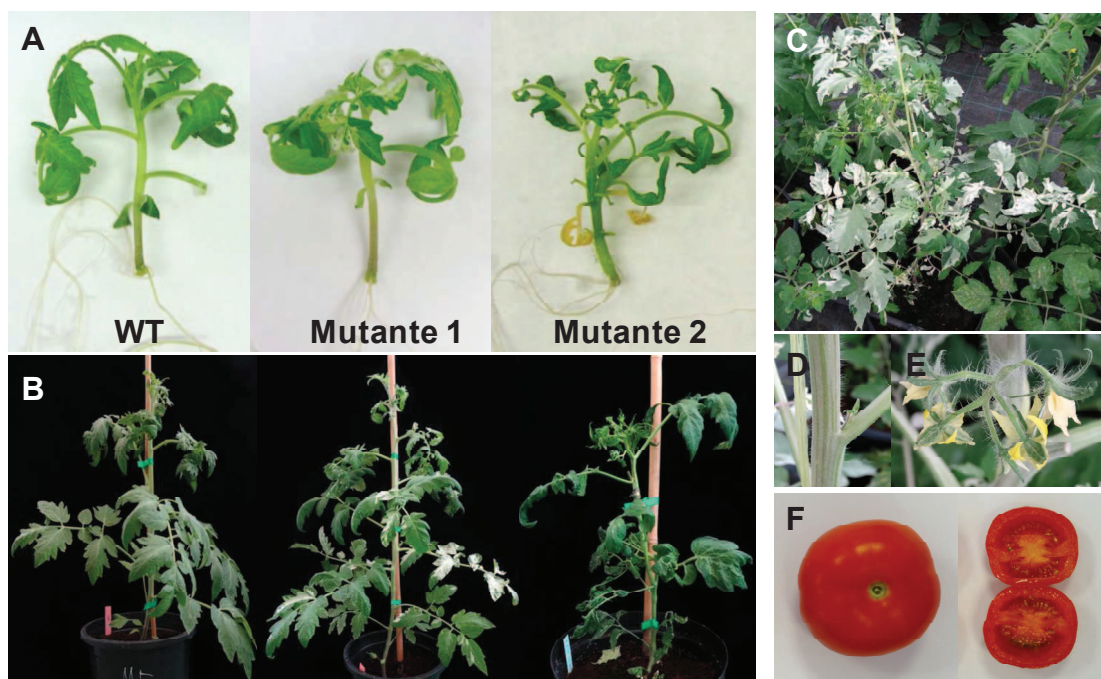


Figura 11. *tom1284*. A) Identificación de las mutaciones *in vitro*: el mutante 1 exhibe variegación y el mutante 2 desarrolla hojas más pequeñas y morfológicamente distintas. B) Observación de las mutaciones *in vivo*: los fenotipos conferidos por ambas mutaciones son idénticos a los observados *in vitro*. C) Mutante 1 (variegado) en el invernadero. D) El tallo del mutante 1 exhibe sectores o franjas con diferentes tonos de color verde (variegación). E) Las flores del mutante 1 son aparentemente normales. F) Los frutos del mutante 1 son rojos, como los del WT, y tienen semilla.

4.3.3. Mutantes afectados en la síntesis de clorofila: *tom1914*

Resumen

En el contexto de este trabajo de investigación se han identificado 10 mutantes que manifiestan con mayor o menor intensidad deficiencia en clorofila en sus hojas. En estos mutantes, el fenotipo clorótico se detecta desde los primeros estadios de desarrollo de la plántula. En la mayor parte de estos mutantes, el fenotipo se detecta cuando se inicia el desarrollo de las primeras hojas verdaderas. Sin embargo, en algunos la clorosis se ve desde el momento en el que se expanden los cotiledones. Los mutantes que nosotros hemos incluido en la categoría fenotípica de mutantes cloróticos se desarrollan con normalidad en los medios básicos que empleamos para la germinación de semillas o la clonación de plantas. Aunque la mayor parte de ellos exhiben un ritmo de crecimiento más lento, algunos crecen al ritmo del parental silvestre a pesar de ser más cloróticos. *tom1914* es uno de estos mutantes en los que, a pesar de exhibir clorosis (ver figura 12), no ve reducido su crecimiento respecto al control. Los análisis realizados en *tom1914* han indicado que se trata de un mutante recesivo portador de 1 inserto con *nptII* funcional que no cosegrega con la mutación.

4.3.3.1. Análisis genético del mutante en cultivo *in vitro*

El fenotipo mutante se observó en tres experimentos (E1, E2 y E3). Los resultados de estos experimentos indicaban que se trata de un mutante recesivo. El análisis de los datos acumulados (χ^2 datos acumulados) confirmó este resultado y el análisis de homogeneidad indicó que las muestras eran homogéneas (tabla 29).

Tabla 29. Análisis genético del mutante *tom1914*

	Segregación observada		χ^2 ^a
	Wild-type	Mutante	
<i>In vitro</i> – 1 ^{er} experimento (E1)	12	5	0,18
<i>In vitro</i> – 2 ^o experimento (E2)	15	3	0,67
<i>In vitro</i> – 3 ^{er} experimento (E3)	8	4	0,44
<i>In vitro</i> – Datos acumulados (E1+E2+E3) ^b	35	12	0,01

^a El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 3 plantas WT y 1 planta mutante ($P > 0,05$; $\chi^2_{t\ 1\ g.l.} = 3,84$)

^b El análisis de la χ^2 de homogeneidad ($\chi^2_H = 1,28$) indica que las muestras son homogéneas.

4.3.3.2. Determinación del número de insertos con *nptII* funcional

Para determinar el número de insertos funcionales se sembraron 46 semillas en medio con kanamicina. Los resultados indicaron que la línea segregaba para 1 inserto con *nptII* funcional (tabla 30).

Tabla 30. Segregación para el carácter resistencia a la kanamicina del mutante *tom1914*

	Kan ^R	Kan ^S	χ^2 ^a
Segregación observada	40	6	3,51

^a El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 3 plantas resistentes a kanamicina y 1 planta sensible ($P > 0,05$; $\chi^2_{t 1 g.l.} = 3,84$)

4.3.3.3. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto con *nptII* funcional

Para ver si había asociación entre la presencia del inserto con *nptII* y el fenotipo mutante, se emplearon progenies TG3 de plantas TG2 de fenotipo mutante (figura 12B, dcha.). Previamente, algunas plantas mutantes¹ que se mantenían en medio de clonación se aclimataron y llevaron al invernadero. Habíamos observado que cuando los ápices de plantas mutantes se transferían a medio de clonación, las plantas axénicas perdían parcialmente la clorosis y no era fácil distinguir las de fenotipo silvestre. Por tanto, para estar completamente seguros de que las plantas que se habían detectado eran realmente mutantes decidimos ver su fenotipo en invernadero. En estas condiciones, se vio que las hojas de las plantas mutantes eran de un color verde más claro (figura 12C vs 12F). Cuando las plantas empezaron a desarrollar frutos vimos que la mutación también afectaba a la pigmentación del fruto. En efecto, en el estadio verde maduro los frutos de las plantas mutantes, de color verde más claro, se diferenciaban claramente de los de las plantas de fenotipo silvestre (figura 12D vs 12G-H). También pudimos apreciar que los frutos de las plantas mutantes no alcanzaban el color rojo característico del estado maduro, sino que eran de color anaranjado. Respecto a otros caracteres, no se detectaron diferencias entre las plantas mutantes y las de fenotipo silvestre. En efecto, el ritmo de crecimiento del mutante era similar al del WT, las inflorescencias tenían la misma arquitectura y similar tamaño, y tampoco se detectaron diferencias apreciables en la tasa de cuajado, el calibre de los frutos o el desarrollo de semillas.

¹ Algunas plantas mutantes que habían sido identificadas en experimentos previos (e.g. experimento 2, ver tabla 29) se mantenían in vitro en medio de clonación

Una vez que se obtuvieron algunas progenies TG3 de plantas mutantes se iniciaron los análisis de cosegregación. Tras evaluar la primera de las progenies mutantes en medio selectivo comprobamos que el inserto funcional no era el responsable del fenotipo mutante, ya que se detectó segregación para la resistencia a la kanamicina (tabla 31). De existir cosegregación, todas las plantas mutantes tendrían que haber sido resistentes a la kanamicina (al tratarse de un mutante recesivo de simple copia). Actualmente sabemos que en esta línea no existe otro fragmento del T-DNA (no funcional para el gen *nptII*) que pudiera ser responsable del fenotipo mutante. Por tanto, el fenotipo se debe a un evento de tipo somaclonal.

Tabla 31. Segregación para el carácter resistencia a la kanamicina en la progenie TG3 procedente de una planta mutante del mutante *tom1914*

	Kan ^R	Kan ^S	χ^2 ^a
Segregación observada	15	4	0,16

^a El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 3 plantas resistentes a kanamicina y 1 planta sensible (P>0,05; $\chi^2_{1\text{ g.l.}} = 3,84$)

Por otro lado, para corroborar el fenotipo clorótico de la planta TG2 original (observado *in vitro* en estadio de plántula) en la progenie TG3, se sembraron semillas en medio básico de germinación. Se vio que todas las plántulas exhibían el fenotipo de clorosis (figura 12I).

En definitiva, *tom1914* es un mutante recesivo no insercional que exhibe un fenotipo de clorosis en hoja y una alteración en la pigmentación en fruto. A pesar de ello, el crecimiento de la planta no se ve afectado por la mutación, ni tampoco otros caracteres del desarrollo reproductivo que podrían estar alterados en este tipo de mutantes. Por estar razones, se decidió obtener el material vegetal que ayude a identificar el gen mutado en un futuro próximo.

4.3.3.4. Obtención de líneas para el mapeo del gen mutado

Para llevar a cabo el mapeo fino del gen mutado se debe cruzar una planta mutante (preferentemente sin inserto) con una planta de *Solanum pimpinellifolium* (accesión LA1589). Tras obtener la F1, conviene conseguir la mayor cantidad de progenie F2 a partir de una única planta F1. La correcta evaluación fenotípica de la población F2 permite identificar las plantas mutantes que poseen la región no recombinante que alberga la mutación en un cromosoma específico. El adecuado conocimiento de la técnica de mapeo permite llegar con éxito al gen mutado. En

este sentido, en el laboratorio del Dr. Lozano ya se han clonado algunos genes empleando esta estrategia.

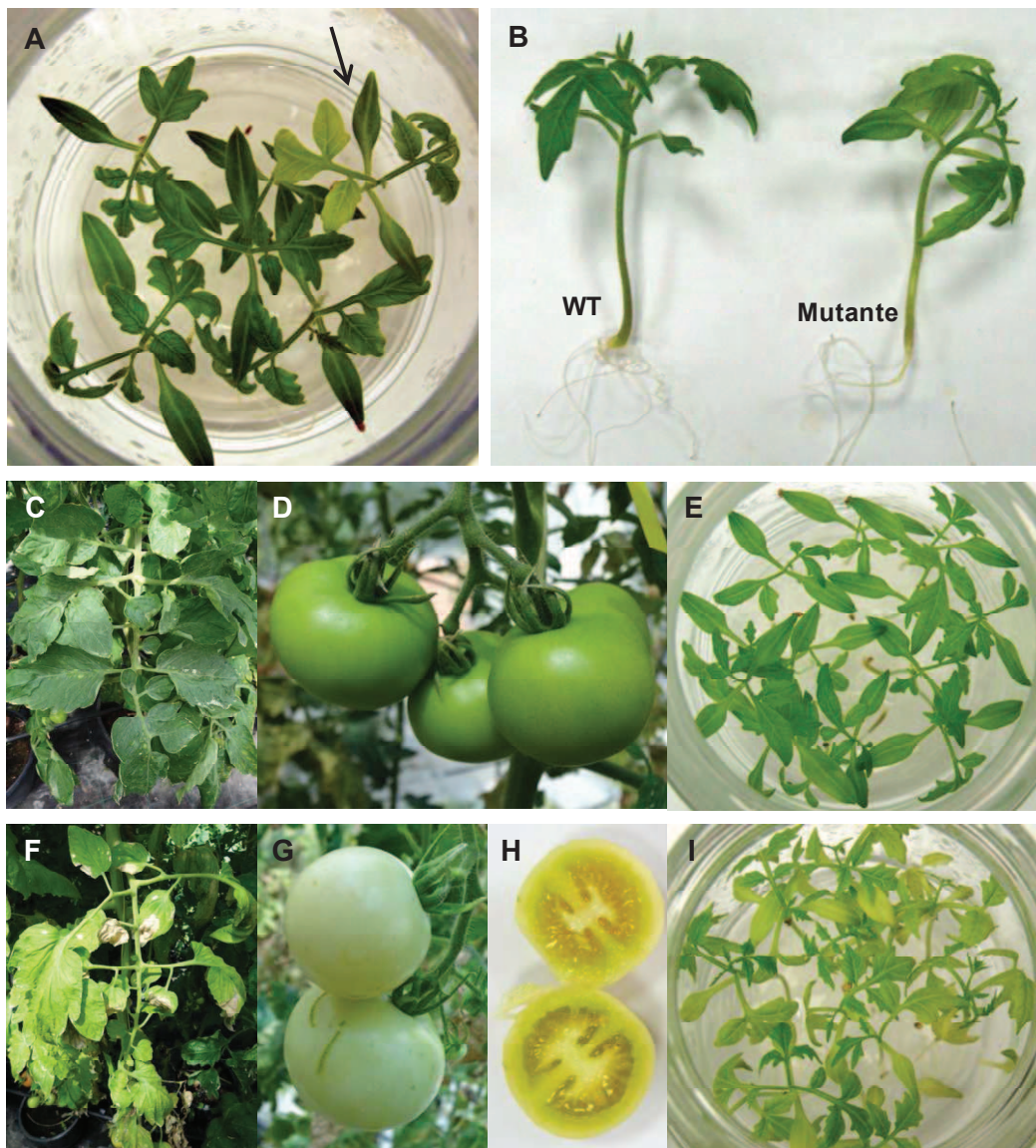


Figura 12. *tom1914*. A) Plantas WT (varias) y mutante (una) en un recipiente de cultivo. B) WT vs mutante después de extraer las plantas del recipiente de cultivo. C) Hoja de una planta WT en invernadero. D) Frutos de una planta WT. E) Progenie TG3 homocigótica para el alelo WT en un recipiente de cultivo. F) Hoja de una planta mutante en invernadero. G-H) Frutos de una planta mutante. I) Progenie TG3 homocigótica para el alelo mutante en un recipiente de cultivo.

Para llevar a cabo el cruzamiento con *Solanum pimpinellifolium*, lo primero que hicimos fue identificar una planta mutante sin inserto y sensible a la kanamicina. Como en ese momento teníamos *in vitro* una progenie TG3 que procedía de una planta TG2 mutante y que segregaba para el gen marcador, identificamos una planta mutante sensible a la kanamicina (ver apartado anterior). Para ello, los ápices de 12 plántulas que se encontraban en el medio básico de

germinación se transfirieron a medio de clonación, y explantes de hoja y cotiledón de cada plántula a medio de morfogénesis suplementado con kanamicina (ver análisis mediante el método ápice-cotiledón, página 62). A los 30 días se vio que 3 de las 12 plantas eran sensibles a la kanamicina (sus cotiledones y/o hojas no había sido capaces de desarrollar callo en el medio organogénico). Una de estas plantas se transfirió al invernadero junto con una planta de la accesión LA1589 de *S. pimpinellifolium*, se obtuvo la F1 y, más adelante, la F2. Actualmente disponemos de más de 2000 semillas F2 para proceder a la identificación del gen alterado en el mutante.

4.3.4. Mutantes que mueren en estadio de plántula (*seedling lethal*)

Resumen

Algunos de los mutantes que se han detectado en el escrutinio de líneas de T-DNA exhiben una muerte prematura en estadio de plántula. En estos mutantes la muerte de la plántula no se debe al sistema radicular, que aparentemente se desarrolla con normalidad (figuras 13B y 14B). Por el contrario, la mutación afecta de manera severa a la parte aérea desde los primeros estadios del desarrollo de la plántula en forma de retraso del crecimiento, clorosis extrema y colapso del ápice meristemático, lo que ocasiona la muerte de la plántula. A continuación, se describirán dos de estos mutantes, a saber, tom338 y tom1738. Los análisis genéticos indican que se trata de mutantes recesivos. Asimismo, los análisis de segregación en medio selectivo han permitido determinar que tom338 tiene un inserto funcional mientras que tom1738 tiene dos. En ambos casos, los análisis de cosegregación han permitido concluir que la mutación no está ocasionada por un inserto funcional.

4.3.4.1. Tom338

4.3.4.1.1. Análisis genético del mutante en cultivo *in vitro*

Se realizaron 3 experimentos para llevar a cabo el análisis genético del mutante *tom338*. Los resultados indicaron que se trataba de un mutante de naturaleza recesiva. El análisis de los datos acumulados confirmó este resultado y el análisis de homogeneidad indicó que las muestras eran homogéneas (tabla 32).

Tabla 32. Análisis genético del mutante *tom338*

	Segregación observada		χ^2 ^a
	Wild-type	Mutante	
<i>In vitro</i> – 1 ^{er} experimento (E1)	25	7	0,17
<i>In vitro</i> – 2 ^o experimento (E2)	25	14	2,47
<i>In vitro</i> – 3 ^{er} experimento (E3)	22	5	0,60
<i>In vitro</i> – Datos acumulados (E1+E2+E3) ^b	72	26	0,12

^a El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 3 plantas WT y 1 planta mutante ($P > 0,05$; $\chi^2_{t 1 g.l.} = 3,84$)

^b El análisis de la χ^2 de homogeneidad ($\chi^2_H = 3,12 < \chi^2_{t 2 g.l.} = 5,99$) indica que las muestras son homogéneas.

4.3.4.1.2. Determinación del número de insertos con *nptII* funcional

Para determinar el número de insertos funcionales se sembraron 40 semillas en medio selectivo. Los resultados indicaron que la línea segregaba para 1 inserto con *nptII* funcional (tabla 33).

Tabla 33. Segregación para el carácter resistencia a la kanamicina del mutante *tom338*

	Kan ^R	Kan ^S	χ^2 ^a
Segregación observada	26	14	2,13

^a El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 3 plantas resistentes a kanamicina y 1 planta sensible ($P > 0,05$; $\chi^2_{t 1 g.l.} = 3,84$)

4.3.4.1.3. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto con *nptII* funcional

Cuando se llevó a cabo la determinación del número de insertos nos dimos cuenta de que en las plantas sensibles a la kanamicina se detectaba claramente la mutación de letalidad. Las plantas de fenotipo silvestre que son sensibles a la kanamicina no desarrollan raíces laterales ni tampoco hojas verdaderas, pero el ápice meristemático no colapsa, al menos durante los primeros 35-40 días de cultivo en el medio selectivo. En cambio, en las plantas mutantes sensibles a la kanamicina de esta línea, observábamos que, además de no desarrollar ni raíces laterales ni hojas verdaderas, el ápice meristemático colapsaba antes de los 20 días de cultivo en el medio selectivo (figura 13C). Como se puede ver en la tabla 34, de las 40 plántulas que se cultivaron en el medio selectivo, 29 eran de fenotipo silvestre y 11 eran mutantes ($\chi^2 = 0,13$).

Tabla 34. Segregaciones para el fenotipo y el carácter resistencia a la kanamicina del mutante *tom338*

	Kan ^R		Kan ^S		χ^2 ^a
	WT	Mutante	WT	Mutante	
Segregación observada	19	7	10	4	-

Por otro lado, la proporción 3:1 se cumple entre las resistentes y las sensibles de cada fenotipo. Por ejemplo, por lo que respecta a las WT se detectaron 19 resistentes a kanamicina y 10 sensibles, lo que representa una χ^2 asociada de 1,39 ($< \chi^2_{t 1 g.l.} = 3,84$); mientras que entre las mutantes, 7 fueron resistentes a kanamicina y 4 sensibles, con una χ^2 asociada de 0,76 ($< \chi^2_{t 1 g.l.} = 3,84$). Estos resultados indican que la resistencia a la kanamicina y el fenotipo segregan de

manera independiente y que, por consiguiente, no existe cosegregación entre el inserto y la mutación.

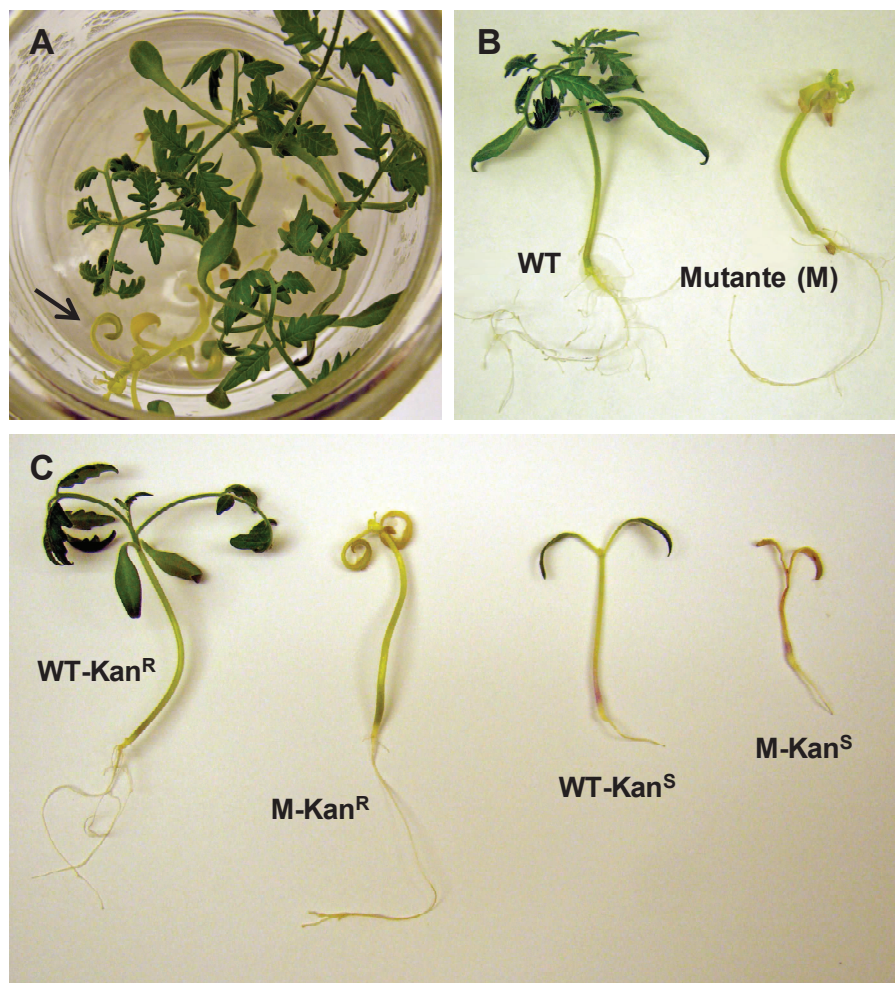


Figura 13. *tom338*. A) Plantas WT (varias) y mutante (una) en un recipiente de cultivo. B) WT vs mutante después de extraer las plantas del recipiente. C) De izquierda a derecha, planta WT resistente a la kanamicina, mutante resistente a kanamicina, WT sensible a la kanamicina y mutante sensible a la kanamicina.

4.3.4.2. *tom1738*

4.3.4.2.1. Análisis genético del mutante en cultivo *in vitro*

El fenotipo del mutante *tom1738* (figura 15B) se observó en cuatro experimentos (E1, E2, E3 y E4). Los resultados de estos experimentos indicaban que se trataba de un mutante de naturaleza recesiva. El análisis de los datos acumulados confirmó este resultado y el análisis de homogeneidad indicó que las muestras eran homogéneas (tabla 35).

Tabla 35. Análisis genético del mutante *tom1738*

	Segregación observada		χ^2 ^a
	Wild-type	Mutante	
<i>In vitro</i> – 1 ^{er} experimento (E1)	5	2	0,05
<i>In vitro</i> – 2 ^o experimento (E2)	10	5	0,56
<i>In vitro</i> – 3 ^{er} experimento (E3)	21	7	0,00
<i>In vitro</i> – 4 ^o experimento (E4)	9	3	0,00
<i>In vitro</i> – Datos acumulados (E1+E2+E3+E4) ^b	45	17	0,19

^a El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 3 plantas WT y 1 planta mutante ($P > 0,05$; $\chi^2_{t, 1 \text{ g.l.}} = 3,84$)

^b El análisis de la χ^2 de homogeneidad ($\chi^2_H = 0,41 < \chi^2_{t, 3 \text{ g.l.}} = 7,82$) indica que las muestras son homogéneas.

4.3.4.2.2. Determinación del número de insertos con *nptII* funcional

Para determinar el número de insertos funcionales se sembraron 40 semillas en medio de germinación con kanamicina. Los resultados indicaron que la línea podía estar segregando para 2 o 3 insertos con *nptII* funcional (tabla 36).

Tabla 36. Segregación para el carácter resistencia a la kanamicina del mutante *tom1738*

	Kan ^R	Kan ^S	χ^2 ^a	χ^2 ^b
Segregación observada	38	2	0,11	3,07

^a El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 15 plantas resistentes a kanamicina y 1 planta sensible ($P > 0,05$; $\chi^2_{t, 1 \text{ g.l.}} = 3,84$)

^b El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 63 plantas resistentes a kanamicina y 1 planta sensible ($P > 0,05$; $\chi^2_{t, 1 \text{ g.l.}} = 3,84$)

4.3.4.2.3. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto en la progenie TG2

El análisis de cosegregación se inició empleando 40 plántulas TG2 en un estadio de desarrollo correspondiente a 7-10 días posteriores a la germinación de la semilla. En este estadio de desarrollo, las plántulas ya han expandido los cotiledones (figura 15A) y, por lo que respecta a esta línea, no se pudo distinguir entre el fenotipo silvestre y el mutante. Los cotiledones de las 40 plántulas se cultivaron en medio organogénico selectivo y los ápices meristemáticos se transfirieron a medio de clonación (ver análisis mediante el método ápice-cotiledón, página 62). A los 30 días se podían distinguir perfectamente las plantas axénicas mutantes en medio de clonación. En efecto, las plantas mutantes habían desarrollado raíces pero exhibían colapso del ápice meristemático (figura 15C).

También pudimos apreciar que los explantes de cotiledón de las plantas mutantes experimentaban menor morfogénesis que los de las plantas WT, y no sólo menor desarrollo de callo sino también menor proliferación de estructuras organogénicas (figura 15D). Estos resultados podrían indicar que las alteraciones en las plantas mutantes podrían acontecer en el contexto del desarrollo del meristemo.

Por lo que respecta a la cosegregación, los datos de este experimento indicaron que no se podía descartar la posibilidad de que la mutación estuviera ocasionada por un inserto funcional, ya que no se había detectado ninguna planta mutante sensible a la kanamicina (tabla 37).

Tabla 37. Segregaciones para el fenotipo y el carácter resistencia a la kanamicina del mutante *tom1738*

	Kan ^R		Kan ^S		χ^2 ^a
	WT	Mutante	WT	Mutante	
Segregación observada	30	8	2	0	0,11

^a El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 11 plantas WT resistentes a kanamicina, 4 plantas mutantes resistentes a kanamicina y 1 planta WT sensible a kanamicina ($P > 0,05$; $\chi^2_{t 2}$ g.l. = 5,99)

Como se puede ver en la tabla 36, los datos se ajustaban mejor a una segregación 15:1 (2 insertos) que a una 63:1 (3 insertos). Por ello, decidimos comprobar si los resultados del experimento de cosegregación se ajustaban a lo esperado en el caso de que la línea tuviera 2 insertos funcionales y uno de ellos fuera el responsable del fenotipo mutante. De ser así, los datos tendrían que ajustarse a una segregación de 11 plantas WT resistentes a la kanamicina, 4 plantas mutantes resistentes a la kanamicina y 1 planta WT sensible a la kanamicina. El análisis de los resultados indicó que no había motivos para dudar de esta hipótesis (tabla 37). Hasta ese momento los resultados no descartaban la posibilidad de que el mutante fuera insercional.

Teniendo en cuenta que disponíamos de pocas semilla TG2 para continuar con los ensayos de cosegregación y que el mutante podría tener 3 insertos funcionales en vez de 2, pensamos que lo mejor sería segregar las copias mediante el cruzamiento entre el parental TG1 (planta transgénica original) y la población silvestre (cv. Moneymaker).

4.3.4.2.4. Análisis de cosegregación con progenies de retrocruzamiento

Pensando en el peor de los escenarios, es decir, que la planta original (TG1) tuviera 3 insertos funcionales, se sembraron en el invernadero 23 semillas del retrocruzamiento (Tom1738-TG1 x Moneymaker) para obtener sus progenies (figura 14).

Figura 14. Genotipos y frecuencias en la progenie resultante del cruce entre una planta con tres insertos y el parental silvestre, y segregación de los insertos en la progenie de plantas del retrocruzamiento.

A, B y C representan 3 insertos funcionales que segregan de manera independiente.

<i>tom1738</i> -TG1 (x) WT Aa Bb Cc (x) aa bb cc	→	⊗	Progenie del retrocruce
	→	→	Segrega para los 3 insertos
	→	→	Segrega para los insertos A y B
	→	→	Segrega para los insertos A y C
	→	→	Segrega para el inserto A
	→	→	Segrega para los insertos B y C
	→	→	Segrega para el inserto B
	→	→	Segrega para el inserto C
	→	→	No contiene insertos

Nota: El tamaño de familia (BC) para identificar cualquiera de los 8 genotipos ($p = 1/8$) con una probabilidad de fallo del 5% es de 23 plantas ($N > 22,43$).

Tras obtener las progenies del retrocruzamiento se iniciaron los experimentos de cosegregación. En el primer experimento se evaluaron 6 progenies. Los resultados no dejaron lugar a dudas e indicaban la ausencia de cosegregación entre cualquiera de los insertos funcionales y la mutación. En efecto, las progenies 2 y 4 no contenían inserto funcional (es decir, todas las plantas de esas progenies eran sensibles a la kanamicina) pero segregaban para el fenotipo (tabla 38). Asimismo, en la progenie 5, con 1 inserto funcional ($3 \text{ kan}^R : 1 \text{ kan}^S$, $\chi^2 = 0,48$) se detectó 1 planta de fenotipo mutante sensible a la kanamicina. Por lo que respecta a otras progenies, la 1 y la 3 sólo segregaron para la resistencia a la kanamicina, pero no para la mutación (tabla 38).

Por otro lado, los resultados parecen indicar que la línea de partida contenía 2 insertos funcionales. Por ejemplo, en seis progenies elegidas al azar hemos detectado dos líneas sin inserto (en el caso de 2 insertos, la probabilidad de encontrar plantas sin inserto en progenies de retrocruce es de 1/4 y en el caso de 3 insertos de 1/8). Por otro lado, parece que la mayor parte de las líneas segregan para 1 inserto funcional. En efecto, en las progenies 3 y 5 los datos no se ajustan a una segregación 15:1 (2 insertos funcionales), y en la progenie 1 los datos se

ajustan mejor a una segregación 3:1 (en el caso de 2 insertos, la probabilidad de encontrar plantas con un sólo inserto en progenies de retrocruce es de 2/4 y en el caso de 3 insertos de 3/8). En la progenie 6, los datos se ajustan mejor a una segregación 15:1, aunque no se puede descartar que pueda contener 1 inserto (en el caso de 2 insertos, la probabilidad de encontrar plantas con dos inserto en progenies de retrocruce es de 1/4 y en el caso de 3 insertos de 3/8). Aún así, conviene indicar que para realizar un ajuste más fino de las segregaciones serían necesarias más plantas de cada progenie y más progenies de retrocruce.

Tabla 38. Segregaciones para el fenotipo y el carácter resistencia a la kanamicina del mutante *tom1738*

	Kan ^R		Kan ^S		WT vs M χ^2 ^a	Kan ^R vs Kan ^S	
	WT	Mutante	WT	Mutante		χ^2 ^b	χ^2 ^c
Progenie 1	17	0	3	0	-	1,07	2,61
Progenie 2	0	0	16	4	0,27	-	-
Progenie 3	12	0	7	0	-	1,42	30,35
Progenie 4	0	0	15	5	0,00	-	-
Progenie 5	14	4	5	1	0,22	0,00	14,40
Progenie 6	13	5	2	0	0,00	2,40	0,48

^a El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 3 plantas WT y 1 planta mutante ($P > 0,05$; $\chi^2_{t 1 g.l.} = 3,84$)

^b El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 3 plantas kan^R y 1 planta Kan^S ($P > 0,05$; $\chi^2_{t 1 g.l.} = 3,84$)

^c El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 15 plantas kan^R y 1 planta Kan^S ($P > 0,05$; $\chi^2_{t 1 g.l.} = 3,84$)

En cualquier caso, y de cara al aprovechamiento del mutante, el hecho de que la línea de partida tenga 2 o 3 copias es irrelevante. En este sentido, disponemos de dos líneas en las que se han segregado los insertos funcionales y exhiben segregación para el fenotipo (progenies 2 y 4).

Actualmente, sabemos que la mutación es de tipo somaclonal ya que en las plantas mutantes de las progenies 2 y 3 no existen fragmentos de T-DNA ni del cuerpo del vector (experimentos realizados por el grupo del Dr. Lozano en Almería).

Por otro lado, ahora sabemos que el fenotipo de colapso meristemático del mutante se produce en condiciones muy concretas o de cierto estrés. Por ejemplo, hemos visto que los brotes o yemas axilares cultivados en medios con agar 'duro' (con mayor fuerza de gel) no son capaces de dar lugar a una planta ya que antes o después se produce el colapso del ápice meristemático (figuras 15B-15C). Sin embargo, cuando los brotes o las yemas se cultivan en medios con agar

'blando' (menor fuerza de gel), la planta axénica es capaz de desarrollarse (figura 15E). Por tanto, es posible que el fenotipo de letalidad por colapso del meristemo apical sea dependiente de las condiciones de cultivo o de situaciones de estrés. En la actualidad se está investigando con este mutante en esta dirección.

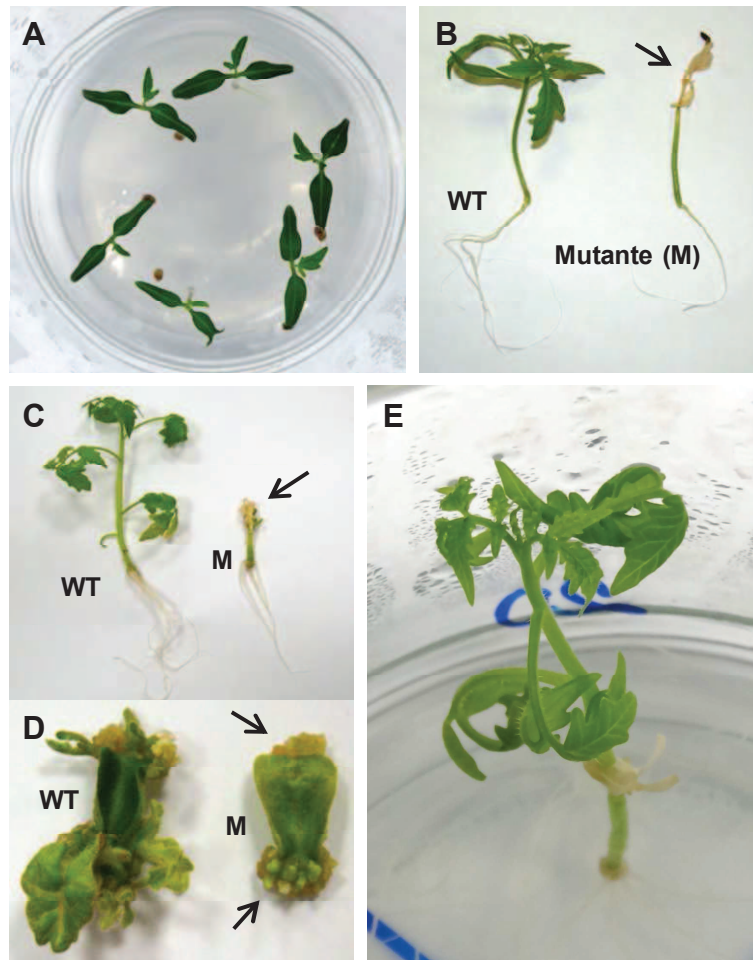


Figura 15. *tom1738*. A) Plántulas TG2 de la línea *tom1738* a los 8 días de la germinación. B) WT y mutante (plántula de semilla) tras 30-35 de cultivo en medio de germinación. C) WT y mutante (planta axénica) tras 30-35 días de cultivo en medio de clonación. D) Organogénesis en explantes de cotiledón del WT y del mutante en medio morfogenético de tomate. E) Mutante (planta axénica) crecido en un medio gelificado con agar 'blando' (poca fuerza de gel).

4.3.5. Mutantes con alteración en el sistema radicular

Resumen

Dos de los mutantes que se han identificado en el cribado de líneas T-DNA se encuentran afectados en el desarrollo radicular, a saber, *tom1608* y *tom1456*. En ambos casos, el fenotipo mutante se detecta desde los primeros estadios de desarrollo de las plántulas, ya que éstas exhiben menor desarrollo de la parte aérea que las plantas de fenotipo silvestre. En ambos casos, tras la aparición de la primera o, a lo sumo, segunda hoja, el desarrollo vegetativo prácticamente se detiene.

En las condiciones de cultivo *in vitro* se puede visualizar perfectamente el desarrollo radicular, lo que facilita la caracterización de este tipo de mutantes y la identificación de las causas que determinan la alteración en el crecimiento de las plantas. En el caso particular de estos dos mutantes se vio que la ausencia de desarrollo de la parte aérea era consecuencia de severas alteraciones en el desarrollo de la raíz. Se ha comprobado que estos mutantes no son capaces de crecer correctamente en el medio de clonación, aunque desarrollan algunas raíces que, eso sí, son completamente aberrantes. Con el tiempo, las plantas axénicas terminan muriendo.

También hemos comprobado que en ambos mutantes se encuentra prácticamente inhibida la respuesta morfogénica a partir de explantes de cotiledón, aunque cada uno de ellos exhibe una respuesta diferente.

Los análisis genéticos que se han llevado a cabo con las dos líneas han determinado que la mutación es de naturaleza recesiva. Finalmente, los análisis de segregación en medio con kanamicina han permitido concluir que *tom1608* tiene dos o tres insertos funcionales, aunque ninguno de ellos es el responsable del fenotipo mutante. De forma similar, el mutante *tom1456* podría tener dos o tres insertos funcionales, aunque por el momento se desconoce si alguno de estos insertos es el responsable del fenotipo mutante.

4.3.5.1. *tom1608*

4.3.5.1.1. Análisis genético del mutante en cultivo in vitro

El fenotipo mutante (figuras 16A-16C) se vio en cuatro experimentos (E1, E2, E3 y E4) que indicaban que la mutación era de naturaleza recesiva. El análisis de

los datos acumulados (χ^2 datos acumulados) confirmó este resultado y el análisis de homogeneidad indicó que las muestras eran homogéneas (tabla 39).

Tabla 39. Análisis genético del mutante *tom1608*

	Segregación observada		χ^2 ^a
	Wild-type	Mutante	
<i>In vitro</i> – 1 ^{er} experimento (E1)	15	7	0,55
<i>In vitro</i> – 2 ^o experimento (E2)	10	5	0,56
<i>In vitro</i> – 3 ^{er} experimento (E3)	17	4	0,40
<i>In vitro</i> – 4 ^o experimento (E4)	57	22	0,34
<i>In vitro</i> – Datos acumulados (E1+E2+E3+E4) ^b	99	38	0,55

^a El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 3 plantas WT y 1 planta mutante ($P > 0,05$; $\chi^2_{t\ 1\ g.l.} = 3,84$)

^b El análisis de la χ^2 de homogeneidad ($\chi^2_H = 1,29$) indica que las muestras son homogéneas.

4.3.5.1.2. Determinación del número de insertos con *nptII* funcional

Para determinar el número de insertos funcionales se evaluaron 56 plántulas en medio selectivo (ver siguiente apartado). Los resultados indicaron que la línea podía segregar para 2 o 3 insertos funcionales (tabla 40).

Tabla 40. Segregación para el carácter resistencia a la kanamicina del mutante *tom1608*

	Kan ^R	Kan ^S	χ^2 ^a	χ^2 ^b
Segregación observada	55	1	1,90	0,02

^a El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 15 plantas resistentes a kanamicina y 1 planta sensible ($P > 0,05$; $\chi^2_{t\ 1\ g.l.} = 3,84$)

^b El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 63 plantas resistentes a kanamicina y 1 planta sensible ($P > 0,05$; $\chi^2_{t\ 1\ g.l.} = 3,84$)

4.3.5.1.3. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto con *nptII* funcional

El análisis de cosegregación se llevó a cabo utilizando el método ápice-cotiledón. Así pues, los explantes de cotiledón de plántulas de 7-8 días se cultivaron en medio organogénico selectivo (100 mg/l de kanamicina) y los brotes se transfirieron a medio de clonación. Al final del experimento se vio que tanto los cotiledones como los brotes de las plántulas mutantes manifestaban severas alteraciones de desarrollo. Por lo que respecta a los cotiledones, se vio que los de las plántulas mutantes exhibían menos morfogénesis que los de las plántulas WT (figura 16F vs 16G). Por lo que respecta a los brotes, observamos que los de las plántulas mutantes no eran capaces de desarrollar una planta axénica en el medio

de clonación de tomate. De hecho, los brotes comenzaban a emitir raíces e incluso desarrollaban las dos primeras hojas verdaderas; sin embargo, a medida que las raíces iban creciendo se podía ver que eran completamente anómalas, es decir, engrosadas y sin desarrollo de raíces laterales (figura 16E), lo que hacía que finalmente las plantas axénicas se estancaran en su crecimiento y terminaran muriendo (figura 16D).

Por otro lado, pudimos apreciar que la única planta sensible a la kanamicina que apareció en el experimento era de fenotipo mutante (tabla 41). El resultado se corroboró transfiriendo el brote a medio de clonación con kanamicina. Este dato parece indicar la ausencia de cosegregación entre uno de los insertos funcionales y el fenotipo mutante.

Tabla 41. Segregaciones para el fenotipo y la resistencia a la kanamicina del mutante *tom1608*

	Kan ^R		Kan ^S	
	WT	Mutante	WT	Mutante
Segregación observada	46	9	0	1

Con todo, habida cuenta de que tan sólo se ha detectado una planta mutante sensible a la kanamicina, se van a realizar nuevos experimentos con más plantas TG2 para confirmar el resultado. Asimismo, se van a ensayar diferentes tipos y concentraciones de auxinas para ver si los brotes emiten raíces normales que permitan un correcto desarrollo de la planta axénica.

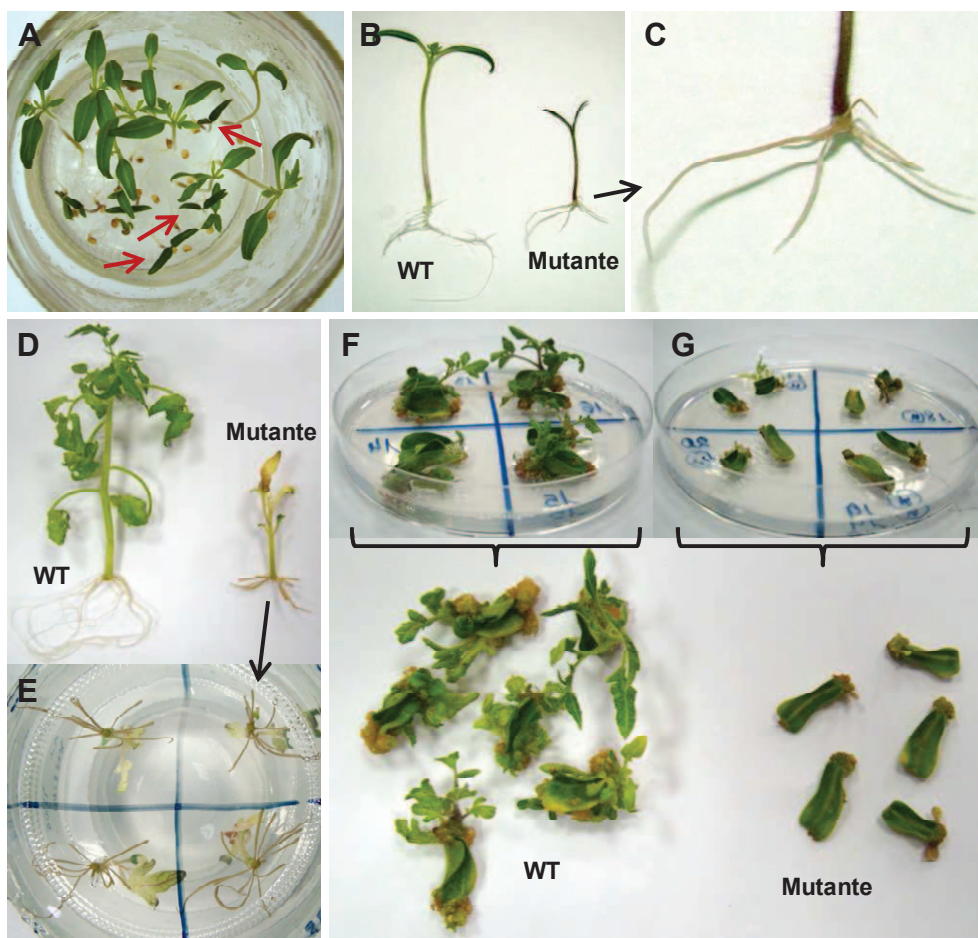


Figura 16. *tom1608*. A) Plántulas TG2 de la línea T-DNA *tom1608* a los 8 días de la germinación (algunas mutantes se señalan con una flecha). B) Plántulas de semilla WT y mutante. C) Detalle del desarrollo radicular de una plántula mutante. D) Plantas axénicas WT y mutante tras 30 días de cultivo en medio de clonación. E) Detalle del enraizamiento del mutante en medio de clonación. F) Morfogénesis a partir de explantes de cotiledón de plántulas WT. G) Morfogénesis a partir de explantes de cotiledón de plántulas mutantes.

4.3.5.2. *tom1456*

4.3.5.2.1. Análisis genético del mutante en cultivo *in vitro*

El fenotipo mutante (figuras 18A-18C) se vio en tres experimentos (E1, E2 y E3). Los resultados sugieren que la mutación es de naturaleza recesiva. Sin embargo, a excepción del primer experimento (E1), los datos se desvían de los valores esperados para una segregación acorde a una proporción de 3 plantas WT y 1 planta mutante (tabla 42). La razón es que en los experimentos 2 y 3 (E2 y E3, tabla 42) se vieron menos plantas mutantes de las esperadas. El análisis de los datos acumulados (χ^2 datos acumulados) confirmó este resultado y el análisis de homogeneidad indicó que las muestras eran homogéneas (tabla 42).

Tabla 42. Análisis genético del mutante *tom1456*

	Segregación observada		χ^2 ^a
	Wild-type	Mutante	
<i>In vitro</i> – 1 ^{er} experimento (E1)	30	9	0,08
<i>In vitro</i> – 2 ^o experimento (E2)	45	5	6,00
<i>In vitro</i> - 3 ^{er} experimento (E3)	50	8	3,89
<i>In vitro</i> – Datos acumulados (E1+E2+E3) ^b	126	22	7,89

^a El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 3 plantas WT y 1 planta mutante ($P > 0,05$; $\chi^2_{t 1 g.l.} = 3,84$)

^b El análisis de la χ^2 de homogeneidad ($\chi^2_H = 2,07$) indica que las muestras son homogéneas.

En relación con estos resultados, una posible explicación sería la existencia de subletalidad asociada al fenotipo mutante, lo que provocaría una disminución del número de plantas en esta categoría fenotípica. También es posible que la alteración del desarrollo radicular reduzca la capacidad de germinación de las semillas mutantes, quizá debido a un menor potencial para romper la testa de la semilla. Con todo, no descartamos que en el momento de la germinación muchas de las semillas mutantes se hubieran desechado al considerar que no habían germinado correctamente. Conviene indicar que nosotros transferimos a los medios de germinación semillas que han sido pregerminadas en placas con agua estéril (ver apartado 3.2.2 de Material y Métodos, página 49). Actualmente se está obteniendo nueva semilla a partir del genotipo de partida (i.e. la planta TG1 original) para analizar de nuevo las segregaciones de este mutante.

4.3.5.2.2. Determinación del número de insertos con *nptII* funcional

Teniendo en cuenta la escasa cantidad de semillas de la que se disponía, el ajuste de las segregaciones para inferir el número de insertos funcionales se llevó a cabo con los resultados del análisis de cosegregación entre el inserto y la mutación (ver siguiente apartado). En total se evaluó la resistencia o sensibilidad a la kanamicina de 109 plántulas (2 experimentos). Los datos indicaron que la línea podía estar segregando para 2 o 3 insertos con *nptII* funcional (tabla 43).

Tabla 43. Segregación para el carácter resistencia a la kanamicina del mutante *tom1456*

	Kan ^R	Kan ^S	χ^2 ^a	χ^2 ^b
Segregación observada (E1)	50	1	1,60	0,05
Segregación observada (E2)	56	2	0,78	1,34
Datos acumulados (E1+E2) ^c	106	3	2,28	1,00

^a El valor calculado representa el ajuste de los datos a un ratio esperado de 15 plantas resistentes a kanamicina y 1 planta sensible ($P > 0,05$; $\chi^2_{t 1 g.l.} = 3,84$)

^b El valor calculado representa el ajuste de los datos a un ratio esperado de 63 plantas resistentes a kanamicina y 1 planta sensible ($P > 0,05$; $\chi^2_{t 1 g.l.} = 3,84$)

^c Para ambas segregaciones, el análisis de la χ^2 de homogeneidad ($\chi^2_H (15:1) = 0,10$, $\chi^2_H (63:1) = 0,39$) indica que las muestras son homogéneas .

4.3.5.2.3. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto con *nptII* funcional

El análisis de cosegregación se llevó a cabo empleando el método ápice-cotiledón (ver análisis mediante el método ápice-cotiledón, página 62). Cuando empezamos a cultivar los explantes de cotiledón en el medio organogénico selectivo, nos dimos cuenta de que los explantes de las plántulas mutantes eran de un calibre muy pequeño. Por tanto, para estar más seguros del resultado decidimos cultivar también segmentos de hipocotilo. Con el fin de tener una referencia sobre el tipo de crecimiento de este tipo de explantes, también se cultivaron los segmentos de hipocotilo de las plántulas WT.

Pudimos ver que los ápices de las plántulas mutantes tenían un desarrollo anómalo en el medio de clonación (figura 18D). En efecto, a los 30 días de cultivo, las plantas axénicas habían desarrollado no más de dos o tres hojas aberrantes de textura crasa, probablemente debido a hiperhidratación. Además, a diferencia del hipocotilo, el epicotilo de las plantas estaba muy engrosado (figura 18D). Aparentemente, el motivo de estas alteraciones radicaba en el aberrante desarrollo de las raíces adventicias, que exhibían un escaso crecimiento, ausencia de desarrollo lateral (i.e. raíces secundarias) y engrosamiento (figura 18E). Es razonable pensar que estas raíces no son capaces de nutrir a la parte aérea y, de ahí, las alteraciones en el desarrollo vegetativo de las plantas mutantes.

Por lo que respecta a los explantes que se cultivaron en el medio organogénico selectivo, vimos que los segmentos de cotiledón de las plantas mutantes tenían claramente afectada la respuesta morfogénica. Así, en la zona de corte del explante (a partir de la cual se desarrolla el callo) prácticamente no

había formación de callo (figura 18F). Además, a diferencia del callo de las plantas WT (semicompacto y con estructuras organogénicas), la proliferación celular observada en los explantes de las plantas mutantes era friable y exhibía síntomas de pardeamiento. En definitiva, vimos que, al igual que ocurre en otros mutantes que exhiben alteraciones en el desarrollo de la raíz (e.g. *tom1608* o *pim15*), la respuesta morfogénica del mutante *tom1456* se encontraba seriamente alterada, aunque en este caso el impacto sobre la morfogénesis es, sin duda, mayor.

Más extraña fue la respuesta observada en los explantes de hipocotilo. A los 50 días de cultivo en el medio organogénico selectivo vimos que los explantes de hipocotilo emitían un elevado número de raíces (figura 18F), lo que nunca ocurre en los segmentos de hipocotilo de las plantas WT. Es más, a diferencia de las raíces completamente aberrantes que emitían las plantas axénicas en medio de clonación (un medio base suplementado con 0,1 mg/l de ácido indolacético), las que surgían de los hipocotilos cultivados en el medio organogénico (un medio de cultivo suplementado con 4,0 mg/l de ácido indolacético, 4,0 mg/l de kinetina y 1,0 mg/l de zeatina) parecían raíces normales que incluso desarrollaban raíces laterales (i.e. secundarias). Por el contrario, como era de prever teniendo en cuenta las concentraciones de citoquininas que posee el medio organogénico, los hipocotilos de las plantas WT desarrollaron callo en las zonas de corte del explante pero nunca raíces (figura 18F, izda.). Estos resultados sugieren que los niveles endógenos de hormonas en este mutante (o el transporte de las mismas) se encuentran alterados. Actualmente se están diseñando experimentos que permitan dilucidar la causa de este extraño resultado.

Por lo que se refiere a la resistencia-sensibilidad a la kanamicina, los resultados obtenidos hasta la fecha indican que no se puede descartar la posibilidad de que la mutación esté ocasionada por la integración de un inserto funcional. En efecto, entre las 106 plántulas evaluadas en los dos experimentos realizados, 13 fueron de fenotipo mutante y todas eran resistentes a la kanamicina (tabla 44). En principio, podría haber cosegregación entre el inserto y la mutación pero, para estar seguro de ello, deberían evaluarse muchas más plántulas TG2. En el caso de que el mutante posea 2 insertos funcionales se deberían evaluar no menos de 191 plantas TG2 y si tuviera 3 insertos funcionales el número de plantas a evaluar no debería ser inferior a 766.

Tabla 44. Segregaciones para el fenotipo y la resistencia a la kanamicina del mutante *tom1456*

	Kan ^R		Kan ^S	
	WT	Mutante	WT	Mutante
Segregación observada (E1)	45	5	1	0
Segregación observada (E2)	48	8	2	0
Total (E1 + E2)	93	13	3	0

Teniendo en cuenta que disponíamos de pocas semillas TG2 para continuar con los ensayos de cosegregación y que el mutante podría tener 3 insertos funcionales en vez de 2, pensamos que lo mejor sería segregar las copias mediante el cruzamiento entre la TG1 (planta transgénica original) y plantas del cultivar de partida (Moneymaker).

Figura 17. Genotipos y frecuencias en la progenie resultante del cruce entre una planta con tres insertos y el parental silvestre, y segregación de los insertos y de la mutación en la progenie de plantas del retrocruzamiento.

A, B y C representan 3 insertos funcionales que segregan de manera independiente. En esta figura, el inserto A en homocigosis promueve el fenotipo mutante.

Genotipos	⊗	Progenie del retrocruce
1/8 Aa Bb Cc	→	Segrega para 3 insertos y para el fenotipo mutante
1/8 Aa Bb cc	→	Segrega para 2 insertos y para el fenotipo mutante
1/8 Aa bb Cc	→	Segrega para 2 insertos y para el fenotipo mutante
1/8 Aa bb cc	→	Segrega para 1 inserto y para el fenotipo mutante
1/8 aa Bb Cc	→	Segrega para 2 insertos y no para fenotipo
1/8 aa Bb cc	→	Segrega para 1 inserto y no para fenotipo
1/8 aa bb Cc	→	Segrega para 1 inserto y no para fenotipo
1/8 aa bb cc	→	No segrega para ningún inserto ni para fenotipo

Actualmente, las plantas de retrocruce (23 plantas) se encuentran en el invernadero. Una vez que se obtengan las progenies de todas estas plantas se cultivarán *in vitro* con el objeto de identificar la que, en el hipotético caso de que se trate de una mutación insercional, sólo segregue para un inserto funcional y para el fenotipo mutante (Figura 17, genotipo Aa bb cc).

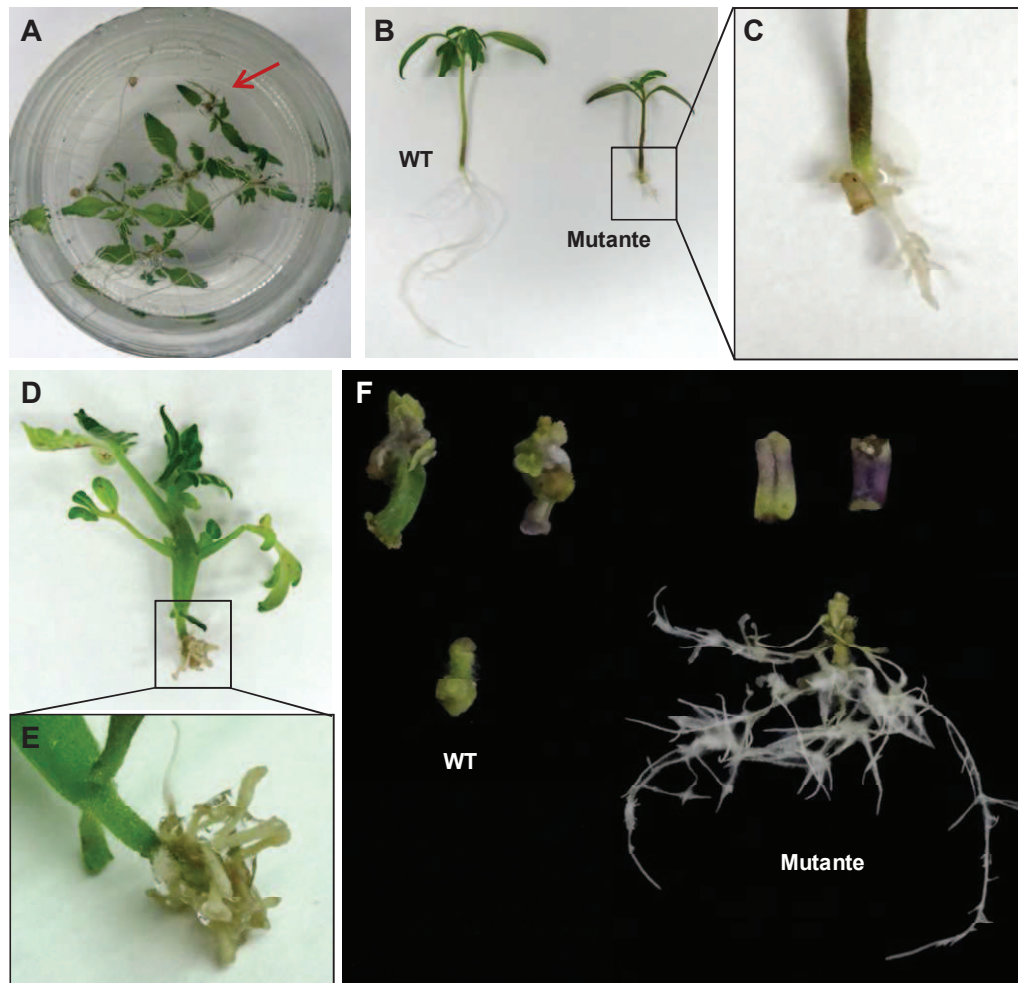


Figura 18. *tom1456*. A) Plántulas TG2 de la línea T-DNA *tom1456* vistas desde la base del recipiente (la plántula mutante se señala con una flecha). B) Plántula de semilla WT y mutante. C) Detalle del desarrollo radicular de una plántula mutante. D) Planta axénica mutante tras 30 días de cultivo en medio de clonación. E) Detalle de la raíz del mutante en medio de clonación. F) Morfogénesis a partir de explantes de cotiledón (arriba) e hipocotilo (abajo) de plántulas de fenotipo silvestre y mutante.

4.3.6. Mutantes con alteraciones en el desarrollo vegetativo: *tom1425*

Resumen

tom1425 es un mutante recesivo que tiene afectado el desarrollo vegetativo. *In vitro*, el fenotipo de las plántulas mutantes se detecta con claridad a los 15-20 días de la germinación. Las plántulas mutantes exhiben un ritmo de crecimiento más lento, tienen un porte más débil (e.g. hipocotilo más delgado y frágil) y desarrollan hojas con morfología distinta a las de las plantas de fenotipo silvestre (figura 19A). Con todo, estas alteraciones no impiden que las plantas se puedan mantener *in vitro*. En condiciones de invernadero, las plantas mutantes exhiben las mismas alteraciones que se ven *in vitro*, a saber, ritmo de crecimiento más lento, porte más débil y morfología de la hoja distinta (figuras 19B-19D). Es más, con el tiempo las plantas mutantes son capaces de florecer y ocasionalmente dan frutos con alguna semilla. Un examen más exhaustivo de algunas partes de la planta tanto *in vitro* como *in vivo* nos ha permitido descubrir que las alteraciones que exhibe el mutante podrían deberse a un desarrollo asincrónico de las células que conduce a un crecimiento zigzagueante o en “espiral” (figuras 19E y 19F). Este tipo de alteración se ha observado no sólo estructuras vegetativas (i.e. raquis de la hoja) sino también en el cono estaminal de las flores (figura 19F). El análisis del mutante en medio suplementado con kanamicina ha indicado que la línea podría contener dos o tres insertos funcionales, aunque el análisis de cosegregación ha indicado que no hay asociación entre cualquiera de estos insertos y el fenotipo mutante

4.3.6.1. Análisis genético del mutante en cultivo *in vitro*

In vitro, el fenotipo mutante se observó en tres experimentos (E1, E2 y E3). Los resultados indicaban que se trataba de un mutante recesivo. El análisis de los datos acumulados (χ^2 datos acumulados) confirmó este resultado y el análisis de homogeneidad indicó que las muestras eran homogéneas (tabla 45).

Tabla 45. Análisis genético del mutante *tom1425*

	Segregación observada		χ^2 ^a
	Wild-type	Mutante	
<i>In vitro</i> – 1 ^{er} experimento (E1)	23	6	0,29
<i>In vitro</i> – 2 ^o experimento (E2)	22	6	0,19
<i>In vitro</i> – 3er experimento (E3)	25	3	3,05
<i>In vitro</i> – Datos acumulados (E1+E2+E3) ^b	70	15	2,45

^a El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 3 plantas WT y 1 planta mutante ($P > 0,05$; $\chi^2_{t 1 g.l.} = 3,84$)

^b El análisis de la χ^2 de homogeneidad ($\chi^2_H = 1,07$) indica que las muestras son homogéneas ($P > 0,05$; $\chi^2_{t 2 g.l.} = 5,99$).

4.3.6.2. Determinación del número de insertos con *nptII* funcional

Para determinar el número de insertos funcionales se sembraron 50 semillas en medio selectivo. Los resultados indicaban que la línea podía segregar para 2 o 3 insertos funcionales (tabla 46).

Tabla 46. Segregación para el carácter resistencia a la kanamicina del mutante *tom1425*

	Kan ^R	Kan ^S	χ^2 ^a	χ^2 ^b
Segregación observada	48	2	0,43	1,93

^a El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 15 plantas resistentes a kanamicina y 1 planta sensible ($P > 0,05$; $\chi^2_{t 1 g.l.} = 3,84$)

^b El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 63 plantas resistentes a kanamicina y 1 planta sensible ($P > 0,05$; $\chi^2_{t 1 g.l.} = 3,84$)

4.3.6.3. Visualización del fenotipo mutante en invernadero

Para ver cómo era el fenotipo de las plantas mutantes *in vivo*, la progenie TG2 (segregante) de *tom1425* se cultivó en el invernadero. En dos campañas distintas se vio que fenotipo mutante era muy parecido al que habíamos visto *in vitro* (figura 19A vs 19B). Asimismo, las segregaciones observadas indicaban que se trataba de un mutante recesivo. Los datos se analizaron conjuntamente con los obtenidos en los experimentos que habíamos realizado *in vitro* para completar el análisis genético. Como se puede ver en la tabla 47, el análisis de los datos acumulados (χ^2 datos acumulados) confirmó la naturaleza recesiva del mutante y el análisis de homogeneidad indicó que las muestras eran homogéneas.

Tabla 47. Análisis genético del mutante *tom1425*

	Segregación observada		χ^2 ^a
	Wild-type	Mutante	
<i>In vivo</i> – 4 ^o experimento (E4)	12	4	0,00
<i>In vivo</i> – 5 ^o experimento (E5)	34	14	0,44
<i>In vitro</i> – 1 ^{er} experimento (E1)	23	6	0,29
<i>In vitro</i> – 2 ^o experimento (E2)	22	6	0,19
<i>In vitro</i> – 3er experimento (E3)	25	3	3,05
<i>In vitro</i> – Datos acumulados (E1+E2+E3+E4+E5) ^b	116	33	0,65

^a El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 3 plantas WT y 1 planta mutante ($P > 0,05$; $\chi^2_{t 1 g.l.} = 3,84$)

^b El análisis de la χ^2 de homogeneidad ($\chi^2_H = 3,32$) indica que las muestras son homogéneas ($P > 0,05$; $\chi^2_{t 4 g.l.} = 9,48$).

4.3.6.4. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto con *nptII* funcional

Algunas de las plantas mutantes de la progenie TG2 que se cultivaron en el invernadero se llevaron a producción para ver si era posible obtener progenies TG3. Como se ha comentado en el resumen, las plantas mutantes desarrollaban flores y, ocasionalmente, daban frutos que tenían semilla. De esta forma, conseguimos obtener algunas progenies TG3 a partir de dos plantas de fenotipo mutante. Además, se obtuvieron progenies TG3 de tres plantas de fenotipo silvestre de esta línea que teníamos en el invernadero para compararlas con las mutantes. Antes de iniciar el ensayo de cosegregación con la TG2, quisimos ver cómo segregaban estas progenies TG3 para los insertos funcionales. En este sentido, podía ocurrir que alguna de las progenies procedente de una planta WT segregara para un único inserto funcional y también para el fenotipo mutante; en cuyo caso se simplificaría sustancialmente el análisis de cosegregación. También podía ocurrir que alguna de las TG3 obtenidas a partir de las plantas mutantes segregara para el o los insertos funcionales. En este caso, se llegaría a la conclusión de que ningún inserto funcional es responsable del fenotipo mutante.

Por lo que respecta a los resultados, las tres progenies procedentes de plantas TG2 con fenotipo silvestre segregaron para el fenotipo mutante (tabla 48). Sin embargo, dos de ellas (progenies 1 y 2) eran completamente resistentes a la kanamicina lo que indica que las plantas TG2 a partir de las cuales se obtuvieron esas progenies tenían alguno de los insertos funcionales en homocigosis. La tercera segregaba como la TG2, es decir, que la planta a partir de la cual se obtuvo esa progenie tenía 2 o 3 insertos funcionales en hemicigosis.

Tabla 48. Segregaciones para el fenotipo y el carácter resistencia a la kanamicina en cinco progenies TG3 procedentes de plantas TG2 WT o mutantes, del mutante *tom1425*.

Progenie TG3	Fenotipo TG2	Segregaciones observadas				WT vs M χ^2 ^a
		Kan ^R		Kan ^S		
		WT	Mutante	WT	Mutante	
Progenie 1	WT	38	10	0	0	0,44
Progenie 2	WT	19	4	0	0	0,71
Progenie 3	WT	32	14	2	0	0,44
Progenie 4	Mutante	0	25	0	0	-
Progenie 5	Mutante	0	22	0	8	-

^a El valor calculado representa el ajuste de los datos a un ratio esperado de 3 plantas WT y 1 planta mutante ($P > 0,05$; $\chi^2_{t 1 g.l.} = 3,84$)

En definitiva, ninguna de estas progenies proporcionaba una ventaja sobre la TG2 a la hora de llevar a cabo el análisis de cosegregación. Sin embargo, el resultado de una de las progenies mutantes reveló que ninguno de los insertos funcionales de esta línea era responsable de la mutación. En concreto, la progenie 5 segregó para la resistencia a la kanamicina en una proporción de 3 plantas resistentes y 1 sensible a la kanamicina (tabla 48), lo que indica que la planta mutante a partir de la cual se obtuvo esa progenie era hemicigótica para un único inserto funcional que no es responsable de la mutación.

Por lo que respecta a este mutante, en aras de clonar el gen mediante técnicas de mapeo, ya se ha realizado el cruzamiento entre una planta mutante sensible a la kanamicina y *Solanum pimpinellifolium*.

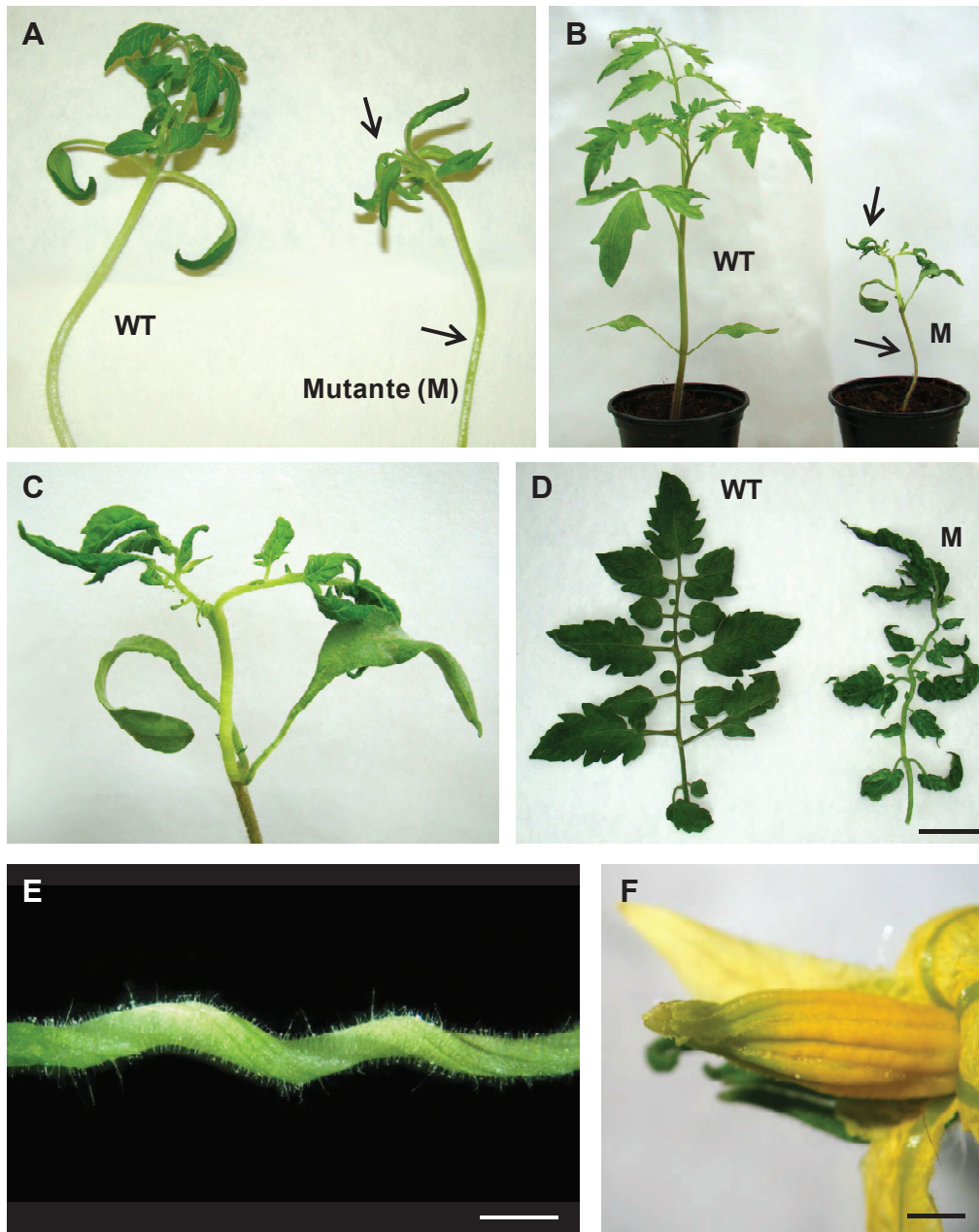


Figura 19. *tom1425*. A) Plántulas WT y mutante en condiciones de cultivo *in vitro*. B) Plántulas WT y mutante en condiciones de cultivo *in vivo*. C) Detalle del desarrollo de la parte aérea en una plántula mutante. D) Hoja de una planta adulta WT y de una mutante. Se pueden ver las alteraciones en la morfología foliar y el desarrollo zigzagueante del raquis. E) Desarrollo en “espiral” del raquis de una hoja procedente de una plántula mutante cultivada *in vitro*. F) Desarrollo en ‘espiral’ del cono estaminal de una flor procedente de una planta mutante cultivada en el invernadero.

Escala de barras: 5 cm en D y 2 mm en E y F

4.3.7. Mutantes con alteraciones en el ápice meristemático: *tom1310*

Resumen

En el escrutinio de líneas T-DNA detectamos tres mutantes que exhiben alteraciones de diferente índole en el ápice meristemático. El más espectacular de los tres es *tom1310*, no solo por la manifestación del fenotipo, sino también porque, a partir de las plantas de fenotipo mutante, es factible recuperar plantas normales, cuya progenie vuelve a dar plantas mutantes. En el mutante *tom1310*, el fenotipo se detecta a los pocos días de la germinación. En efecto, tras la expansión de los cotiledones, en la zona en la que debería encontrarse el ápice meristemático se produce un crecimiento de células que origina una especie de callosidad, a partir de la cual se forman estructuras que parecen hojas alteradas o teratomas (figuras 20A-20B). Curiosamente, cuando esos ápices se transfieren a un medio de clonación se puede recuperar el fenotipo silvestre sobre la base del desarrollo de yemas adventicias que surgen de la región axilar de los cotiledones (figura 20C). Ocasionalmente, el desarrollo de yemas adventicias normales en la región axilar de los cotiledones se produce directamente en la plántula, sin que sea necesario transferir el ápice a medio de clonación (figura 20I). Lo interesante es que, a partir de ese momento, el nuevo ápice meristemático de la planta mutante no vuelve a exhibir ningún tipo de alteración a lo largo del tiempo ni en sucesivas rondas de clonación. Sin embargo, la progenie de esas plantas recuperadas (i.e. WT) vuelve a exhibir de manera consistente el fenotipo mutante (figuras 1E-20G). Los análisis realizados en *tom1310* han indicado que se trata de un mutante recesivo que porta 1 o 2 insertos con *nptII* funcional. Sin embargo, se ha podido comprobar que el fenotipo mutante no está ocasionado por ningún inserto funcional y por ello, en la actualidad estamos intentando identificar el gen alterado mediante técnicas de mapeo.

4.3.7.1. Análisis genético del mutante en cultivo *in vitro*

Los resultados de tres experimentos (E1, E2 y E3) indicaron que se trataba de un mutante de naturaleza recesiva. El análisis de los datos acumulados (χ^2 datos acumulados) confirmó este resultado y el análisis de homogeneidad indicó que las muestras eran homogéneas (tabla 49).

Tabla 49. Análisis genético del mutante *tom1310*

	Segregación observada		χ^2 ^a
	Wild-type	Mutante	
<i>In vitro</i> – 1 ^{er} experimento (E1)	13	4	0,02
<i>In vitro</i> – 2 ^o experimento (E2)	18	2	2,40
<i>In vitro</i> – 3 ^{er} experimento (E3)	12	4	0,00
<i>In vitro</i> – Datos acumulados (E1+E2+E3) ^b	43	10	1,06

^a El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 3 plantas WT y 1 planta mutante ($P > 0,05$; $\chi^2_{t\ 1\ g.l.} = 3,84$)

^b El análisis de la χ^2 de homogeneidad ($\chi^2_H = 1,36$) indica que las muestras son homogéneas ($P > 0,05$; $\chi^2_{t\ 2\ g.l.} = 5,99$).

4.3.7.2. Determinación del número de insertos con *nptII* funcional

Debido a la escasez de semillas TG2, para la determinación del número de plantas resistentes y sensibles a la kanamicina tan sólo se pudieron emplear 25 semillas. Se realizaron dos experimentos (E4 y E5) y los resultados indicaron que la línea podía segregar para 1 o 2 insertos con *nptII* funcional (tabla 50). No obstante, el análisis de los datos acumulados parece indicar que la línea segrega para dos insertos funcionales, ya que el valor de la χ^2 ($\chi^2 = 3,85 > \chi^2_{t\ 1\ g.l.} = 3,84$, tabla 50) sugiere rechazar la hipótesis de una segregación 3:1, lo que no ocurre con la segregación 15:1 ($\chi^2 = 0,13 < \chi^2_{t\ 1\ g.l.} = 3,84$, tabla 50). En cualquier caso, para realizar un ajuste de segregación más fino sería necesario analizar un tamaño de población considerablemente mayor.

Tabla 50. Segregación para el carácter resistencia a la kanamicina del mutante *tom1310*

	Segregación observada		χ^2 ^a	χ^2 ^b
	Kan ^R	Kan ^S		
Experimento 1 (E4)	11	1	1,78	0,09
Experimento 2 (E5)	12	1	2,08	0,05
Datos acumulados (E4 + E5) ^c	23	2	3,85	0,13

^a El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 3 plantas resistentes a kanamicina y 1 planta sensible ($P > 0,05$; $\chi^2_{t\ 1\ g.l.} = 3,84$)

^b El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 15 plantas resistentes a kanamicina y 1 planta sensible ($P > 0,05$; $\chi^2_{t\ 1\ g.l.} = 3,84$)

^c El análisis de la χ^2 de homogeneidad para las dos segregaciones ($\chi^2_H(3:1) = 0,00$ y $\chi^2_H(15:1) = 0,00$) indica que las muestras son homogéneas ($P > 0,05$; $\chi^2_{t\ 1\ g.l.} = 3,84$).

4.3.7.3. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto con *nptII* funcional

Teniendo en cuenta la escasa cantidad de semilla TG2 de la que disponíamos, decidimos obtener descendencia TG3 para llevar a cabo el análisis en estas progenies. Así, los ápices de las plantas de fenotipo WT y mutante de los experimentos E2 y E3 (ver tabla 49) se transfirieron a medio de clonación. En principio, pensábamos que los ápices de las plantas mutantes no iban a prosperar ya que se encontraban atrofiados (figura 20B). A pesar de ello, decidimos también cultivarlos, lo que se tradujo en un resultado que no esperábamos. En efecto, algunos de los ápices atrofiados comenzaron a desarrollar una o varias yemas adventicias en la región axilar del cotiledón, aproximadamente en la zona en la que termina el hipocotilo y comienza el desarrollo del epicotilo (figura 20C). En concreto, de las 6 plantas mutantes (ver tabla 49), 3 desarrollaron ápices adventicios a partir de los cuales se desarrollaron plantas axénicas completamente normales. Estas plantas no volvieron a exhibir alteración alguna en el ápice meristemático ni con el tiempo ni en sucesivas rondas de clonación.

Se analizó la resistencia o sensibilidad a la kanamicina de cada una de las plantas axénicas (i.e. las 20 de fenotipo WT y 3 de fenotipo mutante) antes de aclimatarlas y transferirlas al invernadero. Para ello, se transfirió el ápice meristemático y algunas yemas axilares a medio de clonación suplementado con kanamicina (ver apartado 3.4.4, páginas 61-62). En este experimento descubrimos que la mutación no era insercional ya que una de las tres plantas mutantes resultó ser sensible a la kanamicina. Más tarde pudimos comprobar que la progenie de esta planta mutante también era sensible a la kanamicina (datos no mostrados). En definitiva, los resultados indican que ningún inserto funcional es responsable del fenotipo mutante observado en la línea *tom1310*.

4.3.7.4. Visualización del fenotipo mutante en invernadero

Al disponer de progenie TG3 procedente de plantas mutantes, pudimos comprobar que todas las plantas de esas progenies exhibían el fenotipo de alteración en el ápice meristemático (figuras 20E-20G). Esto quiere decir que, pese a que es factible recuperar el fenotipo WT a través del desarrollo de yemas adventicias de plantas mutantes, el fenotipo se hereda en la progenie de dichas plantas. Además, los resultados indican que, por la razón que sea, el fenotipo mutante solo se manifiesta en el estadio de plántula.

Con posterioridad vimos que *in vivo* el fenotipo mutante era idéntico al que se veía *in vitro*. En efecto, algunas semillas de las progenies de plantas mutantes se sembraron en macetas y se llevaron al invernadero. Se vio que todas las plantas exhibían el fenotipo mutante (figura 20H). También se pudo comprobar que, aunque casi todas las plantas terminaban muriendo por ausencia de desarrollo de la parte aérea, ocasionalmente se restablecía el crecimiento en alguna planta mutante sobre la base del desarrollo de una yema adventicia que aparecía, como previamente se había visto *in vitro*, cerca de la región en la que se encontraban los cotiledones (figura 20I). A partir de ese momento, la planta crecía y se desarrollaba como una planta de fenotipo silvestre y no volvía a exhibir alteraciones en el nuevo ápice meristemático (figura 20J).

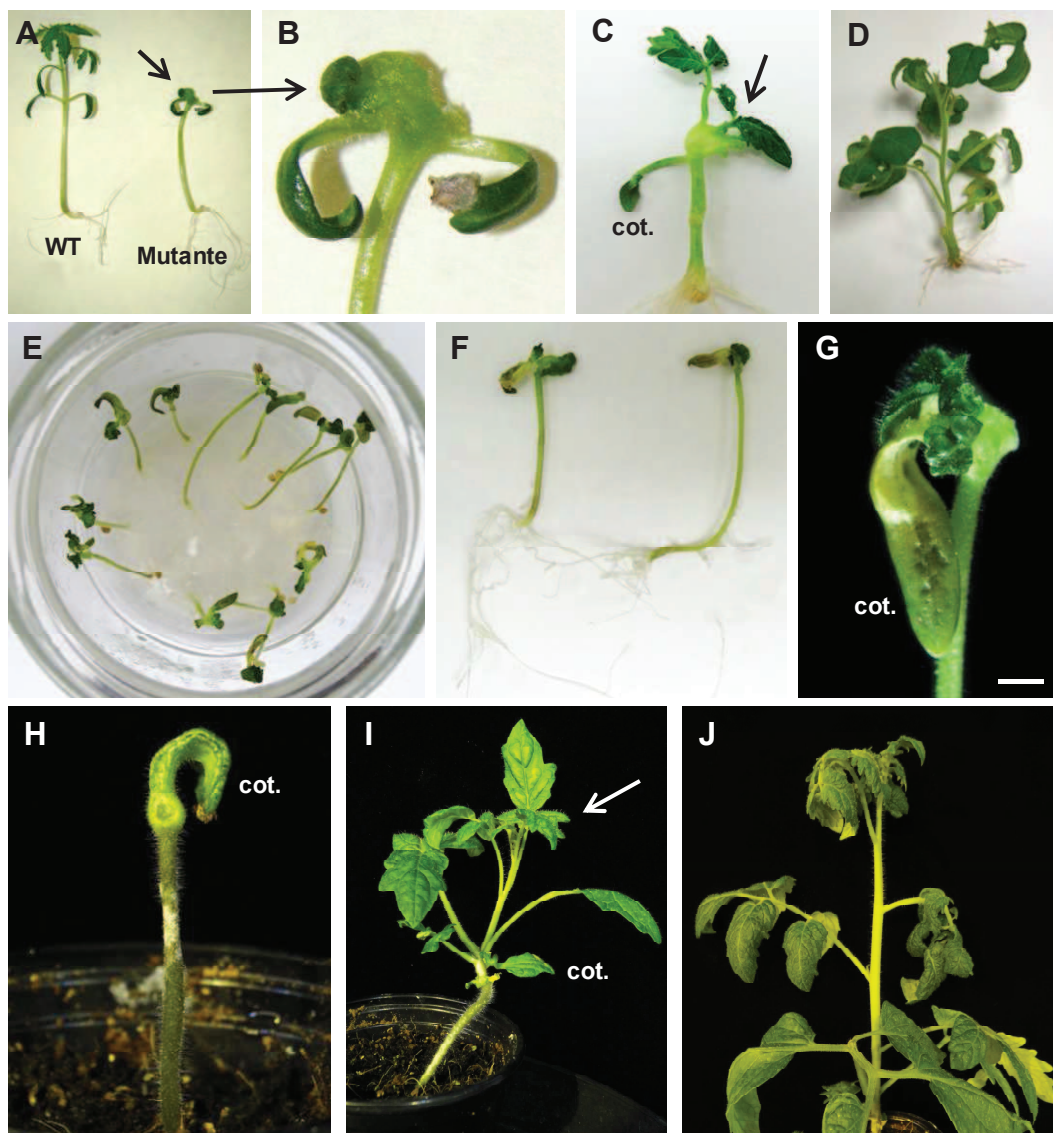


Figura 20. *tom1310*. A) Plántulas WT y mutante. B) Detalle de la alteración en el ápice meristemático. C) Aparición de una yema adventicia en una zona próxima al cotiledón. D) Planta axénica mutante 30 días después de la aparición de la yema adventicia. E)

Progenie procedente de una planta mutante: todas las plantas exhiben el fenotipo de alteración en el ápice meristemático. F) Plántulas TG3 de fenotipo mutante. G) Detalle de la zona apical en uno de los mutantes de la progenie TG3. H) Plántula mutante (TG3) en condiciones de invernadero a los 55 días de la germinación de la semilla. La planta finalmente murió por ausencia del desarrollo apical. I) Desarrollo de un ápice adventicio en una plántula mutante cultivada en el invernadero. J) Desarrollo de la parte aérea de la planta mutante 30 días después de la aparición del ápice adventicio.

Escala de barras: 2 mm (G). (cot. = cotiledón)

4.3.7.5. Obtención de líneas para el mapeo del gen mutado

Habida cuenta del interés del fenotipo mutante, hemos realizado cruzamientos entre una planta mutante sensible a la kanamicina y *Solanum pimpinellifolium* (accesión LA1589) para identificar el gen mutado mediante técnicas de mapeo fino. Actualmente disponemos de más de 2000 semillas F2. El análisis de algunas plantas F2 nos ha permitido ya visualizar el fenotipo de alteración del ápice meristemático.

4.3.8. Mutantes que exhiben manchas foliares. *tom2142*

Resumen

Uno de los últimos mutantes recesivos identificados en el cribado de líneas T-DNA de tomate es *tom2142*. Lo que hemos visto hasta la fecha es que se trata de un mutante que probablemente exhiba un porte frágil a tenor del fenotipo que hemos visto en estadio de plántula. En concreto, se ha visto que el hipocotilo de las plántulas mutantes es de menor longitud y sensiblemente más delgado, que los cotiledones son más pequeños (figura 21B) y que en ellos aparecen manchas necróticas (figuras 21A, 21E y 21F) similares a las que aparecen en las hojas de plantas que sufren ataques por determinados patógenos (e.g. hongos). Aunque aún no sabemos si estas manchas aparecerán en las hojas de las plantas mutantes y cuál será el fenotipo de las plantas en invernadero, se están iniciando los experimentos que nos permitirán descubrirlo. Los análisis realizados *in vitro* en *tom2142* han permitido concluir que se trata de un mutante recesivo que posee un inserto con *nptII* funcional. Además, el análisis de cosegregación ha permitido determinar que el fenotipo mutante no está ocasionado por el inserto funcional.

4.3.8.1. Análisis genético del mutante en cultivo *in vitro*

El fenotipo mutante (figura 21) se observó en dos experimentos (E1 y E2) cuyos datos indicaban que se trataba de un mutante recesivo. El análisis de los datos acumulados (χ^2 datos acumulados) confirmó este resultado y el análisis de homogeneidad indicó que las muestras eran homogéneas (tabla 51).

Tabla 51. Análisis genético del mutante *tom2142*

	Segregación observada		χ^2 ^a
	Wild-type	Mutante	
<i>In vitro</i> – 1 ^{er} experimento (E1)	26	9	0,01
<i>In vitro</i> – 2 ^o experimento (E2)	52	14	0,51
<i>In vitro</i> – Datos acumulados (E1+E2) ^b	78	23	0,25

^a El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 3 plantas WT y 1 planta mutante ($P > 0,05$; $\chi^2_{t 1 g.l.} = 3,84$)

^b El análisis de la χ^2 de homogeneidad ($\chi^2_H = 0,27$) indica que las muestras son homogéneas.

4.3.8.2. Determinación del número de insertos con *nptII* funcional

Para determinar el número de insertos funcionales se sembraron 44 semillas en el medio selectivo. Los resultados indicaron que la línea segregaba para 1 inserto con *nptII* funcional (tabla 52).

Tabla 52. Segregación para el carácter resistencia a la kanamicina del mutante *tom2142*

	Kan ^R	Kan ^S	χ^2 ^a
Segregación observada	31	13	0,48

^a El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 3 plantas resistentes a kanamicina y 1 planta sensible ($P > 0,05$; $\chi^2_{t 1 g.l.} = 3,84$)

4.3.8.3. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto con *nptII* funcional

Cuando se realizó la determinación del número de insertos con *nptII* funcional (apartado anterior) se vio que algunas plántulas mutantes eran sensibles a la kanamicina y que su fenotipo se distinguía perfectamente del fenotipo de las plántulas WT sensibles. En efecto, como se comentaba en el apartado de los mutantes albinos, las plántulas de tomate sensibles a la kanamicina de fenotipo silvestre no son capaces de desarrollar raíces laterales ni tampoco hojas verdaderas. Además el hipocotilo mantiene una coloración violácea. En el caso de *tom2142*, las plántulas mutantes sensibles a la kanamicina tampoco eran capaces de desarrollar raíces laterales ni hojas verdaderas y el hipocotilo tenía el color violáceo. Sin embargo, a diferencia de las WT, las plántulas mutantes eran un poco más pequeñas y en sus cotiledones, que también eran de menor tamaño, se apreciaban claramente las manchas necróticas características del mutante en este estadio de desarrollo (figura 21D y 21F). Como se puede ver en la tabla 53, once plantas mutantes fueron sensibles a la kanamicina. Este resultado indica que no existe cosegregación entre el inserto funcional y el fenotipo mutante.

Tabla 53. Segregaciones para el fenotipo y la resistencia a la kanamicina del mutante *tom2142*

	Kan ^R		Kan ^S		χ^2 ^a
	WT	Mutante	WT	Mutante	
Segregación observada	27	4	2	11	-

Conviene indicar que, aunque en este experimento la mayor parte de las plantas mutantes son sensibles a la kanamicina (11 sensibles vs 4 resistentes), la segregación para el fenotipo se ajusta a una proporción de 3 plantas WT y 1 planta mutante. En concreto, 29 plantas eran de fenotipo WT y 15 eran mutantes ($\chi^2 = 1,94 < \chi^2_{t 1 g.l.} = 3,84$).

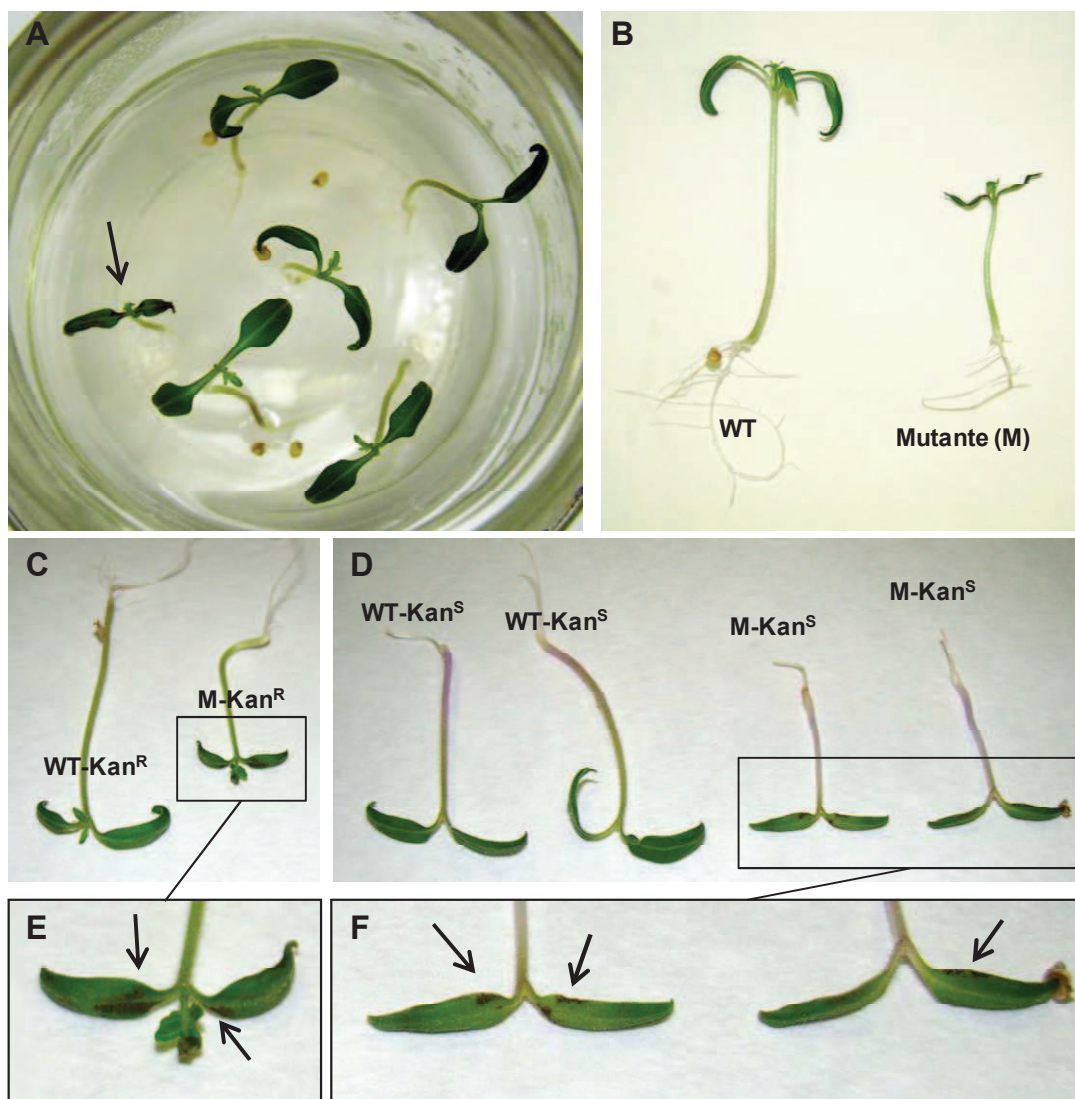


Figura 21. *tom2142*. A) Plántulas WT y mutante (señalada con una flecha) en el recipiente de cultivo. B) Plántula WT vs plántula mutante. El hipocotilo de la mutante es de menor longitud y grosor. C) Plántulas WT y mutante resistentes a la kanamicina. D) Plántulas WT y mutante sensibles a la kanamicina. E) Detalle de las manchas necróticas de la planta resistente a la kanamicina. F) Detalle de las manchas necróticas de las dos plantas sensibles a la kanamicina

Por lo que respecta a este mutante, son varios los experimentos que quedan por hacer. Por un lado queremos saber cómo es el fenotipo de las plantas mutantes en condiciones de invernadero, si son o no capaces de vegetar, florecer

y desarrollar frutos y, por otro lado, si la necrosis que se observa en los cotiledones también se ve en las hojas. Este aspecto nos parece más importante ya que, si es así, no se puede descartar que dispongamos de un mutante de tomate que mimetiza las lesiones causadas por patógenos (i.e. mutantes lesionados o LMM [*Lesion Mimic Mutants*]), lo cual sería de gran utilidad a la hora de identificar genes implicados en la respuesta de defensa a enfermedades.

4.4. Mutantes Vitro-Dev de *Solanum pimpinellifolium*

4.4.1. Mutante de *S. pimpinellifolium* alterado en el desarrollo vegetativo

Resumen

El mutante *pim93* es recesivo con una marcada alteración en diferentes caracteres del desarrollo. *In vitro*, las plantas mutantes se detectan desde el momento en el que se expanden los cotiledones, que son de menor tamaño que los de las plántulas WT (figura 22A). El fenotipo mutante también es fácilmente distinguible por el hipocotilo, que tiene menor longitud aunque mayor diámetro (figuras 22A y 22B). En estadios más avanzados, las plántulas exhiben un porte más compacto y desarrollan hojas de menor tamaño y mayor grosor (figura 22B). *In vivo*, las plantas mutantes exhiben un ritmo de crecimiento muy lento y manifiestan alteraciones similares a las que se observan *in vitro*, (figura 22D). Además de las alteraciones en el desarrollo vegetativo, las plantas mutantes muestran severas alteraciones en caracteres reproductivos. Desarrollan inflorescencias compactas (i.e. con el eje de la inflorescencia de menor longitud) y con pocas flores (figuras 22F vs 22G). Las flores son más pequeñas, oblongas e infértiles (figura 22H). Los análisis han permitido concluir que la línea posee 1 único inserto funcional que no es el responsable del fenotipo mutante.

4.4.1.1. Análisis genético del mutante en cultivo *in vitro*

El fenotipo (figura 22A) se observó en tres experimentos (E1, E2 y E3) que indicaron que se trataba de un mutante de naturaleza recesiva. El análisis de los datos acumulados (χ^2 datos acumulados) confirmó el resultado y el análisis de homogeneidad indicó que las muestras eran homogéneas (tabla 54).

Tabla 54. Análisis genético del mutante *pim93*

	Segregación observada		χ^2 ^a
	Wild-type	Mutante	
<i>In vitro</i> – 1 ^{er} experimento (E1)	25	6	0,53
<i>In vitro</i> – 2 ^o experimento (E2)	29	13	0,79
<i>In vitro</i> - 3 ^{er} experimento (E3)	18	5	0,13
<i>In vitro</i> – Datos acumulados (E1+E2+E3) ^b	72	24	0,00

^a El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 3 plantas WT y 1 planta mutante ($P > 0,05$; $\chi^2_{t\ 1\ g.l.} = 3,84$)

^b El análisis de la χ^2 de homogeneidad ($\chi^2_H = 1,45$) indica que las muestras son homogéneas ($P > 0,05$; $\chi^2_{t\ 2\ g.l.} = 5,99$).

4.4.1.2. Determinación del número de insertos con *nptII* funcional

Para determinar el número de insertos funcionales se sembraron semillas en medio selectivo (i.e. medio de germinación + 100 mg/l de kanamicina). Se realizaron dos experimentos (E4 y E5) que indicaron que la línea segregaba para 1 inserto con *nptII* funcional. El análisis de los datos acumulados (χ^2 datos acumulados) confirmó este resultado y el análisis de homogeneidad indicó que las muestras eran homogéneas (tabla 55).

Tabla 55. Segregación para el carácter resistencia a la kanamicina del mutante *pim93*

	Kan ^R	Kan ^S	χ^2 ^a
Segregación observada (E4)	24	6	0,40
Segregación observada (E5)	31	11	0,03
Datos acumulados (E4 + E5) ^b	55	17	0,07

^a El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 3 plantas resistentes a kanamicina y 1 planta sensible ($P > 0,05$; $\chi^2_{t 1 g.l.} = 3,84$)

^b El análisis de la χ^2 de homogeneidad ($\chi^2_H = 0,36$) indica que las muestras son homogéneas ($P > 0,05$; $\chi^2_{t 1 g.l.} = 3,84$).

4.4.1.3. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto con *nptII* funcional

El análisis de cosegregación se llevó a cabo utilizando el método ápice-cotiledón. En este mutante, tanto explantes de cotiledón como segmentos de hipocotilo de plántulas de 7-8 días se cultivaron en medio organogénico selectivo (100 mg/l de kanamicina). Por otro lado, los ápices se transfirieron a medio de clonación. A los 30-40 días se realizó la lectura del experimento.

Tabla 56. Segregaciones para el fenotipo y el carácter resistencia a la kanamicina del mutante *pim93*

	Kan ^R		Kan ^S	
	WT	Mutante	WT	Mutante
Segregación observada	22	9	7	4

Como se puede ver en la tabla 56, se detectaron 4 plantas mutantes sensibles a la kanamicina. Este dato indica que no existe cosegregación entre el único inserto funcional y la mutación. Los datos también permiten ver que la segregación 3:1 para la resistencia a la kanamicina se cumple entre las resistentes y las sensibles de cada fenotipo (i.e. WT y mutante). Por ejemplo, entre las WT, 22 plantas fueron resistentes a kanamicina y 7 sensibles ($\chi^2 = 0,01$

$< \chi^2_{t-1, g.l.} = 3,84$); mientras que entre las mutantes, 9 fueron resistentes a kanamicina y 4 sensibles ($\chi^2 = 0,23 < \chi^2_{t-1, g.l.} = 3,84$). Es decir, el carácter resistencia a la kanamicina y el fenotipo segregan de manera independiente. En definitiva, los resultados sugieren que en la línea *pim93* la mutación es de origen somaclonal.

4.4.1.4. Visualización del fenotipo mutante en invernadero

Las alteraciones fenotípicas durante los primeros estadios de desarrollo de la plántula *in vivo* son idénticas a las observadas *in vitro* (figuras 22B y 22C). En efecto, los cotiledones de las plántulas mutantes son considerablemente más pequeños y el hipocotilo es más grueso y tiene menor longitud. También son más gruesas y pequeñas sus hojas. Otra de las características de este mutante es que el ritmo de crecimiento es muy lento (figura 22D). A título de ejemplo, las primeras inflorescencias aparecieron a los 3 meses de cultivo en el invernadero, cuando en el WT aparecen a los 40 - 50 días de cultivo. Por lo que respecta a las inflorescencias, son más compactas debido a que el eje de la inflorescencia es de menor longitud y contienen pocas flores (5-6). Las flores son más pequeñas y oblongas (figuras 22F vs 22G y 22H).

Para tratar de identificar el gen alterado en este mutante deberíamos obtener progenies de cruce con plantas de tomate. De esta forma, se podría analizar la población segregante (F2) y, mediante técnicas de mapeo, localizar el gen mutado. Sin embargo, hasta la fecha no hemos podido obtener frutos a partir de estas plantas, ni tampoco hemos conseguido obtener progenies de cruce en ninguno de los dos sentidos. Pensamos que las alteraciones en los órganos reproductivos del mutante no nos van a permitir lograr este objetivo.

Por tanto, vamos a realizar los cruces con una planta WT que posea la mutación en heterocigosis. De esta manera, el 50% de la F1 portará la mutación en heterocigosis y el otro 50% no portará el alelo mutante. A posteriori se seleccionará la F2 que segregue para la mutación. Actualmente, disponemos de 4 plantas sensibles a kanamicina de fenotipo WT (una de las cuales portará la mutación en heterocigosis, $P_F = 1,2\%$) para llevar a cabo el cruce.

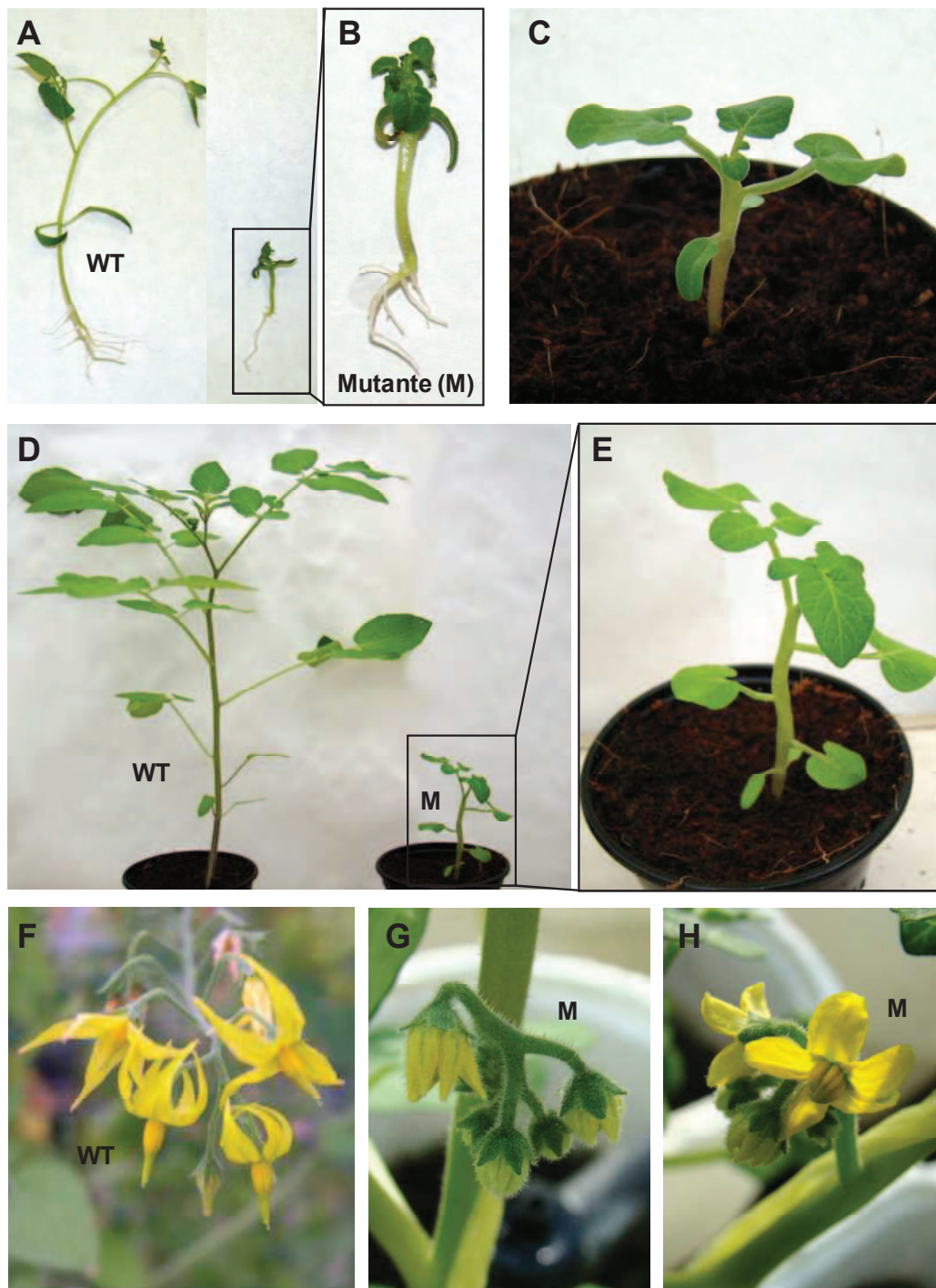


Figura 22. *pim93*. A) Plántulas WT y mutante *in vitro* (20 días post-germinación). B) Detalle de la plántula mutante. C) Plántula mutante *in vivo* (20 días post-germinación). D) Plantas WT y mutante en invernadero (50 días post-germinación). E) Detalle de la planta mutante. F) Inflorescencia de una planta de fenotipo WT. G) Inflorescencia de una planta mutante antes de la apertura de la flor. H) Inflorescencia de una planta mutante con flores en antesis.

4.4.2. Mutante de *S. pimpinellifolium* con alteraciones en el sistema radicular

Resumen

Aparte de los dos mutantes de tomate afectados en el desarrollo radicular, a saber *tom1608* y *tom1456*, en el cribado de líneas de T-DNA de *Solanum pimpinellifolium* se detectó otro mutante recesivo con alteraciones en la raíz, *pim15*. Al igual que en los de tomate, el fenotipo mutante se detecta fácilmente en los primeros estadios del desarrollo de la plántula, ya que las plántulas mutantes exhiben menor crecimiento de la parte aérea (figura 23A). Este menor crecimiento parece ser consecuencia de una ausencia parcial de actividad en el meristemo radicular (figuras 23B y 23C). En efecto, *in vitro* se puede ver que las plantas mutantes tienen una raíz pivotante de menor longitud y emiten menos raíces secundarias. Estas alteraciones también se han observado en condiciones de invernadero en plántulas con 2-3 hojas desarrolladas (figura 23H). Sin embargo, a diferencia de los mutantes de tomate que terminan muriendo, las plántulas mutantes de *pim15* son capaces de seguir creciendo. De hecho, los ápices de las plantas mutantes cultivados en medio de clonación son capaces de enraizar y desarrollar plantas axénicas normales. En efecto, hemos observado que los ápices de las plantas mutantes tardan mucho en emitir raíces, sin embargo, cuando lo hacen se comportan como una planta silvestre. Como ocurría en los mutantes de tomate, hemos visto que los explantes de las plántulas mutantes exhiben menor respuesta morfogénica, consecuencia probablemente de la menor actividad meristemática (figura 23D). Por otro lado, los análisis realizados han determinado que el único inserto funcional que posee *pim15* es el responsable del fenotipo mutante. El gen responsable de la mutación ya ha sido identificado por el grupo del Dr. Lozano (UAL, Almería).

4.4.2.1. Análisis genético del mutante en cultivo *in vitro*

El fenotipo mutante (figura 23A) se observó en cinco experimentos (E1, E2, E3, E4 y E5). Los resultados indicaron que se trataba de un mutante de naturaleza recesiva. El análisis de los datos acumulados (χ^2 datos acumulados) confirmó este resultado y el análisis de homogeneidad indicó que las muestras eran homogéneas (tabla 57).

Tabla 57. Análisis genético del mutante *pim15*

	Segregación observada		χ^2 ^a
	Wild-type	Mutante	
<i>In vitro</i> – 1 ^{er} experimento (E1)	37	6	2,80
<i>In vitro</i> – 2 ^o experimento (E2)	25	7	0,17
<i>In vitro</i> - 3 ^{er} experimento (E3)	22	8	0,04
<i>In vitro</i> - 4 ^o experimento (E4)	51	15	0,18
<i>In vitro</i> - 5 ^o experimento (E5)	50	19	0,24
<i>In vitro</i> – Datos acumulados (E1+E2+E3+E4+ E5) ^b	185	55	0,56

^a El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 3 plantas WT y 1 planta mutante ($P > 0,05$; $\chi^2_{t 1 g.l.} = 3,84$)

^b El análisis de la χ^2 de homogeneidad ($\chi^2_H = 2,87$) indica que las muestras son homogéneas ($P > 0,05$; $\chi^2_{t 4 g.l.} = 9,49$).

4.4.2.2. Determinación del número de insertos con *nptII* funcional

Para determinar el número de insertos funcionales se sembraron semillas en medio selectivo (i.e. medio de germinación + 100 mg/l de kanamicina). Se realizaron dos experimentos (E6 y E7) que indicaron que la línea segregaba para 1 inserto con *nptII* funcional. El análisis de los datos acumulados confirmó este resultado y el análisis de homogeneidad indicó que las muestras eran homogéneas (tabla 58).

Tabla 58. Segregación para el carácter resistencia a la kanamicina del mutante *pim15*

	Kan ^R	Kan ^S	χ^2 ^a
Segregación observada (E6)	22	8	0,04
Segregación observada (E7)	53	24	1,56
Datos acumulados (E7 + E8) ^b	75	32	1,37

^a El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 3 plantas resistentes a kanamicina y 1 planta sensible ($P > 0,05$; $\chi^2_{t 1 g.l.} = 3,84$)

^b El análisis de la χ^2 de homogeneidad ($\chi^2_H = 0,23$) indica que las muestras son homogéneas ($P > 0,05$; $\chi^2_{t 1 g.l.} = 3,84$).

4.4.2.3. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto con *nptII* funcional

El análisis de cosegregación se llevó a cabo utilizando el método ápice-cotiledón. De esta forma, los explantes de cotiledón de plántulas de 7-8 días se cultivaron en medio organogénico selectivo (100 mg/l de kanamicina) y los ápices se transfirieron a medio de clonación. A los 30 días se realizó la lectura del experimento. Pudimos ver que los explantes de todas las plántulas mutantes eran

resistentes a la kanamicina (tabla 59). También pudimos apreciar que exhibían menor morfogénesis que los de las plántulas WT resistentes a la kanamicina (figura 23D). Por otro lado, pudimos ver que los ápices de las plántulas mutantes no habían emitido raíces en el medio de clonación a lo largo de los 30 días de cultivo, a diferencia de los ápices de las plántulas WT que sí que lo habían hecho (figura 23E). En un experimento posterior pudimos comprobar que con el tiempo (i.e. 50-60 días) los ápices de las plántulas mutantes eran capaces de emitir raíces (figura 23F) y, a partir de ese momento, las plantas axénicas exhibían un crecimiento normal.

Tabla 59. Segregaciones para el fenotipo y la resistencia a la kanamicina del mutante *pim15*

	Kan ^R		Kan ^S		χ^2 ^a
	WT	Mutante	WT	Mutante	
Segregación observada	36	15	15	0	0,55

^a El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 1 planta mutante resistente a kanamicina, 2 plantas WT resistentes a kanamicina y 1 planta WT sensible a kanamicina ($P > 0,05$; $\chi^2_{t 2 g.l.} = 5,99$)

Por lo que respecta a los resultados, pudimos comprobar que entre las plantas de fenotipo WT, 2/3 eran resistentes a la kanamicina y 1/3 sensible ($\chi^2 = 0,35$, $P > 0,05$; $\chi^2_{t 1 g.l.} = 3,84$). En conjunto, los datos se ajustaron a una segregación 1:2:1, es decir, 1 planta mutante resistente a la kanamicina, 2 plantas WT resistentes a kanamicina y 1 planta WT sensible a kanamicina, acorde con la segregación esperada para un mutante insercional de simple copia (tabla 3). Además, teniendo en cuenta que en la muestra de 56 plantas no se detectó ninguna planta mutante sensible a la kanamicina, no hay motivo para dudar (probabilidad de fallo = 1,4 %) de que el fenotipo mutante se debe a la presencia en homocigosis de un inserto con *nptII* funcional. En definitiva, no hay motivos para dudar de que hay cosegregación entre el fenotipo mutante y el único inserto con *nptII* funcional. El gen etiquetado ya ha sido identificado por el grupo del Dr. Lozano y en los próximos meses se iniciará el análisis funcional de este gen.

4.4.2.4. Visualización del fenotipo mutante en invernadero

Por lo que respecta al fenotipo *in vivo*, hemos visto que las plántulas mutantes exhiben menor crecimiento que las WT, acorde con lo que previamente se había observado *in vitro*. Asimismo, hemos observado que, al igual que ocurre *in vitro*, la raíz pivotante de las plántulas mutantes es de menor longitud y contiene menor

densidad de raíces secundarias. Actualmente tenemos plantas en el invernadero para ver cuánto tiempo necesitan para florecer y fructificar.

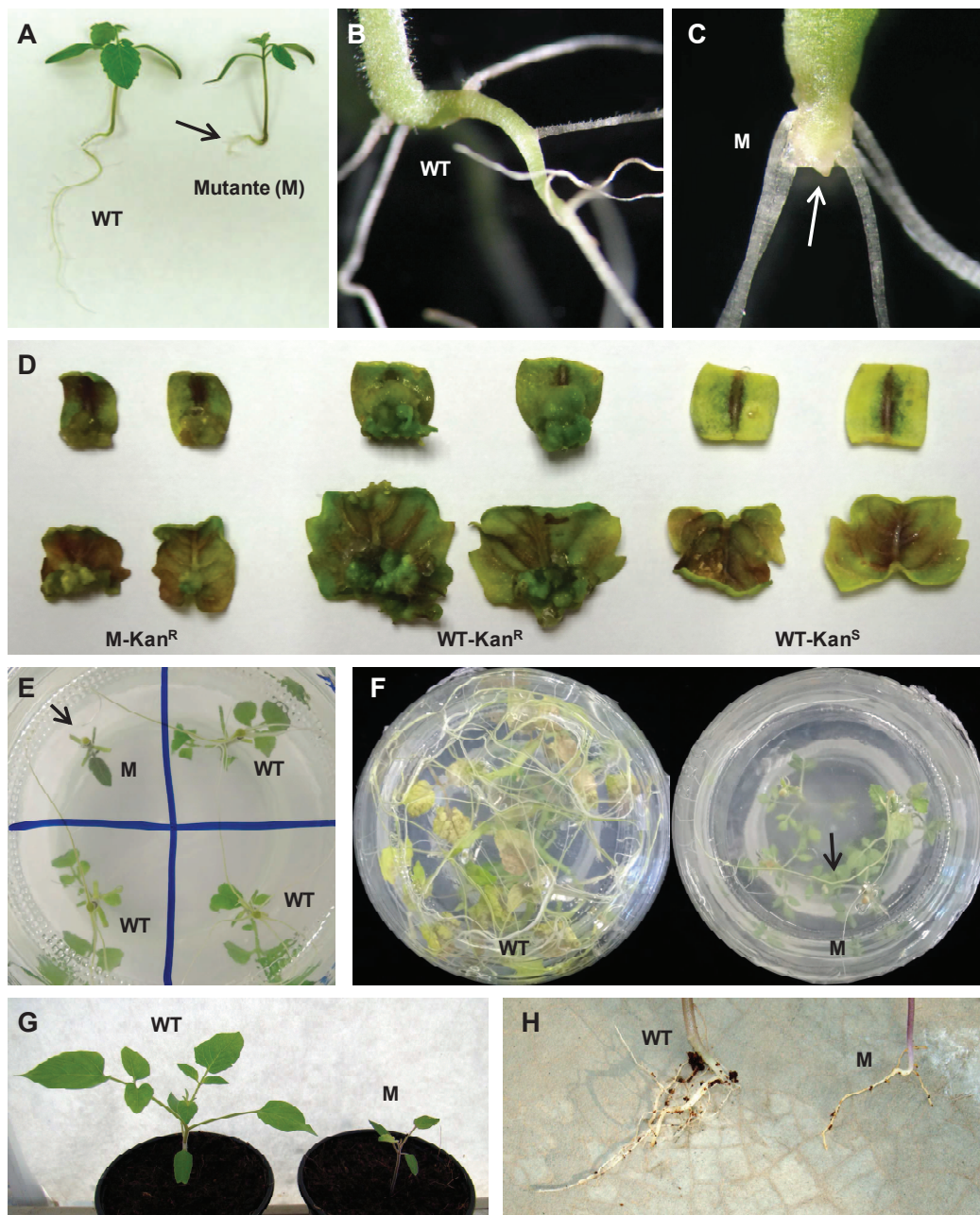


Figura 23. *pim15*. A) Plántulas WT y mutante. B) Detalle de la raíz pivotante en una plántula WT crecida in vitro durante 10 días. C) Alteración del desarrollo de la raíz pivotante en una plántula mutante crecida in vitro durante 10 días. D) Morfogénesis en explantes de cotiledón (arriba) y hoja (abajo) de plántulas mutantes resistentes a la kanamicina (kan^R) y WT resistentes (kan^R) y sensibles a kanamicina (kan^S). E) Enraizamiento de plantas axénicas WT y mutante a los 30 días del cultivo del ápice. F) Enraizamiento de plantas axénicas WT y mutantes a los 60 días del cultivo del ápice. G) Plántula WT y mutante en el invernadero (10 días post-germinación). H) Raíces de plántulas WT y mutante (10 días post-germinación).

4.5. Mutantes Vitro-Dev de *Solanum cheesmaniae*

4.5.1. Mutante de *S. cheesmaniae* alterado en el desarrollo vegetativo

Resumen

En la línea *ch47* se identificaron dos fenotipos mutantes entre los que parece que se produce una situación de epistasia simple recesiva. El fenotipo suprimido por la mutación epistática (Mutante 1, hipostático) exhibe un ritmo de crecimiento lento que podría deberse a un menor desarrollo radicular. Como consecuencia, este mutante desarrolla hojas de menor tamaño y de un color verde más intenso, aunque de morfología similar a las hojas de plantas WT. El mutante epistático (Mutante 2) manifiesta una intensa necrosis a partir del momento en el que se inicia la expansión de los cotiledones, lo que provoca su muerte. Ambos mutantes, claramente distinguibles *in vitro*, exhiben el mismo fenotipo en condiciones de invernadero. Los análisis realizados *in vitro* han permitido concluir que la línea contiene 1 inserto funcional. Sin embargo, ninguna de las dos mutaciones cosegrega con el inserto funcional.

4.5.1.1. Análisis genético del mutante en cultivo *in vitro*

Los resultados de dos experimentos (E1 y E2) sugerían que la segregación se ajustaba a un modelo de epistasia simple recesiva (tabla 60).

Tabla 60. Análisis genético del mutante *ch47*

	Segregación observada			χ^2 ^a
	Wild-type	Mutante 1	Mutante 2	
<i>In vitro</i> – 1 ^{er} experimento (E1)	23	6	4	3,26
<i>In vitro</i> – 2 ^o experimento (E2)	35	4	13	4,52
<i>In vitro</i> – Datos acumulados (E1+E2) ^b	58	10	17	5,23

^a El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 9 plantas WT, 3 plantas con la mutación 1 y 4 plantas con la mutación 2 ($P > 0,05$; $\chi^2_{t 2 g.l.} = 5,99$)

^b El análisis de la χ^2 de homogeneidad ($\chi^2_{H} = 2,54$) indica que las muestras son homogéneas ($P > 0,05$; $\chi^2_{t 4 g.l.} = 9,48$).

El análisis de los datos acumulados indicó que no había motivos para rechazar esta hipótesis y el análisis de homogeneidad indicó que las muestras eran homogéneas (tabla 60).

4.5.1.2. Determinación del número de insertos con *nptII* funcional

Para estimar el número de insertos funcionales se analizó la resistencia-sensibilidad a la kanamicina en 173 plántulas cultivadas en el medio selectivo.

Tabla 61. Segregación para el carácter resistencia a la kanamicina del mutante *ch47*

	Segregación observada		χ^2 ^a
	Kan ^R	Kan ^S	
Experimento 1 (E1)	60	23	0,33
Experimento 2 (E2)	69	21	0,13
Datos acumulados (E1+E2)	128	44	0,02

^a El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 3 plantas resistentes a kanamicina y 1 planta sensible ($P > 0,05$; $\chi^2_{t 1 g.l.} = 3,84$).

^b El análisis de la χ^2 de homogeneidad ($\chi^2_H = 0,44$) indica que las muestras son homogéneas ($P > 0,05$; $\chi^2_{t 1 g.l.} = 3,84$).

Los resultados de cada experimento indicaban que la línea segregaba para 1 inserto con *nptII* funcional. El análisis de los datos acumulados indicó que no había motivos para rechazar esta hipótesis y el análisis de homogeneidad indicó que las muestras eran homogéneas (tabla 61). Además de estimar el número de insertos, estos experimentos nos permitieron detectar plantas sensibles a kanamicina con el fenotipo Mutante 2, es decir, el que se caracteriza por un proceso de necrosis extremo en estadios tempranos del desarrollo de la plántula. En efecto, estas plantas eran fácilmente distinguibles de las otras plantas sensibles a la kanamicina ya que además de exhibir el típico fenotipo de sensibilidad, ausencia del desarrollo radicular o hipocotilo rojo (antocianos), manifestaban una intensa necrosis en los cotiledones. Las plantas mutantes necróticas resistentes a kanamicina desarrollaban raíces y el hipocotilo no tenía esta coloración rojiza. Por tanto, los resultados parecen evidenciar que el inserto funcional no es responsable del fenotipo de necrosis.

4.5.1.3. Visualización de los fenotipos mutantes en invernadero

Para comprobar si los fenotipos mutantes también se veían en condiciones de invernadero se cultivaron 37 plantas. Se observaron los mismos fenotipos que se habían visto *in vitro* (figura 24E) y los resultados, de nuevo, parecían indicar que la segregación se ajustaba a una situación de epistasia simple recesiva. En efecto, de las 37 plantas, 15 eran de fenotipo WT, 11 exhibían retraso del

crecimiento y un porte más débil y otras 11 manifestaron síntomas de necrosis desde los primeros estadios de desarrollo ($\chi^2 = 4,33 < \chi^2_{t 2 g.l.} = 5,99$).

4.5.1.4. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto con *nptII* funcional

En medio de germinación selectivo (apartado 4.5.1.2) habíamos visto que algunas plántulas con fenotipo necrótico eran sensibles a kanamicina. Sin embargo, en el resto de las plántulas sensibles a kanamicina no era posible distinguir el fenotipo. Por tanto, para ver si la otra mutación cosegregaba o no con el inserto funcional se utilizó el método ápice-cotiledón. Para ello, se sembraron 90 semillas en medio de germinación. De las 90 plántulas, 62 fueron de fenotipo WT, 15 exhibieron la Mutación 1 (menor crecimiento) y 13 la Mutación 2 (necrosis). El método sólo se pudo llevar a cabo con las plantas WT y las de fenotipo Mutante 1, ya que los cotiledones de las plantas de fenotipo Mutante 2 estaban necrosados antes de que se expandieran. Con todo, los resultados indicaron que el único inserto funcional tampoco era el responsable del fenotipo Mutante 1 (tabla 62).

Tabla 62. Segregaciones para el fenotipo y el carácter resistencia a la kanamicina del mutante *ch47*

	Kan ^R			Kan ^S		
	WT	Mutante 1	Mutante 2	WT	Mutante 1	Mutante 2
Segregación observada	44	12	-	17	3	-

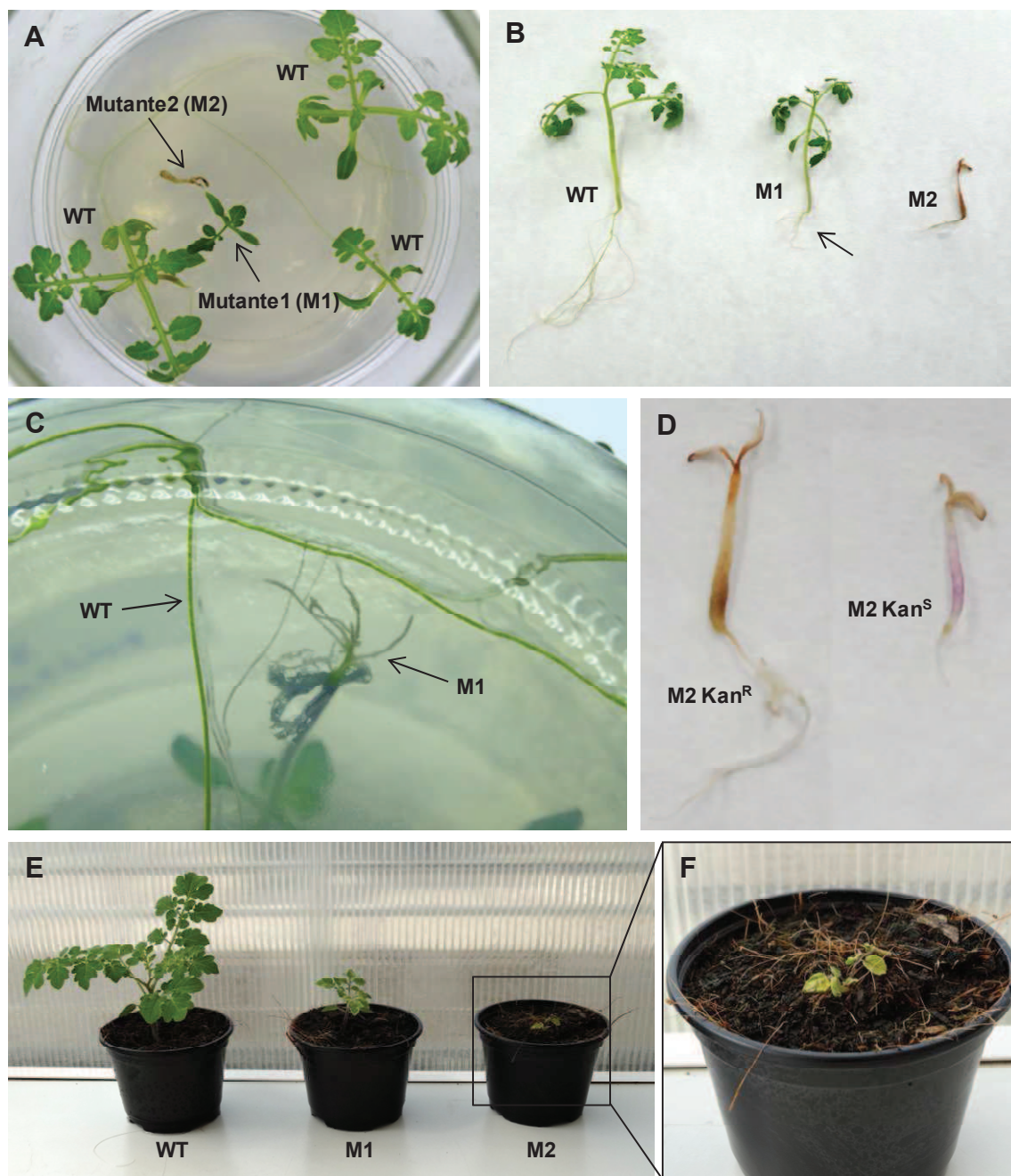


Figura 24. *ch47*. A) Plantas WT, de fenotipo Mutante 1 (M1) y de fenotipo 2 (M2) en el recipiente de cultivo *in vitro*. B) Plantas WT, de fenotipo Mutante 1 (M1) y de fenotipo 2 (M2) después de extraerlas del recipiente de cultivo. Nótese el escaso desarrollo radicular del Mutante 1 (señalado con una flecha) C) Raíz del Mutante 1 (vista desde la parte inferior del recipiente de cultivo). Alrededor se puede ver parte de la raíz de una planta WT. D) Plantas de fenotipo Mutante 2 resistente (kan^R) y sensible (kan^S) a la kanamicina. E) Plantas WT, de fenotipo Mutante 1 (M1) y de fenotipo 2 (M2) *in vivo*. F) Detalle de una planta con fenotipo Mutante 2.

4.5.2. Mutantes de *S. cheesmaniae* afectados en la síntesis de clorofila

Resumen

En el cribado de líneas T-DNA de *Solanum cheesmaniae* se han identificado tres mutantes deficientes en clorofila, a saber: *ch14* (figuras 25A y 25B), *ch27* (figuras 25C y 25D) y *ch29* (figuras 25E y 25F). En estos mutantes el fenotipo clorótico se detecta desde el momento en el que las plántulas comienzan a desarrollar las primeras hojas verdaderas. Estos mutantes exhiben un ritmo de crecimiento más lento en los medios que habitualmente utilizamos para la germinación de semillas o la clonación de plantas. Las plantas mutantes, que se pueden mantener *in vitro* mediante clonación de ápices y yemas axilares, son más cloróticas y manifiestan un retraso en el crecimiento respecto a las de fenotipo silvestre. Los análisis realizados *in vitro* han permitido concluir que las tres líneas contienen 1 inserto funcional que en ninguno de los casos cosegrega con el fenotipo mutante.

4.5.2.1. Análisis genético de los mutantes *ch14*, *ch27* y *ch29* en cultivo *in vitro*

En los tres mutantes, el análisis genético se llevó a cabo con los datos de 2 experimentos (E1 y E2). El resultado de cada uno de los experimentos así como el de los datos acumulados indicaron que los tres mutantes eran recesivos (ver tabla 63 para el mutante *ch14*, tabla 64 para *ch27* y tabla 65 para *ch29*).

Tabla 63. Análisis genético del mutante *ch14*

	Segregación observada		χ^2 ^a
	Wild-type	Mutante	
<i>In vitro</i> – 1 ^{er} experimento (E1)	34	6	2,13
<i>In vitro</i> – 2 ^o experimento (E2)	39	10	0,55
<i>In vitro</i> – Datos acumulados (E1+E2) ^b	73	16	2,34

^a El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 3 plantas WT y 1 planta mutante ($P > 0,05$; $\chi^2_{t 1 g.l.} = 3,84$)

^b El análisis de la χ^2 de homogeneidad ($\chi^2_H = 0,34$) indica que las muestras son homogéneas.

Tabla 64. Análisis genético del mutante *ch27*

	Segregación observada		χ^2 ^a
	Wild-type	Mutante	
<i>In vitro</i> – 1 ^{er} experimento (E1)	13	5	0,07
<i>In vitro</i> – 2 ^o experimento (E2)	25	15	3,33
<i>In vitro</i> – Datos acumulados (E1+E2) ^b	38	20	2,78

^a El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 3 plantas WT y 1 planta mutante ($P > 0,05$; $\chi^2_{t\ 1\ g.l.} = 3,84$)

^b El análisis de la χ^2 de homogeneidad ($\chi^2_H = 0,63$) indica que las muestras son homogéneas.

Tabla 65. Análisis genético del mutante *ch29*

	Segregación observada		χ^2 ^a
	Wild-type	Mutante	
<i>In vitro</i> – 1 ^{er} experimento (E1)	16	6	0,06
<i>In vitro</i> – 2 ^o experimento (E2)	20	9	0,56
<i>In vitro</i> – Datos acumulados (E1+E2) ^b	36	15	0,53

^a El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 3 plantas WT y 1 planta mutante ($P > 0,05$; $\chi^2_{t\ 1\ g.l.} = 3,84$)

^b El análisis de la χ^2 de homogeneidad ($\chi^2_H = 0,09$) indica que las muestras son homogéneas.

4.5.2.2. Determinación del número de insertos con *nptII* funcional

Para determinar el número de insertos funcionales, se analizó el número de plantas resistentes y sensibles a la kanamicina de la respectivas progenies segregantes TG2. Como se puede ver en las tablas 66 (*ch14*), 67 (*ch27*) y 68 (*ch29*), los tres mutantes segregaron para 1 inserto con *nptII* funcional.

Tabla 66. Segregación para el carácter resistencia a la kanamicina en el mutante *ch14*.

	Kan ^R	Kan ^S	χ^2 ^a
Segregación observada (E3)	31	13	0,48
Segregación observada (E4)	37	12	0,01
Datos acumulados (E3+E4) ^b	68	25	0,18

^a El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 3 plantas resistentes a kanamicina y 1 planta sensible ($P > 0,05$; $\chi^2_{t\ 1\ g.l.} = 3,84$)

^b El análisis de la χ^2 de homogeneidad ($\chi^2_H = 0,32$) indica que las muestras son homogéneas.

Tabla 67. Segregación para el carácter resistencia a la kanamicina en el mutante *ch27*.

	Kan ^R	Kan ^S	χ^2 ^a
Segregación observada (E3)	35	15	0,67

^a El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 3 plantas resistentes a kanamicina y 1 planta sensible (P>0,05; $\chi^2_{t 1 g.l.} = 3,84$)

Tabla 68. Segregación para el carácter resistencia a la kanamicina en el mutante *ch29*.

	Kan ^R	Kan ^S	χ^2 ^a
Segregación observada (E3)	31	13	0,48

^a El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 3 plantas resistentes a kanamicina y 1 planta sensible (P>0,05; $\chi^2_{t 1 g.l.} = 3,84$)

4.5.2.3. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto con *nptII* funcional

El análisis de cosegregación entre el inserto funcional y el fenotipo mutante se llevó a cabo en los tres casos mediante el método ápice-cotiledón. Los explantes de cotiledón de plántulas de 7-10 días se cultivaron en medio organogénico selectivo (100 mg/l de kanamicina) mientras que los brotes se transfirieron a medio de clonación. Los resultados indicaron la ausencia de cosegregación entre el inserto funcional y la mutación en los tres mutantes (ver tabla 69 para el mutante *ch14*, tabla 70 para *ch27* y tabla 71 para *ch29*).

Tabla 69. Segregaciones para el fenotipo y el carácter resistencia a la kanamicina en el mutante *ch14*.

	Kan ^R		Kan ^S	
	WT	Mutante	WT	Mutante
Segregación observada	58	10	16	9

Tabla 70. Segregaciones para el fenotipo y el carácter resistencia a la kanamicina en el mutante *ch27*.

	Kan ^R		Kan ^S	
	WT	Mutante	WT	Mutante
Segregación observada	25	10	7	8

Tabla 71. Segregaciones para el fenotipo y el carácter resistencia a la kanamicina en el mutante *ch29*.

	Kan ^R		Kan ^S	
	WT	Mutante	WT	Mutante
Segregación observada	32	4	6	2

Conviene indicar que en condiciones de cultivo *in vitro* ha sido difícil detectar caracteres fenotípicos claros que diferencien a los tres mutantes (figura 25). Por ello, actualmente se está llevando a cabo una caracterización fenotípica de cada uno de estos mutantes en invernadero a fin de detectar los caracteres que los diferencian en las distintas etapas del desarrollo de la planta.

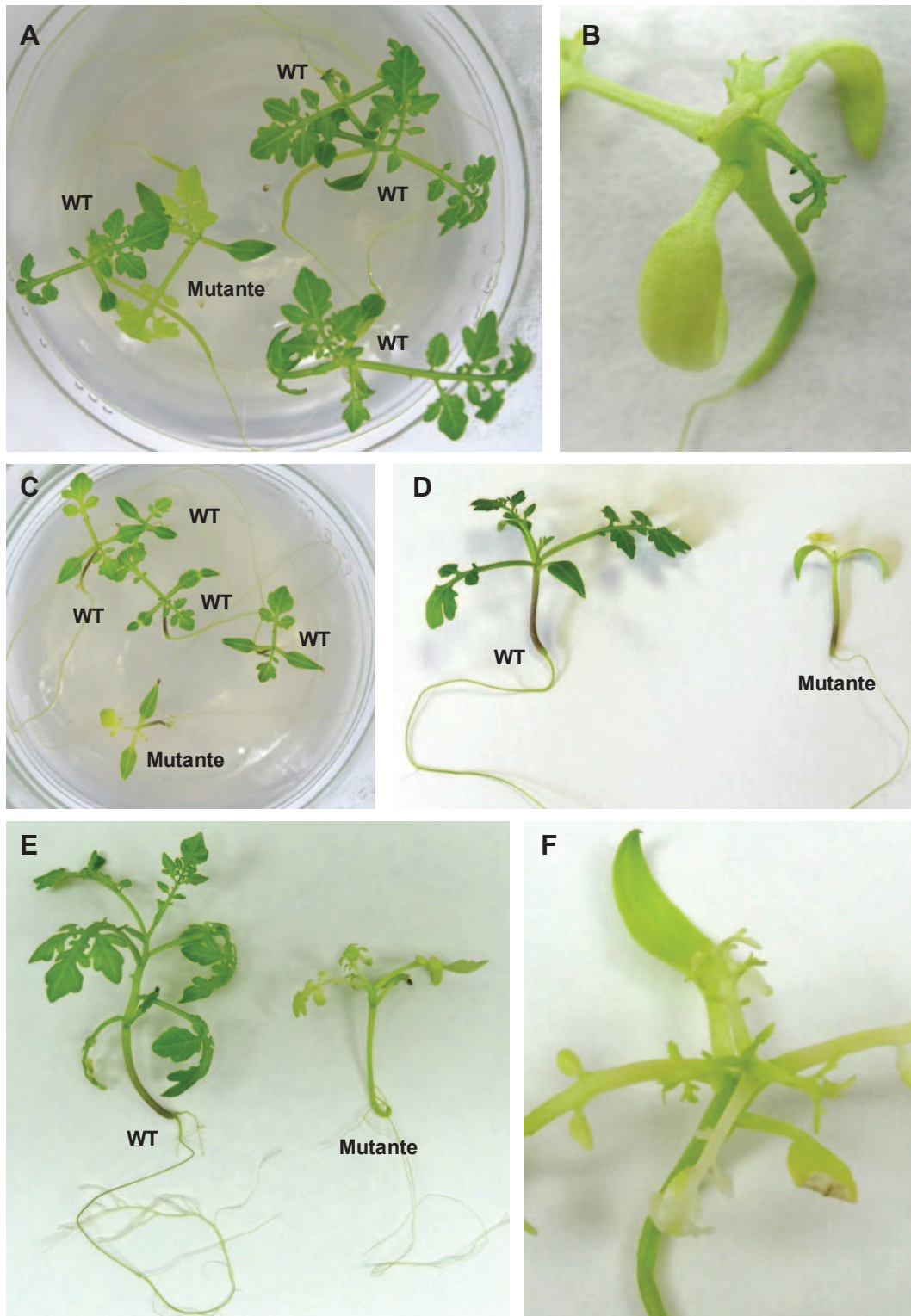


Figura 25. *ch14*, *ch27* y *ch29*. A) Mutante *ch14*. WT y mutante en el recipiente de cultivo *in vitro*. B) Detalle de una planta mutante después de extraerla del recipiente de cultivo. C) Mutante *ch27*. WT y mutante en el recipiente de cultivo *in vitro*. D) WT y mutante después de extraerlos del recipiente de cultivo. E) Mutante *ch29*. WT y mutante después de extraerlos del recipiente de cultivo. F) Detalle de una planta mutante.

4.6. Mutantes afectados en el nivel de tolerancia a la salinidad

4.6.1. *tom1560*

Resumen

En *tom1560* se identificaron dos fenotipos mutantes entre los que podría haber una situación de epistasia simple recesiva. El alelo epistático (Mutante 2) determina en homocigosis severas alteraciones en el desarrollo de las plántulas desde los primeros estadios, a saber, hipocotilo de menor longitud, más grueso e irregular, cotiledones pequeños y ausencia de desarrollo de la parte aérea (figuras 26D y 26J). A consecuencia de estas alteraciones, las plantas no son capaces de sobrevivir y terminan marchitando en cualquiera de las condiciones en las que hemos experimentado (i.e. desarrollo de plántulas tanto *in vitro* como *in vivo*, o desarrollo de planta axénica mediante el cultivo de ápices en medio de clonación). El fenotipo suprimido por la mutación epistática (Mutante 1) sólo exhibe el fenotipo mutante en condiciones de estrés salino. En concreto, las plántulas que se desarrollan *in vitro* en un medio de cultivo básico suplementado con NaCl tienen engrosados diferentes órganos (i.e. hipocotilo, cotiledones y hojas) y exhiben un alto grado de clorosis (figura 26B). Cuando se cultivan las plántulas en invernadero en condiciones de estrés salino, el fenotipo es idéntico aunque el grado de clorosis es mayor (figuras 26L y 26M). En ambos ambientes (*in vitro* e *in vivo*) las plántulas no desarrollan alteraciones en ausencia de estrés, lo que indica que el fenotipo mutante es específico de una situación de estrés salino. Además, las plántulas que *in vitro* muestran síntomas de hipersensibilidad a la sal son capaces de recuperar el fenotipo silvestre cuando los ápices se transfieren a medio de clonación (figuras 26E-26H). Los análisis realizados *in vitro* han permitido concluir que la línea contiene 1 inserto funcional, aunque ninguna de las dos mutaciones cosegrega con el inserto.

4.6.1.1. Análisis genético del mutante en cultivo *in vitro*

El primer experimento (E1) se realizó con 33 plántulas que se cultivaron en un medio de germinación suplementado con NaCl (100 mM). Pudimos observar que 8 de las 33 plántulas exhibían engrosamiento en el hipocotilo, cotiledones de mayor calibre y hojas más cloróticas (tabla 72 – E1, figuras 26A y 26B). A este mutante lo denominaremos a partir de ahora 'Mutante 1'. Para corroborar el resultado se realizó un segundo experimento (E2) en el mismo medio de cultivo (medio de germinación suplementado con NaCl) con 29 plántulas. Vimos que 5 de

las 29 plántulas volvían a exhibir el mismo fenotipo que se había visto en el primer experimento (i.e. Mutante 1), pero además se vio que una plántula exhibía un fenotipo distinto (tabla 72 – E2). En concreto, la plántula tenía un hipocotilo que parecía exhibir un crecimiento discontinuo, de menor longitud y con un color más tenue, y cotiledones más pequeños curvados hacia su cara abaxial (figura 26D). Este mutante será a partir de ahora el 'Mutante 2'. Teniendo en cuenta que sólo se había visto una planta en dos experimentos, en un primer momento no estábamos seguros que fuese un mutante, sino que podía tratarse de una planta que había germinado mal en medio salino. Obviando este resultado, los datos de cada experimento y los acumulados indicaban que el Mutante 1 es recesivo.

Tabla 72. Análisis genético del mutante *tom1560* en medio suplementado con NaCl (100 mM).

	Segregación observada			χ^2 ^a
	Wild-type	Mutante 1	Mutante 2	
<i>In vitro</i> – 1 ^{er} experimento (E1)	25	8	0	0,01
<i>In vitro</i> – 2 ^o experimento (E2)	23	5	1	0,76
<i>In vitro</i> – Datos acumulados (E1+E2) ^b	48	13	1	0,44

^a Considerando sólo las plantas WT y las que exhiben la mutación 1, el valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 3 plantas WT y 1 planta mutante ($P > 0,05$; $\chi^2_{t 1 g.l.} = 3,84$)

^b Considerando sólo las plantas WT y las que exhiben la mutación 1, el análisis de la χ^2 de homogeneidad ($\chi^2_H = 0,33$) indica que las muestras son homogéneas.

En paralelo, se evaluó el fenotipo de 26 plántulas que crecieron en medio de germinación sin el suplemento de NaCl (E3). Pudimos comprobar que en ausencia de estrés no aparecía el primer fenotipo que observamos en el medio salino, es decir, el que se caracterizaba por un engrosamiento del hipocotilo, cotiledones de mayor calibre y hojas más cloróticas (Mutante 1). Sin embargo, pudimos observar que 6 de las 26 plántulas que crecieron en el medio de germinación sin sal exhibían la mutación 2 (tabla 73).

Tabla 73. Análisis genético del mutante *tom1560* en medio sin el suplemento de NaCl.

	Segregación observada			χ^2 ^a
	Wild-type	Mutante 1	Mutante 2	
<i>In vitro</i> – 3 ^{er} experimento (E3)	17	0	6	0,01

^a El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 3 plantas WT y 1 planta mutante ($P > 0,05$; $\chi^2_{t 1 g.l.} = 3,84$)

Estos resultados nos hicieron pensar que ambos mutantes (Mutante 1 y Mutante 2) eran el mismo pero con una expresión fenotípica distinta en función de

que las plantas crecieran en medio con sal (donde se vería sólo el fenotipo Mutante 1) o sin sal (donde sólo se vería el fenotipo Mutante 2).

4.6.1.2. Recuperación del fenotipo silvestre en plantas con fenotipo mutante

Para aclarar la situación, es decir, para ver si se trataba de la misma mutación o de dos mutaciones distintas, decidimos obtener progenies de plantas mutantes y evaluar su fenotipo en medios sin y con sal. Para ello, teníamos que ser capaces de recuperar las plantas de los mutantes cultivando los ápices respectivos en medio de clonación sin sal. Pudimos comprobar que los ápices de las plantas que exhibían el fenotipo Mutante 2 no prosperaban. En efecto, los ápices de estas plantas no desarrollaban raíces adventicias y, a los 10-15 días, necrosaban. Sin embargo, los ápices de las plantas que exhibían el fenotipo Mutante 1 en medio salino -conviene recordar que este fenotipo no se veía en medio sin sal- dieron lugar a plantas axénicas normales (i.e. de fenotipo WT) cuando se cultivaron en medio sin sal (figuras 26E-26H). Así pues, tras recuperar el fenotipo de 3 de las 5 plantas mutantes del experimento 2 (tabla 72, E2), se aclimataron en el invernadero para obtener las progenies. Una vez obtenidas las progenies de estas plantas, se sembraron semillas en medios con y sin sal.

Tabla 74. Análisis de progenies TG3 del mutante *tom1560* obtenidas a partir de plantas TG2 que exhibieron el fenotipo Mutante 1. Fenotipo de las plantas en medios sin y con sal.

	Fenotipos observados sin sal			Fenotipos observados con sal		
	Wild-type	Mutante 1	Mutante 2	Wild-type	Mutante 1	Mutante 2
Progenie 5	20	0	0	0	36	0
Progenie 15	16	0	4	0	18	2
Progenie 34	21	0	3	0	33	4

^a Considerando sólo las plantas WT y las que exhiben la mutación 1, el valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 3 plantas WT y 1 mutante ($P > 0,05$; $\chi^2_{1 \text{ g.l.}} = 3,84$)

Vimos que dos de estas progenies (TG3-15 y TG3-34) segregaban para la mutación 2 en medios sin y con suplemento de NaCl, mientras que en la otra progenie (TG3-5) no se observaron plantas con la mutación 2 (tabla 74). Por otro lado, en ninguna de las progenies se detectó el fenotipo Mutante 1 en medio sin sal. Sin embargo, en medio con sal, todas las plantas de la TG3-5 exhibían el fenotipo mutante 1, mientras que las otras dos progenies (TG3-15 y TG3-34) segregaban para ambas mutaciones (tabla 74). Así pues, los resultados indicaban que se trataba de dos mutaciones independientes.

En definitiva, con los anteriores experimentos se comprobó que: i) las plantas que exhiben la mutación 1 son capaces de recuperar el fenotipo silvestre en medio de clonación; y ii) la línea de partida (*tom1560*) contiene dos mutaciones, una relacionada con caracteres del desarrollo (mutación 2) y otra implicada en la respuesta de la planta en condiciones de estrés salino (mutación 1).

Los resultados indican, en cualquier caso, que la frecuencia de plantas con la mutación 2 es menor de lo esperado para una mutación recesiva (ver tabla 3). No es de extrañar que así ocurra, ya que teniendo la gama de anomalías en las plantas homocigóticas para la mutación 2, es lógico que exista algún tipo de subletalidad.

4.6.1.3. Determinación del número de insertos con *nptII* funcional

Para determinar el número de insertos funcionales (tabla 75), se analizó el número de plantas resistentes y sensibles a la kanamicina en una muestra (32 plántulas) de la población segregante TG2. Los resultados indicaron que la línea segrega para 1 inserto con *nptII* funcional.

Tabla 75. Segregación para el carácter resistencia a la kanamicina del mutante *tom1560*.

	Kan ^R	Kan ^S	χ^2 ^a
Segregación observada (E3)	25	8	0,01

^a El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 3 plantas resistentes a kanamicina y 1 planta sensible (P>0,05; $\chi^2_{1\text{ g.l.}} = 3,84$)

4.6.1.4. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto con *nptII* funcional

Para llevar a cabo el análisis de cosegregación entre el inserto funcional y alguna de las dos mutaciones se empleó el método ápice-cotiledón. Se emplearon los explantes de cotiledón de las plántulas de los experimentos 2 y 3. De esta forma, con las plántulas del experimento 2, que se realizó en condiciones de estrés salino y en el que se detectaron cinco plántulas con la mutación 1 y una con la mutación 2, podíamos ver cuántas plántulas mutantes eran o no resistentes a la kanamicina. De forma análoga, con las plántulas del experimento 3, podíamos evaluar el carácter resistencia a la kanamicina en las 6 plántulas con la mutación 2.

Tabla 76. Segregaciones para el fenotipo y el carácter resistencia a la kanamicina en el mutante *tom1560*.

	Kan ^R			Kan ^S		
	WT	Mutante 1	Mutante 2	WT	Mutante 1	Mutante 2
Segregación observada	15	3	3	25	2	4

Como puede verse en la tabla 76, en principio ninguna de las dos mutaciones está asociada al inserto funcional. En efecto, 3 de las 5 plantas que exhibieron la mutación 1 en el experimento 2 fueron sensibles a la kanamicina. Por otro lado, 3 de las 7 plantas que exhibieron la mutación 2 fueron sensibles a la kanamicina. En todo caso, conviene indicar que los datos sugieren la existencia de fenómenos de silenciamiento génico, ya que más de la mitad de las plantas fueron sensibles a la kanamicina (21 plantas resistentes vs 31 plantas sensibles). Así pues, podría ocurrir que alguna de las dos mutaciones fuera insercional y que el *nptII* se encontrara silenciado (e.g. en plantas homocigóticas para el inserto). Por lo que respecta a la mutación que más interesante nos parece (i.e. la que sólo se detecta en condiciones salinas), hemos realizado diferentes experimentos que sugieren que no se trata de una mutación insercional. En este sentido, comprobamos que 2 de las 3 plantas mutantes (Mutante 1) utilizadas para obtener progenies TG3 (ver tabla 74) eran sensibles a la kanamicina. Además de obtener progenies derivadas de la autofecundación, se realizaron cruces con plantas de fenotipo silvestre (Moneymaker). En este sentido, si el silenciamiento se origina cuando el T-DNA se encuentra en homocigosis, las derivadas del cruce con el parental silvestre (que son hemocigóticas para el T-DNA) deberían ser resistentes. Sin embargo, comprobamos que estas progenies también eran sensibles a la kanamicina. Por ello, en el laboratorio del Dr. Lozano (UAL, Almería) se va a analizar mediante PCR la posible existencia de secuencias de un T-DNA truncado o del cuerpo del vector que pudieran ser responsables del fenotipo mutante en algunas plantas sensibles a la kanamicina. En cualquier caso, nosotros ya hemos iniciado el cruzamiento de una planta mutante sensible a la kanamicina con *Solanum pimpinellifolium* (LA1589) para hacer factible la identificación del gen mediante mapeo posicional.

4.6.1.5. Corroboración de la respuesta hipersensible en invernadero

Cultivamos 24 plantas TG2 de la línea *tom1560* para ver los fenotipos mutantes en condiciones de invernadero. A la 7-10 días de la siembra de las semillas, cuando los cotiledones ya se encontraban expandidos y comenzaban a

desarrollarse las primeras hojas verdaderas, se podían distinguir con facilidad las plantas con el fenotipo Mutante 2. Una semana más tarde, cuando la mayor parte de las plantas desarrollaron las 2-3 primeras hojas verdaderas, el fenotipo del Mutante 2 era inconfundible (figuras 26I y 26J). Estas plantas exhibían un notable retraso del crecimiento en comparación con las hermanas de fenotipo silvestre, aunque parecía que empezaban a desarrollar las dos primeras hojas verdaderas. Con todo, días más tarde pudimos comprobar que estas plantas no eran capaces de continuar su desarrollo y terminaban muriendo (figura 26K). En total, 5 de las 24 plantas TG2 manifestaban este fenotipo (tabla 77).

Hasta ese momento (las plantas de fenotipo WT habían desarrollado 2-3 hojas verdaderas) sólo se veían plantas con fenotipo WT y 5 plantas con el fenotipo Mutante 2. Decidimos entonces iniciar el tratamiento salino (solución de fertirrigación suplementada con 100 mM de NaCl) con las 19 plantas de fenotipo WT. Tras 7 días de tratamiento, 3 de las 19 plantas exhibían severos síntomas de clorosis en hojas que parecían estar hiperhidratadas (figura 26L). A los 15 días del inicio del tratamiento salino, las plantas mutantes mostraban síntomas severos de clorosis en las hojas, no habían desarrollado más de 4-5 hojas verdaderas mientras que las de fenotipo WT habían desarrollado 8-9 y habían crecido mucho menos que las de fenotipo silvestre, casi la mitad de altura (figura 26M). Decidimos en ese momento dar por finalizado el experimento.

Tabla 77. Análisis genético del mutante *tom1560* en condiciones de invernadero

	Segregación observada			χ^2 ^a
	Wild-type	Mutante 1	Mutante 2	
<i>In vivo</i>	16	3	5	1,13

^a El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 9 plantas WT, 3 plantas con la mutación 1 y 4 plantas con la mutación 2 ($P > 0,05$; $\chi^2_{1\ 2\ g.l.} = 5,99$)

En conjunto, los resultados indicaban una situación de epistasia simple recesiva (tabla 77). Sobre la base de los datos obtenidos en este experimento, el alelo Mutante 2 sería el epistático mientras que el alelo Mutante 1 sería el hipostático.

Actualmente, disponemos de una línea TG3 que sólo contiene la mutación 1 (progenie 5, tabla 74) con la que se está llevando a cabo el cruzamiento con *Solanum pimpinellifolium* (LA1589) para el mapeo posicional del gen mutado. Asimismo, una vez se obtengan suficientes semillas de esta progenie se realizará

una caracterización fenotípica más exhaustiva del fenotipo de hipersensibilidad a la sal en el mutante.

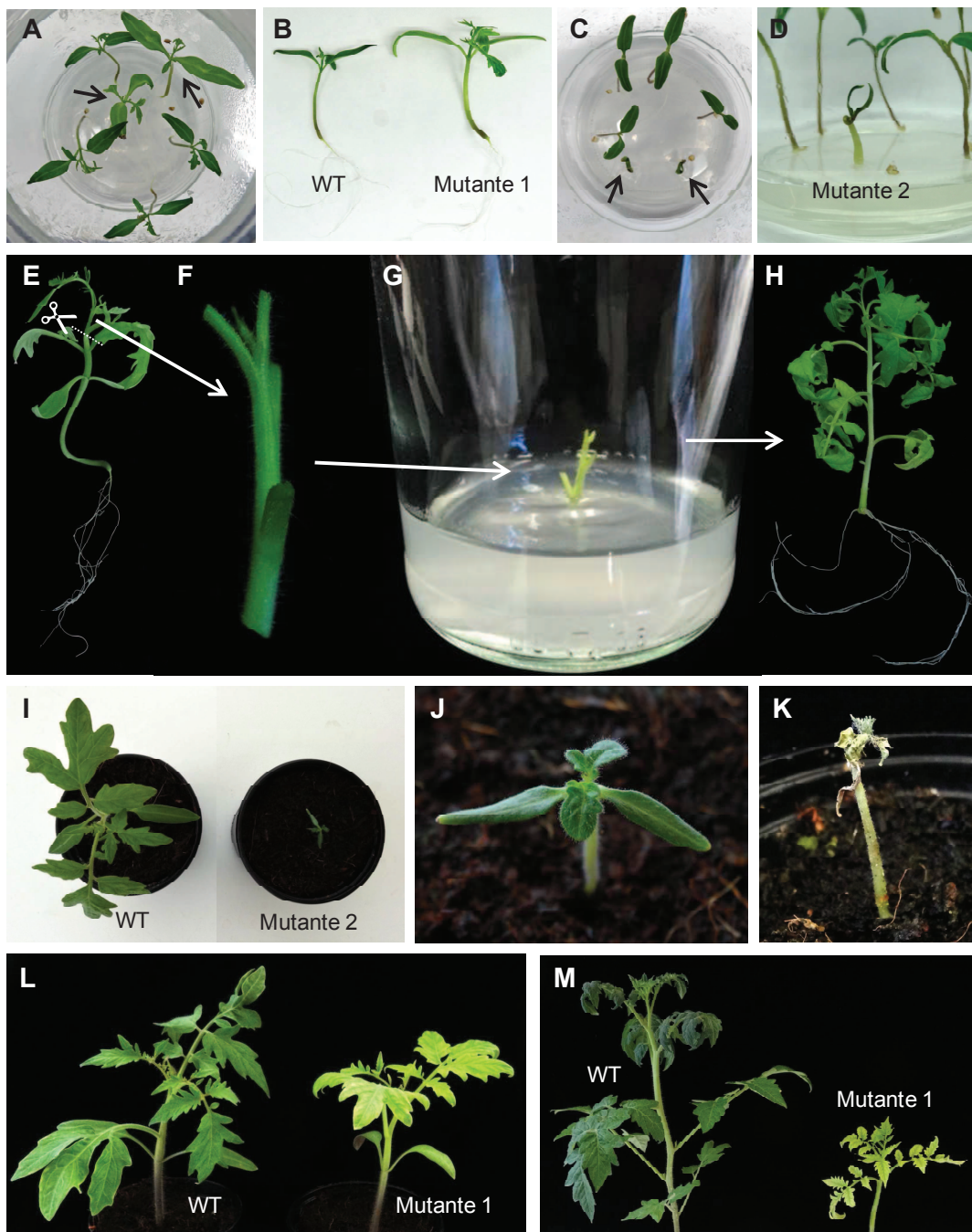


Figura 26. *tom1560*. A) Plántulas WT y de fenotipo Mutante 1 *in vitro* en el medio de cultivo suplementado con NaCl. B) Detalle de una plántula WT respecto a otra con el fenotipo Mutante 1. C) Plántulas WT y de fenotipo Mutante 2 *in vitro* en el medio de cultivo sin NaCl. D) Detalle del crecimiento de una plántula con fenotipo Mutante 2. E) Plántula Mutante 1 detectada *in vitro* en medio con sal. F) Detalle del ápice de la plántula. G) Cultivo del ápice en medio de clonación. H) Crecimiento de una planta axénica sin síntomas de hipersensibilidad (i.e. hiperhidratación y clorosis). I) Plántulas WT y de fenotipo Mutante 2 *in vivo* a los 15-20 días de la germinación. J) Detalle de la plántula Mutante 2 a los 15-20 días de la germinación. K) Detalle del agostamiento de la plántula Mutante 2 a los 30 días de la germinación. L) Plántula WT y de fenotipo Mutante 1 tras 7 días de tratamiento salino (100 mM NaCl). M) Plántula WT y de fenotipo Mutante 1 tras 15 días de tratamiento salino (100 mM NaCl).

4.6.2. *tom1303*

Resumen

tom1303 es un mutante recesivo que manifiesta síntomas severos de clorosis que culminan con el colapso del ápice meristemático en condiciones de estrés salino (figuras 27A y 27B). Sin embargo, en ausencia de estrés no manifiesta alteraciones, lo que sugiere que el gen alterado sólo es requerido en condiciones de estrés (figura 27C). Las evaluaciones realizadas hasta la fecha indican que el fenotipo mutante se visualiza relativamente tarde en condiciones salinas. *In vitro*, el fenotipo mutante se detecta con facilidad pero no antes de los 20-25 días de cultivo en medio suplementado con sal (figura 27D), mientras que *in vivo* la clorosis se empieza a vislumbrar a los 26-30 días de tratamiento salino (figura 27H). Nuestra hipótesis es que en condiciones salinas, la parte aérea de las plantas mutantes se va intoxicando progresivamente por la acumulación de iones, lo que concluye finalmente con el colapso de las plantas. Al igual que ocurre en otros mutantes específicos de estrés, a partir de las plántulas mutantes que *in vitro* muestran síntomas de hipersensibilidad a la sal, se puede recuperar el fenotipo silvestre transfiriendo los ápices a medio de clonación sin sal (figuras 27D-27G). Los análisis realizados *in vitro* han permitido concluir que la línea segrega para 1 inserto funcional, aunque el inserto no cosegrega con la mutación.

4.6.2.1. Análisis genético del mutante en cultivo *in vitro*

El mutante se detectó en medio básico de germinación suplementado con NaCl (100 mM). En el primer experimento (E1), en el que se cultivaron 26 plántulas, pudimos observar que 9 plantas exhibían una extrema clorosis y algunas habían colapsado (tabla 78, figuras 27A y 27B). Para corroborar el resultado se realizó un segundo experimento (E2) en el mismo medio de cultivo (i.e. medio de germinación suplementado con NaCl) con 23 plántulas, realizando semanalmente una evaluación visual del fenotipo de las plantas. A lo largo de las 2-3 primeras semanas no fuimos capaces de ver un resultado claro. Sin embargo, a los 25-30 días empezamos a apreciar síntomas claros de clorosis en algunas plántulas que se iban intensificando con el paso de los días. Al final del experimento, 5 de las 23 plántulas exhibían una extrema clorosis o habían colapsado (tabla 78 – E2). Realizamos un tercer experimento (E3) para estar seguros y, de nuevo, a los 25-30 días volvimos a visualizar el mismo fenotipo mutante (tabla 78 – E3). Como se puede ver en la tabla 78, los datos de cada

experimento y los datos acumulados indicaban que se trataba de un mutante recesivo.

Tabla 78. Análisis genético del mutante *tom1303* en medio de germinación suplementado con NaCl (100 mM).

	Wild-type	Mutante	χ^2 ^a
<i>In vitro</i> – 1 ^{er} experimento (E1)	17	9	1,28
<i>In vitro</i> – 2 ^o experimento (E2)	18	5	0,13
<i>In vitro</i> – 3 ^{er} experimento (E3)	15	9	2,00
<i>In vitro</i> – Datos acumulados (E1+E2+E3) ^b	50	23	1,65

^a El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 3 plantas WT y 1 planta mutante ($P > 0,05$; $\chi^2_{t\ 1\ g.l.} = 3,84$)

^b El análisis de la χ^2 de homogeneidad ($\chi^2_H = 0,33$) indica que las muestras son homogéneas.

En paralelo, se realizaron otros 2 experimentos (E4 y E5) en medio de germinación sin NaCl. En ambos experimentos pudimos apreciar que el fenotipo de todas las plantas era silvestre (figura 27C), lo que parecía indicar que habíamos identificado un mutante específico de estrés (tabla 79).

Tabla 79. Análisis genético del mutante *tom1303* en medio de germinación sin el suplemento de NaCl.

	Wild-type	Mutante
<i>In vitro</i> – 1 ^{er} experimento (E4)	24	0
<i>In vitro</i> – 2 ^o experimento (E5)	24	0
<i>In vitro</i> – Datos acumulados (E4+E5) ^b	48	0

4.6.2.2. Determinación del número de insertos con *nptII* funcional

Para determinar el número de insertos funcionales se sembraron 39 semillas de la población TG2 segregante en medio selectivo (medio de germinación suplementado con 100 mg/l de kanamicina).

Tabla 80. Segregación para el carácter resistencia a la kanamicina del mutante *tom1303*.

	Kan ^R	Kan ^S	χ^2 ^a
Segregación observada (E3)	32	7	1,03

^a El valor calculado representa el ajuste de los datos a un ratio esperado de 3 plantas resistentes a kanamicina y 1 planta sensible ($P > 0,05$; $\chi^2_{t\ 1\ g.l.} = 3,84$)

Los resultados indicaron que la línea segrega para 1 inserto con *nptII* funcional (tabla 80).

4.6.2.3. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto con *nptII* funcional

Para ver si había o no cosegregación entre el inserto funcional y la mutación se empleó el método ápice-cotiledón. Como se ha comentado antes, el método consiste en el cultivo de explantes de cotiledón de plántulas de 7-8 días en medio organogénico selectivo (100 mg/l de kanamicina) y la transferencia de los brotes a medio de clonación. De esta forma, si el mutante se visualiza *in vitro*, cuando crezcan los brotes en el medio de clonación se podrán identificar las plantas mutantes, y, por otro lado, la morfogénesis de los cotiledones en medio selectivo permitirá discernir si las plantas son resistentes o sensibles a la kanamicina.

En este mutante específico de estrés teníamos que modificar el protocolo, ya que en ausencia de estrés el fenotipo no se detecta. Por otro lado, no podíamos cultivar los explantes de cotiledón después de detectar el fenotipo mutante puesto que éste se visualiza pasados los 25-30 días de cultivo en medio salino, y transcurrido ese periodo los cotiledones se han desprendido de la plántula. Por tanto, lo que hicimos fue transferir los brotes a medio de clonación suplementado con 75 mM de NaCl. A los 35-40 días pudimos apreciar que en torno a la cuarta parte de plantas axénicas que habían crecido en el medio de clonación suplementado con sal exhibían síntomas evidentes de clorosis (figura 27D).

Tabla 81. Segregaciones para el fenotipo y el carácter resistencia a la kanamicina en el mutante *tom1303*.

	Kan ^R		Kan ^S	
	WT	Mutante	WT	Mutante
Segregación observada	28	4	5	2

Los resultados del experimento indicaron la ausencia de cosegregación entre el inserto funcional y la mutación (tabla 81). En consecuencia, para llevar a cabo la identificación del gen mediante mapeo posicional, ya se ha iniciado el cruzamiento de una planta mutante sensible a la kanamicina con *Solanum pimpinellifolium* (LA1589).

4.6.2.4. Recuperación del fenotipo silvestre en plantas con fenotipo mutante

En aras de realizar el cruzamiento de una planta mutante sensible a la kanamicina con *S. pimpinellifolium*, realizamos ensayos para recuperar el fenotipo silvestre de los mutantes cultivando el ápice en medio de clonación. Vimos que era posible restaurar el fenotipo silvestre del mutante siempre y cuando el ápice se transfiriera antes de que la planta se encontrase muy afectada por el estrés

salino, es decir, cuando se empezaban a visualizar los síntomas de clorosis (figuras 27D-27G). Sin embargo, en las plantas seriamente afectadas, es decir, muy cloróticas o con inicios de colapso (figuras 27A y 27B), el brote no enraizaba y experimentaba un proceso de senescencia.

4.6.2.5. Corroboración de la respuesta hipersensible en invernadero

Cultivamos 24 plantas TG2 de la línea *tom1303* y, cuando la mayor parte de las plantas habían desarrollado las 2-3 primeras hojas verdaderas, se inició el tratamiento salino (solución de fertirrigación suplementada con 100 mM de NaCl). Los primeros síntomas de sensibilidad a la salinidad los empezamos a visualizar a los 26 días de haber iniciado el tratamiento (figura 27H). A los 35 días del inicio del tratamiento salino, las plantas mutantes mostraban síntomas severos síntomas de clorosis en las hojas y algunas exhibía los primeros síntomas de senescencia (figura 27I). Decidimos en ese momento dar por finalizado el experimento.

Tabla 82. Análisis genético del mutante *tom1303* en condiciones de invernadero.

	Wild-type	Mutante	χ^2 ^a
<i>In vivo</i>	20	4	0,89

^a Valor calculado para una línea en la que el resultado esperado es que todas las plantas exhiban el mismo fenotipo ($P > 0,05$; $\chi^2_{1 \text{ g.l.}} = 3,84$)

Acorde con lo que se había observado *in vitro*, los resultados de este experimento indicaron que la mutación segregaba de manera recesiva (tabla 82). Además del cruce con *Solanum pimpinellifolium* (accesión LA1589) para el mapeo del gen mutado, nuestro propósito es obtener suficientes semillas de las plantas mutantes para llevar a cabo una caracterización fenotípica más exhaustiva de la sensibilidad a la salinidad. Asimismo, queremos evaluar la respuesta del mutante frente a otros tipos de estrés (i.e. estrés hídrico).

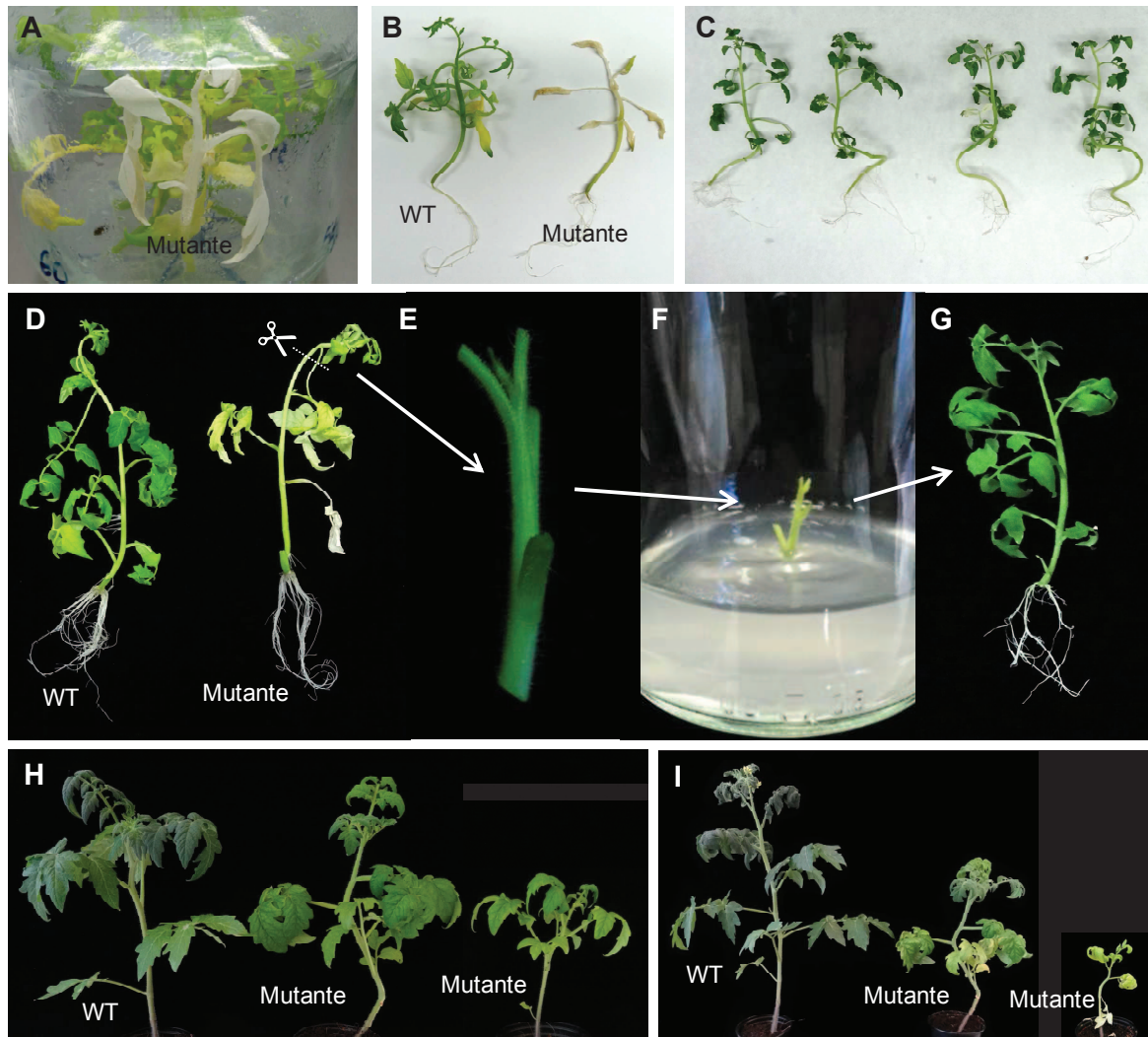


Figura 27. *tom1303*. A) Plántula mutante colapsada por el efecto de la sal (NaCl) en el recipiente de cultivo *in vitro*. B) Plántulas WT y mutante en medio con NaCl. C) Plántulas de la línea segregante (TG2) después de 30 días en el medio de cultivo sin NaCl (se puede apreciar que en medio sin NaCl todas las plantas tienen fenotipo WT). D) Plantas axénicas WT (izquierda) y Mutante (derecha) después de 30 días en el medio de clonación suplementado con 75 mM de NaCl. E) Detalle del ápice de la plántula mutante. F) Cultivo del ápice de la planta mutante en medio de clonación. G) Crecimiento de una planta axénica sin síntomas de hipersensibilidad (i.e. clorosis). H) Plantas WT y mutante tras 26 días de tratamiento salino (100 mM NaCl). I) Plantas WT y mutante tras 35 días de tratamiento salino (100 mM NaCl).

4.6.3. *pms-916*

Resumen

El mutante recesivo *pms-916* (*protecting meristems against salinity-916*) exhibe una extrema sensibilidad al estrés salino en el medio básico de germinación suplementado con 100 mM de NaCl. Las plántulas del mutante exhiben un engrosamiento del hipocotilo y la inhibición del desarrollo de la parte aérea. En concreto, las primeras hojas verdaderas no se expanden, muestran síntomas severos de marchitamiento y el ápice meristemático sufre un rápido colapso que conduce a la muerte de la plántula. En condiciones control *in vitro* no se puede distinguir entre las plantas mutantes y las WT, lo que indica que el fenotipo sólo aparece en condiciones de estrés. De forma similar, cuando las plantas mutantes se cultivan en el invernadero su fenotipo depende de si realiza o no un tratamiento de estrés. En efecto, el fenotipo de las plantas sometidas a sal es el mismo que el que se observa *in vitro*, mientras que en condiciones control *in vivo* no se detectan alteraciones en el fenotipo de las plantas mutantes. En definitiva, el fenotipo mutante sólo aparece cuando se realiza un tratamiento salino, tanto *in vitro* como *in vivo*. Los análisis realizados *in vitro* han indicado que la línea segrega para dos insertos funcionales. La obtención de progenies TG3 y los posteriores análisis realizados tanto *in vitro* como *in vivo* han permitido identificar una línea que sólo segrega para el inserto promotor de la mutación. El análisis de Anchor-PCR que se ha llevado a cabo en el laboratorio del Dr. Lozano (Universidad de Almería) ha permitido determinar que el gen etiquetado por el T-DNA es *PMS*. El silenciamiento de *PMS* en plantas transgénicas de tomate ha permitido confirmar que el fenotipo de hipersensibilidad a la salinidad es consecuencia de la ausencia de función de este gen.

4.6.3.1. Análisis genético del mutante en cultivo *in vitro*

El mutante se detectó en medio básico de germinación suplementado con NaCl (100 mM). En el primer experimento (E1) se cultivaron 26 plántulas. Pudimos observar que 6 plantas exhibían un extraño engrosamiento del hipocotilo, necrosis en las hojas e inhibición del crecimiento de la parte aérea (tabla 83, figura 28A). Para corroborar el resultado se realizaron dos experimentos más (E2 y E3) en el mismo medio de cultivo (i.e. medio de germinación suplementado con NaCl) en los que se observó el mismo resultado (tabla 83). Los

datos de cada experimento y los acumulados indicaban que se trataba de un mutante recesivo.

Tabla 83. Análisis genético del mutante *pms-916* en medio de germinación suplementado con NaCl (100 mM).

	Wild-type	Mutante	χ^2 ^a
<i>In vitro</i> – 1 ^{er} experimento (E1)	17	9	1,28
<i>In vitro</i> – 2 ^o experimento (E2)	28	7	0,47
<i>In vitro</i> – 3 ^{er} experimento (E3)	26	7	0,25
<i>In vitro</i> – Datos acumulados (E1+E2+E3) ^b	74	20	0,70

^a El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 3 plantas WT y 1 planta mutante ($P > 0,05$; $\chi^2_{1 \text{ g.l.}} = 3,84$)

^b El análisis de la χ^2 de homogeneidad ($\chi^2_{\text{H}} = 0,08$) indica que las muestras son homogéneas.

En paralelo, se realizaron 2 experimentos (E4 y E5) en medio de germinación pero sin el suplemento de la sal en los que pudimos apreciar que el fenotipo de todas las plantas era silvestre (figura 28C, tabla 84). Estos resultados indicaban que *pms-916* era un mutante específico de estrés.

Tabla 84. Análisis genético del mutante *pms-916* en medio de germinación sin el suplemento de NaCl.

	Wild-type	Mutante
<i>In vitro</i> – 4 ^o experimento (E4)	15	0
<i>In vitro</i> – 5 ^o experimento (E5)	20	0
<i>In vitro</i> – Datos acumulados (E4+E5) ^b	35	0

4.6.3.2. Corroboración de la respuesta hipersensible en invernadero

Con el fin de determinar si el fenotipo observado en condiciones salinas *in vitro* se detectaba también *in vivo*, se realizaron dos experimentos (E6 y E7). En ambos casos, se sembraron semillas pregerminadas de la progenie TG2 segregante en macetas que contenían fibra de coco y las plántulas comenzaron a irrigarse con solución salina (solución nutritiva + 100 mM de NaCl) cuando habían desarrollado las dos primeras hojas verdaderas. Hasta ese momento no se podía distinguir entre el fenotipo WT y el mutante. A los 12 días de tratamiento salino se empezaba a distinguir al mutante por el inicio de clorosis en el borde de las hojas (figura 28D). A los 24 días, la clorosis en los bordes de los folíolos era más intensa, el tallo tenía mayor grosor y el ápice meristemático parecía haber inhibido su crecimiento (figura 28E). A los 35 días de cultivo en condiciones salinas, las

plantas mutantes comenzaron a exhibir síntomas de senescencia foliar y necrosis apical.

Acorde con los resultados observados *in vitro*, la segregación observada en ambos experimentos (tabla 85, E6 y E7) indicó que la mutación era recesiva y el test χ^2 de homogeneidad indicó que las muestras eran homogéneas. Por tanto, se puede concluir que el mutante de tomate *pms-916* exhibe el mismo fenotipo de hipersensibilidad a la salinidad (NaCl) tanto *in vitro* como *in vivo*.

Tabla 85. Análisis genético del mutante *pms-916* en condiciones de invernadero (solución nutritiva + 100 mM NaCl).

	Wild-type	Mutante	χ^2 ^a
<i>In vivo</i> – 6º experimento (E6)	20	4	0,89
<i>In vivo</i> – 7º experimento (E7)	19	5	0,22
<i>In vivo</i> – Datos acumulados (E6+E7) ^b	39	9	1,00

^a El valor calculado representa el ajuste de los datos a un ratio esperado de 3 plantas WT y 1 planta mutante ($P > 0,05$; $\chi^2_{t 1 g.l.} = 3,84$)

^b El análisis de la χ^2 de homogeneidad ($\chi^2_H = 0,11$) indica que las muestras son homogéneas.

4.6.3.3. Determinación del número de insertos con *nptII* funcional

Para determinar el número de insertos funcionales se sembraron 80 semillas de la población segregante (TG2) en medio selectivo (medio de germinación suplementado con 100 mg/l de kanamicina). Los resultados indicaron que la línea segregaba para dos insertos funcionales

Tabla 86. Segregación para el carácter resistencia a la kanamicina del mutante *pms-916*.

	Kan ^R	Kan ^S	χ^2 ^a
Segregación observada	74	6	0,21

^a El valor calculado representa el ajuste de los datos a una segregación esperada de 15 plantas resistentes a kanamicina y 1 planta sensible ($P > 0,05$; $\chi^2_{t 1 g.l.} = 3,84$)

Nota: Los resultados observados no son acordes con los esperados para una segregación de 3 plantas resistentes y 1 planta sensible ($\chi^2 = 13,04 > \chi^2_{t 1 g.l.} = 3,84$) ni tampoco para una segregación de 63 plantas resistentes y una sensible ($\chi^2 = 18,34 > \chi^2_{t 1 g.l.} = 3,84$). Es decir, en términos estadísticos se puede excluir la presencia de un inserto o de tres insertos en la línea *pms-916*.

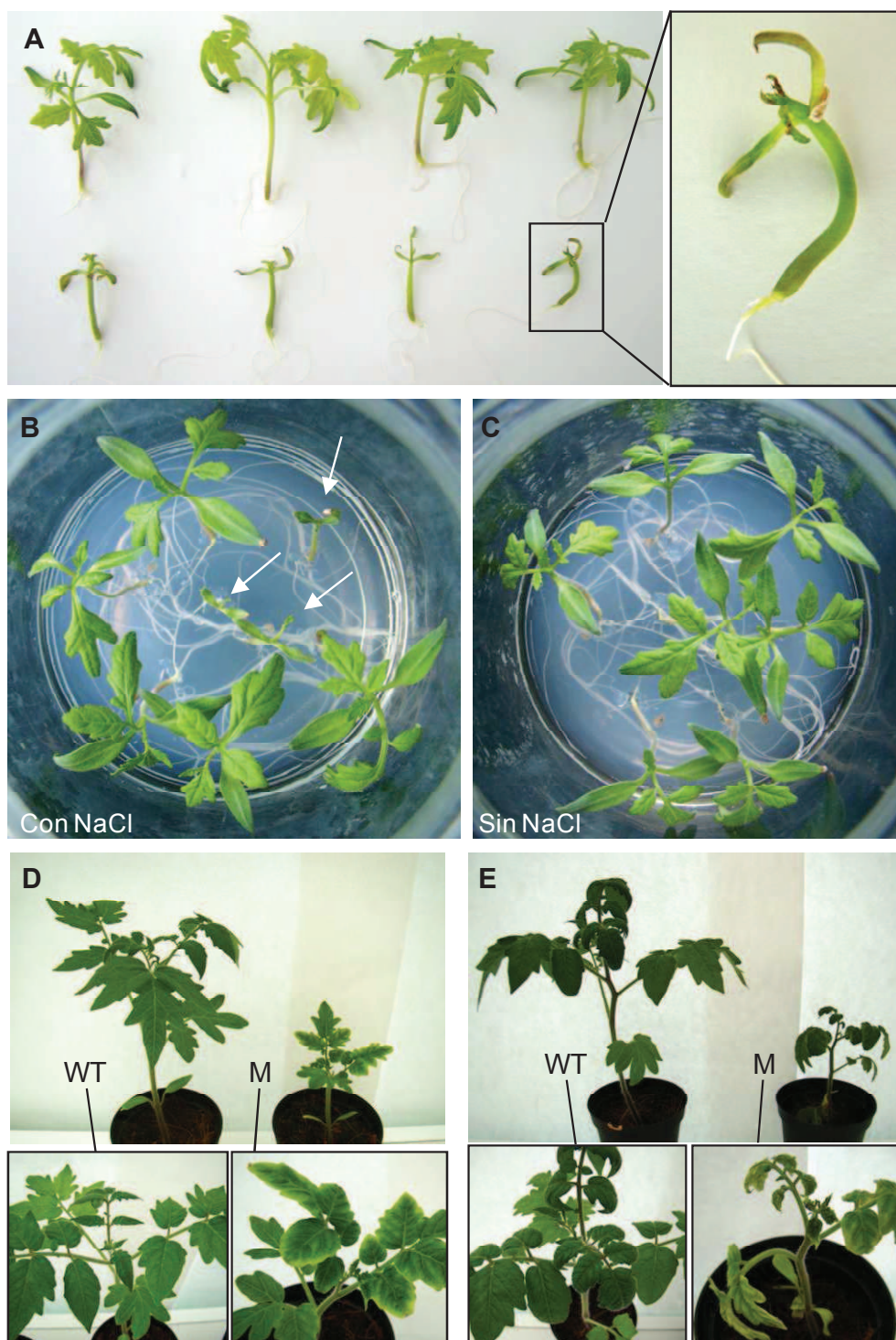


Figura 28. Hipersensibilidad al estrés salino del mutante *pms-916*. A) Fenotipo de las plantas WT (arriba) y mutantes (abajo) crecidas *in vitro* con 100 mM de NaCl. A la derecha, detalle de una planta mutante. B) Segregación para el fenotipo en medio suplementado con 100 mM de NaCl. C) Ausencia de segregación en ausencia de estrés salino (medio sin NaCl). D y E) Fenotipo del WT y del mutante en condiciones de invernadero a los 12 días (D) y 24 días (E) del inicio del tratamiento salino (solución nutritiva suplementada con 100 mM de NaCl). Debajo de D y E, detalle de las hojas de las plantas WT y mutante.

4.6.3.4. Segregación del inserto responsable del fenotipo mutante

Para segregar el inserto causante de la mutación se obtuvieron 12 progenies TG3 de plantas de fenotipo WT. Nosotros queríamos identificar una línea segregante para la mutación (i.e. 3 WT : 1 M) con un sólo inserto de T-DNA (i.e. 3 Kan^R : 1 kan^S), a fin de poder asociar la presencia de dicho inserto al fenotipo mutante. Por esta razón, en este experimento no se obtuvieron progenies TG3 a partir de las plantas mutantes.

Para identificar las plantas TG2 WT y mutantes se realizó un ensayo *in vitro* en condiciones salinas. En el momento en el que se detectó el fenotipo mutante (10-15 días después de la siembra de las semillas), se aclimataron 12 plantas TG2 de fenotipo WT. Una vez obtenidas las progenies TG3, se realizaron tres experimentos en paralelo con cada progenie (Tabla 87). Por un lado, se sembraron semillas en medio suplementado con kanamicina y, por otro, se cultivaron plántulas en condiciones salinas, tanto *in vitro* como *in vivo*, para llevar a cabo el análisis genético (i.e. marcador y fenotipo) con cada una de las progenies.

Como puede verse en la tabla 87, las progenies TG3-6 y TG3-8 no contenían insertos con un *nptII* funcional (i.e. 100% Kan^S) y en condiciones salinas exhibían fenotipo WT. Las progenies TG3-1 y TG3-3 segregaron para el inserto no responsable de la mutación, ya que en condiciones salinas exhibieron fenotipo WT. Las progenies TG3-2, TG3-4 y TG3-9 eran análogas a la TG2 ya que segregaron 15 Kan^R : 1 Kan^S para el gen marcador y 3 WT : 1 M para el fenotipo mutante en condiciones salinas. Las progenies TG3-5, TG3-11 y TG3-12 eran homocigóticas para el inserto no causante de la mutación (100% Kan^R) y hemicigóticas para el inserto que posiblemente fuera responsable de la mutación, ya que segregaron en condiciones salinas (3 WT : 1 M). Finalmente, las progenies TG3-7 y TG3-10 segregaron 3 : 1 tanto para el gen marcador como para el fenotipo mutante. Los resultados sugieren que este inserto podría ser el que está asociado a la mutación.

Tabla 87. Análisis de segregación del marcador (Resistencia o sensibilidad a la kanamicina) y del fenotipo (WT / M) en progenies TG3.

Progenie TG3	<i>In vitro</i>								<i>In vivo</i>			
	Medio de cultivo con kanamicina				Medio de cultivo con NaCl				Riego suplementado con sal			
	Kan ^R	Kan ^S	Segregación	χ^2 ^a	WT	Mutante	Segregación	χ^2 ^a	WT	Mutante	Segregación	χ^2 ^a
TG3-1	23	7	3:1	0,04	24	0	-		24	0	-	
TG3-2	63	7	15:1	1,68	23	7	3:1	0,04	20	4	3:1	0,89
TG3-3	22	8	3:1	0,04	24	0	-		24	0	-	
TG3-4	28	2	15:1	0,01	20	10	3:1	1,10	20	4	3:1	0,89
TG3-5	30	0	-		23	9	3:1	0,17	20	4	3:1	0,89
TG3-6	0	30	-		24	0	-		24	0	-	
TG3-7	61	29	3:1	2,50	21	7	3:1	0	22	2	3:1	3,56
TG3-8	0	30	-		30	0	-		24	0	-	
TG3-9	28	2	15:1	0,01	25	7	3:1	0,17	16	8	3:1	0,89
TG3-10	24	6	3:1	0,40	14	7	3:1	0,78	19	5	3:1	0,22
TG3-11	30	0	-		23	7	3:1	0,04	18	6	3:1	0
TG3-12	30	0	-		21	9	3:1	0,40	10	2	3:1	0,44

^a El análisis χ^2 de cada segregación indicó la ausencia de diferencias significativas para el ratio esperado (P = 0,05)

4.6.3.5. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto con *nptII* funcional

Para llevar a cabo el análisis de cosegregación fenotipo - *npt* se utilizó la progenie TG3 *pms-916-10* que segregó 3 : 1 tanto para el gen marcador como para el fenotipo mutante (ver apartado anterior). Previamente, intentamos recuperar las plantas de fenotipo mutante (que habían sido identificadas en condiciones salinas *in vitro*) mediante subcultivo a medio de clonación sin NaCl. Comprobamos que esto era posible siempre y cuando se realizara la transferencia del ápice antes del colapso del meristemo apical (figura 29A). Así pues, transferimos los ápices de todas las plantas (WT y M) a medio de clonación sin NaCl (figura 29B). A continuación, una vez recuperadas las plantas, los ápices se cultivaron en medio de suplementado con 100 mg/l de kanamicina. Comprobamos que todas las plantas de fenotipo mutante eran resistentes a la kanamicina, así como 2/3 de las plantas de fenotipo WT (figura 29C). Las plantas resistentes a la kanamicina se aclimataron y cultivaron en el invernadero para obtener, a partir de cada una de ellas, las correspondientes progenies TG4 (figura 29D). Con las progenies TG4 se realizaron ensayos de segregación en medios con kanamicina y NaCl. Se pudo determinar que las progenies de plantas WT resistentes a la kanamicina segregaban tanto para el inserto funcional (i.e. 3 Kan^R : 1 kan^S) como para la mutación (i.e. 3 WT : 1 M), mientras que las progenies de plantas mutantes siempre eran resistentes a la kanamicina y de fenotipo mutante en medio salino (figura 29E). De esta forma, se pudo corroborar que el fenotipo mutante se debe a la presencia en homocigosis de un inserto que porta un *nptII* funcional y, además, se pudieron obtener líneas homocigóticas para el inserto responsable del fenotipo mutante.

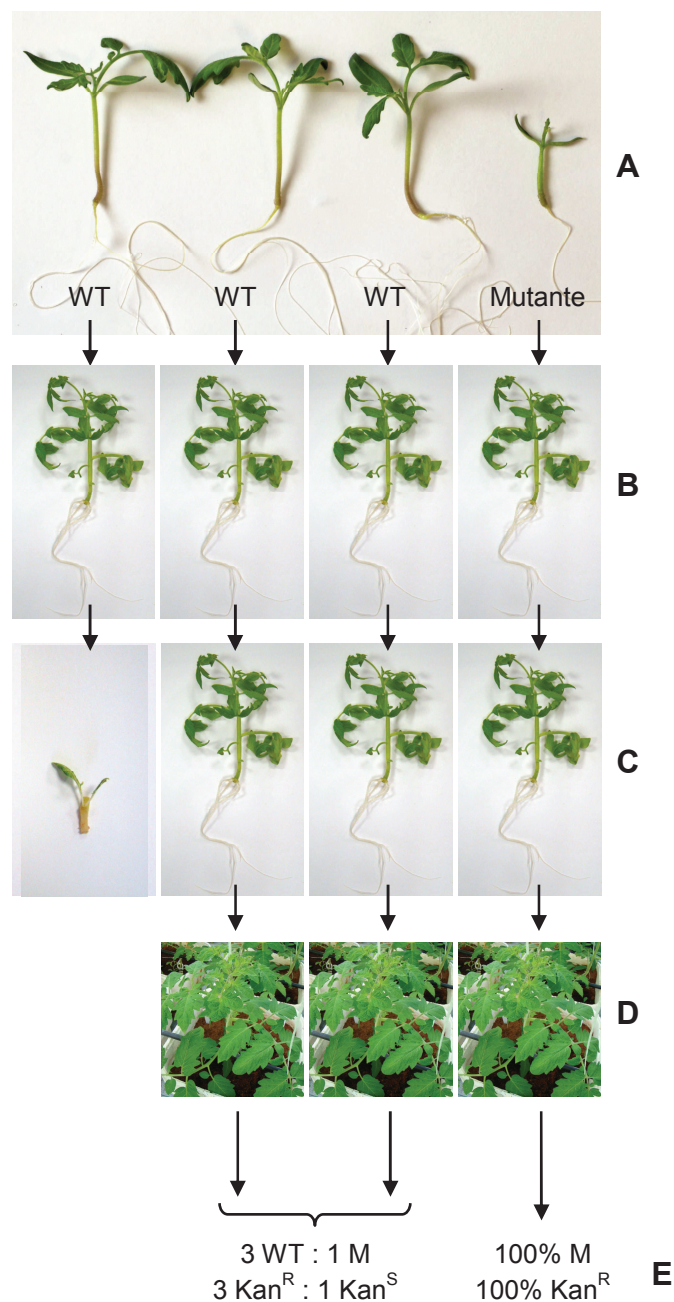


Figura 29. Análisis de cosegregación entre el inserto funcional y la mutación del mutante *pms-916*.

A) Identificación de las plantas mutantes y WT en el medio de germinación suplementado con NaCl (100 mM). B) Recuperación del crecimiento normal en medio de clonación sin sal. C) Transferencia del ápice a medio de clonación suplementado con kanamicina (100 mg/l). A la izda., la planta acigótica para el inserto funcional no puede desarrollarse en este medio selectivo. D) Aclimatación y transferencia al invernadero de las plantas resistentes a la kanamicina para la obtención de progenies. E) Análisis genético de las progenies sobre la base de los resultados en medios suplementados con NaCl y kanamicina.

4.6.3.6. Caracterización fenotípica de la respuesta hipersensible en *pms-916*

La caracterización de la respuesta hipersensible se realizó, tanto *in vitro* como *in vivo*, con plantas acigóticas (WT) y homocigóticas (mutantes) para el inserto responsable del fenotipo de hipersensibilidad en condiciones de estrés salino.

In vitro se comparó el desarrollo del WT respecto al mutante en ausencia o presencia de NaCl en el medio de cultivo. Evaluamos el desarrollo foliar y radicular de las plántulas después de 20 días de cultivo. Bajo condiciones normales de cultivo (i.e. ausencia de NaCl) no se observaron alteraciones visibles entre las plantas mutantes y las plantas WT. Sin embargo, en medio suplementado con 100 mM de NaCl, las plántulas mutantes exhibían colapso del ápice meristemático y engrosamiento del hipocotilo, acorde con lo observado en anteriores experimentos (figuras 30B-30C). Además, pudimos apreciar que las plantas mutantes exhibían menor desarrollo radicular. En concreto, y a pesar de que la longitud de la raíz principal era similar en el mutante y en el WT, las plantas mutantes tenían claramente afectado el desarrollo de raíces laterales (figura 30D).

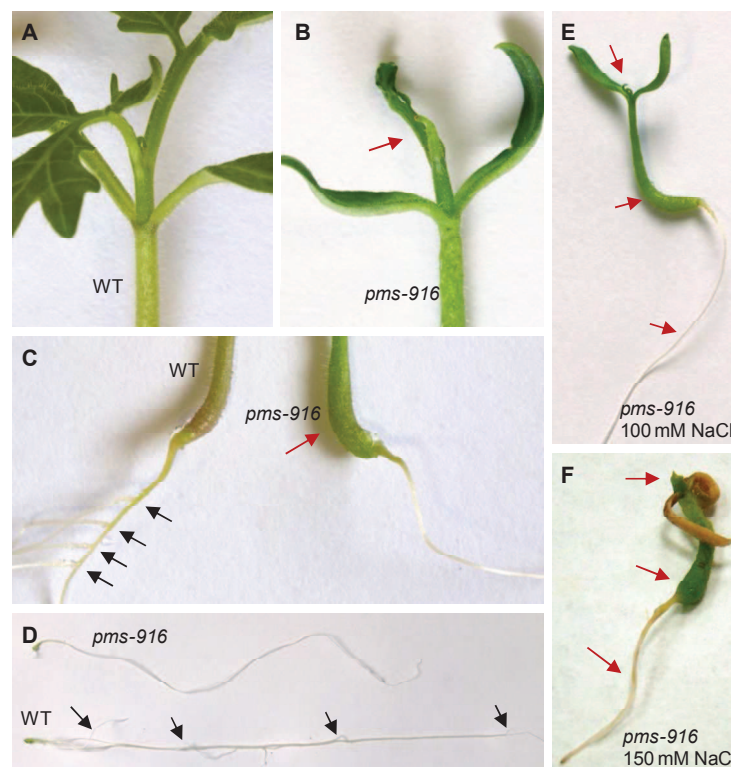


Figura 30. Respuesta hipersensible al estrés salino del mutante *pms-916* *in vitro*. A, B) Efecto del estrés salino sobre el desarrollo de los brotes del WT (A) y del mutante (B) tras 20 días de cultivo en medio de germinación suplementado con 100 mM de NaCl. C, D) Efecto del estrés salino sobre el crecimiento del hipocotilo y el desarrollo radicular del WT y del mutante. E, F) Efecto de la concentración salina (100 mM en E y 150 mM en F) sobre el fenotipo mutante.

En un segundo experimento realizado *in vitro* a mayor concentración salina (i.e. 150 mM de NaCl) se observó la misma respuesta aunque con mayor severidad (figura 30F). En conclusión, el NaCl inhibe el desarrollo de las plantas mutantes y el efecto es más dramático conforme aumenta la concentración salina. Respecto a las plantas WT, la presencia de NaCl en el medio de cultivo ralentizó su crecimiento, aunque no inhibió la elongación del ápice, el desarrollo de hojas verdaderas y la formación de raíces laterales (figuras 30A, 30C y 30D).

Para llevar a cabo la caracterización *in vivo*, se sembraron semillas del WT y del mutante en macetas que contenían fibra de coco. Las plantas empezaron a irrigarse con solución salina (100 mM) cuando habían desarrollado 2-3 hojas verdaderas. Al igual que en el ensayo *in vitro*, se comparó el desarrollo del WT respecto al mutante en ausencia o presencia de NaCl en la solución nutritiva. Se evaluó el desarrollo foliar de plantas mutantes y WT tras 12, 24, 36 y 60 días de tratamiento salino, así como el desarrollo radicular al final del experimento. En ausencia de NaCl, el crecimiento del WT y del mutante fue muy similar después de 12, 24, 36 y 60 días de cultivo, no observándose alteraciones visibles en las plantas mutantes. Sin embargo, a los 12 días de tratamiento salino los bordes de los folíolos de las plantas mutantes (principalmente en las hojas más jóvenes) comenzaron a exhibir una intensa clorosis. Asimismo, se observaba un cierto engrosamiento del tallo y alteraciones en el desarrollo del ápice (figura 31B). A los 24 días de tratamiento salino se podía observar un aumento de la clorosis de los folíolos e inicio de necrosis en sus bordes (figura 31D). Como se había visto a los 12 días de tratamiento, las hojas más afectadas eran principalmente las más jóvenes, es decir, las más cercanas al ápice. Asimismo, era evidente la inhibición de la elongación del tallo. Tras 36 días de tratamiento salino la necrosis de la superficie de los folíolos era más pronunciada (de nuevo, en las hojas más jóvenes) y se veía claramente el engrosamiento del tallo (figura 31F). Tras 60 días de tratamiento las hojas de las plantas mutantes que estaban completamente secas se habían desprendido de la planta y el ápice meristemático había necrosado (figura 31H). Para observar el desarrollo radicular, extrajimos las plantas de las macetas y lavamos el cepellón con agua. Al igual que habíamos observado *in vitro*, las plantas mutantes exhibían menor desarrollo de raíces laterales que las plantas WT (figura 31I).

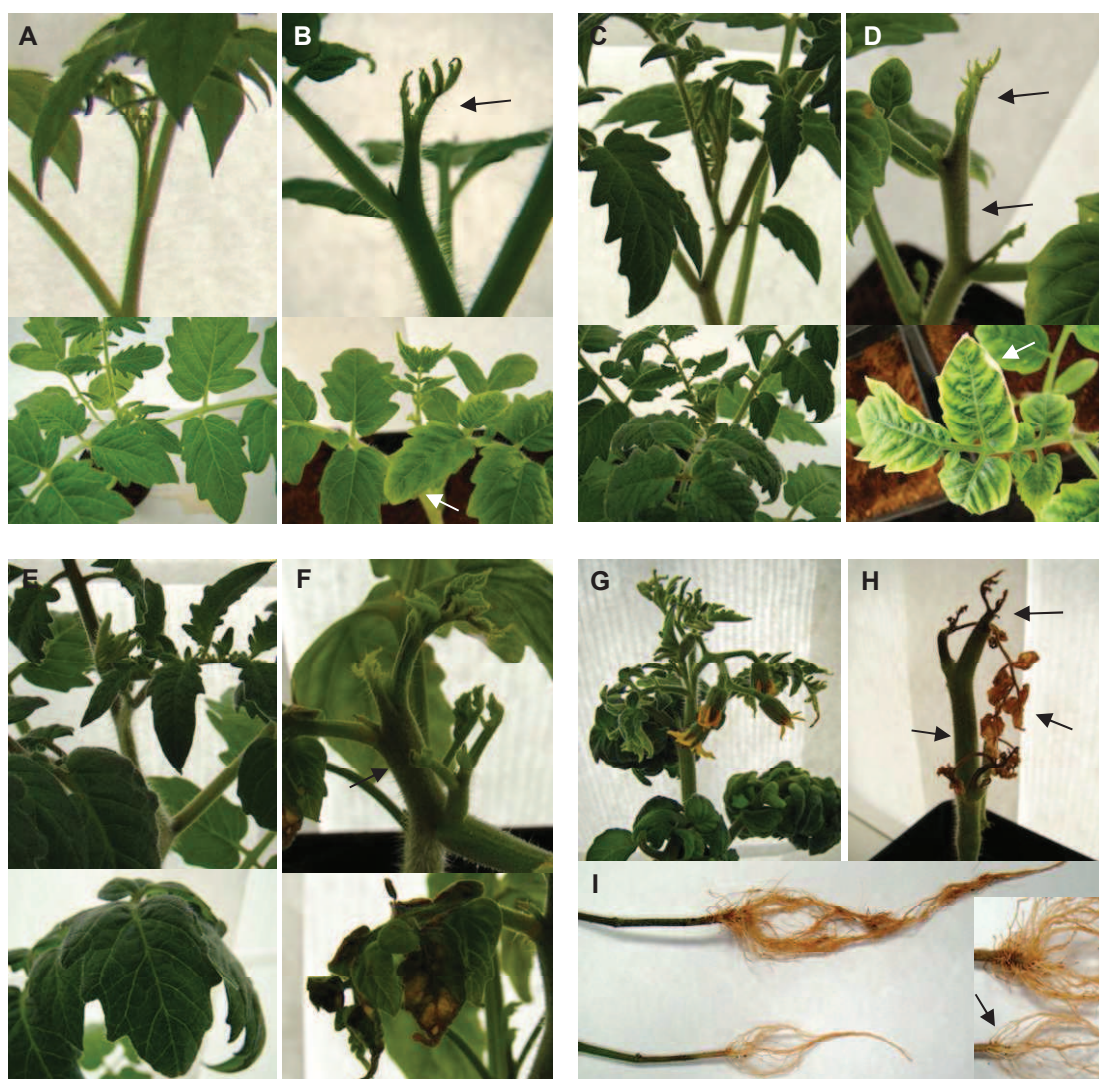


Figura 31. Respuesta hipersensible al estrés salino del mutante *pms-916* *in vivo*.

Efecto del estrés salino (100 mM NaCl) sobre el desarrollo de los brotes (arriba) y las hojas jóvenes (abajo, salvo en los paneles G y H) del WT (A, C, E y G) y del mutante (B, D, F y H) a los 12 (A y B), 24 (C y D), 36 (E y F) y 60 días (G y H) de tratamiento salino.

I) Longitud y desarrollo lateral de las raíces del WT (arriba) y del mutante (abajo) al final del experimento.

4.6.3.7. Análisis funcional del gen etiquetado en tomate: caracterización del fenotipo en líneas silenciadas

Una vez que se determinó que el inserto funcional cosegregaba con el fenotipo mutante (apartado 4.6.3.5) se decidió abordar la clonación del gen etiquetado mediante Anchor-PCR en el laboratorio del Dr. Lozano (Universidad de Almería), donde vieron que el T-DNA provocaba la disrupción del gen *PMS* (*PROTECTING MERISTEMS AGAINST SALINITY*). Con el fin de comprobar que el fenotipo de hipersensibilidad a la salinidad era consecuencia de la ausencia de función de este gen, se obtuvieron 46 líneas transgénicas diploides de tomate

(cada una de ellas procedente de un evento independiente de transformación genética) utilizando la aproximación de interferencia por RNA (RNAi).

El primer experimento se llevó a cabo con transformantes primarios (TG1) y para ello, se aclimataron 2 réplicas de 28 TG1 independientes en macetas que contenían fibra de coco. Asimismo, se aclimataron 2 réplicas de 12 plantas diploides WT clonadas *in vitro* en las mismas condiciones que las líneas transgénicas. Se comparó el desarrollo del WT respecto al mutante en ausencia o presencia de NaCl en la solución nutritiva y el tratamiento salino se inició cuando las plantas habían desarrollado 4-5 hojas verdaderas. Las líneas RNAi no mostraban alteraciones visibles con respecto a las WT en ausencia de estrés. Sin embargo, tras 10-12 días de tratamiento salino, en 27 de las 28 líneas RNAi se empezaron a observar los mismos síntomas que se habían visto en el mutante irrigado con sal, es decir, clorosis en los bordes del foliolo y alteraciones en el ápice (figura 32A). A los 24 días, las plantas silenciadas exhibían una clara inhibición de la elongación del tallo, engrosamiento del tallo a la altura del ápice y primeros síntomas de necrosis en hojas jóvenes (figura 32B). Tras 36 días de tratamiento salino la necrosis foliar fue más pronunciada, como la clorosis y el marchitamiento, principalmente en los folíolos de las hojas más jóvenes (figura 32D). A partir de los 50 días de tratamiento la mayoría de las plantas RNAi tenían las hojas marchitadas y el ápice meristemático necrosado.

A lo largo del experimento se pudo observar que los primeros síntomas de hipersensibilidad en las plantas silenciadas aparecían en el ápice y en las hojas más jóvenes (i.e. las más cercanas al ápice) mientras que, como es típico, en las plantas WT se manifestaban en las hojas más adultas (i.e. las más alejadas del ápice) (figura 32E). Conviene recordar que este resultado ya se había observado en el mutante cuando se llevó a cabo la caracterización fenotípica *in vivo* (apartado 4.6.3.6).

Como se ha comentado anteriormente, el fenotipo de hipersensibilidad se vio en 27 de las 28 líneas RNAi. El análisis de expresión de *PMS* determinó que la línea que no exhibía fenotipo de hipersensibilidad no tenía silenciado el gen *PMS*, mientras que las otras 27 exhibían entre el 97 y 99% de silenciamiento.

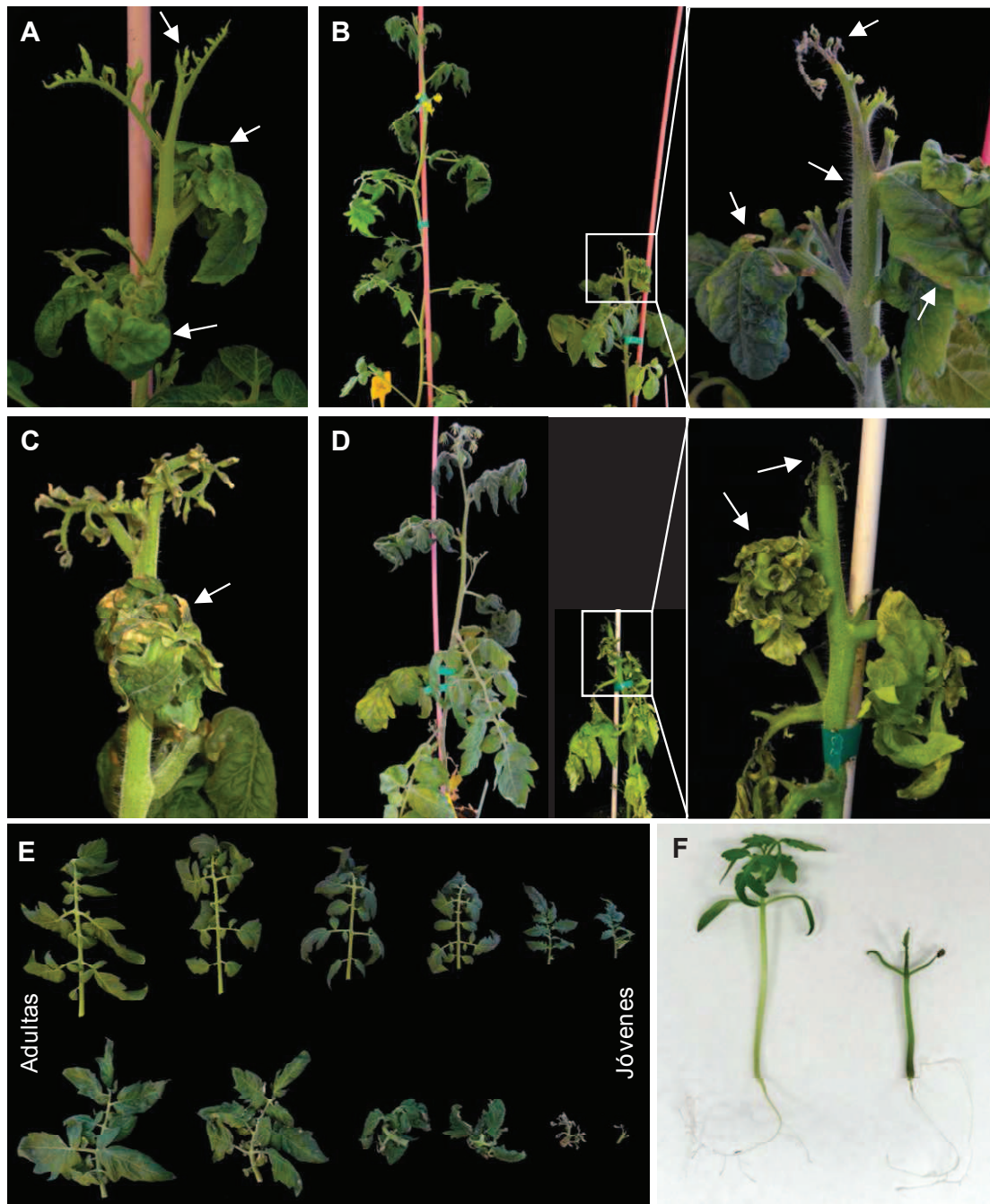


Figura 32. Respuesta hipersensible al estrés salino de las líneas RNAi-*PMS* de tomate.

A) Los primeros síntomas de sensibilidad a la salinidad en las plantas RNAi-*PMS* (i.e. con el gen *PMS* silenciado) se detectan a los 12 días del inicio del tratamiento salino. Las plantas exhiben alteraciones en el meristemo apical y en las hojas se ven los primeros síntomas de clorosis. B) Tras 24 días de tratamiento salino, las plantas RNAi-*PMS* manifiestan una clara inhibición del desarrollo del brote, engrosamiento del tallo y primeros síntomas de necrosis. C) Los síntomas de necrosis son más pronunciados después de 36 días de tratamiento salino. D) A los 50 días de estrés salino, las hojas jóvenes están completamente necrosadas y el ápice meristemático ha colapsado. E) En contraste con el WT (arriba), las hojas jóvenes de las plantas con *PMS* silenciado son las que se encuentran más afectadas por el tratamiento salino. F) El fenotipo de las plántulas con *PMS* silenciado (i.e. progenies de plantas RNAi-*PMS*) es el mismo que el de las plántulas homocigóticas para el alelo mutante cuando se cultivan *in vitro* en medio de germinación suplementado con sal (ver figuras 28 y 30).

A partir de las líneas RNAi cultivadas en condiciones normales (sin sal) se obtuvieron progenies TG2. Evaluamos algunas de estas progenies *in vitro* en medio de germinación suplementado con 100 mM de NaCl. Al igual que ocurría con el mutante (ver figura 30), las plántulas silenciadas exhibían colapso del ápice meristemático, engrosamiento del hipocotilo y menor desarrollo de raíces laterales (figura 32F). En medio sin sal el fenotipo de las plantas silenciadas era igual que el de las plantas WT.

Los resultados indican que el fenotipo de hipersensibilidad a salinidad del mutante *pms-916* se debe a la ausencia de expresión del gen *PMS*.

5. Discusión

5.1. Generación de líneas T-DNA de tomate cultivado y silvestre

Los genomas de las plantas superiores están compuestos por miles de genes que controlan diferentes caracteres. El conocimiento de los genes que determinan caracteres de relevancia agronómica tendría una gran trascendencia a nivel básico, pero además permitiría aprovechar las fuentes de variación intra y extraespecífica mediante transgénesis, optimizaría los programas de selección asistida por marcadores basados en la secuencia de dichos genes y facilitaría la búsqueda de variantes alélicas mediante TILLING y EcoTILLING, entre otras muchas aplicaciones.

El desarrollo de herramientas genómicas ha contribuido a lo largo de los últimos años a la identificación de genes que controlan diferentes caracteres. Entre tales herramientas destaca la mutagénesis insercional, que se ha convertido en una herramienta básica para la identificación y etiquetado de genes, así como para el análisis de su función. En este sentido, la interrupción de un gen endógeno o la integración del inserto transgénico en la vecindad del mismo pueden ocasionar la anulación o alteración de su función. Además, el uso de la mutagénesis insercional proporciona, en principio, el camino más rápido para la clonación del gen mutado (Radhamony *et al.*, 2005).

Una de las ventajas del T-DNA sobre los transposones como mutágeno insercional es que el T-DNA no cambia de localización tras la inserción, y es química y físicamente estable a lo largo de las generaciones (Radhamony *et al.*, 2005). La mutagénesis insercional por T-DNA ha sido ampliamente utilizada en *Arabidopsis* (Feldmann, 1991; Azpiroz-Leehan & Feldmann, 1997; Krysan *et al.*,

1999; Bouché & Bouchez, 2001) y arroz (Jeon *et al.*, 2000; Yin & Wang, 2000; Jeong *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2003; Sallaud *et al.*, 2003; Sha *et al.*, 2004) donde se han obtenido miles de líneas T-DNA. También se ha utilizado, aunque evidentemente a menor escala, en otras especies como *Lotus japonicus* (Webb *et al.*, 2000), *Medicago truncatula* (Scholte *et al.*, 2002), *Salvia miltiorrhiza* (Lee *et al.*, 2008), *Brachypodium distachyon* (Vain *et al.*, 2008), *Brassica rapa* (Lee *et al.*, 2004), álamo (Harrison *et al.*, 2007), tomate (Mathews *et al.*, 2003), cebada (Zhao *et al.*, 2006) y fresa (Oosumi *et al.*, 2006).

Diferentes aspectos de carácter social, económico y científico hacen que el tomate sea una especie de enorme interés estratégico a la hora de identificar genes relevantes para su mejora genética. Es, entre la amplia gama de especies hortícolas que se comercializan, la más importante por lo que representa su producción, así como por aspectos relacionados con su distribución y consumo. Asimismo, la cantidad, calidad y diversidad de centros públicos y privados dedicados a la investigación y mejora de esta especie reflejan tanto su importancia económica como social.

Desde un punto de vista científico, su naturaleza diploide, pequeño tamaño del genoma (0.9 pg por genoma haploide), corto ciclo de vida, relativa facilidad para obtener plantas transgénicas, disponibilidad de colecciones de mutantes (sobre todo, espontáneos e inducidos por EMS) y recursos genéticos y genómicos (marcadores de DNA, colecciones de EST, micromatrices y un mapa físico desarrollado) convierten al tomate en uno de los más efectivos modelos entre las especies de interés agronómico (Giovannoni, 2004). En particular, y como consecuencia de los avances moleculares y genéticos conseguidos en esta especie, el tomate ha emergido como el sistema modelo para el estudio de los procesos de desarrollo y maduración de frutos climatéricos (Giovannoni, 2007).

A pesar de todas estas cuestiones, se desconocen en gran medida los genes y mecanismos que regulan las etapas iniciales del desarrollo, cómo se establece la identidad del meristemo de esta especie, y cuáles son los determinantes genéticos que especifican las distintas etapas del desarrollo de la flor y el fruto de tomate. Asimismo, se conoce muy poco en torno a los genes y mecanismos implicados en la respuesta a estrés abiótico.

Con el fin de identificar genes que controlan caracteres del desarrollo de relevancia agronómica así como determinantes de la tolerancia a la salinidad en tomate y especies silvestres relacionadas, en nuestro laboratorio se está

abordando un programa de mutagénesis insercional en colaboración con los grupos del Dr. Lozano (Universidad de Almería) y la Dra. Bolarín (CEBAS-Murcia). Para ello, en nuestro laboratorio se habían generado algo más de 3000 líneas T-DNA de tomate y casi 2500 líneas T-DNA de *Solanum pennellii*, lo que ha permitido la identificación de mutantes afectados en caracteres del desarrollo así como algunos mutantes más sensibles a salinidad o estrés hídrico.

En este contexto, uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral ha sido la generación de líneas T-DNA de tomate cultivado. En concreto, se han obtenido 952 líneas T-DNA de tomate (cv. Moneymaker) y de la mayor parte de estas líneas se han obtenido sus descendencias TG2. Así pues, con el trabajo realizado se ha ampliado la colección de líneas T-DNA de tomate, lo que está permitiendo seguir profundizando en la disección genética de caracteres relevantes desde un punto de vista agronómico en esta especie.

Uno de los puntos cruciales de esta estrategia basada en la mutagénesis insercional con T-DNA radica en la necesidad de obtener un elevado número de líneas para que haya una cierta probabilidad de detectar mutantes, lo que implica disponer de un método eficaz y reproducible de transformación genética. En este sentido, las eficacias que se obtenían con los primeros métodos de transformación de tomate que se pusieron a punto en el laboratorio (ver Gisbert, 1997; Pineda, 1997, Naval, 2001 o Ellul *et al.*, 2003) no permitían afrontar el reto de iniciar un programa de mutagénesis insercional. Gracias al trabajo realizado en este proyecto y en trabajos anteriores (e.g. Angarita, 2009), actualmente disponemos de un método de transformación genética en tomate que proporciona una eficacia útil de en torno al 25% (lo que supone obtener 25 plantas transgénicas diploides independientes, es decir, procedentes de eventos independientes de transformación, por cada 100 explantes inoculados). En efecto, la eficacia útil de los cinco experimentos de transformación genética realizados en esta Tesis ronda el 23-24%. En la actualidad, otros componentes del grupo siguen ampliando la colección de líneas T-DNA de tomate y en sus experimentos las eficacias de transformación rondan el 20-25%, lo que confirma la reproducibilidad del método que se está empleando actualmente en el laboratorio.

Como se comentaba anteriormente, nuestro grupo ha generado también una colección de líneas T-DNA de la especie silvestre *Solanum pennellii* y los resultados en cuanto a la detección y caracterización de mutantes hipersensibles a estrés hídrico o salino se publicaron hace poco (Atarés *et al.*, 2011). Habida

cuenta del interés que suscitaba generar colecciones de líneas T-DNA en otras especies silvestres filogenéticamente relacionadas con tomate, en el contexto de esta Tesis se ha iniciado la generación de colecciones de líneas T-DNA de *S. cheemaniae* y *S. pimpinellifolium*. La ventaja de estas últimas con respecto a *S. pennellii* reside en el hecho de que ambas comparten con el tomate su modo de reproducción. En efecto, al ser autógamas, no requieren de polinización manual para obtener las progenies TG2, una tarea obligada en *S. pennellii* por tratarse de una alógama facultativa. Además, en el caso de *S. pimpinellifolium*, al ser el ancestro del tomate (Qi *et al.*, 2013), la identificación de mutaciones que afectan el tamaño, forma y color del fruto podría ayudarnos a identificar los genes que fueron seleccionados en el proceso de domesticación.

Por lo que respecta a *S. cheesmaniae*, aunque disponíamos de un método de transformación genética (Arrillaga *et al.*, 2001), la eficacia del mismo no permitía obtener el número de líneas T-DNA requerido. Ahora, sin embargo, disponemos de un método que nos permite generar tantas líneas T-DNA como sean necesarias. En efecto, el trabajo realizado en esta Tesis nos ha permitido generar 707 plantas a partir de eventos independientes de transformación genética, la mayor parte de las cuales son diploides (550 plantas, es decir, casi el 78%). Lo más interesante es que la eficacia útil de transformación es incluso mayor que la que se consigue en tomate. Más concretamente, en los 6 experimentos de transformación genética que se realizaron en esta especie se obtuvo una eficacia útil en torno al 30%.

Aunque en el laboratorio no habíamos trabajado previamente con *S. pimpinellifolium*, también hemos logrado poner a punto un método eficaz y reproducible introduciendo algunas modificaciones respecto al de tomate (ver Atarés *et al.*, 2011). En concreto, hemos generado 562 plantas transgénicas a partir de eventos independientes de transformación genética, la mayor parte de las cuales son diploides (405 plantas, es decir, el 72%). A pesar de que la eficacia útil en *S. pimpinellifolium* es inferior a la que se obtiene en tomate (en torno al 21%), es suficiente como para plantear un programa de mutagénesis insercional.

Conviene indicar que en ambas especies (i.e. *S. cheesmaniae* y *S. pimpinellifolium*) los experimentos de transformación genética se realizaron utilizando explantes de hoja (en tomate empleamos explantes de cotiledón). Esto fue así porque antes de iniciar la generación de las líneas de T-DNA se realizó un experimento de regeneración a partir de explantes de cotiledón y de hoja en el

que pudimos observar que la mayor parte de las plantas regeneradas a partir de explantes de cotiledón eran tetraploides. Sin embargo, las plantas regeneradas a partir de explantes de hoja eran mayoritariamente diploides. Por tanto, aunque los explantes de cotiledón dan mayor respuesta morfogénica que los de hoja, resulta más eficaz emplear estos últimos.

En total, se han generado 1907 líneas T-DNA: 952 de tomate (cv. Moneymaker), 405 de *S. pimpinellifolium* y 550 de *S. cheesmaniae* y se han obtenido las progenies TG2 de la mayor parte de estas líneas. Estas y otras líneas generadas por el grupo se han cribado para la identificación de mutantes afectados en el grado de tolerancia a la salinidad.

5.2. Cribado de la colección de líneas de T-DNA para la identificación de mutantes alterados en el grado de tolerancia a la salinidad

A pesar de los esfuerzos para aumentar el nivel de tolerancia a la salinidad en especies de interés agronómico, los resultados obtenidos a través de mejora convencional, así como mediante algunas alternativas biotecnológicas han sido escasos (Flowers, 2004; Yamaguchi & Blumwald, 2005; Cuartero *et al.*, 2006; Ashraf *et al.*, 2008). La dificultad para obtener resultados explica las expectativas ante la posibilidad de abordar el problema vía transformación genética. En un gran número de artículos publicados desde principios de la década de los noventa se ha descrito el aumento de tolerancia a la salinidad a través de la sobreexpresión de genes endógenos o la expresión heteróloga de genes que supuestamente actúan en diferentes procesos (revisado en Munns, 2005; Tuberosa & Salvi, 2006; Vij & Tyagi, 2007; Cattivelli *et al.*, 2008; Cuartero *et al.*, 2008; 2009). Los resultados obtenidos muestran que la expresión de genes muy diversos en plantas transgénicas promueve un aumento de la tolerancia a la salinidad, pero no es posible concluir que se hayan conseguido cultivares con un nivel de tolerancia suficiente desde un punto de vista agronómico (Cuartero *et al.*, 2009). Es más, algunos autores (Flowers, 2004; Munns & Tester, 2008) han cuestionado el excesivo optimismo a la hora de extraer conclusiones, debido a la falta de evidencias fiables en algunos casos, el uso de métodos de evaluación inadecuados y, sobre todo, porque la mayor parte de estos trabajos se han realizado en especies modelo (Vij & Tyagi, 2007), cuando lo que importa es obtener resultados con especies cultivadas (Grover *et al.*, 2003; Yamaguchi & Blumwald, 2005; Bhatnagar-Mathur *et al.*, 2008; Cuartero *et al.*, 2009).

Desde nuestro punto de vista, el objetivo prioritario en este campo sigue siendo la identificación de genes realmente implicados en el proceso de tolerancia. En este sentido, una de las aproximaciones más empleadas ha consistido en la selección de genes cuya actividad o expresión estuviera regulada por estrés salino (revisado por Hasegawa *et al.*, 1987; Cushman *et al.*, 1990; Bray, 1993; Bohner *et al.*, 1996). Lo que se asume en general es que estos genes regulados por sal deben tener una función importante en la tolerancia a la salinidad. Aunque esta aproximación ha contribuido a una mayor comprensión de la complejidad de este carácter en plantas, no se puede concluir que haya permitido establecer los determinantes de la tolerancia a la salinidad. Según Zhu *et al.*, (1998), los cambios en los niveles de expresión de genes en condiciones salinas pueden ser directa o indirectamente una consecuencia del daño ocasionado por el estrés salino, pero eso no quiere decir que esos genes sean claves para conferir tolerancia. De hecho, como comentábamos en el párrafo anterior, el aumento de tolerancia a la salinidad conseguido a través de la sobreexpresión de genes endógenos o la expresión heteróloga de genes que supuestamente actúan en diferentes procesos no ha sido suficiente para obtener plantas con un nivel de tolerancia apropiado desde un punto de vista agronómico.

Una de las aproximaciones más interesantes para determinar qué genes y mecanismos están relacionados con la tolerancia a la salinidad en plantas es la identificación de mutantes alterados en este carácter. De hecho, en su día la detección de mutantes abrió el camino para la disección genética de procesos del desarrollo (Coen & Meyerowitz, 1991). Más recientemente, la perspicacia de algunos científicos a la hora de valorar mutantes que habían pasado desapercibidos para la gran mayoría (e.g. *teosinte branched1* y otros) ha sido clave para iniciar la búsqueda de los así llamados 'genes de domesticación' (Doebley *et al.*, 1995). En tomate, mediante esta estrategia se han clonado algunos genes relevantes, como por ejemplo, *rin*, cuya mutación da lugar al desarrollo de frutos que no maduran (Vrebalov *et al.*, 2002) o el gen *ovate* (Liu *et al.*, 2002) relacionado con la morfología del fruto en algunas variedades de tomate. Por lo que respecta a la tolerancia a la salinidad, la identificación de mutantes hipersensibles en *Arabidopsis* permitió la localización y clonación del gen *SOS1*, esencial para la tolerancia a la salinidad en esta especie (Wu *et al.*, 1996). Los experimentos realizados en esta dirección dieron como fruto la clonación de cuatro nuevos genes (*SOS2*, *SOS3*, *SOS4* y *SOS5*) relacionados con este proceso (Liu & Zhu, 1997; Zhu *et al.*, 1998; Shi *et al.*, 2002; Shi *et al.*,

2003). Este tipo de estrategia también ha permitido la identificación de tres mutantes EMS de tomate sensibles al estrés salino: *tss1*, *tss2* y *tos1* (Borsani *et al.*, 2001; 2002). Ciertamente, tras la detección de un mutante espontáneo o inducido (e.g. EMS) queda un largo camino para llegar a la clonación y análisis funcional del gen alterado, y en estos casos hay que recurrir a aproximaciones de clonaje posicional que resultan tediosas en tiempo y metodológicamente laboriosas. Esto explicaría por qué los genes *TSS1*, *TSS2* y *TOS1* no han sido aún clonados.

Tras la obtención de progenies TG2 de tomate, *S. cheesmaniae* y *S. pimpinellifolium*, el siguiente objetivo de esta Tesis Doctoral fue identificar mutantes afectados en el grado de tolerancia a la salinidad. Con el fin de evitar los problemas que podría ocasionar el escrutinio de las líneas T-DNA en condiciones de cultivo *in vivo*, nosotros hemos optado por llevar a cabo una evaluación *in vitro*. Para ello, nuestro grupo puso a punto un método para identificar de forma rápida y sencilla posibles mutantes hipersensibles a la salinidad. Con este sistema de evaluación, todas las plantas quedan expuestas a la misma concentración salina y perciben la sal a partir del mismo estadio de desarrollo. Wu *et al.* (1996) y Borsani *et al.* (2001) utilizaron también un sistema basado en el cultivo *in vitro* para la identificación de los mutantes hipersensibles de *Arabidopsis* (mutantes *sos*) y tomate (mutantes *tss* y *tos1*) respectivamente. En ambos trabajos, los autores evaluaban el desarrollo radicular de plántulas crecidas durante los primeros estadios de desarrollo en ausencia de estrés y transferidas posteriormente a un medio con NaCl. Nuestro esquema de evaluación ha sido diferente. Nosotros hemos transferido semillas pregerminadas a los recipientes de cultivo con el medio suplementado con NaCl, de manera que las plántulas quedan expuestas a la concentración salina seleccionada (100 mM de NaCl) desde los primeros estadios de su desarrollo. Así, la detección de mutantes se realiza sobre la base de alteraciones en el desarrollo de la parte aérea de la plántula (e.g. clorosis foliar, marchitamiento o ausencia de crecimiento de las plántulas), aunque el método de evaluación también permite detectar las alteraciones que se producen en el sistema radicular.

No cabe duda que uno de los aspectos importantes en este tipo de experimentos es utilizar una concentración salina apropiada para la fácil identificación de los mutantes. En los trabajos relacionados con la identificación de los mutantes *sos* se emplearon concentraciones de 50 y 75 mM de NaCl (Wu

et al., 1996; Zhu *et al.*, 1998). Según los autores, esta concentración es la más apropiada para detectar mutantes hipersensibles ya que no afecta al crecimiento radicular de las plantas WT. En tomate, Borsani *et al.* (2001) emplearon una concentración mayor de NaCl (125 mM) para la identificación de los mutantes hipersensibles de tomate. En nuestro laboratorio se había realizado un experimento previo para determinar qué concentración salina podría ser la más apropiada para la detección de mutantes hipersensibles a estrés salino. Se vio que a 100 mM de NaCl algunas de las variables relacionadas con el crecimiento de las plántulas se veían seriamente afectadas (e.g. altura de la planta, número de hojas desarrolladas o desarrollo radicular), pero a esta concentración las plántulas eran capaces de desarrollarse adecuadamente (es decir, desarrollaban raíces y hojas verdaderas). Por tanto, esta concentración salina tendría que permitir la detección de mutantes con diferentes grados de sensibilidad a la salinidad. Conocido el fenotipo del WT a 100 mM de NaCl, la estrategia fue detectar fenotipos diferenciales con alteraciones en el desarrollo de la parte aérea.

En este trabajo se han evaluado *in vitro* 1545 líneas T-DNA de tomate, 194 líneas T-DNA de *Solanum pimpinellifolium* y 149 líneas T-DNA de *S. cheesmaniae*. Conviene indicar que, por lo que respecta a tomate, una parte de las líneas evaluadas había sido previamente obtenida por el grupo. Resultado del escrutinio *in vitro* en condiciones salinas se han identificado 47 mutantes, cada uno de los cuales exhibe una segregación mendeliana que ha sido contrastada con, al menos, 3 experimentos. En este sentido, una de las restricciones que nos pusimos a la hora de seleccionar un determinado mutante fue que exhibiera una segregación simple mendeliana. En el caso de que se tratara de un mutante con efectos de tipo dominante, 3 de cada 4 plantas tendría que exhibir el fenotipo mutante y 1 el fenotipo WT. En el caso de un mutante recesivo, 3 de cada 4 plantas tendría que ser WT y 1 mutante.

Otro de los requisitos que debía cumplir un mutante afectado exclusivamente por el estrés salino es que las plantas de fenotipo mutante no manifestaran alteración alguna en ausencia de sal. Con todo, en algunos casos, la alteración de la función de genes implicados en el proceso de tolerancia a la salinidad también puede afectar al fenotipo de las plantas en ausencia de estrés, por lo que no se deben descartar estos mutantes hasta haber realizado un análisis más exhaustivo. Por ejemplo, el mutante *sas1* de *Arabidopsis* acumula una elevada

concentración de sodio en condiciones salinas y exhibe un menor desarrollo de la raíz y de la parte aérea en ausencia de sal (Nublat *et al.*, 2001). Asimismo, el mutante *shs1* de *Arabidopsis*, que exhibe una hipersensibilidad específica a sodio, tiene un desarrollo radicular más lento y alteraciones en la morfología de la hoja en ausencia de sal (Inan *et al.*, 2007). En el mutante *res* de tomate también se produce una remarcable inhibición del crecimiento y alteraciones morfológicas en hoja y raíz en ausencia de estrés (García-Abellan *et al.*, 2015). Además de la inhibición del crecimiento, las plantas mutantes exhiben una extrema clorosis. Sin embargo, el mutante restaura la morfología y la estructura celular de la raíz, y desarrolla hojas de color verde en condiciones de salinidad, lo que sugiere que el gen mutado debe estar implicado en los mecanismos de respuesta a estrés salino.

Los análisis realizados en los mutantes que se han identificado en este trabajo indican que la mayor parte de los fenotipos observados en condiciones salinas también se detectan en ausencia de estrés. Es decir, la mayoría de los mutantes no son específicos de estrés sino que se trata de mutantes que exhiben alteraciones en diferentes caracteres del desarrollo. Más concretamente, de los 47 mutantes identificados, 44 están afectados en caracteres del desarrollo como albinismo, color o morfología de la hoja, deficiencia en clorofila, letalidad en estadio de plántula, desarrollo radicular, desarrollo vegetativo, desarrollo del ápice meristemático o menor crecimiento y necrosis. Conviene en cualquier caso indicar que se han identificado 3 mutantes de tomate hipersensibles a estrés salino. Estos mutantes no presentan alteración fenotípica cuando se cultivan en ausencia de estrés y, sobre la base de los experimentos realizados, sus fenotipos parecen estar ligados a la presencia de NaCl en el medio de cultivo.

En definitiva, en esta Tesis Doctoral se ha realizado el escrutinio *in vitro* de progenies de líneas T-DNA para identificar mutantes afectados en el grado de tolerancia a la salinidad. Este escrutinio ha permitido identificar tanto mutantes más sensibles a salinidad como mutantes afectados en caracteres del desarrollo sobre los que se discute en los siguientes apartados de esta sección.

5.3. Detección *in vitro* de mutaciones que afectan a caracteres del desarrollo

Aunque uno de los principales objetivos de esta Tesis Doctoral ha sido la búsqueda de mutantes afectados en la tolerancia a la salinidad, el escrutinio *in vitro* de las colecciones de tomate cultivado y silvestre ha hecho factible la identificación de mutantes afectados en diferentes caracteres del desarrollo. La

detección de este tipo de mutantes se realiza habitualmente en invernadero, pero la identificación *in vitro* ofrece considerables ventajas, al menos para aquellas mutaciones que se expresan en etapas tempranas del desarrollo. De hecho, creemos que muchos de los mutantes que se han identificado en este trabajo mediante el escrutinio *in vitro* habrían pasado desapercibidos o no se habrían podido caracterizar adecuadamente *in vivo* por el dramático efecto de la mutación. Por fortuna, el cultivo *in vitro* nos ha permitido no sólo a detectar y caracterizar este tipo de mutantes, sino también a mantenerlos mediante propagación clonal. Como estos mutantes se han identificado *in vitro*, decidimos darles la denominación de 'mutantes Vitro-Dev'.

Tres de los 44 mutantes identificados exhiben albinismo. En general, los mutantes albinos surgen como consecuencia del bloqueo en el proceso de la fotosíntesis, bien afectando directamente al desarrollo del cloroplasto, o indirectamente como consecuencia de defectos más generales en el desarrollo de la planta o en su metabolismo.

Uno de los problemas de este tipo de mutantes es que los genes alterados pueden estar implicados en muchas rutas metabólicas. Por ejemplo, Qin *et al.* (2007) identificaron un mutante albino de *Arabidopsis* (*pds3*) resultado de la disrupción funcional del gen *PDS3*. Comprobaron que el mutante tenía niveles muy elevados de fitoeno. Los autores reportaron que el mutante también exhibía un fenotipo enano y demostraron que la adición de GA3 podía rescatar parcialmente el fenotipo de enanismo, sugiriendo que el fenotipo podría deberse a una deficiencia de giberelinas. Observaron, mediante análisis transcriptómico y RT-PCR, que la pérdida de función del gen *PDS3* promovía cambios en la expresión de genes implicados en al menos 20 rutas metabólicas, lo que incluye la inhibición de muchos genes que intervienen en las rutas de síntesis de carotenoides, clorofila y giberelinas.

Otro de los problemas de un mutante albino es que su caracterización resulta complicada ya que normalmente mueren en una etapa temprana del desarrollo de la plántula (Yamamoto *et al.*, 2000). Esto es lo que ocurre en los tres mutantes albinos que hemos identificado (*tom2158*, *tom2297* y *tom2372*). En concreto, las plantas albinas no son capaces de superar la etapa siguiente al desarrollo de las primeras hojuelas a pesar de exhibir un apropiado desarrollo radicular.

Se ha descrito que algunas mutaciones albinas se pueden mantener *in vitro* durante más tiempo suplementando el medio básico de cultivo (e.g. MS) con

mayores concentraciones de azúcar. De esta forma, Kasmati *et al.* (2011) fueron capaces de rescatar parcialmente el fenotipo de los mutantes *tic* de *Arabidopsis* suplementando el medio MS con 3% de sacarosa. En nuestro caso no ha sido así, ya que las plántulas mutantes terminaban muriendo en medios suplementados con 2, 3 o 4% de sacarosa (no mostrado en el apartado de Resultados).

La caracterización de mutantes albinos ha permitido llegar a la identificación de genes implicados en el desarrollo del cloroplasto. Por ejemplo, los plastidios y cloroplastos del mutante de *Arabidopsis vip1* (*vesicle-inducing protein in plastids1*) tienen una morfología única, al desarrollar estructuras tipo globo (Zhang *et al.*, 2012). El análisis funcional indicó que el gen afectado (*VIPP1*) codifica una proteína multifuncional que es esencial para el mantenimiento de la envoltura del cloroplasto y la biogénesis de los tilacoides (Zhang *et al.*, 2012).

CLA1 es otro gen que está implicado en el desarrollo de los cloroplastos y que se identificó a partir del mutante insercional albino de *Arabidopsis cla1-1* (por *cloroplastos alterados*) (Mandel *et al.*, 1996). Posteriormente, Estévez *et al.* (2000) descubrieron que *CLA1* codifica la primera enzima de la ruta no mevalonato relacionada con la síntesis de isoprenoides, más concretamente el 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa (DXS). Estos mismos autores indicaron que la mutación en *CLA1/DXS* afecta de manera pleiotrópica a la formación de los tejidos del mesófilo. Los análisis realizados por Araki *et al.* (2000) en el mutante *chs5* de *Arabidopsis*, otro mutante defectivo en la síntesis de DXS, sugerían que la localización de la ruta no mevalonato se encuentra en plastidios y que la actividad de DXS se requiere a lo largo de los primeros estadios de desarrollo del cloroplasto (Araki *et al.*, 2000). El fenotipo albino del mutante nulo *ispH* de *Arabidopsis* también está relacionado con una alteración de la ruta no mevalonato (Hsieh & Goodman, 2005). En este caso, el gen alterado (*ISPH*) se encuentra en la etapa final de esta ruta y cataliza la síntesis de isopentenil difosfato (IPP) y su isómero el diametilalil difosfato (DMAPP). Al igual que en el mutante *cla1*, *ispH* tiene alterado el desarrollo de los cloroplastos (Hsieh & Goodman, 2005).

Que nosotros sepamos, hasta la fecha no se han caracterizado mutantes albinos de tomate. En este sentido, los mutantes *tom2158*, *tom2297* y *tom2372* podrían representar una oportunidad única para identificar genes implicados en el desarrollo de los cloroplastos en esta especie. Los análisis efectuados en estos tres mutantes recesivos han indicado que portan una copia funcional de T-DNA.

En el caso de *tom2158* no hay cosegregación entre el fenotipo mutante y un inserto de T-DNA. Sin embargo, en los mutantes *tom2297* y *tom2372* sí hay cosegregación inserto-fenotipo. Actualmente, el grupo del Dr. Lozano ha clonado ya los genes etiquetados en ambos mutantes y en breve se iniciarán los experimentos relacionados con el análisis funcional de estos genes.

Además de los mutantes albinos, en el escrutinio *in vitro* se ha identificado un mutante (*tom1284*) que exhibe variegación en las estructuras vegetativas. Los mutantes variegados han sido definidos como "plantas que desarrollan sectores de diferentes colores en sus estructuras vegetativas" (Kirk & Tilney-Bassett, 1978). Algunas de las variegaciones más comunes comparten sectores verdes y blancos (o amarillos) en tejidos y órganos que normalmente son de color verde. Mientras que las células de los sectores verdes típicamente contienen cloroplastos, las de los sectores blancos suelen contener plastidios deficientes en clorofila. El análisis de estos plastidios sugiere el bloqueo en alguna de las etapas de la biogénesis del cloroplasto, ya que con frecuencia carecen de organización de las estructuras de la membrana interna y/o contienen sólo laminillas rudimentarias. A pesar de su presencia generalizada en la naturaleza, existen relativamente pocas variegaciones caracterizadas a nivel molecular. Según Tilney-Bassett (1975), la variegación puede deberse a mecanismos diferentes. Algunas variegaciones son inducidas por agentes externos y no son heredables mientras que otras sí lo son y se deben a mutaciones en genes nucleares, plastidiales o mitocondriales que, de una u otra forma, promueven alteraciones en plastidios. Nosotros hemos visto que en las hojas del mutante *tom1284* algunos sectores son de color blanco, otros de color verde y, además, algunos exhiben una tonalidad verde más tenue. Por lo que respecta al modo de herencia, las segregaciones observadas en los experimentos realizados tanto *in vitro* como *in vivo* indican que se trata de una mutación en un gen nuclear

En *Arabidopsis* se han identificado mutantes variegados a partir de colecciones de líneas EMS y de inserción (Wisman *et al.*, 1998; Kuromori *et al.*, 2006; Vizir *et al.*, 1996), la mayor parte de los cuales sólo se han caracterizado superficialmente. Aún así, algunos mutantes han recibido una caracterización más exhaustiva y se ha identificado el gen responsable del fenotipo. Por ejemplo, en el mutante de *Arabidopsis var2*, los cotiledones, que son morfológicamente normales, tienen sectores verdes y sectores blanquecinos o amarillentos (Martínez-Zapater, 1992). Los cloroplastos de los sectores verdes son normales

mientras que los de los sectores blancos carecen de una estructura lamelar organizada (Chen *et al.*, 1999). Según Chen *et al.* (2000) *VAR2* es un gen nuclear que codifica una metaloproteasa de zinc dependiente de ATP y la mutación de *VAR2* ocasiona la pérdida de función de la proteína que actúa en la membrana tilacoidal del cloroplasto. *Immutans (im)*, descrito por primera vez hace más de 50 años (Redei, 1963; Röbbelen, 1968), es una mutación recesiva de un gen nuclear. Wetzell *et al.* (1994) comprobaron que los sectores verdes de *im* contenían cloroplastos normales, mientras que los blancos contenían plastidios vacuolados que carecían de estructuras laminares organizadas. La clonación de *IMMUTANS (IM)* reveló que el gen codifica una proteína mitocondrial con similitud a una oxidasa alternativa (AOX) que actúa como una oxidasa terminal en las cadenas respiratorias de todas las plantas (Wu *et al.*, 1999; Carol *et al.*, 1999). Según Wu *et al.* (1999), *IM* desempeña un papel importante en los primeros estadios de la biogénesis del cloroplasto.

El mutante *ghost* de tomate tiene mutado el ortólogo de *IM* (Josse *et al.*, 2000). En condiciones normales de iluminación, *ghost* desarrolla hojas blancas o variegadas, y sus frutos inmaduros son blancos mientras que los maduros tienen color naranja. En cambio, en condiciones de baja iluminación, las hojas del mutante son menos variegadas, y los frutos son verdes con sectores blancos en estadio inmaduro y de color rojo con sectores naranjas en estadio maduro (Barr *et al.*, 2004).

Nosotros hemos cultivado nuestro mutante en distintas condiciones medioambientales y el fenotipo es siempre similar. En efecto, los patrones de variegación de *tom1284* (i.e. hojas combinando sectores blancos, verde pálido y verde) se observan tanto en condiciones de cultivo *in vitro* (fotoperiodo con 16 horas de luz), invernadero con luz de apoyo (fotoperiodo con 16 horas de luz) e invernadero sin luz de apoyo (horas de luz variable en función de la campaña). Además, los frutos de *tom1284* no exhiben alteración de su pigmentación, es decir, son verdes en estadio inmaduro y completamente rojos en estadio maduro.

Se han clonado otros genes a partir de mutantes variegados de *Arabidopsis*, como *PAC* (Reiter *et al.*, 1994; Tirlapur *et al.*, 1999), *CHM* (Abdelnoor *et al.*, 2003) o *THF1* (Wang *et al.*, 2004); pero también hay otros muchos mutantes a partir de los cuales no se ha llegado a clonar el gen, como *dov1*, *re (lcd1-1)*, *sca3*, *cue1* o *am* (ver González-Bayón *et al.*, 2006). Por comparación con los mutantes albinos, una de las ventajas de los variegados es que no mueren, lo que permite

caracterizar genes implicados en el desarrollo del cloroplasto en los sectores sin pigmentos. En *tom1284*, nosotros hemos comprobado que el gen alterado está etiquetado por un T-DNA, lo que ha facilitado su identificación en el laboratorio del Dr. Lozano (UAL, Almería). El análisis funcional de este gen permitirá conocer si participa en el desarrollo de los cloroplastos.

Otra vía para el estudio de genes implicados en el desarrollo de los cloroplastos es la caracterización de mutantes que exhiben alteraciones en los pigmentos clorofílicos. La clorofila es un pigmento esencial (Chl) que desempeña un papel fundamental en la captación de luz y la transferencia de energía durante la fotosíntesis (Liu *et al.*, 2007). El metabolismo de la clorofila se ha estudiado en diversos organismos, tanto desde un punto de vista bioquímico (Pontoppidan & Kannangara, 1994) como genético (Bollivar *et al.*, 1994; Nakayashiki. *et al.*, 1995; Tanaka *et al.*, 1998), y se ha relacionado con el desarrollo de plastidios y cloroplastos, así como con la fotomorfogénesis (Eckhardt *et al.*, 2004). En los fotosistemas de plantas superiores existen dos tipos de clorofilas, Chla y Chlb. Según Nagata *et al.* (2005), todos los genes requeridos para la biosíntesis de clorofila han sido identificados. Sin embargo, la regulación de la biosíntesis de clorofila, su degradación, su efecto sobre la fotosíntesis y su inserción modulada en complejos captadores de luz y diferentes fotosistemas son en gran parte desconocidos y requieren una mayor exploración (Czarnecki & Grimm, 2012).

Se han identificado mutantes deficientes en clorofila en un amplio abanico de especies, lo que incluye *Arabidopsis* (Kim *et al.*, 2009; Nakanishi *et al.*, 2005), arroz (Zhou *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2007), colza (Zhao *et al.*, 2000; Sun & Zhang, 2007), soja (Kato & Palmer., 2004), girasol (Yue *et al.*, 2009), trigo (Falbel *et al.*, 1996), cebada (Li *et al.*, 2013) y maíz (Shi *et al.*, 2013). Estos mutantes han sido especialmente útiles para la identificación de genes implicados en la biosíntesis de la clorofila. Jung *et al.* (2003) identificaron 189 fenotipos deficientes en clorofila a partir del escrutinio de una colección de 1995 líneas T-DNA de arroz con una trampa de genes. A partir de uno de los mutantes insercionales, donde determinaron la existencia de cosegregación entre el inserto y la mutación, pudieron clonar el gen *OsCHLH* que codifica un enzima implicado en la biosíntesis de la clorofila: la magnesio quelatasa. Wu *et al.* (2007) clonaron el gen *YGL1* a partir del mutante de arroz *yellow-green leaf1* (*ygl1*). El análisis de secuencias reveló que *YGL1* codifica una clorofila sintasa, el enzima que cataliza

la esterificación de clorofilida para completar el último paso de la biosíntesis de clorofila.

Nosotros hemos identificado 10 mutantes de tomate y 3 de *S. cheesmaniae* que manifiestan diferentes grados de deficiencia en clorofila. Hemos visto que estos mutantes se desarrollan con normalidad en los medios básicos que empleamos para la germinación de semillas o la clonación de plantas. La mayor parte de estos mutantes exhiben un ritmo de crecimiento más lento, probablemente consecuencia de la clorosis. Por ello, hemos centrado nuestra atención en uno que crece al mismo ritmo que el parental silvestre a pesar de ser clorótico, es el caso de *tom1914*. A la espera de llevar a cabo una caracterización más profunda, hemos visto que el mutante tiene también alterado el proceso de maduración del fruto. En efecto, los frutos en estadio verde-maduro son de un color verde más claro y, en estadio maduro son de color anaranjado, no llegando a alcanzar el rojo característico de este estadio de desarrollo.

El mutante de tomate *lutescent1 (l1)* exhibe un fenotipo clorótico dependiente de las condiciones medioambientales (Barry *et al.*, 2012). En este sentido, *l1* experimenta mayor pérdida de clorofila (i.e. fenotipo más clorótico) a medida que envejece, siendo especialmente clorótico en condiciones de estrés lumínico u oscuridad. Además, en estas condiciones los frutos en estadio verde-maduro son de color amarillo-blanquecino y no verdes. Barry *et al.* (2012) comprobaron que los frutos de *l1* experimentaban un retraso en el inicio de la maduración del fruto de aproximadamente una semana respecto al WT. Sin embargo, una vez los frutos maduraban, eran del mismo color que los del parental silvestre (i.e. rojo), demostrando que la acumulación de carotenoides no estaba alterada. El *locus l1* se mapeó en el brazo largo del cromosoma 10 y el clonaje posicional del gen indicó la existencia de un prematuro codón de stop en una metaloproteasa de zinc de la familia M50 que es homóloga al gen *ETHYLENE-DEPENDENT GRAVITROPISM DEFICIENT AND YELLOW-GREEN1* de *Arabidopsis*. Según los autores, el estudio sugiere la posibilidad de que los cloroplastos puedan desempeñar un papel en el inicio de la maduración del fruto de tomate. Además, indican que el desarrollo de los cromoplastos no depende de la funcionalidad de los cloroplastos (Barry *et al.*, 2012).

Nuestro mutante *tom1914* comparte ciertas similitudes con *l1* toda vez que la clorosis foliar aumenta a medida que la planta envejece así como en ciertas condiciones de estrés. En este sentido, hemos comprobado que el grado de

clorosis de las plantas cultivadas en invernadero es mayor a final de ciclo, es decir, cuando las plantas comienzan a envejecer. También hemos comprobado que a lo largo de los primeros estadios de desarrollo *in vitro* (2-3 hojas verdaderas), la clorosis de *tom1914* es mucho mayor en condiciones de estrés salino que en ausencia de estrés, a diferencia de lo que le ocurre a las plántulas WT que no exhiben diferencias en cuanto a pigmentación foliar en estas dos condiciones de cultivo *in vitro* (sin y con sal). Probablemente, la ausencia de clorosis en las plantas WT se debe a que no ha transcurrido el tiempo necesario para que la acumulación de iones tóxicos comience a tener efectos en la hoja. Por tanto, el mayor grado de clorosis del mutante *tom1914* en condiciones salinas parece indicar que el estrés acelera la pérdida de clorofila en el mutante. Este resultado sugiere que los cloroplastos pueden desempeñar un papel en la respuesta de la planta frente estas condiciones de estrés.

Respecto al desarrollo reproductivo, hemos visto que, al igual que ocurre en el mutante *l1*, el color de los frutos de *tom1914* en estadio verde maduro es amarillo-blanquecino. Sin embargo, los frutos de *tom1914* son anaranjados en estadio maduro a diferencia de lo que sucede en el mutante *l1*, cuyos frutos alcanzan el color rojo típico del tomate en el mismo estadio. Este resultado sugiere que el gen alterado en *tom1914* podría intervenir no sólo en la síntesis de pigmentos fotosintéticos sino también en la transición de cloroplasto a cromoplasto. Además, a pesar de que ambos mutantes (i.e. *l1* y *tom1914*) tienen fenotipos similares, las diferencias existentes en el proceso de maduración del fruto parecen indicar que el gen alterado en nuestro mutante no es el mismo que el de *l1*. Por ello, se están obteniendo progenies segregantes a partir del cruce con *S. pimpinellifolium* para llevar a cabo la identificación del gen mutado por mapeo posicional.

El cribado de la colección de líneas T-DNA también ha permitido identificar 6 mutantes que no superan la etapa de plántula, es decir, degeneran o exhiben procesos de senescencia que concluyen con la muerte de la plántula. A estos mutantes los hemos incluido en la categoría fenotípica de 'letalidad a nivel de plántula' (*seedling lethal*). Por el fenotipo que exhibían hemos prestado mayor atención a dos de estos mutantes (*tom338* y *tom1738*). El mutante *tom338* exhibe una intensa clorosis desde los primeros estadios de desarrollo. Sin embargo, a diferencia de los mutantes deficientes en clorofila, *tom338* muere en cualquiera de los medios que habitualmente empleamos para el mantenimiento de las plantas *in vitro*. Por lo que respecta al *tom1738*, las plantas mutantes se caracterizan por

exhibir un colapso del meristemo cuando se inicia el desarrollo de las primeras hojas verdaderas. Este fenómeno ocurre en plántulas que se cultivan tanto *in vitro* como *in vivo*. Curiosamente, cuando se transfieren brotes a los medios de enraizamiento que empleamos habitualmente, el colapso meristemático se produce dependiendo del tipo de agar utilizado para gelificar el medio de cultivo. En efecto, los brotes o yemas axilares cultivados en medios con agar 'duro' (i.e. con mayor fuerza de gel) no son capaces de dar lugar a una planta ya que antes o después se produce el colapso del ápice meristemático; sin embargo, si los brotes o las yemas se cultivan en medios con un agar 'blando' (i.e. menor fuerza de gel), la planta axénica es capaz de desarrollarse. Por el momento no hemos sido capaces de descubrir por qué este fenómeno es dependiente de la dureza del agar que se emplea para gelificar el medio, pero haremos un análisis histológico del meristemo apical en medios gelificados con distintos tipos de agar para ver si se observan diferencias que ayuden a explicar el fenómeno. En cualquier caso, las observaciones que hemos realizado sugieren que la actividad meristemática se encuentra alterada en este mutante. Así, los explantes de cotiledón de las plantas mutantes experimentan menor desarrollo de callo y, sobre todo, menor proliferación de estructuras organogénicas (i.e. meristemas adventicios) que los de las plantas WT.

Respecto al fenotipo de este tipo de mutantes, es difícil diferenciar si la alteración afecta al desarrollo embrionario o al inicio del desarrollo de la plántula, toda vez que los primeros (i.e. los que afectan al embrión) son también capaces de germinar y dar lugar a una plántula que se comporta como un mutante letal (Budziszewski *et al.*, 2001). Debido a la complejidad y diversidad de los procesos biológicos que son necesarios para que una planta pueda crecer y desarrollarse, son muchos los genes que podrían ser responsables del fenotipo de letalidad. Según Budziszewski *et al.* (2001), probablemente se trata de genes requeridos específicamente para el desarrollo temprano, o bien genes que cumplen una función más general y cuya ausencia se convierte en crítica para el desarrollo de la plántula. Los estudios que se han realizado hasta la fecha proporcionan estimaciones contradictorias sobre el número de genes que son esenciales para la embriogénesis en *Arabidopsis*. Jurgens *et al.* (1991) y Miséra *et al.* (1994) estimaron que para la embriogénesis de *Arabidopsis* son esenciales entre 3500-4000 genes, mientras que según Franzmann *et al.*, (1995), son sólo 500 los genes esenciales. Que nosotros sepamos, en plantas superiores se desconoce el número de genes esenciales para la viabilidad de la planta en los primeros

estadios de desarrollo. Sin embargo, en otros sistemas sí que existen datos. Por ejemplo, Winzeler *et al.* (1999) reportaron que en *Saccharomyces cerevisiae* el 17% de los genes es esencial para la viabilidad mientras que en *Caenorhabditis elegans* las estimaciones varían desde el 15% (Brenner, 1974; Herman, 1988) al 25% (Stewart *et al.*, 1998). No obstante, los estudios basados en la interferencia por RNA (RNAi) sugieren que sólo el 10% de los genes de *C. elegans* son esenciales para su viabilidad (Fraser *et al.*, 2000).

En trabajos más recientes aparecen datos sobre la identificación de genes responsables de un fenotipo '*seedling lethal*'. Según Tzafrir *et al.* (2004), muchos de los genes clonados codifican proteínas que participan en una amplia variedad de procesos biológicos, tales como metabolismo, transporte, morfogénesis, transcripción, etc. También se ha descrito que la biogénesis del cloroplasto está estrechamente vinculada con la embriogénesis y el desarrollo de las plántulas (Liang *et al.*, 2010). Así, el fenotipo de muchos de los mutantes descritos como *seedling lethal* están alterados en genes implicados en la biogénesis del cloroplasto (Pyo *et al.*, 2013). Habida cuenta de que en los cloroplastos se produce la fotosíntesis y la biosíntesis de metabolitos esenciales (aminoácidos, ácidos grasos y metabolitos secundarios), el desarrollo de cloroplastos funcionales es esencial para el desarrollo o crecimiento de la plántula. Por ejemplo, la mutación en el gen nuclear *EDD1* (*Embryo-Defective Development*) que codifica una glicil-ARNt-sintetasa, promueve letalidad en el estadio embrionario, deteniendo el desarrollo en la etapa del embrión corazón (Uwer *et al.*, 1998). Se ha sugerido que *EDD1* está implicado en la producción de una señal muy temprana requerida para iniciar el primer paso en la diferenciación del proplastidio (Uwer *et al.* 1998). El mutante *slp* (*schlepperless*), que afecta al gen de la chaperonina-60 α , también promueve retraso del desarrollo del embrión antes del estadio corazón (Apuya *et al.*, 2001). Según los autores, los embriones mutantes poseen plastos mal desarrollados que dan lugar a plántulas albinas. También está implicado en el desarrollo de plastidios durante la etapa de embriogénesis el factor G de elongación plastidial (*SCO1*). Ruppel & Hangarter (2007) observaron que las mutaciones *sco1-2* y *sco1-3* dan lugar a letalidad en estadio de embrión, mientras que las plántulas con la mutación *sco1-4* son albinas y mueren poco después de la germinación. Se han clonado otros muchos genes implicados en aspectos relacionados con los cloroplastos a partir de mutantes de *Arabidopsis* cuyo fenotipo es *seedling lethal*, a saber, el complejo Tic-Toc, implicado en biogénesis de plástidos (Jarvis *et al.*, 1998; Kikuchi *et al.*, 2013; Tada

et al., 2014), *EMB506*, implicado en la diferenciación de plastidios (Albert *et al.*, 1999; Garcion *et al.*, 2006), *AGL23*, en biogénesis del cloroplasto (Chi *et al.*, 2008; Colombo *et al.*, 2008) o *EMB1303*, en desarrollo del cloroplasto (Huang *et al.*, 2009). En definitiva, la mayor parte de los trabajos relacionados con mutantes *seedling lethal* afectan a procesos relacionados o con la función o la biogénesis del cloroplasto. De hecho, algunos de los mutantes descritos en estos trabajos tienen un fenotipo letal porque son albinos y, evidentemente, por esta razón no superan un determinado estadio de desarrollo. Por el fenotipo que exhibe (intensa clorosis), no se puede descartar que el gen alterado en *tom338* esté implicado en aspectos relacionados con el cloroplasto. Sin embargo, el fenotipo del mutante *tom1738* no parece estar relacionado con funciones cloroplásticas ya que las plantas axénicas que crecen *in vitro* (en medio con agar 'blando') no exhiben deficiencia en clorofila. El característico fenotipo de *tom1738* parece deberse a un problema relacionado con la integridad del ápice meristemático. Con todo, el hecho de que determinadas condiciones (i.e. cultivo *in vitro* de brotes en medio con agar 'blando') permitan que el meristemo no colapse lo convierte en un mutante intrigante, y no menos el proceso en el que actúa el gen alterado. Por ello, ya hemos iniciado los cruces con *S. pimpinellifolium* a fin de llegar a la identificación del gen alterado. Es muy probable que el conocimiento de la naturaleza del gen aporte pistas sobre el proceso en el que está implicado, lo que nos permitirá interpretar los resultados fenotípicos.

Hemos identificado también 3 mutantes afectados en el desarrollo de la raíz, dos de tomate y uno de *S. pimpinellifolium*. La raíz es el órgano encargado de la absorción de agua y nutrientes así como de dar soporte a la planta proporcionándole un anclaje (Jones & Ljung, 2011). Resultan, por ello, órganos esenciales en suelos pobres donde la disponibilidad de agua y nutrientes es limitada. A lo largo de la evolución, los sistemas radiculares han adquirido caracteres morfológicos deseables así como mecanismos de respuesta rápidos y eficaces, lo que ha permitido que las plantas puedan adaptarse a diferentes tipos de suelos (Lynch, 1995). Así, Cannon (1911) comprobó que las plantas del desierto son capaces de modificar la arquitectura radicular en función de la disponibilidad de agua. En épocas de sequía las plantas desarrollan sistemas radiculares profusos y muy ramificados, mientras que en los periodos de lluvia se transforman en sistemas mucho menos arbustivos. En diferentes ecotipos de *Arabidopsis* se ha observado un aumento del tamaño de la raíz y de los pelos radiculares como respuesta a la carencia de fosfato, lo que le permite a la planta

sobrevivir (Narang *et al.*, 2000). Estos datos llevan a la conclusión de que la distribución espacial del sistema radicular es un carácter de enorme relevancia agronómica ya que puede determinar la productividad de las cosechas en condiciones extremas (de Dorlodot *et al.*, 2007). Por ello, la identificación de genes implicados en el desarrollo radicular cobra un especial interés.

Se sabe que especies afines a *Arabidopsis* desarrollan sistemas radiculares con arquitecturas diferentes. De hecho, en *Arabidopsis* existe variabilidad en la disposición del sistema radicular entre ecotipos. Según Malamy (2005), aunque se desconocen los mecanismos implicados en esta variabilidad, se han identificado QTLs responsables de biomasa, profundidad y capacidad de ramificación de las raíces (Kamoshita *et al.*, 2002a y b; Zhang *et al.*, 2003). Mouchel *et al.* (2004) identificó el primer QTL relacionado con el vigor radicular en la accesión Umkirch-1 de *Arabidopsis*. Se trata de un factor de transcripción, *BREVIS RADIX (BRX)*, que controla el grado de proliferación y diferenciación celular en la zona de crecimiento del ápice radicular. Más recientemente, *BRX* se ha relacionado con la inhibición del inicio del desarrollo de raíces laterales mediada por citoquininas (Li *et al.*, 2009), y con la respuesta a auxinas y su comunicación con la ruta de respuesta a brasinosteroides (Scacchi *et al.*, 2009). Según Beuchat *et al.* (2010), *BRX* también puede modular la tasa de crecimiento de la parte aérea de la planta.

Por otro lado, el desarrollo radicular comprende una serie de eventos que suceden tanto durante la formación del embrión como en etapas postembrionarias y que, en conjunto, conducen a la correcta formación y funcionamiento del sistema radicular de la planta. Los estudios realizados en mutantes de *Arabidopsis* han hecho factible el descubrimiento de genes implicados en el desarrollo radicular. Algunos de los mutantes identificados exhiben alteraciones en el desarrollo de la raíz principal, como es el caso de *shortroot (shr)*, *scarecrow (scr)* y *pinocchio (pic)*, todos ellos identificados a partir de mutantes de inserción, o *wooden leg (wol)*, *goollum (glm)*, *root meristemless (rml)* y *fass (fs)*, identificados a partir de colecciones de EMS. Todos estos mutantes muestran alteraciones en la organización de la raíz primaria, aunque en cada uno de ellos de manera diferente (Scheres *et al.*, 1995). Las raíces primarias de las plantas de fenotipo silvestre contienen una serie de capas simples de células: epidermis, cortex, endodermis y periciclo. En el interior de estas capas se encuentran las células vasculares del protofloema y protoxilema. Por lo que respecta a algunos de los mutantes, *shr* carece de endodermis., *scr* y *pic* tienen un fenotipo similar pero

además no contienen cortex; por su parte, *glm* carece de la organización característica de tejidos vasculares y de periciclo. La ausencia de este tipo de células específicas en los mutantes está relacionada con defectos asociados a divisiones particulares durante la embriogénesis, así como alteraciones relacionadas con la especificación celular. El sistema vascular de las raíces de *wol* tiene pocas células en comparación con el WT. Además, las células vasculares se diferencian en elementos del xilema. Las raíces de *fs* tienen múltiples capas de células corticales, y sus células epidérmicas y del periciclo están presentes como una capa continua. *Rml* es un mutante cuya alteración en el sistema radicular (sus raíces primarias tienen unos 2 mm de longitud) se traduce en un menor tamaño de las distintas partes aéreas de la planta (aunque su fenotipo es normal). Estas alteraciones se deben a una limitada división celular en el meristemo de las raíces primarias (Cheng *et al.*, 1995).

Los mutantes de tomate que hemos identificado en el contexto de esta Tesis, a saber, *tom1456* y *tom1608*, exhiben un fenotipo muy diferente pero parece que tienen alterado el desarrollo de la raíz primaria, lo que repercute en el adecuado desarrollo de la parte aérea. Por lo que respecta a *tom1608*, los resultados sugieren alteraciones en el desarrollo de los meristemos radiculares. Tanto las raíces de las plántulas como las adventicias que se forman en los brotes que enraízan en medio de clonación son de mayor grosor, aunque de menor longitud, que las de las plantas WT y, lo que es más importante, carecen de raíces secundarias. Es decir, la mutación promueve el desarrollo de raíces aberrantes que tienen una capacidad limitada para crecer en longitud y que no son capaces de desarrollar raíces laterales. La ausencia de raíces laterales podría explicar que las plantas terminen muriendo porque el sistema radicular aberrante que se forma en el mutante es posible que no tenga capacidad para nutrir a la parte aérea. Además, las plantas mutantes exhiben menor capacidad morfogénica, es decir, menor capacidad para desarrollar estructuras meristemáticas adventicias, a partir de explantes de cotiledón. Los análisis de cosegregación parecen indicar que el mutante no es insercional, aunque actualmente estamos realizando nuevos experimentos para corroborar este resultado. Por lo que respecta *tom1456*, tanto la raíz principal como las laterales que se desarrollan a partir de ésta son de escasa longitud. Las raíces adventicias que se forman en los brotes que enraízan en medio de clonación son también de escasa longitud y de morfología aberrante. Estos resultados también sugieren alteraciones en el desarrollo meristemático. Sin embargo, al cultivar explantes de cotiledón e hipocotilo en medio

organogénico observamos un resultado inesperado. Los explantes de cotiledón tenían prácticamente inhibida la formación de callo y el escaso crecimiento a partir de las zonas de corte era de tipo friable. En el medio organogénico (i.e. con suplemento de citoquininas), los explantes de hipocotilo emitieron raíces completamente normales, similares a las que se desarrollan a partir de un brote WT cuando se cultiva en medio de clonación (i.e. con suplemento de auxinas). Este resultado sugiere alteraciones en los niveles endógenos de hormonas.

De hecho, las auxinas son reguladores esenciales para el desarrollo de las raíces laterales. Se ha comprobado que el número de raíces laterales se encuentra alterado en mutantes que tienen afectado el metabolismo de las auxinas (Boerjan *et al.*, 1995; Celenza *et al.*, 1995; Delarue *et al.*, 1998; King *et al.*, 1995), su transporte (Marchant *et al.*, 2002), o su señalización (Hobbie & Estelle, 1995; Leyser *et al.*, 1996). Por ejemplo, la mutación *rooty* ocasiona un incremento de la síntesis de ácido indol-acético (IAA), promoviendo un dramático aumento del desarrollo de raíces laterales (Boerjan *et al.*, 1995; Celenza *et al.*, 1995; King *et al.*, 1995). Asimismo, el mutante *slr-1* (*solitary-root*), afectado en un gen tipo Aux-IAA, no muestra alteraciones en la raíz primaria pero tiene bloqueada la formación de raíces laterales desde los primeros estadios (Fukaki *et al.*, 2002). Así, no se puede descartar que la mutación en *tom1456* afecte al balance hormonal, toda vez que el cultivo de explantes de hipocotilo en un medio con elevada concentración de citoquininas, donde normalmente no se deben desarrollar raíces, promueve que se formen raíces completamente normales. Es posible que la mutación esté alterando el equilibrio de varias hormonas y que éste sólo se restablezca en determinadas condiciones de cultivo (e.g. elevadas concentraciones de citoquininas). En el momento actual estamos investigando en esta dirección.

Por otro lado, los análisis genéticos no descartan la posibilidad de que uno de los insertos funcionales sea el responsable del fenotipo mutante. Como parece que la línea de partida (TG1) tiene 2 o más copias de T-DNA funcional, hemos iniciado ya el cruce con el parental silvestre para separarlas e identificar el inserto responsable de la mutación, lo que permitirá saber si, como parece, el gen alterado está implicado en alguna ruta de síntesis, transporte o señalización de hormonas.

Además de estos dos mutantes de tomate, hemos identificado otro de *S. pimpinellifolium* (*pim15*) que parece tener afectada la actividad del meristemo

radicular. Al igual que en el mutante de tomate *tom1608*, los explantes de cotiledón de las plántulas mutantes de *pim15* exhiben escasa respuesta morfogénica. Sin embargo, a diferencia del de tomate, los brotes de las plantas mutantes desarrollan con el tiempo raíces normales en un medio de clonación, lo que posibilita el desarrollo de una planta axénica. Lo más interesante es que el mutante *pim15* es insercional y el gen responsable del fenotipo ha sido ya clonado por el grupo del Dr. Lozano (UAL-Almería).

El escrutinio *in vitro* también nos ha permitido identificar algunos mutantes que exhiben alteraciones en otros aspectos del desarrollo vegetativo. Así, las alteraciones del mutante de tomate *tom1425* parecen deberse a un desarrollo asincrónico de las células, lo que conduce a un crecimiento zigzagueante o en “espiral”. Curiosamente, este tipo de crecimiento no sólo se ha observado en estructuras vegetativas sino que también se ha visto en estructuras reproductivas (i.e. estambres de la flor). En *Arabidopsis* se han identificado algunos mutantes que exhiben un crecimiento en espiral consecuencia de alteraciones en la organización del citoesqueleto. Este es el caso de las mutaciones recesivas *spiral1* (*spr1*) y *spiral2* (*spr2*), que exhiben un crecimiento en espiral de tipo dextrógiro (Furutani *et al.*, 2000). El escrutinio de mutaciones supresoras del fenotipo *spiral1* permitió identificar las mutaciones *lefty1* y *lefty2*, que exhiben un crecimiento en espiral pero en este caso de tipo levógiro (Thitamadee *et al.*, 2002). *LEFTY1* y *LEFTY2* codifican dos α -tubulinas homólogas, *TUA6* y *TUA4*, que forman dímeros con las β -tubulinas, contribuyendo a la estabilización de los microtúbulos. Los mutantes *eli* (*ectopic lignification*) también exhiben una cierta torsión de los tallos consecuencia de la expansión reducida de todas sus células. Caño-Delgado *et al.* (2000) observaron que en estos mutantes las células del xilema eran deformes, provocando la desorganización de los haces vasculares y, por ende, el torcimiento de los tallos. Los autores comprobaron que *ELI1* se expresa durante la etapa de elongación celular, tanto en la raíz primaria como en otros tejidos. En el mutante *fra2* (*fragile fiber2*) también se observan alteraciones morfológicas en las estructuras vegetativas. Burk *et al.* (2001) reportaron que *fra2* es responsable de que las fibras celulares sean más cortas, del menor espesor de la pared celular, del menor contenido de celulosa y hemicelulosa, y del aumento de condensación de lignina. Así, el fenotipo de *fra2* es el resultado de alteraciones tanto en la elongación de las fibras celulares como en la biosíntesis de la pared celular. *FRA2* codifica una proteína similar a la katanina que interacciona con los microtúbulos corticales y contribuye a su estabilización (Burk *et al.*, 2001). El uso

de diferentes estrategias genéticas para identificar factores de organización de microtúbulos en *Arabidopsis* permitió el aislamiento de diferentes alelos del gen *MOR1* (*MICROTUBULE ORGANIZATION 1*). Mutaciones en este gen promueven enanismo, compacidad de la roseta y enrollamiento en espiral de algunos órganos radiales, como por ejemplo las raíces, lo que sugiere que *MOR1* es esencial para la organización de los microtúbulos corticales que regulan propiedades de expansión de las células vegetales (Whittington *et al.*, 2001). El mutante *ton2* tiene alterado los microtúbulos corticales del citoesqueleto. Estas alteraciones afectan a la mitosis y a la forma y disposición de las células, lo que tiene consecuencias sobre la morfología de las plantas (Camilleri *et al.*, 2002). *TON2* codifica para la subunidad reguladora B' de una fosfatasa de tipo 2A (PP2A B') que participa en el control de la organización del citoesqueleto. Los fenotipos de estos mutantes de *Arabidopsis* nos hacen pensar que la mutación *tom1425* está relacionada con los microtúbulos. Que nosotros sepamos, no existe ningún mutante de tomate similar, por lo que en el laboratorio se han iniciado los cruces con *S. pimpinellifolium* para la clonación del gen alterado, toda vez que en este caso la mutación podría ser somaclonal.

El mutante *pim93* de *S. pimpinellifolium* también exhibe dramáticas alteraciones en el desarrollo vegetativo. Las plántulas de *pim93* son más compactas, tienen un hipocotilo de menor longitud aunque de mayor diámetro y sus hojas son de menor tamaño y mayor grosor. El fenotipo también se refleja en los caracteres reproductivos, puesto que el mutante desarrolla inflorescencias más compactas y con menor número de flores más pequeñas, oblongas e infértiles. Este fenotipo podría deberse a alteraciones en genes implicados en la síntesis, regulación o percepción de las giberelinas o brasinosteroides. Se sabe que las giberelinas desempeñan un papel muy importante en aspectos relacionados con la expansión de las hojas, el desarrollo de la flor, el cuajado del fruto y la germinación de las semillas (Hedden & Kamiya, 1997). Los mutantes deficientes en giberelinas tienden a ser más pequeños debido a una reducción de la longitud del tallo. En el caso contrario, los mutantes con incrementos en los niveles endógenos de giberelinas tienen tallos más largos y delgados (Richards *et al.*, 2001; Sakamoto *et al.*, 2004). En tomate se observó que la alteración de la expresión de genes implicados en la síntesis de giberelinas modifica la arquitectura de la planta. Por ejemplo, Xiao *et al.* (2006) comprobaron que la anulación de función del gen *GA 20-oxidasa* (un importante regulador de la ruta

de biosíntesis de giberelinas) en plantas transgénicas de tomate daba lugar a fenotipos de menor tamaño y con menor longitud internodal.

Los niveles endógenos de giberelinas también se pueden alterar a través de modificaciones genéticas de las proteínas DELLA. Los estudios de genética molecular efectuados en *Arabidopsis* han contribuido a esclarecer la ruta de transducción de señales de DELLA. De acuerdo con el modelo propuesto en *Arabidopsis*, la respuesta a giberelinas se encuentra bajo el control negativo de una familia de proteínas DELLA, denominadas RGA, GAI, RGL1, RGL2 y RGL3 (Peng *et al.*, 1997; Dill & Sun, 2001; Lee *et al.*, 2002; Wen & Chang, 2002). El alelo semidominante tipo GAI *gai-1*, que codifica una proteína de ganancia de función (*Atgai^{del}*), carece del motivo de degradación DELLA. De esta forma, los mutantes de *Arabidopsis gai-1* tienen activada la ruta DELLA de manera constitutiva y son parcialmente insensibles a giberelinas (Peng *et al.*, 1997). Martí *et al.* (2007) transformaron tomate con *Atgai^{del}* y con una construcción antisentido de un gen DELLA de tomate. En las plantas transgénicas con *Atgai^{del}* había una ramificación abundante y una reducción de su tamaño, lo que hacía que las plantas exhibieran una estructura de tipo compacta, mientras que las plantas de anulación de función de DELLA eran muy altas y tenían tallos delgados. Martí *et al.* (2007) fenocopiaron estos mismos fenotipos aplicando de forma exógena a los parentales silvestres ácido giberélico (fenotipo similar al de plantas transgénicas de anulación de función de DELLA) y pacobutrazol (fenotipo similar al de plantas transgénicas con *Atgai^{del}*). Bassel *et al.* (2008) demostraron que el mutante *procera*, que exhibe un fenotipo de respuesta constitutiva de giberelinas, es un mutante nulo para DELLA. Las plantas de fenotipo *procera* son más desgarradas, más altas, con tallos más finos y hojas con lóbulos menos pronunciados que las de fenotipo silvestre (Stubbe, 1957; Jones, 1987; Jupe *et al.*, 1988; Van Tuinen *et al.*, 1999).

Por otro lado, los brasinosteroides (BRs) desempeñan un papel clave en el desarrollo de las plantas, participando en procesos de expansión, división y diferenciación celular de los tejidos jóvenes. Muchos mutantes deficientes en las rutas de señalización o biosíntesis de BRs exhiben enanismo o mayor compacidad (Altmann, 1999; Yokota, 1997; Fujioka & Yokota, 2003). En tomate, mutaciones en los *loci Dwarf (D)* y *Dumpy (Dpy)* ocasionan deficiencia biosintética de BR y generan fenotipos de baja estatura, reducida ramificación axilar y morfología alterada de la hoja (Bishop *et al.*, 1999; Koka *et al.*, 2000). Asimismo,

mutaciones en el *locus Curl3* de *S. pimpinellifolium* afectan a la señalización de BR provocando enanismo extremo, alteración de la morfología de la hoja y reducción de la fertilidad (Koka *et al.*, 2000; Montoya *et al.*, 2002). En definitiva, no se puede descartar que el mutante *pim93* tenga alterados los niveles de giberelinas o brasinosteroides.

Siguiendo con mutaciones que afectan a caracteres relacionados con el desarrollo vegetativo, hemos identificado una línea de *S. cheesmaniae* (*ch47*) en la que se detectaron dos fenotipos que se encuentran en una situación de epistasia simple recesiva. El fenotipo hipostático parece estar relacionado con menor desarrollo radicular y, en este sentido, se podría incluir entre los mutantes que exhiben este tipo de alteración. Más concretamente, podría estar relacionado con alteraciones en la actividad meristemática ya que, al igual que los otros mutantes afectados en el desarrollo radicular, exhibe una escasa respuesta morfogénica en el medio organogénico (no comentado en el apartado de resultados). Respecto al mutante epistático, manifiesta una intensa necrosis o senescencia prematura a partir del momento en el que se inicia la expansión de los cotiledones, lo que provoca su muerte repentina. Que nosotros sepamos, no se han descrito mutantes de tomate con alteraciones en procesos de senescencia, y tampoco en especies silvestres afines. En *Arabidopsis*, sin embargo, sí que existen algunos mutantes de este tipo. Los procesos de senescencia asociados al mutante *hypersenescence1* (*hys1*) están relacionados con desequilibrios en las rutas de señalización de azúcares (Yoshida *et al.*, 2002). También se sabe que la expresión del gen *AtNAP*, que codifica un factor de transcripción de la familia NAC, está estrechamente relacionada con los procesos de senescencia de las hojas en roseta de *Arabidopsis*. En este sentido, la sobreexpresión inducible del gen ocasionó senescencia precoz (Guo & Gan, 2006). Los autores sugieren que genes homólogos en otras plantas podrían desempeñar funciones similares. También se ha podido comprobar que las proteínas kinasas, en concreto las kinasas tipo receptores asociadas a membranas (RLKs), están implicadas en procesos de senescencia (Hajouj *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2006).

Hemos identificado 3 mutantes de tomate con defectos en el desarrollo del meristemo apical. El meristemo apical (SAM) es un pequeño domo de células indiferenciadas responsable de la arquitectura de la parte aérea de la planta. El SAM se caracteriza por un equilibrio entre la organogénesis (diferenciación) y el

mantenimiento de la actividad meristemática (división). Estudios en *Arabidopsis* han revelado que para la normal actividad del SAM debe funcionar un circuito dinámico de retroalimentación entre los genes *CLAVATA* y *WUSCHEL*. Asimismo, para la adecuada formación del SAM se requiere de la actividad del gen *SHOOT MERISTEMLESS (STM)*. Estos genes se descubrieron en la década de los 90 a partir de mutantes de *Arabidopsis*. En los mutantes *stm (shoot meristemless)* se encuentra inhibida la formación del meristemo caulinar primario (Barton & Poethig, 1993). Se ha reportado que el efecto fenotípico de estas mutaciones se restringe al meristemo caulinar ya que el mutante exhibe un desarrollo normal de la raíz (Clark *et al.*, 1996). La expresión de *STM* se detecta en estadios embrionarios tempranos (embrión globular) en las células que darán lugar al meristemo caulinar, y persiste tras la germinación, lo que sugiere que la actividad de *STM* se requiere no sólo para la formación sino también para el mantenimiento de la actividad del meristemo (Barton & Poethig, 1993). Los mutantes *wus (wuschel)* también exhiben defectos en el desarrollo del meristemo apical. Según Laux *et al.* (1996), el gen *WUSCHEL* cumple un importante papel en el mantenimiento estructural y funcional del meristemo, y se requiere para dotar de identidad a la región central del meristemo. Los mutantes *clv (clavata)* tienen meristemas ampliados respecto a los del fenotipo silvestre (Clark *et al.*, 1993; Clark *et al.*, 1995; Kayes & Clark, 1998). Se han clonado 3 genes *CLAVATA*, a saber, *CLV1* (Clark *et al.*, 1993), *CLV2* (Kayes & Clark, 1998) y *CLV3* (Clark *et al.*, 1995), que tienen restringida su expresión en el meristemo caulinar. La mutación en alguno de estos 3 genes *CLV* afectan al tamaño de los meristemas vegetativo, inflorescente y floral, siendo la mutación en *CLV2* la que menor efecto fenotípico promueve (Kayes & Clark, 1998).

Además de estos 3 genes, esenciales para la formación y el mantenimiento del SAM, se han identificado otros que intervienen en la actividad meristemática. Así, la mutación *forever young (fey)* afecta al mantenimiento del meristemo y al posicionamiento de la hoja. En este mutante, el desarrollo de los primordios de hoja se inicia en posiciones anormales (Callos *et al.*, 1994). Las anomalías observadas en los meristemas, células desorganizadas o el SAM aplanado, conducen a la muerte de la mayor parte de plantas mutantes *fey* antes de concluir el desarrollo vegetativo. Además, las plantas mutantes que alcanzan el desarrollo reproductivo son infértiles. La clonación del gen *FEY* ha permitido determinar que codifica una oxidoreductasa y su función en el meristemo podría estar relacionada con la modificación de algún factor que regula el desarrollo

meristemático (Callos *et al.*, 1994). Parsons *et al.* (2000) describieron el mutante *schizoid* (*shz*), que presenta una alteración que afecta al desarrollo meristemático pero no a la formación *de novo* de órganos laterales (i.e. brotes axilares). Curiosamente, el fenotipo de las plantas mutantes *sch* es dependiente de las condiciones medioambientales, más concretamente de la temperatura. A 16-18° C, las plantas mutantes muestran fenotipos más sutiles mientras que a 25° C los fenotipos son más extremos. Según Parsons *et al.* (2000), *SHZ* es un gen pleitrópico ubicado en el cromosoma 4 que desempeña un papel en la división y diferenciación celular así como en el mantenimiento del meristemo. Que nosotros sepamos, el gen aún no se ha clonado. *PINHEAD* (*PNH*) es otro gen clave en el desarrollo meristemático. Mutaciones en el *locus PNH* impiden la formación de un meristemo caulinar funcional a partir de las etapas embriogénicas (McConnel & Barton, 1995). Sin embargo, los defectos en el SAM que exhiben los mutantes *pnh* son variables ya que algunos individuos mutantes son capaces de desarrollar meristemas funcionales. La habilidad para que algunos mutantes *pnh* desarrollen meristemas funcionales se debe a la acción de un gen redundante, *ARGONAUTE1* (*AGO1*), que suple la ausencia de *PNH* (Lynn *et al.*, 1999). Además, *PNH* se requiere para la adecuada formación de los meristemas axilares en las etapas post-embriogénicas, lo que es consistente con el patrón de expresión del gen en los dominios axilares de la región adaxial de la hoja.

Nosotros hemos centrado nuestra atención en un insólito mutante de tomate, *tom1310*, que exhibe defectos en el meristemo apical al inicio del desarrollo de la plántula, concretamente a partir del momento de la expansión de los cotiledones. En concreto, tras la expansión de los cotiledones, en la zona en la que debería encontrarse el ápice meristemático se produce un crecimiento de células que origina una especie de callosidad, a partir de la cual se forman estructuras que parecen hojas alteradas o teratomas. Curiosamente, cuando esos ápices se transfieren a un medio de clonación se puede recuperar el fenotipo silvestre sobre la base del desarrollo de yemas adventicias que surgen de la región axilar de los cotiledones. Lo interesante es que, a partir de ese momento, el nuevo ápice meristemático de la planta mutante no vuelve a exhibir ningún tipo de alteración a lo largo del tiempo ni en sucesivas rondas de clonación. Sin embargo, las progenies de esas plantas recuperadas (i.e. con fenotipo WT) vuelven a exhibir de manera consistente el fenotipo mutante. Que nosotros sepamos, no se ha identificado por el momento ningún fenotipo mutante que cumpla con estas características, lo que podría representar la identificación de un nuevo gen

implicado en la funcionalidad meristemática durante los primeros estadios de desarrollo de la plántula. Con tal fin, estamos intentando identificar el gen alterado mediante técnicas de mapeo, después de comprobar que la mutación podría ser de tipo somaclonal.

El mutante *tom2142* ha sido el último de los del tipo Vitro-Dev que hemos identificado en el escrutinio *in vitro* de líneas T-DNA de tomate. Lo que hemos visto hasta la fecha es que se trata de un mutante que probablemente exhiba un porte frágil a tenor del fenotipo que hemos visto en estadio de plántula. En concreto, se ha visto que el hipocotilo de las plántulas mutantes es de menor longitud y sensiblemente más delgado, que los cotiledones son más pequeños y que en ellos aparecen manchas necróticas similares a las que aparecen en las hojas de plantas que sufren ataques por determinados patógenos (e.g. hongos).

Como respuesta al ataque de patógenos, las plantas han desarrollado complejos mecanismos de señalización y de defensa para protegerse. Una de las más eficientes e inmediatas es la respuesta hipersensible (HR), que se caracteriza por la rápida muerte de las células que se encuentran directamente en contacto o cerca del patógeno. Se ha dedicado mucho esfuerzo en identificar los genes implicados en el control y la ejecución de la muerte celular en la HR. Con este fin se identificaron los mutantes lesionados o LMM (*Lesion Mimic Mutants*) que mimetizan las lesiones inducidas por patógenos (Dietrich *et al.*, 1994; Lorrain *et al.*, 2003). Se trata de líneas mutantes en las que la muerte celular se encuentra desregulada.

Los LMM muestran diferentes fenotipos en función del momento o las condiciones de aparición de la lesión, así como el color y el tamaño de las lesiones. Estos mutantes se pueden clasificar en dos grupos: los mutantes de iniciación, que exhiben manchas necróticas de un tamaño determinado, y los mutantes de retroalimentación o propagación, que son incapaces de controlar la velocidad y extensión de las lesiones (Walbot *et al.*, 1993). Esta clasificación se basa en la suposición de que existen dos mecanismos diferentes implicados en el control de la muerte celular: una vía para la iniciación de la muerte celular programada (PCD) y un mecanismo para supresión de la PCD. En la mayoría de los casos, la aparición de lesiones va acompañada por la expresión constitutiva de marcadores asociados con la infección por patógenos, como por ejemplo la acumulación de compuestos fenólicos, la deposición de callosa, la producción de reactivos intermediarios de oxígeno (ROI), la expresión constitutiva de genes

marcadores de defensa y la producción de niveles elevados de ácido salicílico (Lorrain *et al.*, 2003).

A partir de mutantes LMM se han identificado genes implicados en la respuesta hipersensible. Así, los mutantes *sid2* (*salicylic acid induction deficient2*) y *eds16* (*enhanced disease susceptibility16*) tienen alterada la biosíntesis de ácido salicílico (AS) y son más susceptibles a patógenos. Conviene resaltar que, pese a la diferente denominación, ambos mutantes son alélicos. Estos mutantes permitieron descubrir el papel de la isocorismato sintasa, codificada por el gen *SID2*, en la biosíntesis de AS estimulada por patógenos (Wildermuth *et al.*, 2001). La identificación del mutante *npr1* (*non expresser of PR genes1*), incapaz de activar la expresión de genes PR (proteínas relacionadas con patógenos), permitió descubrir el papel esencial desempeñado por *NPR1* en una vía de señalización independiente del AS (Shah, 2003; Dong, 2004). Por lo que respecta a nuestro mutante (i.e. *tom2142*), en breve procederemos a cultivarlo en el invernadero para llevar a cabo una caracterización fenotípica exhaustiva.

5.4. Detección *in vitro* de mutaciones que promueven mayor sensibilidad a salinidad

Uno de los principales objetivos de esta Tesis Doctoral ha sido la identificación de mutantes afectados en el grado de tolerancia a la salinidad. Tras el escrutinio de más de 1850 líneas de T-DNA se han identificado 3 mutantes recesivos de tomate más sensibles a estrés salino, a saber, *tom1303*, *tom1560* y *pms-916* (*protecting meristems against salinity-916*).

Como se ha comentado en un apartado anterior, uno de los requisitos que debía cumplir un mutante afectado por el estrés salino es que las plantas de fenotipo no manifestaran alteración alguna en ausencia de sal. De hecho, hemos comprobado que en ausencia de estrés salino los tres mutantes exhiben un desarrollo normal, lo que indica que el *locus* alterado en cada uno de los mutantes no es esencial para el normal crecimiento y desarrollo de la planta pero sí es requerido para la tolerancia al estrés salino. Además, en los tres casos, a partir de las plántulas mutantes que *in vitro* muestran los síntomas de hipersensibilidad a la sal, se puede recuperar el fenotipo silvestre transfiriendo los ápices a medio de clonación sin sal. Por otro lado, a la hora de valorar la idoneidad del método de evaluación *in vitro* que hemos utilizado, otro de los requisitos fue que el fenotipo *in vivo* debía ser reminiscente del observado *in vitro*. Las evidencias que se

presentan en esta memoria indican que en los tres mutantes la respuesta hipersensible *in vitro* e *in vivo* es básicamente la misma, lo que indica que la metodología empleada es válida para identificar mutantes más sensibles a la salinidad.

Se han realizado varios experimentos con las líneas segregantes en diferentes condiciones de cultivo y en todos los casos la segregación WT : M se aproxima a 3:1, lo que indica que los fenotipos están ocasionados por mutaciones nucleares en un simple *locus*. Además, los diferentes fenotipos de sensibilidad a la salinidad en los tres mutantes sugieren la identificación de tres *loci* distintos y necesarios para la tolerancia a la salinidad en tomate.

Así, el mutante *tom1303* manifiesta síntomas severos de clorosis en condiciones de estrés salino. Las evaluaciones que hemos realizado tanto *in vitro* como *in vivo* indican que el fenotipo mutante se visualiza relativamente tarde. *In vitro*, el fenotipo mutante se detecta con facilidad pero no antes de los 20-25 días de cultivo en medio suplementado con sal, mientras que *in vivo* la clorosis se empieza a vislumbrar a los 26-30 días de tratamiento salino. Nuestra hipótesis es que en condiciones salinas, la parte aérea de las plantas mutantes se va intoxicando progresivamente por la acumulación de iones, lo que concluye finalmente con el colapso de las plantas. En *tom1560* el fenotipo hipersensible aparece antes. Las plántulas que se desarrollan *in vitro* en un medio de cultivo básico suplementado con NaCl tienen engrosados diferentes órganos (i.e. hipocotilo, cotiledones y hojas) y exhiben un alto grado de clorosis. Este fenotipo se observa a lo largo de los primeros estadios de desarrollo de la plántula, desde el momento en el que se expanden los cotiledones y las raíces comienzan a nutrirse del medio de cultivo con NaCl. Cuando se cultivan las plántulas en invernadero en condiciones de estrés salino, el fenotipo es idéntico aunque el grado de clorosis es mayor. De nuevo, los síntomas de intensa clorosis se detectan a los pocos días de iniciar el tratamiento salino. El mutante *pms-916* exhibe una extrema sensibilidad a la salinidad. Las plántulas del mutante exhiben un engrosamiento del hipocotilo y la inhibición del desarrollo de la parte aérea. En concreto, las primeras hojas verdaderas no se expanden, muestran síntomas severos de marchitamiento y el ápice meristemático sufre un rápido colapso que conduce a la muerte de la plántula. Este fenotipo de hipersensibilidad también se detecta rápido, a lo largo de los primeros estadios de desarrollo de la plántula, es decir, después de la expansión de los cotiledones. De forma similar, cuando las

plantas mutantes se cultivan en el invernadero el fenotipo de las plantas sometidas a sal es el mismo que el que se observa *in vitro* y aparece a los pocos días del inicio del tratamiento salino.

Los mutantes de tomate *tss1* y *tss2* (Borsani et al., 2001) exhiben una respuesta distinta en relación con el número de días que transcurren desde el inicio del tratamiento salino hasta que aparece el fenotipo de sensibilidad a la salinidad. Las plantas mutantes *tss1* exhiben el fenotipo hipersensible a las 24 horas de iniciar el tratamiento salino (250 mM de NaCl) mientras que en *tss2* no se observan diferencias claras entre el mutante y el WT a lo largo de los primeros 11 días de tratamiento. Según Borsani et al. (2001), el mutante *tss1* es sensible al efecto específico de la salinidad, es decir, a la componente iónica mientras que *tss2* es además sensible a la componente osmótica. Según los autores, el *locus TSS1* se requiere para la nutrición de K^+ ya que los mutantes *tss1* no son capaces de crecer en un medio con bajas concentraciones de K^+ , mientras que *tss2* se comportó igual que el testigo en medios con bajas concentraciones de potasio. Las medidas de potencial de membrana dependiente de potasio indicaron que la entrada de K^+ se encontraba alterada en el mutante *tss1* pero no en *tss2*. Teniendo en cuenta que el potasio es uno de los cationes más importantes en la nutrición de las plantas, la alteración de sistemas selectivos de transporte de potasio en plantas que limitan la entrada de iones tóxicos (i.e. Na^+) en condiciones adversas podría promover fenotipos en los que la hipersensibilidad se detecta en un periodo de tiempo menor. *A priori*, sobre la base de los resultados de Borsani et al. (2001), se podría pensar que el *locus TSS1* es más determinante para la tolerancia de tomate que el *locus TSS2*, a pesar de que la ausencia de éste último confiere también sensibilidad a estrés osmótico.

Es posible que los *loci* alterados en los mutantes *tom1560* y *pms-916* sean más determinantes para la tolerancia a la salinidad en tomate que el alterado en *tom1303* ya que la respuesta hipersensible aparece antes. En *tom1303*, los resultados de las evaluaciones parecen indicar que las plantas mutantes se van intoxicando poco a poco por el efecto de la acumulación de Na^+ en las hojas, tanto las adultas como las más jóvenes. Es posible que en este mutante se encuentre alterado algún sistema selectivo de transporte que limite la acumulación de Na^+ en las células. Al igual que ocurre en *tom1303*, el mutante *tom1560* manifiesta síntomas severos de clorosis en condiciones de estrés salino, pero la diferencia es que los síntomas de acumulación de Na^+ en hoja son

inmediatos. Teniendo en cuenta que la clorosis foliar es una de las respuestas características que definen una mayor sensibilidad como consecuencia de los efectos tóxicos que ocasiona el Na^+ a nivel celular, los síntomas tan precoces de clorosis foliar exhibidos por el mutante *tom1560* (tanto *in vitro* como *in vivo*) podrían ser interpretados como una alteración en los mecanismos de transporte de Na^+ a través de diferentes tejidos de la planta (tanto jóvenes como adultos) y de entrada a la célula. Además, el mutante *tom1560* exhibe, junto con los síntomas de clorosis, un fenotipo de hiperhidratación que es más evidente en cultivo *in vitro* que en invernadero. La mayor hiperhidratación debe estar asociada a la mayor entrada de agua al interior de la célula, lo que sugiere que los mecanismos que limitan la entrada de agua junto con los iones tóxicos en condiciones de estrés salino no funcionan en este mutante. Aún nos encontramos en una etapa preliminar en la caracterización de este mutante ya que queremos analizar una serie de caracteres que podrían estar alterados y que podrían ser responsables del fenotipo. Por ejemplo, la mayor hiperhidratación, es decir, la mayor entrada de agua en la planta, podría estar relacionada con mayores tasas de transpiración que, a su vez, podrían deberse a alteraciones en los sistemas de apertura y cierre de los estomas. De esta forma, si los sistemas de transporte raíz-parte aérea se encuentran alterados (i.e. no hay restricción para entrada de Na^+ en la célula) y los sistemas de transpiración están continuamente activos, la planta se intoxicaría rápidamente como consecuencia de la continua entrada de agua que, al llevar iones tóxicos, provocaría la acumulación de Na^+ en la célula. Alternativamente, la entrada descontrolada de agua, junto con iones tóxicos, podría deberse a alteraciones en los sistemas de absorción por parte de la raíz del mutante. En definitiva, queremos ver cómo se encuentran los estomas en ausencia y presencia de estrés, analizar la conductancia estomática y las tasas de transpiración, ver qué ocurre cuando se realizan injertos del mutante sobre un patrón silvestre (y viceversa), así como determinar los niveles de Na^+ y K^+ en diferentes tejidos de la planta. Es posible que estos experimentos y otros análisis en los que se determinen los niveles de expresión de genes presuntamente implicados en el proceso (e.g. genes *SOS*, *HKTs*, *HAK5* etc.) nos permitan clarificar la causa del fenotipo hipersensible.

Por otro lado, el fenotipo hipersensible del mutante *pms-916* sugiere que el gen alterado desempeña un papel esencial en la protección de las zonas meristemáticas de la planta en condiciones de estrés salino. El método para evaluar *in vitro* el efecto de la salinidad sobre las plántulas se diseñó para que

éstas percibieran la sal desde el momento en el que empiezan a nutrirse del medio de cultivo, antes de iniciar el desarrollo de las primeras hojas verdaderas. Así, en medio suplementado con NaCl, las plántulas mutantes de *pms-916* exhiben colapso apical y engrosamiento del hipocotilo. En estas condiciones de cultivo *in vitro*, el mutante es incapaz de desarrollar hojas verdaderas normales incluso a bajas concentraciones de NaCl (i.e. 75 mM de NaCl). Es decir, a diferencia de lo que ocurre en las plántulas WT, capaces de desarrollar hojas normales en condiciones salinas, las primeras hojas de las plantas mutantes son muy pequeñas, con malformaciones y arrugadas, y por algunas zonas parece como si estuvieran quemadas (manchas necróticas). Además, las plántulas mutantes no son capaces de desarrollar raíces laterales en condiciones salinas. Todas estas razones inducen a pensar que las regiones meristemáticas del mutante se encuentran seriamente alteradas en condiciones salinas.

El papel que debe desempeñar el gen alterado en este mutante se vislumbra más claramente cuando el tratamiento salino se inicia después de que las plantas hayan desarrollado hojas verdaderas. En invernadero, el tratamiento se realiza cuando las plantas han desarrollado tres hojas verdaderas. Hasta ese momento, las plantas mutantes vegetan de forma similar a como lo hacen las plantas WT. Sin embargo, a los pocos días del inicio del tratamiento salino (i.e. a los 10 días), las hojas más jóvenes comienzan a manifestar una intensa clorosis en los bordes, lo que no se ve en las hojas más adultas. Además, empieza a ser visible tanto la alteración en el ápice meristemático como el engrosamiento del tallo en la región cercana al ápice. Con el tiempo, el ápice meristemático colapsa y las hojas más jóvenes de las plantas exhiben una intensa marchitez, a diferencia de las adultas que parecen no haber sido prácticamente afectadas por el tratamiento salino. Esto contrasta con lo que se observa en las plantas WT, en las que las hojas más afectadas (i.e. cloróticas o senescentes) son las más adultas y las que menos han sufrido los efectos de la sal son las más jóvenes, es decir, las más cercanas al ápice meristemático. Además, la observación del sistema radicular indica que el desarrollo de raíces laterales del mutante es significativamente menor que el del WT. Estos resultados sugieren que las plantas mutantes no son capaces de proteger las regiones de crecimiento activo del efecto de la sal, de manera que el Na⁺ parece que alcanza rápidamente las regiones meristemáticas de la planta e intoxica con severidad las hojas en desarrollo. Por el contrario, en las plantas WT el Na⁺ se acumula en las hojas más adultas o en el tallo para que, de esa forma, no alcance a las zonas en crecimiento activo. Además, la salinidad altera el

desarrollo radicular de *pms-916* sobre la base de una menor formación de raíces laterales, lo que sugiere que también afecta al desarrollo de los meristemas radiculares, si bien aún no sabemos si esto es una causa de la ausencia de expresión del gen mutado, o una consecuencia de los efectos que la salinidad tiene sobre la región meristemática de la parte aérea, desde el momento en el que se produce la detención del crecimiento de la planta y el desarrollo de nuevas estructuras vegetativas.

Recientemente se ha descubierto en arroz un gen implicado en la viabilidad del meristemo en condiciones salinas, así como en otros tipos de estrés. Se trata del gen *RSS1*, que tiene un papel crítico en la tolerancia a diferentes tipos de estrés, y su expresión se relaciona con el vigor y la viabilidad de las células meristemáticas bajo condiciones salinas (Ogawa *et al.*, 2011). Más concretamente, se ha descrito como un factor clave en el mantenimiento de la actividad meristemática asegurando la división celular en condiciones de estrés. *RSS1* se expresa preferentemente en células en división e interactúa con la proteína fosfatasa 1 (PP1) implicada en la regulación de muchos procesos celulares, entre los que se incluye el ciclo de división celular. Ogawa *et al.* (2011) observaron que el mutante *rss1*, que no exhibía alteraciones fenotípicas en condiciones normales de crecimiento, era extremadamente compacto y desarrollaba raíces de escasa longitud en condiciones salinas. Esto ocurría porque en condiciones salinas se producía una disminución de la zona meristemática y de la zona de elongación. Según Ogawa *et al.* (2011), el fenotipo de hipersensibilidad no se debe a una sobrecarga de Na^+ consecuencia de la exposición a altas concentraciones de sal, ya que las proporciones K^+/Na^+ en el mutante y en el WT en esas condiciones eran similares. En definitiva *RSS1* protege la actividad meristemática asegurando la división celular en condiciones de estrés en contraste con lo que parece que ocurre con el gen *PMS* (*PROTECTING MERISTEMS AGAINST SALINITY*), cuya implicación en la protección de la actividad meristemática parece estar relacionada con la limitación de la acumulación de Na^+ en el meristemo apical y en las hojas jóvenes. Además, según Ogawa *et al.* (2011), *RSS1* protege la actividad meristemática frente a cualquier condición de estrés (i.e. déficit hídrico, frío, altas temperaturas o salinidad) mientras que *PMS* parece que ejerce su función en condiciones específicas de salinidad, más concretamente protegiendo la actividad meristemática de la componente iónica del estrés salino.

Los análisis genéticos en progenies TG3 del mutante *pms-916* hicieron factible la identificación de una línea de simple copia de T-DNA en la que el inserto cosegregaba con el fenotipo mutante. Ello ha permitido la clonación del gen *PMS* mediante técnicas de Anchor-PCR en el laboratorio del Dr. Lozano (UAL- Almería), así como su análisis funcional. La caracterización de líneas con el gen *PMS* silenciado ha permitido confirmar que la respuesta hipersensible a la salinidad del mutante se debe a la ausencia de expresión del gen *PMS*.

Que nosotros sepamos, la ausencia de función del gen *PMS* en condiciones salinas genera el fenotipo más dramático en tomate en lo que respecta a una respuesta hipersensible. El fenotipo de las plantas RNAi-*PMS* en condiciones salinas, idéntico al del mutante, culmina con las hojas jóvenes completamente secas y el ápice necrosado. Salvo que el tratamiento salino se inicie cuando las plantas están en el periodo de transición floral, las plantas que no expresan *PMS* son incapaces de dar frutos incluso en condiciones de salinidad moderada. En comparación, el silenciamiento de genes relevantes relacionados con la tolerancia a la salinidad no promueve fenotipos tan dramáticos. Así por ejemplo, Olias *et al.* (2009) silenciaron *SISOS1* en plantas transgénicas de tomate (cv. Microtom) y, tras un tratamiento de 100 mM de NaCl durante 5 días, observaron una severa reducción del crecimiento en las plantas transgénicas y una intensa clorosis, tal y como evidencian las fotografías del trabajo. Orellana *et al.* (2010) silenciaron el factor de transcripción *SIAREB1* de tomate (cv. Moneymaker) y regaron las plantas transgénicas durante 30 días con una solución suplementada con 300 mM de NaCl. Al final del drástico tratamiento, vieron que en torno al 50% de las plantas WT eran capaces de superar el tratamiento y sobrevivir, mientras que entre las plantas transgénicas este porcentaje variaba del 2-3% al 30%. Asimismo, en el trabajo de AbuQamar *et al.* (2009), en el que reportan el silenciamiento de un factor de transcripción tipo R2R3MYB (*SIAIM1*) que se induce por estrés salino en tomate, las plantas transgénicas sometidas a concentraciones de 100 o 150 mM de NaCl durante 21 días exhiben un cierto retraso del desarrollo y síntomas de senescencia en hojas adultas, pero las evidencias fotográficas que aporta el trabajo indican que las plantas mantienen el color verde en las 3-4 hojas más jóvenes. En definitiva, en estos trabajos el efecto de la salinidad sobre las plantas no es tan drástico como el que se observa en las que tienen silenciado el gen *PMS*. Es posible por tanto que hayamos identificado un gen clave cuya modulación permita conferir mayor tolerancia a la salinidad en tomate.

A modo de resumen, en el contexto de esta Tesis Doctoral se han generado 1907 líneas de T-DNA, en concreto, 952 de tomate, 405 de *S. pimpinellifolium* y 550 de *S. cheesmaniae* con las que se podrá seguir profundizando en la disección genética de caracteres relevantes desde un punto de vista agronómico. Con el fin de identificar mutantes afectados en la tolerancia a salinidad, se ha realizado el escrutinio *in vitro* en 1888 progenies TG2, a saber, 1545 de tomate, 194 de *S. pimpinellifolium* y 149 de *S. cheesmaniae*. Se han identificado 47 mutantes, la mayor parte de los cuales (i.e. 44) están afectados en caracteres del desarrollo. Entre estos mutantes del desarrollo, 42 exhiben una segregación monogénica recesiva y 2 evidencian una situación de epistasia simple recesiva. Con todo, se han identificado 3 mutantes afectados específicamente en la tolerancia a la salinidad, 2 de los cuales son recesivos para un simple *locus*, mientras que en el tercero confluyen dos mutaciones en situación de epistasia simple recesiva, una de las cuales afecta al desarrollo y la otra a la tolerancia a la salinidad. En el 2,49% de las líneas evaluadas *in vitro* hemos detectado una mutación y, si nos centramos en el tema de estrés salino el porcentaje desciende al 0,16%. De los 47 mutantes, en 5 hay cosegregación entre el fenotipo y un inserto con *nptII* funcional (~10%), en uno estamos intentando corroborar si hay o no hay cosegregación, mientras que en el resto no se dispone aún de datos que permitan concluir que la mutación es de tipo somaclonal o insercional. Los resultados obtenidos permiten afirmar que se ha abierto una nueva vía para la identificación de mutaciones relacionadas con una amplia gama de procesos del desarrollo que podrían ser difíciles de detectar en condiciones de invernadero, así como de mutaciones que afectan de manera específica a los mecanismos de tolerancia a la salinidad. En definitiva, los mutantes detectados en esta Tesis Doctoral proporcionan el punto de partida para la identificación de genes que permitirán avanzar en el conocimiento de procesos que regulan diferentes caracteres de interés.

6. Conclusiones

1. Se han obtenido 952 líneas T-DNA de tomate y sus correspondientes progenies TG2. De esta forma, en el contexto de nuestro programa de mutagénesis insercional, disponemos de una colección de unas 4000 líneas T-DNA de tomate, lo que permitirá seguir avanzando en la disección genética de caracteres relevantes a nivel agronómico en esta especie.
2. Se ha iniciado la generación de colecciones de líneas T-DNA de *Solanum cheemaniae* y *S. pimpinellifolium*. Por lo que respecta a *S. cheesmaniae*, se han obtenido 550 líneas T-DNA con un método de transformación genética que proporciona una eficacia útil incluso mayor que la que se consigue en tomate. Respecto a *S. pimpinellifolium*, se han generado 405 líneas T-DNA empleando un método de transformación genética que proporciona una eficacia útil similar a la que se consigue en tomate.
3. Se han evaluado *in vitro* 1545 líneas T-DNA de tomate, 194 líneas T-DNA de *Solanum pimpinellifolium* y 149 líneas T-DNA de *S. cheesmaniae*. Resultado del escrutinio *in vitro* se han identificado 47 mutantes, la mayor parte de los cuales se ha evaluado en detalle.
4. De los 47 mutantes identificados, 44 están afectados en diversos caracteres como desarrollo del ápice meristemático, desarrollo radicular, tasa de crecimiento, morfología de la hoja, deficiencia en clorofila, albinismo, letalidad en estadio de plántula, respuesta necrótica, y otros aspectos del desarrollo vegetativo.
5. Los análisis genéticos realizados en los 44 mutantes del desarrollo identificados en el contexto de esta Tesis Doctoral han indicado que en cuatro de ellos el fenotipo cosegrega con un inserto que porta un *nptII*

funcional, lo que facilitará la identificación de los genes etiquetados en dichos mutantes.

6. Tras el escrutinio de 1888 líneas T-DNA se han identificado 3 mutantes recesivos de tomate que exhiben hipersensibilidad en presencia de NaCl, a saber, *tom1303*, *tom1560* y *pms-916* (*protecting meristems against salinity-916*). Hemos comprobado que, en ausencia de estrés salino, los tres mutantes tienen un desarrollo normal, lo que indica que el *locus* alterado en cada uno de ellos no es esencial para el normal crecimiento y desarrollo de la planta pero sí cumple una función en el grado de tolerancia al estrés salino. Además, hemos comprobado que en los tres mutantes la respuesta hipersensible es básicamente la misma *in vitro* e *in vivo*.
7. Los fenotipos de hipersensibilidad al estrés salino en los tres mutantes sugieren la identificación de tres *loci* distintos. El fenotipo de *tom1303* se visualiza no antes de los 25-30 días de cultivo en el medio salino y se manifiesta a través de una intensa clorosis que conlleva en última instancia al colapso de la planta. En cambio, en el mutante *tom1560* la respuesta hipersensible se detecta a los pocos días del inicio del tratamiento y se manifiesta a través de un proceso de hiperhidratación en diferentes órganos y una extrema clorosis que provocan la muerte de la planta. El fenotipo hipersensible del mutante *pms-916* es el más extremo, y se caracteriza por un engrosamiento del hipocotilo o del tallo y la inhibición del desarrollo de la parte aérea. En concreto, las primeras hojas verdaderas no se expanden, muestran síntomas severos de marchitamiento y, lo más característico, el ápice meristemático sufre un rápido colapso que conduce a la muerte de la plántula.
8. Se ha demostrado que en el mutante *pms-916* existe cosegregación entre el fenotipo y un inserto con un *nptII* funcional, lo que ha facilitado la identificación del gen alterado en el mutante. Utilizando la tecnología de interferencia por RNA, se ha confirmado que el fenotipo de hipersensibilidad se debe a la ausencia de expresión del gen *PMS* (*PROTECTING MERISTEMS AGAINST SALINITY*). La caracterización del fenotipo hipersensible sugiere que la función de *PMS* ocurre en condiciones específicas de salinidad, limitando la acumulación de Na⁺ en el meristemo apical y en las hojas jóvenes. Así, *PMS* actuaría protegiendo al meristemo terminal de la componente iónica del estrés salino.

7. Bibliografía

- Abdelnoor R.V., Yule R., Elo A., Christensen A.C., Meyer-Gauen G. & Mackenzie S.A.** (2003). Substoichiometric shifting in the plant mitochondrial genome is influenced by a gene homologous to MutS. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100: 5968-5973.
- AbuQamar S., Luo H., Laluk K., Mickelbart M. V. & Mengiste T.** (2009). Crosstalk between biotic and abiotic stress responses in tomato is mediated by the AIM1 transcription factor. *The Plant Journal*, 58: 347-360.
- Agarwal P. K., Agarwal P., Reddy M. K. & Sopory S. K.** (2006). Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant cell reports*, 25: 1263-1274.
- Albert S., Després B., Guilleminot J., Bechtold N., Pelletier G., Delseny M. & Devic M.** (1999). The EMB 506 gene encodes a novel ankyrin repeat containing protein that is essential for the normal development of Arabidopsis embryos. *The Plant Journal*, 17: 169-179.
- Allaway W. G.** (1973). Accumulation of malate in guard cells of *Vicia faba* during stomatal opening. *Planta*, 110: 63-70.
- Altmann T.** (1999). Molecular physiology of brassinosteroids revealed by the analysis of mutants. *Planta*, 208(1): 1-11.
- Andrus C.F., Reynard G.B. & Wade B.L.** (1942). Relative resistance of tomato varieties, selections and crosses to defoliation by *Alternaria* and *Stemphyllium*. USDA Circular 652:23.
- Angarita M.P.** (2009). Generación de líneas T-DNA de Tomate (*Solanum lycopersicum* c.v p73) e identificación de mutantes de inserción. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.

- Anguillara L.** (1561). Semplici dell' eccellente M.L.A., Liguagli in piu Pareri a diversi nobili huomini scritti appaiono, et Nouvamente da M. Giovanni Martinello mandati in luce. *Venice*: V. Valgrisi.
- Antón M.T.** (2012). *La caracterización del mutante insercional Arlequín revela que el gen etiquetado tiene un papel clave en el desarrollo reproductivo de tomate* (Doctoral dissertation).
- Apel K. & Hirt H.** (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55: 373-399.
- Apse M. P., Sottosanto J. B. & Blumwald E.** (2003). Vacuolar cation/H⁺ exchange, ion homeostasis, and leaf development are altered in a T-DNA insertional mutant of AtNHX1, the Arabidopsis vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter. *The Plant Journal*, 36: 229-239.
- Apse M.P., Aharon G.S., Snedden W.A. & Blumwald E.** (1999). Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*. *Science*, 285: 1256–1258.
- Araki N., Kusumi K., Masamoto K., Niwa Y. & Iba K.** (2000). Temperature-sensitive *Arabidopsis* mutant defective in 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase within the plastid non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Physiologia Plantarum*, 108: 19–24.
- Arenas-Huertero C., Pérez B., Rabanal F., Blanco-Melo D., De la Rosa C., Estrada-Navarrete G., Sanchez F., Covarrubias A. & Reyes J.** (2009) Conserved and novel miRNAs in the legume *Phaseolus vulgaris* in response to stress. *Plant Mol Biol* 70:385–401.
- Arrillaga I., Gisbert C., Sales E., Roig L. & Moreno V.** (2001). In vitro plant regeneration and gene transfer in the wild tomato *Lycopersicon cheesmanii*. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 76: 413-418.
- Ashraf M. & Akram N. A.** (2009). Improving salinity tolerance of plants through conventional breeding and genetic engineering: an analytical comparison. *Biotechnology advances*, 27: 744-752.
- Ashraf M., Athar H. R., Harris P. J. C. & Kwon T. R.** (2008). Some prospective strategies for improving crop salt tolerance. *Advances in Agronomy*, 97: 45-110.
- Asins M.J., Breto M.P. & Carbonell E.A.** (1993) Salt tolerance in *Lycopersicon* species. II. Genetic effects and a search for associated traits. *Theor. Appl. Genet.* 86: 769–774
- Asins M.J., Breto M.P., Cambra M. & Carbonell E.A.** (1993) Salt tolerance in *Lycopersicon* species. I. Character definition and changes in gene expression. *Theor. Appl. Genet.* 86: 737–743.

- Aslam R., Bostan N., Amen N., Maria M. & Safdar W.** (2011). A critical review on halophytes: Salt tolerant plants. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5: 7108-7118.
- Atarés A., Moyano E., Morales B., Schleicher P., García-Abellán J. O., Antón T., García-Sogo B., Perez-Martín F., Lozano R., Flores F.B., Moreno V., Bolarín M.C. & Pineda B.** (2011). An insertional mutagenesis programme with an enhancer trap for the identification and tagging of genes involved in abiotic stress tolerance in the tomato wild-related species *Solanum pennellii*. *Plant cell reports*, 30: 1865-1879.
- Axtell M. J. & Bowman J. L.** (2008). Evolution of plant microRNAs and their targets. *Trends in plant science*, 13: 343-349.
- Azpiroz-Leehan R. and Feldman K.A.** (1997). T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis* going back and forth. *Trends in Genetics*, 13: 152-156.
- Barr J., White W. S., Chen L., Bae H. & Rodermeil S.** (2004). The GHOST terminal oxidase regulates developmental programming in tomato fruit. *Plant, Cell & Environment*, 27: 840-852.
- Barry C. S., Aldridge G. M., Herzog G., Ma Q., McQuinn R. P., Hirschberg J., & Giovannoni J. J.** (2012). Altered chloroplast development and delayed fruit ripening caused by mutations in a zinc metalloprotease at the lutescent2 locus of tomato. *Plant physiology*, 159: 1086-1098.
- Bartels D. & Sunkar, R.** (2005). Drought and Salt Tolerance in Plants. *Critical Review in Plant Science*. 24: 23–58.
- Barton M.K. & Poethig R.S.** (1993). Formation of the shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana*: an analysis of development in the wild type and in the shoot meristemless mutant. *Development*, 119: 823-831.
- Bassel G.W., Mullen R.T. & Bewley J.D.** (2008). Procera is a putative DELLA mutant in tomato (*Solanum lycopersicum*): effects on the seed and vegetative plant. *Journal of Experimental Botany*, 59: 585–593.
- Batelli G., Verslues P.E., Agius F., Qiu Q.S., Fujii H., Pan S., Schumaker K.S., Grillo S. & Zhu J.K.** (2007). SOS2 promotes salt tolerance in part by interacting with the vacuolar H⁺-ATPase and upregulating its transport activity. *Molecular and Cellular Biology*, 27: 7781-7790.
- Batistič O. & Kudla J.** (2004). Integration and channeling of calcium signaling through the CBL calcium sensor/CIPK protein kinase network. *Planta*, 219: 915–924.
- Belver A., Olías R., Huertas R. & Rodríguez-Rosales M. P.** (2012). Involvement of SISOS2 in tomato salt tolerance. *Bioengineered*, 3: 298-302.
- Bergougnoux V.** (2013). The history of tomato: from domestication to biopharming. *Biotechnology advances*, 32: 170-189.

- Bernacchi D., Beck-Bunn T., Emmatty D., Eshed Y., Inai S., Lopez J., Petiard V., Sayama H., Uhlig J., Zamir D. & Tanksley S.D.** (1998). Advanced backcross QTL analysis of tomato. II 140 Evaluation of near-isogenic lines carrying single-donor introgressions for desirable wild QTL-alleles derived from *Lycopersicon hirsutum* and *Lycopersicon pimpinellifolium*. *Theoretical and Applied Genetics*, 97:170-180.
- Bernstein L.** (1961). Osmotic adjustment of plants to saline media. I. Steady state. *American Journal of Botany*, 909-918.
- Bernstein L.** (1963). Osmotic adjustment of plants to saline media. II. Dynamic phase. *American Journal of Botany*, 360-370.
- Berry S.Z. & Oakes G.L.** (1987). Inheritance of resistance to *Fusarium* crown and root rot in tomato. *HortScience*, 22: 110-111.
- Beuchat J., Li S., Ragni L., Shindo C., Kohn MH. & Hardtke C.S.** (2010). A hyperactive quantitative trait locus allele of Arabidopsis BRX contributes to natural variation in root growth vigor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, May 4; 107: 8475-80.
- Beuchat J., Scacchi E., Tarkowska D., Ragni L., Strnad M. & Hardtke C.S.** (2010). BRX promotes Arabidopsis shoot growth. *New Phytologist*, Oct; 188(1):23-9.
- Bhatnagar-Mathur P., Vadez V. & Sharma K.K.** (2008). Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects. *Plant Cell Report*, 27: 411-424.
- Bishop G. J., Nomura T., Yokota T., Harrison K., Noguchi T., Fujioka S., Takatsuto S., Jones J.D.G. & Kamiya Y.** (1999). The tomato DWARF enzyme catalyses C-6 oxidation in brassinosteroid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96: 1761-1766.
- Blumwald E. & Poole R. J.** (1985). Na⁺/H⁺ antiport in isolated tonoplast vesicles from storage tissue of *Beta vulgaris*. *Plant physiology*, 78: 163-167.
- Boerjan W., Cervera M.T., Delarue M., Beeckman T., Dewitte W., Bellini C., Caboche M., Van Onckelen H., Van Montagu M. & Inze D.** (1995). Superroot, a recessive mutation in Arabidopsis, confers auxin overproduction. *Plant Cell*, 7: 1405-1419.
- Bohner H.J., Gollmack D., Ishitani M., Kamasani U.R., Rammesmayr G., Shen B., Sheleva E. & Jensen K.J.** (1996). Salt tolerance engineering requires multiple gene transfer. En: *Engineering plants for commercial products and application*. Eds. Collins GB, and Shepherd RJ. Ann. New York Acad. Sci. pp 115-125
- Bohner H.J., Gollmack D., Ishitani M., Kamasani U.R., Rammesmayr G., Shen B., Sheleva E. & Jensen K.J.** (1996). Salt tolerance engineering requires multiple gene transfer. En: *Engineering plants for commercial products and application*. Eds. Collins GB, and Shepherd RJ. Ann. New York Acad. Sci. Pp: 115-125.

- Bolarin, M. C., Fernandez, F. G., Cruz, V., & Cuartero, J.** (1991). Salinity tolerance in four wild tomato species using vegetative yield-salinity response curves. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 116: 286-290.
- Bollivar D. W., Suzuki J. Y., Beatty J. T., Dobrowolski J. M. & Bauer C. E.** (1994). Directed mutational analysis of bacteriochlorophyll a biosynthesis in *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of molecular biology*, 237: 622-640.
- Borsani O., Cuartero J., Fernández J. A., Valpuesta V. & Botella M. A.** (2001). Identification of two loci in tomato reveals distinct mechanisms for salt tolerance. *The Plant Cell Online*, 13: 873-887.
- Borsani O., Cuartero J., Valpuesta V. & Botella M. A.** (2002). Tomato *tos1* mutation identifies a gene essential for osmotic tolerance and abscisic acid sensitivity. *The Plant Journal*, 32: 905-914.
- Botella M. A., Martínez V., Nieves M. & Cerdá A.** (1997). Effect of salinity on the growth and nitrogen uptake by wheat seedlings. *Journal of Plant Nutrition*, 20: 793-804.
- Bouché N. & Bouchez D.** (2001). *Arabidopsis* gene knockout: phenotypes wanted. *Current Opinion in Plant Biology*, 4: 111-117.
- Bray E.A.** (1993). Molecular responses to water deficit. *Plant Physiology*, 103: 1035-1040.
- Brenner S.** (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77: 71-94.
- Brown A. D. & Simpson J. R.** (1972). Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols. *Journal of General Microbiology*, 72: 589-591.
- Brown A.D.** (1990). *Microbial Water Stress Physiology, Principles and Perspectives*. New York: Wiley & Sons.
- Budziszewski, G. J., Lewis, S. P., Glover, L. W., Reineke, J., Jones, G., Ziemnik, L. S., Lonowski J., Nyfeler B., Aux G., Zhou Q., McElver J., Patton D.A., Martienssen R., Grossniklaus U., Ma H., Law M. & Levin, J. Z.** (2001). *Arabidopsis* genes essential for seedling viability: isolation of insertional mutants and molecular cloning. *Genetics*, 159: 1765-1778.
- Burk D.H., Liu B., Zhong R., Morrison W.H. & Ye Z.H.** (2001). A katanin-like protein regulates normal cell wall biosynthesis and cell elongation. *Plant Cell*, 13: 807-827.
- Callos J. D., DiRado M., Xu B., Behringer F. J., Link B. M. & Medford J. I.** (1994). The forever young gene encodes an oxidoreductase required for proper development of the *Arabidopsis* vegetative shoot apex. *The Plant Journal*, 6: 835-847.
- Camilleri C., Azimzadeh J., Pastuglia M., Bellini C., Grandjean O. & Bouchez D.** (2002). The *Arabidopsis* TONNEAU2 gene encodes a putative novel protein phosphatase 2A regulatory subunit essential for the control of the cortical cytoskeleton. *Plant Cell*, 14: 833-845.
- Cannon O.S. & Waddoups V.** (1952). Loran Blood and VR Moscow, two new *Verticillium* wilt resistant tomatoes for Utah. *Utah Farm and Home Sci.*, 13(4): 74.

- Cannon.** (1911). *The Root Habits of Desert Plants*. DC, Washington.
- Cano E.A., Perez-Alfocea F., Moreno V., Caro M. & Bolarin M.C.** (1998). Evaluation of salt tolerance in cultivated and wild tomato species through *in vitro* shoot apex culture. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 53: 19–26.
- Caño-Delgado A.I., Metzlauff K. & Bevan M.W.** (2000). The eli1 mutation reveals a link between cell expansion and secondary cell wall formation in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 127: 3395-3405.
- Carol P., Stevenson D., Bisanz C., Breitenbach J., Sandmann G., Mache R., Coupland G. & Kuntz M.** (1999). Mutations in the *Arabidopsis* gene IMMUTANS cause a variegated phenotype by inactivating a chloroplast terminal oxidase associated with phytoene desaturation. *Plant Cell*, 11: 57-68
- Cattiveli L., Rizza F., Badeck F.W., Mazzucotelli E., Mastrangelo A.M., Francia E., Mare C., Tondelli A. & Stanca M.** (2008). Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. *Field Crops Research*, 105: 1–14.
- Celenza J.L., Grisafi P.L. & Fink G.R.** (1995). A pathway for lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genes & development*, 9: 2131-2142.
- Chen M., Choi Y., Voytas D.F. & Rodermel S.R.** (2000). Mutations in the *Arabidopsis* VAR2 locus cause leaf variegation due to the loss of a chloroplast FtsH protease. *Plant Journal*, 22: 303-313.
- Chen M., Jensen M. & Rodermel S.R.** (1999). The *yellow variegated* mutant of *Arabidopsis* is plastid autonomous and delayed in chloroplast biogenesis. *Journal of Heredity*, 90: 207-214.
- Chen S., Jin W., Wang M., Zhang F., Zhou J., Jia Q., Wu Y., Liu F. & Wu P.** (2003). Distribution and characterization of over 1000 T-DNA tags in rice genome. *The Plant Journal*, 36: 105-113.
- Chen T. H. & Murata N.** (2002). Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Current opinion in plant biology*, 5: 250-257.
- Cheng J. C., Seeley K. A. & Sung Z. R.** (1995). RML1 and RML2, *Arabidopsis* genes required for cell proliferation at the root tip. *Plant Physiology*, 107: 365-376.
- Cheng N.H, Pittman J.K., Zhu J.K. & Hirschi K.D.** (2004). The protein kinase SOS2 activates the *Arabidopsis* H⁺/Ca²⁺ antiporter CAX1 to integrate calcium transport and salt tolerance. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 2922–2926.
- Chi W., Ma J.F., Zhang D.Y., Guo J.K., Chen F., Lu C.M. & Zhang L.X.** (2008). The pentatricopeptide repeat protein DELAYED GREENING1 is involved in the early chloroplast development and chloroplast gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 147: 573–584

- Child A.** (1990). A synopsis of *Solanum* subgenus *Potatoe* (G. Don) D'Arcy [*Tuberarium* (Dun.) Bitter (s.l.)]. *Feddes Repert*, 101: 209–235.
- Chinnusamy V., Jagendorf A. & Zhu J.K.** (2005). Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Science*, 45: 437-448.
- Clark S. E., Running M. P. & Meyerowitz E. M.** (1993). CLAVATA1, a regulator of meristem and flower development in Arabidopsis. *Development*, 119: 397-418.
- Clark S.E., Jacobsen S.E., Levin J.Z. & Meyerowitz E.M.** (1996). The CLAVATA and SHOOT MERISTEMLESS loci competitively regulate meristem activity in Arabidopsis. *Development*, 122: 1567-1575.
- Clark S.E., Running M.P. & Meyerowitz E.M.** (1995). CLAVATA3 is a specific regulator of shoot and floral meristem development affecting the same processes as CLAVATA1. *Development*, 121: 2057-2067.
- Clouse S.D. & Gilchrist D.G.** (1987). Interaction of the *asc* locus in F8 paired lines of tomato with *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* and AAL-toxin. *Phytopathology*, 77: 80- 82.
- Coen E.S. & Meyerowitz E.M.** (1991). The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature*, 353: 31-37.
- Colombo M., Masiero S., Vanzulli S., Lardelli P., Kater M.M. & Colombo L.** (2008). AGL23, a type I MADS-box gene that controls female gametophyte and embryo development in Arabidopsis. *Plant Journal*, 54: 1037–1048.
- Cortina C. & Culiáñez-Macià F. A.** (2005). Tomato abiotic stress enhanced tolerance by trehalose biosynthesis. *Plant Science*, 169: 75-82.
- Cuartero J. & Fernández-Muñoz R.** (1999). Tomato and salinity. *Scientia Horticulturae*, 78: 83-125.
- Cuartero J., Bolarin M.C., Asíns M.J. & Moreno V.** (2006). Increasing salt tolerance in the tomato. *Journal of Experimental Botany*, 57: 1045-1058.
- Cuartero J., Bolarin M.C., Moreno V. & Pineda B.** (2008). Capítulo 9. Tolerancia a la salinidad. El ambiente y los estreses abióticos en la mejora vegetal. pp. 233-261.
- Cuartero J., Bolarin M.C., Moreno V. & Pineda B.** (2009). Chapter 34. Molecular tools for enhancing salinity tolerance in plants. En Jain MS and Brar DS. Kluwer Academic Publishers. Molecular techniques for crop improvement. En prensa.
- Cuartero J., Yeo, A. R. & Flowers T. J.** (1992). Selection of donors for salt-tolerance in tomato using physiological traits. *New Phytologist*, 121: 63-69.
- Cushman J.C., DeRocher E.J. & Bohnert H.J.** (1990). Gene expression during adaptation to salt stress. En Environmental Injury to Plants, F.J. Katerman, ed (New York: Academic Press), pp. 173–203.
- Czarnecki O. & Grimm B.** (2012). Post-translational control of tetrapyrrole biosynthesis in plants, algae, and cyanobacteria. *Journal of Experimental Botany*, 63:1675–87.

- Dai X., Xu Y., Ma Q., Xu W., Wang T., Xue Y. & Chong K.** (2007). Overexpression of an R1R2R3 MYB gene, OsMYB3R-2, increases tolerance to freezing, drought, and salt stress in transgenic *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 143: 1739-1751.
- Darwin S.C., Knapp S. & Peralta I.E.** (2003). Taxonomy of tomatoes in the Galápagos Islands: native and introduced species of *Solanum* section *Lycopersicon* (Solanaceae). *Systematics and Biodiversity*, 1: 29-53.
- Davenport R., James R., Zakrisson-Plogander A., Tester M. & Munns R.** (2005). Control of Sodium Transport in Durum Wheat. *Plant Physiology*, 137: 807-818.
- De Candolle, A.** (1886). Origin of cultivated plants. Hafner Publishing Company, New York, 468pp.
- de Dorlodot S., Forster B., Pages L., Price A., Tuberosa R. & Draye X.** (2007). Root system architecture: opportunities and constraints for genetic improvement of crops. *Trends in plant science*, 12: 474-481.
- Dehan K. & Tal M.** (1978) Salt tolerance in the wild relatives of the cultivated tomato: Responses of *Solanum pennellii* to high salinity. *Irrig. Sci.* 1: 71–76
- Delarue M., Prinsen E., Onckelen H.V., Caboche M. & Bellini C.** (1998). Sur2 mutations of *Arabidopsis thaliana* define a new locus involved in the control of auxin homeostasis. *The Plant Journal*, 14: 603-611.
- Delauney A. J. & Verma D. P. S.** (1993). Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *The plant journal*, 4: 215-223.
- Dietrich R.A., Delaney T.P., Uknes S.J., Ward E.R., Ryals J. A. & Dangl J.L.** (1994). *Arabidopsis* mutants simulating disease resistance response. *Cell*, 77: 565-577.
- Díez M.J. & Nuez F.** (2008). Tomato. *Vegetables II*. Springer New York p. 249-323.
- Dill A. & Sun T.-p.** (2001). Synergistic derepression of gibberellin signaling by removing RGA and GAI function in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 159: 777-785.
- Doebley J., Stec A. & Gustus C.** (1995). Teosinte branched1 and the origin of maize: evidence for epistasis and the evolution of dominance. *Genetics*, 141: 333.
- Dong X.** (2004). NPR1, all things considered. *Current Opinion in Plant Biology*, 7: 547–552.
- Eckhardt U., Grimm B. & Hortensteiner S.** (2004). Recent advances in chlorophyll biosynthesis and breakdown in higher plants. *Plant molecular biology*, 56:1–14.
- Egea I., Plasencia F., Pineda B., García-Abellán J.O., García-Alcazar M., Flores F.B, Atarés A., Angosto T., Lozano R., Moreno V., Bolarín M.C.** (2014). The high shoot Na⁺ accumulation in a salt-hipersensitive tomato mutant is related to altered expression pattern of HKT gene family. SEB Annual Main Meeting.
- Ellis P.R. & Maxon-Smith J.W.** (1971). Inheritance of resistance to potato cyst-eelworm (*Heterodera rostochiensis* Woll.) in the genus *Lycopersicon*. *Euphytica* 20: 93-101.
- Ellul P., Garcia-Sogo B., Pineda B., Rios G., Roig L. & Moreno V.** (2003). The ploidy level of transgenic plants in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato

- cotyledons (*Lycopersicon esculentum* L. Mill.) is genotype and procedure dependent. *Theoretical and Applied Genetics*, 106: 231-238.
- Eltelib H.A., Fujikawa Y. & Esaka M.** (2012). Overexpression of the acerola (*Malpighia glabra*) monodehydroascorbate reductase gene in transgenic tobacco plants results in increased ascorbate levels and enhanced tolerance to salt stress. *South African Journal of Botany*, 78: 295–301.
- Esquinas-Alcázar J. y Nuez F.** (1995). Situación taxonómica, domesticación y difusión del tomate. In: F Nuez (ed) *El cultivo del tomate*, Mundi-Prensa, Madrid, España, pp:13-42.
- Essah P. A., Davenport R. & Tester M.** (2003). Sodium influx and accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 133: 307-318.
- Estévez J.M., Cantero A., Romero C., Kawaide H., Jiménez L.F., Kuzuyama T., Seto H., Kamiya Y. & León P.** (2000). Analysis of the expression of *CLA1*, a gene that encodes the 1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase of the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 124: 95-104.
- Falbel T.G., Meehl J.B. & Staehelin L.A.** (1996). Severity of mutant phenotype in a series of chlorophyll-deficient wheat mutants depends on light intensity and the severity of the block in chlorophyll synthesis. *Plant Physiology*, 112: 821–32.
- Feldmann K.A.** (1991). T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: mutational spectrum. *The Plant Journal*, 1: 71–82.
- Fernández-Lozano A., Yuste-Lisbona F. J., Pérez-Martín F., Pineda B., Moreno V., Lozano R. & Angosto T.** (2015). Mutation at the tomato EXCESSIVE NUMBER OF FLORAL ORGANS (ENO) locus impairs floral meristem development, thus promoting an increased number of floral organs and fruit size. *Plant Science*, 232, 41-48.
- Flowers T. J. & Colmer T. D.** (2008). Salinity tolerance in halophytes*. *New Phytologist*, 179: 945-963.
- Flowers T. J., Troke P. F. & Yeo A. R.** (1977). The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annual review of plant physiology*, 28: 89-121.
- Flowers T.J.** (2004). Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 55: 307-319.
- Foolad M.R. & Chen F.Q.** (1999). RFLP mapping of QTLs conferring salt tolerance during vegetative stage in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 99: 235-243.
- Foolad M.R. & Lin G.Y.** (1997). Absence of a relationship between salt tolerance during germination and vegetative growth in tomato. *Plant Breed.* 116: 363–367.
- Foolad M.R. & Lin G.Y.** (1997). Genetic potential for salt tolerance during germination in *Lycopersicon* species. *HortScience* 32: 296–300.
- Foolad M.R.** (2004) Recent advances in genetics of salt tolerance in tomato. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 76: 101–119

- Foolad M.R.** (2007). Genome mapping and molecular breeding of tomato. *International Journal of Plant Genomics*.
- Ford C. W.** (1984). Accumulation of low molecular weight solutes in water-stressed tropical legumes. *Phytochemistry*, 23: 1007-1015.
- Forrest K. L. & Bhawe M.** (2007). Major intrinsic proteins (MIPs) in plants: a complex gene family with major impacts on plant phenotype. *Functional & integrative genomics*, 7: 263-289.
- Foyer C.H. & Noctor G.** (2005) Oxidant and antioxidant signalling in plants: a reevaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environment*, 28: 1056–1071.
- Francia E., Tacconi G., Crosatti C., Barabaschi D., Bulgarelli D., Dall'Áglio E. & Vale G.** (2005) Marker assisted selection in crop plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 82: 317-342.
- Franzmann L. H., Yoon E. S. & Meinke D. W.** (1995). Saturating the genetic map of *Arabidopsis thaliana* with embryonic mutations. *The Plant Journal*, 7: 341–350.
- Fraser A.G., Kamath R.S., Zipperlen P., Martinez-Campos M., Sohrmann M. & Ahringer J.** (2000). Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature*, 408: 325-330.
- Fujioka S. & Yokota T.** (2003). Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Annual Review of Plant Biology*, 54: 137-164.
- Fukaki H., Tameda S., Masuda H. & Tasaka M.** (2002). Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the SOLITARY-ROOT/IAA14 gene of *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 29: 153-168.
- Furutani I., Watanabe Y., Prieto R., Masukawa M., Suzuki K., Naoi K., Thitamadee S., Shikanai T. & Hashimoto T.** (2000). The SPIRAL genes are required for directional control of cell elongation in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 127: 4443-4453.
- Galinski E. A.** (1993). Compatible solutes of halophilic eubacteria: molecular principles, water-solute interaction, stress protection. *Experientia*, 49(6-7): 487-496.
- Gálvez F.J., Baghour M., Hao G., Cagnac O., Rodríguez-Rosales M.P. & Venema K.** (2012). Expression of LeNHX isoforms in response to salt stress in salt sensitive and salt tolerant tomato species. *Plant Physiology and Biochemistry*, 51: 109-15.
- Gao P., Bai X., Yang L., Lv D., Pan X., Li Y., ... & Zhu Y.** (2011). osa-MIR393: a salinity- and alkaline stress-related microRNA gene. *Molecular biology reports*, 38: 237-242.
- García-Abellan J. O., Egea I., Pineda B., Sanchez-Bel P., Belver A., Garcia-Sogo B., ... & Bolarin M. C.** (2014). Heterologous expression of the yeast HAL5 gene in tomato enhances salt tolerance by reducing shoot Na⁺ accumulation in the long term. *Physiologia plantarum*, 152: 700-713.

- Garcion C., Guillemot J., Kroj T., Parcy F., Giraudat J. & Devic M.** (2006). AKRP and EMB506 are two ankyrin repeat proteins essential for plastid differentiation and plant development in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 48: 895–906.
- Garg A. K., Kim J. K., Owens T. G., Ranwala A. P., Do Choi Y., Kochian L. V. & Wu R. J.** (2002). Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99: 15898-15903.
- Garrido L.** (2009). Escrutinio de una colección de líneas transgénicas de tomate para la identificación de mutantes insercionales hipersensibles al estrés salino. Proyecto fin de carrera. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Valencia.
- Gaxiola R. A., Li, J., Undurraga S., Dang L. M., Allen G. J., Alper S. L., & Fink G. R.** (2001). Drought-and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺-pump. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98: 11444-11449.
- Gaxiola R. A., Rao R., Sherman A., Grisafi P., Alper S. L., & Fink G. R.** (1999). The Arabidopsis thaliana proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96: 1480-1485.
- Giménez E., Pineda B., Capel J., Antón M. T., Atarés A., Pérez-Martín F., ... & Lozano R.** (2010). Functional analysis of the Arlequin mutant corroborates the essential role of the Arlequin/TAGL1 gene during reproductive development of tomato. *PLoS One*, 5(12), e14427-e14427.
- Giovannoni J. J.** (2004). Genetic regulation of fruit development and ripening. *The plant cell*, 16: S170-S180.
- Giovannoni J. J.** (2007). Fruit ripening mutants yield insights into ripening control. *Current opinion in plant biology*, 10: 283-289.
- Gisbert C.** (1997). Transformación genética en *Lycopersicon*: Introducción de genes relacionados con la tolerancia a la salinidad en *L. esculentum* Mill. cv. p73 y de genes marcadores en *L. pennellii* (Corr.) D'Arcy entrada PE-47. Tesis Doctoral.
- Gisbert C., Rus A. M., Bolarín M. C., López-Coronado J. M., Arrillaga I., Montesinos C., ... & Moreno V.** (2000). The yeast HAL1 gene improves salt tolerance of transgenic tomato. *Plant Physiology*, 123: 393-402.
- Glenn E. P., Brown J. J. & Blumwald E.** (1999). Salt tolerance and crop potential of halophytes. *Critical reviews in plant sciences*, 18: 227-255.
- Gomez-Roldan V., Fermas S., Brewer P. B., Puech-Pagès V., Dun E. A., Pillot J. P., ... & Rochange S. F.** (2008). Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature*, 455: 189-194.

- González-Bayón R., Kinsman E. A., Quesada V., Vera A., Robles P., Ponce M. R., ... & Micol J. L.** (2006). Mutations in the RETICULATA gene dramatically alter internal architecture but have little effect on overall organ shape in Arabidopsis leaves. *Journal of experimental botany*, 57: 3019-3031.
- Greenway H. & Munns, R.** (1980). Mechanisms of salt-tolerance in nonhalophytes. *Annual review of plant physiology*, 31: 149-190.
- Grover A., Aggarwal P.K., Kapoor A., Katiyar-Agarwal S., Agarwal M. & Chandramouli A.** (2003). Addressing abiotic stresses in agriculture through transgenic technology. *Current Science*, 84: 355-367.
- Gu Y. Q., Wildermuth M. C., Chakravarthy S., Loh Y. T., Yang C., He X., ... & Martin G. B.** (2002). Tomato transcription factors Pti4, Pti5, and Pti6 activate defense responses when expressed in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 14: 817-831.
- Guan L.Q.M., Zhao J. & Scandalios J.G.** (2000) Cis elements and trans-factors that regulate expression of maize Cat1 antioxidant gene in response to ABA and osmotic stress: H₂O₂ is the likely intermediary signaling molecule for the response. *The Plant Journal*, 22: 87-95
- Guern J., Mathieu Y., Kurkdjian A., Manigault P., Manigault J., Gillet B., ... & Lallemand J. Y.** (1989). Regulation of Vacuolar pH of Plant Cells II. A 31P NMR Study of the Modifications of Vacuolar pH in Isolated Vacuoles Induced by Proton Pumping and Cation/H⁺ Exchanges. *Plant Physiology*, 89: 27-36.
- Guilandini M.** (1572). Papyrus hoc est comentarius in tria C. Plinii maioris de papyro capita. Venice.
- Guo Y. & Gan S.** (2006). AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence. *The Plant Journal*, 46: 601-612.
- Gur A. & Zamir D.** (2004) Unused natural variation can lift yield barriers in plant breeding. *PLoS biology*, 2: e245.
- Hajouj T., Michelis R. & Gepstein S.** (2000). Cloning and characterization of a receptor-like protein kinase gene associated with senescence. *Plant Physiology*, 124: 1305-1314.
- Halfter U., Ishitani M. & Zhu J.K.** (2000). The Arabidopsis SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97: 3735-3740.
- Ham B. K., Park J. M., Lee S. B., Kim M. J., Lee I. J., Kim K. J., ... & Paek K. H.** (2006). Tobacco Tsp1, a DnaJ-type Zn finger protein, is recruited to and potentiates Tsi1-mediated transcriptional activation. *The Plant Cell*, 18: 2005-2020.
- Han S. E., Park S. R., Kwon H. B., Yi B. Y., Lee G. B. & Byun M. O.** (2005). Genetic engineering of drought-resistant tobacco plants by introducing the trehalose phosphorylase (TP) gene from *Pleurotus sajor-caju*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 82: 151-158.

- Harrison E.J., Bush M., Plett J.M., McPhee D.P., Vitez R., O'Malley B., Sharma V., Bonich W., Seguin A., MacKay J. & Regan S.** (2007). Diverse developmental mutants revealed in an activation-tagged population of poplar. This article is one of a selection of papers published on the Special Issue of Poplar Research in Canada. *Botany*, 85: 1071-1081.
- Hasegawa P. M., Bressan R. A., Nelson D. E., Samaras Y. & Rhodes D.** (1994). Tissue culture in the improvement of salt tolerance in plants. In *Soil Mineral Stresses* (pp. 83-125). Springer Berlin Heidelberg.
- Hasegawa P.M., Bressan R.A. & Handa A.K.** (1987). Cellular mechanisms of salinity tolerance. *HortScience*, 21: 1317-1324.
- Hasegawa P.M., Bressan R.A., Zhu J.K. & Bohnert H.J.** (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual review of plant biology*, 51: 463-499.
- Hedden P. & Kamiya Y.** (1997). Gibberellin biosynthesis: enzymes, genes and their regulation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48: 431-460.
- Hedrich R. & Kudla J.** (2006). Calcium signaling networks channel plant K⁺ uptake. *Cell* 125: 1221-1223.
- Herman R. K.** (1988). *The Nematode Caenorhabditis elegans*, edited by Wood W. B. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. *Genetics*, pp. 17-46.
- Hobbie L. & Estelle M.** (1995) The axr4 auxin-resistant mutants of Arabidopsis thaliana define a gene important for root gravitropism and lateral root initiation. *Plant J.*, 7: 211-220.
- Holmström K. O., Mäntylä E., Welin B., Mandal A., Palva E. T., Tunnela O. E., & Londesborough J.** (1996). Drought tolerance in tobacco.
- Horie T., Hauser F. & Schroeder J. I.** (2009). HKT transporter-mediated salinity resistance mechanisms in Arabidopsis and monocot crop plants. *Trends in plant science*, 14: 660-668.
- Hossain Z., Mandal A.K.A., Datta S.K. & Biswas A.K.** (2007). Development of NaCl tolerant line in Chrysanthemum morifolium Ramat. through shoot organogenesis of selected callus line. *Journal of biotechnology*, 129: 658-667.
- Hsieh M. H. & Goodman H. M.** (2005). The Arabidopsis IspH homolog is involved in the plastid nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Plant physiology*, 138: 641-653.
- Huang X., Zhang X. & Yang S.** (2009). A novel chloroplast-localized protein EMB1303 is required for chloroplast development in Arabidopsis. *Cell research*, 19: 1205-1216

- Huang Z., Zhang Z., Zhang X., Zhang H., Huang D., & Huang R.** (2004). Tomato TERF1 modulates ethylene response and enhances osmotic stress tolerance by activating expression of downstream genes. *Febs Letters*, 573(1), 110-116.
- Huertas R., Olias R., Eljakaoui Z., Gálvez F.J., Li J., De Morales P.A. & Rodríguez-Rosales M.P.** (2012). Overexpression of SISOS2 (SICIPK24) confers salt tolerance to transgenic tomato. *Plant, cell & environment*, 35: 1467-1482.
- Inan G., Goto F., Jin J.B., Rosado A., Koiwa H., Shi H., Hasegawa P.M., Bressan R.A., Maggio A. & Li X.** (2007). Isolation and characterization of *shs1*, a sugar-hypersensitive and ABA-insensitive mutant with multiple stress responses. *Plant molecular biology*, 65: 295-309.
- Iordachescu M. & Imai R.** (2008). Trehalose biosynthesis in response to abiotic stresses. *Journal of integrative plant biology*, 50: 1223-1229.
- Ishitani M., Liu J., Halfter U., Kim C.S., Shi W. & Zhu J.K.** (2000). SOS3 function in plant salt tolerance requires N-myristoylation and calcium binding. *The Plant Cell Online* 12: 1667-1677.
- Jagadeeswaran G., Saini A. & Sunkar R.** (2009). Biotic and abiotic stress down-regulate miR398 expression in Arabidopsis. *Planta*, 229(4):1009–14.
- Jarvis P., Chen L.-J., Li H., Peto C. A., Fankhauser C. & Chory J.** (1998). An *Arabidopsis* mutant defective in the plastid general protein import apparatus. *Science*, 282: 100–103.
- Jenkins J. A.** (1948). The origin of the cultivated tomato. *Economic Botany*, 2: 379-392.
- Jeon J. S., Lee S., Jung K. H., Jun S. H., Jeong D. H., Lee J., Kim Ch., Jang S., Lee Sh., Yang K., Nam J., An K., Han M.-J., Sung R.J., Choi H.S., Yu J.H., Choi J.H., Cho S.Y., Cha S.S., Kim ShL. & An G.** (2000). T-DNA insertional mutagenesis for functional genomics in rice. *The Plant Journal*, 22(6): 561-570.
- Jeong D. H., An S., Kang H. G., Moon S., Han J. J., Park S., Lee H.S. & An G.** (2002). T-DNA insertional mutagenesis for activation tagging in rice. *Plant Physiology*, 130: 1636-1644.
- Jia G. X., Zhu Z. Q., Chang F. Q. & Li Y. X.** (2002). Transformation of tomato with the BADH gene from *Atriplex* improves salt tolerance. *Plant Cell Reports*, 21: 141-146.
- Jones B. & Ljung K.** (2011). Subterranean space exploration: the development of root system architecture. *Current Opinion in Plant Biology*, 15:1–6.
- Jones M. G.** (1987). Gibberellins and the procerca mutant of tomato. *Planta*, 172: 280-284.
- Jones R.A.** (1986). The development of salt-tolerant tomatoes: breeding strategies. *Acta Hort.* 190: 101–114.
- Josse E.-M., Simkin A.J., Gaffé J., Labouré A.-M., Kuntz M. & Carol P.** (2000). A plastid terminal oxidase associated with carotenoid desaturation during chromoplast differentiation. *Plant Physiology*, 123: 1427–1436.

- Jung K. H., Hur J., Ryu C. H., Choi Y., Chung Y. Y., Miyao A., Hirochika H. & An G.** (2003). Characterization of a rice chlorophyll-deficient mutant using the T-DNA gene-trap system. *Plant and Cell Physiology*, 44: 463-472.
- Jurgens G., Mayer U., Torres Ruiz R. A., Berleth T. & Misera S.** (1991). Genetic analysis of pattern formation in the Arabidopsis embryo. *Development*, 91 (Suppl. 1): 27–38.
- Kamoshita A., Wade J., Ali L., Pathan S., Zhang J., Sarkarung S. & Nguyen T.** (2002a). Mapping QTLs for root morphology of a rice population adapted to rainfed lowland conditions. *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 880-893.
- Kamoshita A., Zhang J., Siopongco J., Sarkarung S., Nguyen H.T. & Wade L.J.** (2002b). Effects of Phenotyping Environment on Identification of Quantitative Trait Loci for Rice Root Morphology under Anaerobic Conditions. *Crop Science*, 42(1): 255-265.
- Karakas B., Ozias-Akins P., Stushnoff C., Suefferheld M. & Rieger M.** (1997). Salinity and drought tolerance of mannitol-accumulating transgenic tobacco. *Plant Cell and Environment*, 20: 609-616.
- Kasmati A. R., Töpel M., Patel R., Murtaza G. & Jarvis P.** (2011). Molecular and genetic analyses of Tic20 homologues in Arabidopsis thaliana chloroplasts. *The Plant Journal*, 66: 877-889.
- Kato K.K. & Palmer R.G.** (2004). Duplicate chlorophyll-deficient loci in soybean. *Genome*, 47: 190–8.
- Kaur N. & Gupta A. K.** (2005). Signal transduction pathways under abiotic stresses in plants. *Curr Sci*, 88: 1771-1780.
- Kaya C., Tuna A. L., Ashraf M. & Altunlu H.** (2007). Improved salt tolerance of melon (*Cucumis melo* L.) by the addition of proline and potassium nitrate. *Environmental and Experimental Botany*, 60: 397-403.
- Kayes J. M. & Clark S. E.** (1998). CLAVATA2, a regulator of meristem and organ development in Arabidopsis. *Development*, 125: 3843-3851.
- Kerr E.A., Patrick Z.A. & Bailey D.L.** (1971). Resistance in tomato species to new races of leaf mold (*Cladosporium fulvum* Cke). *Hort. Res.* 11: 84-92.
- Kesavan V. & Choudhuri B.** (1977). Screening for resistance to *Fusarium* wilt of tomato. *Sabrao J.*, 9: 57-65.
- Kikuchi S., Bédard J., Hirano M., Hirabayashi Y., Oishi M., Imai M., Takase M., Ide T. & Nakai M.** (2013). Uncovering the protein translocon at the chloroplast inner envelope membrane. *Science*, 339: 571-574.
- Kim B.G., Waadt R., Cheong Y.H., Pandey G.K., Dominguez- Solis J.R., Schultke S., Lee S.C., Kudla J. & Luan S.** (2007). The calcium sensor CBL10 mediates salt tolerance by regulating ion homeostasis in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 52: 473–484.

- Kim E.H., Li X.P., Razeghifard R., Anderson J.M., Niyogi K.K., Pogson B.J. & Chow W.S.** (2009). The multiple roles of light-harvesting chlorophyll a/b-protein complexes define structure and optimize function of Arabidopsis chloroplasts: a study using two chlorophyll b-less mutants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1787: 973-984.
- King J. J., Stimart D. P., Fisher R. H. & Bleecker A. B.** (1995). A mutation altering auxin homeostasis and plant morphology in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 7: 2023-2037.
- Kirk J.T.O. & Tilney-Bassett R.A.E.** (1978). The Plastids, 2nd ed. Amsterdam: Elsevier/North-Holland.
- Kishor P. K., Sangam S., Amrutha R. N., Laxmi P. S., Naidu K. R., Rao K. R. S. S., ... & Sreenivasulu N.** (2005). Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Curr Sci*, 88(3): 424-438.
- Koka C.V., Cerny R.E., Gardner R.G., Noguchi T., Fujioka S., Takatsuto S., Yoshida S. & Clouse S.D.** (2000). A putative role for the tomato genes DUMPY and CURL-3 in brassinosteroid biosynthesis and response. *Plant Physiology*, 122: 85-98.
- Krysan P.J., Young J.C. & Sussman M.R.** (1999). T-DNA as an insertional mutagen in Arabidopsis. *The Plant Cell Online*, 11: 2283-2290.
- Kuromori T., Wada T., Kamiya A., Yuguchi M., Yokouchi T., Imura1 Y., Takabe H., Sakurai T., Akiyama K., Hirayama T., Okada K. & Shinozaki K.** (2006). A trial of phenome analysis using 4000 *Ds*-insertional mutants in gene-coding regions of Arabidopsis. *Plant Journal*, 47: 640-651.
- Labate J. A., Grandillo S., Fulton T., Muñoz S., Caicedo A. L., Peralta I., ... & Causse M.** (2007). Tomato. In Vegetables (pp. 1-125). Springer Berlin Heidelberg.
- Ladizinsky G.** (1998). A new species of Avena from Sicily, possibly the tetraploid progenitor of hexaploid oats. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 45: 263-269.
- Laterrot H.** (2000). Disease resistance in tomato: practical situation. *Acta Physiologiae Plantarum*, 22: 328-331.
- Lauchli A. & Epstein E.** (1990). Plant responses to saline and sodic conditions. *Agricultural salinity assessment and management*, 71: 113-137.
- Laurie S., Feeney K.A., Maathuis F.J., Heard P.J., Brown S.J. & Leigh R.A.** (2002). A role for HKT1 in sodium uptake by wheat roots. *The Plant Journal*, 32: 139-149.
- Laux T., Mayer K. F. X., Berger J. & Jürgens G.** (1996). The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in Arabidopsis. *Development*, 122: 87-96.
- Lee C.Y., Agrawal D.C., Wang C.S., Yu S.M., Chen J.J. & Tsay H.S.** (2008). T-DNA activation tagging as a tool to isolate *Salvia miltiorrhiza* transgenic lines for higher yields of tanshinones. *Planta medica*, 74: 780.

- Lee E.K., Kwon M., Ko J.H., Yi H., Hwang M.G., Chang S. & Cho M.H.** (2004). Binding of sulfonylurea by AtMRP5, an Arabidopsis multidrug resistance-related protein that functions in salt tolerance. *Plant Physiology*, 134: 528-538.
- Lee S. C., Cheng H., King K. E., Wang W., He Y., Hussain A., Lo J., Harberd N. P. & Peng J. R.** (2002). Gibberellin regulates Arabidopsis seed germination via RGL2, a GAI/RGA-like gene whose expression is upregulated following imbibition. *Genes Dev.*, 16: 646-658.
- Lee S.C., Lan W., Kim B., Li L., Cheong Y.H., Pandey G.K., Lu G., Buchanan B.B. & Luan S.** (2007). A protein phosphorylation/dephosphorylation network regulates a plant potassium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 104: 15959–15964.
- Lee Y. P., Kim S. H., Bang J. W., Lee H. S., Kwak S. S. & Kwon S. Y.** (2007). Enhanced tolerance to oxidative stress in transgenic tobacco plants expressing three antioxidant enzymes in chloroplasts. *Plant cell reports*, 26: 591-598.
- Leidi E. O., Barragán V., Rubio L., El-Hamdaoui A., Ruiz M. T., Cubero, B., ... & Pardo J. M.** (2010). The AtNHX1 exchanger mediates potassium compartmentation in vacuoles of transgenic tomato. *The Plant Journal*, 61(3), 495-506.
- Leyser H. M., Pickett F. B., Dharmasiri S. & Estelle M.** (1996). Mutations in the AXR3 gene of Arabidopsis result in altered auxin response including ectopic expression from the SAUR-AC1 promoter. *The Plant Journal*, 10: 403-413.
- Li N., Jia J., Xia C., Liu X. & Kong X.** (2013). Characterization and mapping of novel chlorophyll deficient mutant genes in durum wheat. *Breeding science*, 63:169–75.
- Li X.P., Gan R., Li P.L., Ma Y.Y., Zhang L.W., Zhang R., Wang Y. & Wang N.N.** (2006). Identification and functional characterization of a leucine-rich repeat receptor-like kinase gene that is involved in regulation of soybean leaf senescence. *Plant molecular biology*, 61: 829-844.
- Liang Q., Lu X., Jiang L., Wang C., Fan Y. & Zhang C.** (2010). EMB1211 is required for normal embryo development and influences chloroplast biogenesis in Arabidopsis. *Physiologia plantarum*, 140: 380-394.
- Linneo C.** (1753) *Species plantarum*, 1st ed. Holmiae, Stockholm, 2 volumes, 1200 pp.
- Liu H.H., Tian X., Li Y.J., Wu C.A. & Zheng C.C.** (2008) Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *RNA* 14:836–843
- Liu J. & Zhu J. K.** (1998). A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. *Science*, 280: 1943-1945.
- Liu J. & Zhu J.K.** (1997). An *Arabidopsis* mutant with increased calcium requirement for potassium nutrition and salt tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94: 14960–14964.
- Liu J. & Zhu J.K.** (1997). Proline accumulation and salt induced gene expression in a salt-hypersensitive mutant of Arabidopsis. *Plant Physiology*, 11: 591–596.

- Liu J., Ishitani M., Halfter U., Kim C.S. & Zhu J.K.** (2000) The Arabidopsis thaliana SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 3730-3734.
- Liu J., Van Eck J., Cong B. & Tanksley S. D.** (2002). A new class of regulatory genes underlying the cause of pear-shaped tomato fruit. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99: 13302-13306.
- Liu K., Wan, L., Xu Y., Chen N., Ma Q., Li F. & Chong K.** (2007a). Overexpression of OsCOIN, a putative cold inducible zinc finger protein, increased tolerance to chilling, salt and drought, and enhanced proline level in rice. *Planta*, 226: 1007-1016.
- Liu N., Zhong N. Q., Wang G. L., Li L. J., Liu X. L., He Y. K. & Xia G. X.** (2007b). Cloning and functional characterization of PpDBF1 gene encoding a DRE-binding transcription factor from *Physcomitrella patens*. *Planta*, 226: 827-838.
- Lorenzo O., Piqueras R., Sánchez-Serrano J. J. & Solano R.** (2003). ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *The Plant Cell*, 15: 165-178.
- Lorrain S., Vaillau F., Balagué C. & Roby D.** (2003). Lesion mimic mutants: keys for deciphering cell death and defense pathways in plants?. *Trends in plant science*, 8: 263-271.
- Louis P. & Galinski, E. A.** (1997). Characterization of genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine from *Marinococcus halophilus* and osmoregulated expression in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 143: 1141-1149.
- Luan S., Kudla J., Rodriguez-Concepcion M., Yalovsky S. & Gruissem W.** (2002). Calmodulins and calcineurin B-like proteins calcium sensors for specific signal response coupling in plants. *The Plant Cell Online*, 14 (suppl 1): S389-S400.
- Luckwill L.C.** (1943). The genus *Lycopersicon*: An historical, biological, and taxonomical survey of the wild and cultivated tomatoes.
- Lynch J.** (1995). Root architecture and plant productivity. *Plant physiology*, 109: 7.
- Lynn K., Fernandez A., Aida M., Sedbrook J., Tasaka M., Masson P. & Barton M. K.** (1999). The PINHEAD/ZWILLE gene acts pleiotropically in Arabidopsis development and has overlapping functions with the ARGONAUTE1 gene. *Development*, 126: 469-481.
- Lyon C. B.** (1941): Responses of two species of tomatoes and the F1 generation to sodium sulphate in the nutrient medium. *Bot. Gaz.* 103: 107-122.
- Maas E. V. & Nieman R. H.** (1978). Physiology of plant tolerance to salinity. Crop tolerance to suboptimal land conditions, (croptoleranceto), 277-299.
- Mahajan S. & Tuteja N.** (2005). Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of biochemistry and biophysics*, 444:139-158.

- Mahajan S., Pandey G.K. & Tuteja N.** (2008). Calcium-and salt stress signaling in plants: Shedding light on SOS pathway. *Archives of biochemistry and biophysics*, 471: 146-158.
- Malamy J.E.** (2005). Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant, cell & environment*, 28: 67-77.
- Malcomber S. T. & Kellogg E. A.** (2005). SEPALLATA gene diversification: brave new whorls. *Trends in plant science*, 10: 427-435.
- Mandel M.A., Feldmann K.A., Herrera-Estrella L., Rocha-Sosa M. & León P.** (1996). *CLA1*, a novel gene required for chloroplast development, is highly conserved in evolution. *The Plant Journal*, 9: 649-658.
- Mangrauthia S. K., Agarwal S., Sailaja B., Madhav M. S., & Voleti S. R.** (2013). MicroRNAs and their role in salt stress response in plants. In *Salt Stress in Plants* (pp. 15-46). Springer New York.
- Maniatis T., Fritsch E. F. & Sambrook J.** (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual* (Vol. 545). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Marchant A., Bhalerao R., Casimiro I., Eklöf J., Casero P. J., Bennett M. & Sandberg G.** (2002). AUX1 promotes lateral root formation by facilitating indole-3-acetic acid distribution between sink and source tissues in the Arabidopsis seedling. *The Plant Cell*, 14: 589-597.
- Martí C., Orzáez D., Ellul P., Moreno V., Carbonell J. & Granell A.** (2007). Silencing of DELLA induces facultative parthenocarpy in tomato fruits. *The Plant Journal*, 52: 865-876.
- Martinez V. & Läuchli A.** (1993). Effects of Ca²⁺ on the salt-stress response of barley roots as observed by in-vivo ³¹P-nuclear magnetic resonance and in-vitro analysis. *Planta*, 190: 519-524.
- Martínez-Zapater J.M., Gil P., Capel J. & Somerville C.R.** (1992) Mutations at the Arabidopsis CHM locus promote rearrangements of the mitochondrial genome. *Plant Cell*, 4: 889- 899.
- Mathews H., Clendennen S.K., Caldwell C.G., Liu X.L., Connors K., Matheis N., Schuester D.J., Menasco D.J., Wagoner W., Lightner J. & Wagner D.R.** (2003). Activation tagging in tomato identifies a transcriptional regulator of anthocyanin biosynthesis, modification, and transport. *The Plant Cell Online*, 15: 1689-1703.
- Matsushita N. & Matcho T.** (1991). Characterization of Na⁺ exclusion mechanisms of salt-tolerant reed plants in comparison with salt-sensitive rice plants. *Physiologia Plantarum*, 83: 170-176.
- McConnell J. R. & Barton M. K.** (1995). Effect of mutations in the *PINHEAD* gene of *Arabidopsis* on the formation of shoot apical meristems. *Developmental Genetics*, 16: 358-366.

- McCue K. F. & Hanson A. D.** (1990). Drought and salt tolerance: towards understanding and application. *Trends in Biotechnology*, 8: 358-362.
- Mendoza I., Rubio F., Rodriguez Navarro A. & Pardo J.M.** (1994). The protein calcineurin is essential for NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 269: 8792-8796.
- Miller J.C. & Tanksley S.D.** (1990). RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. *Theoretical and applied genetics*, 80: 437-448.
- Miller P.** (1754). *The gardeners dictionary abridged*, 4th ed. London: printed for the author.
- Miranda J. A., Avonce N., Suárez R., Thevelein J. M., Van Dijck P. & Iturriaga G.** (2007). A bifunctional TPS–TPP enzyme from yeast confers tolerance to multiple and extreme abiotic-stress conditions in transgenic *Arabidopsis*. *Planta*, 226: 1411-1421.
- Miséra S., Müller A. J., Weiland-Heidecker U., & Jürgens G.** (1994). The FUSCA genes of *Arabidopsis*: negative regulators of light responses. *Molecular and General Genetics MGG*, 244: 242-252.
- Mitsuya S., Taniguchi M., Miyake H. & Takabe T.** (2005). Disruption of RCI2A leads to over-accumulation of Na⁺ and increased salt sensitivity in *Arabidopsis thaliana* plants. *Planta*, 222: 1001-1009.
- Moftah A. E. & Michel B. E.** (1987). The effect of sodium chloride on solute potential and proline accumulation in soybean leaves. *Plant physiology*, 83: 238-240.
- Mohamed E. A., Iwaki T., Munir I., Tamoi M., Shigeoka S. & Wadano A.** (2003). Overexpression of bacterial catalase in tomato leaf chloroplasts enhances photo-oxidative stress tolerance. *Plant, Cell & Environment*, 26: 2037-2046.
- Montoya T., Nomura T., Farrar K., Kaneta T., Yokota T. & Bishop G. J.** (2002). Cloning the tomato curl3 gene highlights the putative dual role of the leucine-rich repeat receptor kinase tBR11/SR160 in plant steroid hormone and peptide hormone signaling. *The Plant Cell Online*, 14: 3163-3176.
- Moreau P., Thoquet P., Olivier J., Laterrot H. & Grimsley N.** (1998). Genetic mapping of the *Ph-2*, a single locus controlling partial resistance to *Phytophthora infestans* in tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact*, 11: 259-268.
- Mouchel C.F., Briggs G.C. & Hardtke C.S.** (2004). Natural genetic variation in *Arabidopsis* identifies BREVIS RADIX, a novel regulator of cell proliferation and elongation in the root. *Genes & development*, 18: 700-714.
- Müller C. H.** (1940). A revision of the genus *Lycopersicon*. *U.S.D.A. Misc. Publ.* 382: 1–28 + 10 pl.
- Munns R. & Fisher D. B.** (1986). Na⁺ and Cl⁻ transport in the phloem from leaves of NaCl-treated barley. *Functional Plant Biology*, 13: 757-766.

- Munns R. & Tester M.** (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 651-681.
- Munns R.** (1993). Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses. *Plant, Cell & Environment*, 16: 15-24.
- Munns R.** (2005). Genes and salt tolerance: bringing them together. *New phytologist*, 167: 645-663.
- Munns R., James R.A. & L'auchli A.** (2006). Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *Journal of Experimental Botany*, 57: 1025-43
- Munns R., Schachtman D.P. & Condon A.G.** (1995). The significance of a two-phase growth response to salinity in wheat and barley. *Journal of Experimental Botany*, 22: 561-69
- Muñoz-Mayor A., Pineda B., Garcia-Abellán J. O., Antón T., Garcia-Sogo B., Sanchez-Bel P., ... & Bolarin M. C.** (2012). Overexpression of dehydrin tas14 gene improves the osmotic stress imposed by drought and salinity in tomato. *Journal of plant physiology*, 169: 459-468.
- Muñoz-Mayor A., Pineda B., Garcia-Abellán J. O., Garcia-Sog, B., Moyano E., Atares A., ... & Bolarin M. C.** (2008). The HAL1 function on Na⁺ homeostasis is maintained over time in salt-treated transgenic tomato plants, but the high reduction of Na⁺ in leaf is not associated with salt tolerance. *Physiologia plantarum*, 133: 288-297.
- Nagata N., Tanaka R., Satoh S. & Tanaka A.** (2005). Identification of a vinyl reductase gene for chlorophyll synthesis in *Arabidopsis thaliana* and implications for the evolution of *Prochlorococcus* species. *Plant Cell*, 17: 233-40.
- Nakanishi H., Nozue H., Suzuki K., Kaneko Y., Taguchi G. & Hayashida N.** (2005). Characterization of the *Arabidopsis thaliana* mutant *pcb2* which accumulates divinyl chlorophylls. *Plant Cell Physiology*, 46:467-73.
- Nakashima K., Ito Y. & Yamaguchi-Shinozaki K.** (2009). Transcriptional Regulatory Networks in Response to Abiotic Stresses in *Arabidopsis* and Grasses. *Plant Physiology*. 149: 88-95.
- Nakashima K., Tran L. S. P., Van Nguyen D., Fujita M., Maruyama K., Todaka D., ... & Yamaguchi-Shinozaki K.** (2007). Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. *The Plant Journal*, 51: 617-630.
- Nakayashiki T., Nishimura K. & Inokuchi H.** (1995). Cloning and sequencing of a previously unidentified gene that is involved in the biosynthesis of heme in *Escherichia coli*. *Gene*, 153: 67-70.
- Nakazato T., Warren D. L., & Moyle L. C.** (2010). Ecological and geographic modes of species divergence in wild tomatoes. *American Journal of Botany*, 97(4): 680-693.

- Narang R.A., Bruene A. & Altmann T.** (2000). Analysis of phosphate acquisition efficiency in different Arabidopsis accessions. *Plant Physiology*, 124: 1786-1799.
- Naval M.** (2001). Caracterización de plantas transgénicas de tomate con el gen quimérico pSAG₁₂::*ipt* (isopentenil transferasa). Trabajo Final de Carrera. ETSIA.
- Navarre C. & Goffeau A.** (2000). Membrane hyperpolarization and salt sensitivity induced by deletion of PMP3, a highly conserved small protein of yeast plasma membrane. *The EMBO journal*, 19: 2515-2524.
- Nublat A., Desplans J., Casse F. & Berthomieu P.** (2001). Sas1, an arabidopsis mutant overaccumulating sodium in the shoot, shows deficiency in the control of the root radial transport of sodium. *Plant Cell*, 13: 125-137.
- Ogawa D., Abe K., Miyao A., Kojima M., Sakakibara H., Mizutani M. ... & Takeda S.** (2011). RSS1 regulates the cell cycle and maintains meristematic activity under stress conditions in rice. *Nature communications*, 2: 278.
- Ogawa D., Yamaguchi K. & Nishiuchi T.** (2007). High-level overexpression of the Arabidopsis HsfA2 gene confers not only increased thermotolerance but also salt/osmotic stress tolerance and enhanced callus growth. *Journal of experimental botany*, 58: 3373-3383.
- Olías R., Eljakaoui Z., Li J., De Morales P.A., Marín-Manzano M.C., Pardo J.M. & Belver A.** (2009). The plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter SOS1 is essential for salt tolerance in tomato and affects the partitioning of Na⁺ between plant organs. *Plant Cell Environmet*, 32: 904-16.
- Oosumi T., Gruszewski H. A., Blischak L. A., Baxter A. J., Wadl P. A., Shuman J. L., Veilleux R. & Shulaev V.** (2006). High-efficiency transformation of the diploid strawberry (*Fragaria vesca*) for functional genomics. *Planta*, 223: 1219-1230.
- Orellana S., Yanez M., Espinoza A., Verdugo I., Gonzalez E., Ruiz-Lara S. & Casaretto J. A.** (2010). The transcription factor SIAREB1 confers drought, salt stress tolerance and regulates biotic and abiotic stress-related genes in tomato. *Plant, cell & environment*, 33: 2191-2208.
- Osmond C.B.** (1976). Ion absorption and carbon metabolism in cells of higher plants. *Transport in plants II*. Springer-Verlag (ed)., Berlin-Heideberg. 347.372.
- Palmer J. D. & Zamir D.** (1982). Chloroplast DNA evolution and phylogenetic relationships in *Lycopersicon*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79: 5006–5010.
- Papageorgiou G. C. & Murata N.** (1995). The unusually strong stabilizing effects of glycine betaine on the structure and function of the oxygen-evolving photosystem II complex. *Photosynthesis Research*, 44: 243-252.

- Pardo J. M., Cubero B., Leidi E. O. & Quintero F. J.** (2006). Alkali cation exchangers: roles in cellular homeostasis and stress tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 57: 1181-1199.
- Pardo J.M. & Rubio F.** (2012). Na⁺ and K⁺ transporters in plant signaling. In *Transporters and Pumps in Plant Signaling*. Geisler M, Venema K, Eds. Springer-Verlag, Berlin, Germany 2: 65-99.
- Parida A.K. & Das A.B.** (2005) Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and environmental safety*, 60: 324–349.
- Park E.J., Jeknic Z., Pino M.T., Murata N. & Chen T.H.** (2007). Glycinebetaine accumulation is more effective in chloroplasts than in the cytosol for protecting transgenic tomato plants against abiotic stress. *Plant Cell Environment*, 30: 994-1005.
- Park S., Li, J., Pittman J. K., Berkowitz G. A., Yang H., Undurraga S., ... & Gaxiola R. A.** (2005). Up-regulation of a H⁺-pyrophosphatase (H⁺-PPase) as a strategy to engineer drought-resistant crop plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102: 18830-18835.
- Parsons R. L., Behringer F. J. & Medford J. I.** (2000). The SCHIZOID gene regulates differentiation and cell division in *Arabidopsis thaliana* shoots. *Planta*, 211: 34-42.
- Pei Z.M., Murata Y., Benning G., Thomine S., Klusener B., Allen G.J., Grill E. & Schroeder I.** (2000) Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signaling in guard cells. *Nature*, 406: 731–734.
- Pelaz S., Ditta G. S., Baumann E., Wisman E. & Yanofsky M. F.** (2000). B and C floral organ identity functions require SEPALLATA MADS-box genes. *Nature*, 405(6783), 200-203.
- Peng J. R., Carol P., Richards D. E., King K. E., Cowling R. J., Murphy G. P. & Harberd N. P.** (1997). The *Arabidopsis* GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev.*, 11: 3194-3205.
- Penna S.** (2003). Building stress tolerance through over-producing trehalose in transgenic plants. *Trends in plant science*, 8(8): 355-357.
- Peralta I. E. & Spooner D. M.** (2000). Classification of wild tomatoes: a review. *Kurtziana*, 28: 45-54.
- Peralta I. E. & Spooner D. M.** (2005). Morphological characterization and relationships of wild tomatoes (*Solanum* L. Sect. *Lycopersicon*). *Monographs In Systematic Botany*, 104: 227.
- Peralta I. E. & Spooner D. M.** (2006). History, origin and early cultivation of tomato (*Solanaceae*). *Genetic improvement of Solanaceous crops*, 2: 1-27.
- Peralta I.E., Spooner D.M. & Knapp S.** (2008). Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (*Solanum* sect. *Lycopersicoides*, sect. *Juglandifolia*, sect. *Lycopersicon*; *Solanaceae*). *Systematic Botany*, 84: 1-186.

- Pérez-Alfocea F., Balibrea M. E., Parra M. & Bolarín M. C.** (2000). Increasing salt tolerance in tomato and lettuce by inducing plant adaptation: haloconditioning. In *International Symposium on Techniques to Control Salination for Horticultural Productivity 573* (pp. 369-375).
- Perez-Alfocea F., Estan M.T., Caro Perez-Alfocea F., Guerrier G., Estan M.T. & Bolarin M.C.** (1994). Comparative salt responses at cell and whole-plant levels of cultivated and wild tomato and their hybrid. *J. Hort. Sci.*, 69: 639–644
- Pérez-martín F., Campos J.F., Pineda B., Gimenez E., Moreno V., Capel J., Bolarín M.C., Lozano R. & Angosto T.** (2013). Development of stamen organs requires the *SUCCULENT STAMENS (SUS)* tomato gene. XIII Congresso Luso-Espanhol de Fisiologia Vegetal
- Phills B.R., Peck N.H., McDonald G.E. & Robinson R.W.** (1979). Differential responses of *Lycopersicon* and *Solanum* species to salinity. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 104: 349–352
- Pilon-Smiths E. A., Ebskamp M. J., Paul M. J., Jeuken M. J., Weisbeek P. J., & Smeekens S. C.** (1995). Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. *Plant physiology*, 107: 125-130.
- Pineda B.** (1997). Obtención de plantas transgénicas de tomate con los genes *tas14* y *phal3* relacionados con el estrés abiótico. Trabajo Final de Carrera. ETSIA.
- Pineda B., Antón T., García-Sogo B., Atarés A., Scheicher P., Campos J.F., Morales B., García M., Pérez F., Angosto T., Lozano R., Bolarín M.C. & Moreno V.** (2011). *Solanum lycopersicum salt sensitive - 8*, un mutante insercional de tomate con una elevada hipersensibilidad a estrés salino. IX Reunión de la Sociedad Española de Cultivo in vitro de Tejidos Vegetales
- Pineda B., García-Abellán J. O., Antón T., Pérez F., Moyano E., García Sogo B., ... & Atarés A.** (2012). Tomato: Genomic Approaches for Salt and Drought Stress Tolerance. *Improving Crop Resistance to Abiotic Stress, Volume 1 & Volume 2*, 1085-1120.
- Pineda B., Giménez-Camínero E., García-Sogo B., Antón M. T., Atarés A., Capel J., ... & Moreno V.** (2010). Genetic and physiological characterization of the arlequin insertional mutant reveals a key regulator of reproductive development in tomato. *Plant and cell physiology*, 51: 435-447.
- Pitblado R.E. & MacNeill B.H.** (1983). Genetic basis of resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in field tomatoes. *Can. J. Plant Pathol.* 5: 251-255.
- Plett C. & Møller I. S.** (2010). Na⁺ transport in glycophytic plants: what we know and would like to know. *Plant, cell & environment*, 33: 612-626.

- Pontoppidan B., & Kannangara C. G.** (1994). Purification and partial characterisation of barley glutamyl-tRNA_{Glu} reductase, the enzyme that directs glutamate to chlorophyll biosynthesis. *European Journal of Biochemistry*, 225: 529-537.
- Pyo Y. J., Kwon K. C., Kim A. & Cho M. H.** (2013). Seedling Lethal1, a pentatricopeptide repeat protein lacking an E/E+ or DYW domain in *Arabidopsis*, is involved in plastid gene expression and early chloroplast development. *Plant physiology*, 163: 1844-1858.
- Qi J., Liu X., Shen D., Miao H., Xie B., Li X. ... & Huang S.** (2013). A genomic variation map provides insights into the genetic basis of cucumber domestication and diversity. *Nature genetics*, 45(12), 1510-1515.
- Qin G., Gu H., Ma L., Peng Y., Deng X. W., Chen Z. & Qu L. J.** (2007). Disruption of phytoene desaturase gene results in albino and dwarf phenotypes in *Arabidopsis* by impairing chlorophyll, carotenoid, and gibberellin biosynthesis. *Cell research*, 17: 471-482.
- Qiu Q.S., Guo Y., Dietrich M.A., Schumaker K.S. & Zhu J.K.** (2002). Regulation of SOS1, a plasmamembrane Na⁺/H⁺ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99: 8436-8441.
- Quan R., Lin H., Mendoza I., Zhang Y., Cao W., Yang Y., Shang M., Chen S., Pardo J.M. & Guo Y.** (2007). SCABP8/CBL10, a putative calcium sensor, interacts with the protein kinase SOS2 to protect *Arabidopsis* shoots from salt stress. *Plant Cell* 19: 1415–1431.
- Quintero F. J., Blatt M. R. & Pardo J. M.** (2000). Functional conservation between yeast and plant endosomal Na⁺/H⁺ antiporters. *FEBS letters*, 471: 224-228.
- Quintero F.J, Ohta M., Shi H., Zhu J.K. & Pardo J.M.** (2002). Reconstitution in yeast of the *Arabidopsis* SOS signaling pathway for Na⁺ homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99: 9061-9066.
- Radhamony R. N., Mohan Prasad A. & Srinivasan R.** (2005). T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis*: a tool for functional genomics. *Electronic Journal of Biotechnology*, 8: 82-106.
- Rai M.K., Kalia R.K., Singh R., Gangola M.P. & Dhawan A.K.** (2011). Developing stress tolerant plants through in vitro selection-An overview of the recent progress. *Environmental and Experimental Botany*, 71: 89–98.
- Rajendran, K., Tester, M. & Roy, S. J.** (2009). Quantifying the three main components of salinity tolerance in cereals. *Plant, Cell & Environment*, 32: 237-249.
- Rao E.S., Kadirvel P., Symonds R.C. & Ebert A.W.** (2013). Relationship between survival and yield related traits in *Solanum pimpinellifolium* under salt stress. *Euphytica*, 190: 215-228.
- Redei G.P.** (1963). Somatic Instability Caused by a Cysteine-Sensitive Gene in *Arabidopsis*. *Science*, 139: 767-769.

- Reiter R.S., Coomber S.A., Bourett T.M., Bartley G.E. & Scolnik P.A.** (1994). Control of leaf and chloroplast development by the *Arabidopsis* gene *pale cress*. *Plant Cell*, 6: 1253-1264.
- Ren X.L., Qi G.N., Feng H.Q., Zhao S., Zhao S.S., Wang Y. & Wu W.H.** (2013). Calcineurin B-like protein CBL10 directly interacts with AKT1 and modulates K⁺ homeostasis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 74: 258-266.
- Rhodes D. & Samaras Y.** (1994). Genetic control of osmoregulation in plants. *Cellular and molecular physiology of cell volume regulation*, 347-361.
- Richards D.E., King K.E., Ait-ali T. & Harberd N.P.** (2001). How gibberellin regulates plant growth and development: a molecular genetic analysis of gibberellin signaling. *Annual review of plant biology*, 52: 67-88.
- Rick C.M.** (1960). Hybridization between *Lycopersicon esculentum* and *Solanum pennellii*. Phylogenetic and cytogenetic significance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 46: 78-82.
- Rick C.M.** (1979). Biosystematic studies in *Lycopersicon* and closely related species of *Solanum*. Hawkes, J. G., Lester, R. N., Skelding, A. D ed (s). *The biology and taxonomy of the Solanaceae*. London, Academic Press for the Linnean Society, 667-678.
- Röbbelen G.** (1968). Genbedingte rotlicht-empfindlichkeit der chloroplastendifferenzierung bei *Arabidopsis*. *Planta*, 80(3), 237-254.
- Rodríguez-Rosales M. P., Jiang X., Gálvez F. J., Aranda M. N., Cubero B. & Venema K.** (2008). Overexpression of the tomato K⁺/H⁺ antiporter LeNHX2 confers salt tolerance by improving potassium compartmentalization. *New Phytologist*, 179: 366-377.
- Romero C., Bellés J. M., Vayá J. L., Serrano R. & Culiáñez-Macià F. A.** (1997). Expression of the yeast trehalose-6-phosphate synthase gene in transgenic tobacco plants: pleiotropic phenotypes include drought tolerance. *Planta*, 201: 293-297.
- Roy C. & Sengupta D.N.** (2014) Effect of Short Term NaCl Stress on Cultivars of *S. lycopersicum*: A Comparative Biochemical Approach. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 10(1).
- Ruppel N.J. & Hangarter R.P.** (2007). Mutations in a plastid-localized elongation factor G alter early stages of plastid development in *Arabidopsis thaliana*. *BMC plant biology*, 7: 37.
- Rus A., Lee B. H., Muñoz-Mayor A., Sharkhuu A., Miura K., Zhu, J. K., ... & Hasegawa P. M.** (2004). AtHKT1 facilitates Na⁺ homeostasis and K⁺ nutrition in planta. *Plant Physiology*, 136: 2500-2511.

- Rus A., Yokoi S., Sharkhuu A., Reddy M., Lee B. H., Matsumoto T. K., ... & Hasegawa P. M.** (2001). AtHKT1 is a salt tolerance determinant that controls Na⁺ entry into plant roots. *Proceedings of the national academy of sciences*, 98: 14150-14155.
- Rush D.W. & Epstein E.** (1976). Genotypic responses to salinity: Differences between salt-sensitive and salt-tolerant genotypes of the tomato. *Plant Physiology*, 57: 162-166.
- Rush D.W. & Epstein E.** (1981). Breeding and selection for salt tolerance by the incorporation of wild germplasm into a domesticated tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 106: 699-704.
- Rush D.W. & Epstein E.** (1981). Comparative studies on the sodium, potassium and chloride relations of a wild halophytic and a domestic salt-sensitive tomato species. *Plant Physiology*, 68: 1308-1313.
- Sabine J.** (1820). On the love apple or tomato. *Transactions, Royal Hort Soc London* 3: 342-354
- Sakamoto A., Murata A. & Murata N.** (1998). Metabolic engineering of rice leading to biosynthesis of glycinebetaine and tolerance to salt and cold. *Plant Molecular Biology*. 38: 1011-1019.
- Sakamoto T., Miura K., Itoh H., Tatsumi T., Ueguchi-Tanaka M., Ishiyama K., Kobayoshi M., Agrawal G.K., Takeda S., Abe K., Miyao A., Hirochika H., Kitano H., Ashikari M. & Matsuoka M.** (2004). An overview of gibberellin metabolism enzyme genes and their related mutants in rice. *Plant Physiology*, 134: 1642-1653.
- Salisbury F. B. & Ross C. W.** (1985). *Stress physiology. Plant Physiology*. 3d ed, Wadsworth Publishing Company, Belmont.
- Sallaud C., Meynard D., Van Boxtel J., Gay C., Bes M., Brizard J.P., Lamarde P., Ortega D., Raynal M., Portefaix M., Ouwerkert P.F.F., Rueb S., Delsany M. & Guiderdoni E.** (2003). Highly efficient production and characterization of T-DNA plants for rice (*Oryza sativa* L.) functional genomics. *Theoretical and Applied Genetics*, 106: 1396-1408.
- Sánchez-Barrena M.J., Martínez-Ripoll M., Zhu J.K. & Albert A.** (2005). The structure of the Arabidopsis thaliana SOS3: molecular mechanism of sensing calcium for salt stress response. *Journal of molecular biology*, 345: 1253-1264.
- Saranga .Y, Zamir D., Marani A. & Rudich J.** (1991). Breeding tomatoes for salt tolerance: field evaluation of *Lycopersicon* germplasm for yield and dry matter production. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 116: 1067–1071.
- Scacchi E., Osmont K.S., Beuchat J., Salinas P., Navarrete-Gómez M., Trigueros M., Ferrándiz C. & Hardtke C.S.** (2009). Dynamic, auxin-responsive plasma membrane-to-nucleus movement of Arabidopsis BRX. *Development*, Jun; 136: 2059-67.

- Scheres B., Di Laurenzio L., Willemsen V., Hauser M-T., Janmaat K., Weisbeek P. & Benfey P.N.** (1995). Mutations affecting the radial organisation of the *Arabidopsis* root display specific defects throughout the embryonic axis. *Development*, 121: 53-62.
- Scholte M., d'Erfurth I., Rippa S., Mondy S., Cosson V., Durand P., Breda C., Trinh H., Rodriguez-Llorente I., Kondorosi E., Schultze M., Kondorosi A. & Ratet, P.** (2002). T-DNA tagging in the model legume *Medicago truncatula* allows efficient gene discovery. *Molecular Breeding*, 10: 203-215.
- Seong E. S., Cho H. S., Choi D., Joung Y. H., Lim C. K., Hur J. H. & Wang M. H.** (2007). Tomato plants overexpressing CaKR1 enhanced tolerance to salt and oxidative stress. *Biochemical and biophysical research communications*, 363: 983-988.
- Serrano R.** (1996). Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *International review of cytology*, 165: 1-52.
- Sha Y., Li S., Pei Z., Luo L., Tian Y. & He C.** (2004) Generation and flanking sequence analysis of a rice T-DNA tagged population. *Theoretical and Applied Genetics*, 108: 306–314
- Shabala S. & Cuin T. A.** (2008). Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiologia Plantarum*, 133: 651-669.
- Shah J.** (2003). The salicylic acid loop in plant defense. *Current Opinion in Plant Biology*, 6: 365–371.
- Sheveleva E., Chmara W., Bohnert H. J. & Jensen R. G.** (1997). Increased salt and drought tolerance by D-ononitol production in transgenic *Nicotiana tabacum* L. *Plant Physiology*, 115: 1211-1219.
- Shi D., Zheng X., Li L., Lin W., Xie W., Yang J., Chen S. & Jin W.** (2013). Chlorophyll deficiency in the maize elongated mesocotyl2 mutant is caused by a defective heme oxygenase and delaying grana stacking. *PloS one*, 8: e80107.
- Shi H., Ishitani M., Wu S.J., Kim C. & Zhu J.K.** (2000). The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 97: 6896-6901.
- Shi H., Lee B.H., Wu S.J. & Zhu J.K.** (2003). Overexpression of a plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Biotechnology*, 21: 81–85.
- Shi H.Z., Xiong L.M., Guo Y., Stevenson B. & Zhu J.K.** (2003). The *Arabidopsis* *SOS5* locus encodes a putative cell surface adhesion protein and is required for normal cell expansion. *Plant Cell*, 15: 19–32.
- Shi H.Z., Xiong L.M., Stevenson B., Lu T.G. & Zhu J.K.** (2002). The *Arabidopsis salt overly sensitive 4* Mutants Uncover a Critical Role for Vitamin B6 in Plant Salt Tolerance. *Plant Cell*, 14: 575–588.

- Sickler C.M., Edwards G.E., Kiirats O., Gao Z. & Loescher W.** (2007). Response of mannitol-producing *Arabidopsis thaliana* to abiotic stress. *Functional Plant Biology*, 34: 382–391.
- Sohn K. H., Lee S. C., Jung H. W., Hong J. K. & Hwang B. K.** (2006). Expression and functional roles of the pepper pathogen-induced transcription factor RAV1 in bacterial disease resistance, and drought and salt stress tolerance. *Plant molecular biology*, 61: 897-915.
- Solomon A., Beer S., Waisel Y., Jones G.P. & Paleg L.G.** (1994). Effects of NaCl on the carboxylating activity of Rubisco from *Tamarix jordanis* in the presence and absence of proline-related compatible solutes. *Plant Physiol.* 90: 198-204.
- Sottosanto J. B., Gelli A. & Blumwald E.** (2004). DNA array analyses of *Arabidopsis thaliana* lacking a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter: impact of AtNHX1 on gene expression. *The Plant Journal*, 40: 752-771.
- Spooner D.M., Anderson G.J. & Jansen R.K.** (1993). Chloroplast DNA evidence for the interrelationships of tomatoes, potatoes, and pepinos (Solanaceae). *American Journal of Botany*, 80: 676-688.
- Stachel S. E., Messens E., Van Montagu M. & Zambryski P.** (1985). Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature*, 318: 624-629.
- Stamova L. & Yordanov M.** (1990). *Lv* as a symbol of the gene controlling resistance to *Leveillula taurica*. *Tomato Gen. Coop. Rept.* 40: 36.
- Stevens M.R., Lamb E.M. & Rhoads D.D.** (1995). Mapping the *Sw-5* locus for *Tomato spotted wilt virus* resistance in tomatoes using RAPD and RFLP analyzes. *Theor. Appl. Genet.* 90: 451-456.
- Stewart H.I., O'Neil N.J., Janke D.L., Franz N.W., Chamberlin H.W., Howell A.M., Gilchrist E.J., Ha T.T., Kuervers L.M., Vatcher G.P., Danielson J.L. & Baillie D.L.** (1998). Lethal mutations defining 112 complementation groups in a 4.5 Mb sequenced region of *Caenorhabditis elegans* chromosome III. *Molecular and General Genetics MGG*, 260: 280-288.
- Storey R., Ahmad N. & Jones R. W.** (1977). Taxonomic and ecological aspects of the distribution of glycinebetaine and related compounds in plants. *Oecologia*, 27: 319-332.
- Stubbe H.** (1957). Mutanten der Kulturtomate *Lycopersicon esculentum* Miller I. *Die Kulturpflanze*, 5: 190–220.
- Sun J. & Zhang N.** (2007). Chlorophyll biosynthesis in a chlorophyll b-deficient oilseed rape mutant cr3529. *Acta Bot Boreal Occident Sin*, 27:1962.
- Sun W., Xu X., Zhu H., Liu A., Liu L., Li J. & Hua X.** (2010). Comparative transcriptomic profiling of a salt-tolerant wild tomato species and a salt-sensitive tomato cultivar. *Plant and Cell Physiology*, 51(6), 997-1006.

- Sunkar R. & Zhu J.-K.** (2004). Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 16: 2001–2019.
- Sunkar R., Kapoor A., Zhu J.K.** (2006) Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *Plant Cell* 18:2051–2065.
- Tada A., Adachi F., Kakizaki T. & Inaba T.** (2014). Production of viable seeds from the seedling lethal mutant *ppi2-2* lacking the *atToc159* chloroplast protein import receptor using plastic containers, and characterization of the homozygous mutant progeny. *Frontiers in plant science*, 5.
- Tal M. & Gavish U.** (1973). Salt tolerance in the wild relatives of the cultivated tomato: Water balance and abscisic acid in *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum* under low and high salinity. *Aust. J. Agric. Res.* 24: 353–361
- Tal M.** (1971). Salt tolerance in the wild relatives of the cultivated tomato: Responses of *Lycopersicon esculentum*, *L. peruvianum*, and *L. esculentum minor* to sodium chloride solution. *Aust. J. Agric. Res.*, 22: 631–638.
- Tanaka Y., Tsuda S. & Kusumi T.** (1998). Metabolic engineering to modify flower color. *Plant and cell physiology*, 39: 1119-1126.
- Tanksley S. D.** (2004). The genetic, developmental, and molecular bases of fruit size and shape variation in tomato. *The Plant Cell*, 16(suppl 1), S181-S189.
- Tarczynski M. C., Jensen R. G. & Bohnert H. J.** (1993). Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol. *SCIENCE-NEW YORK THEN WASHINGTON-*, 259: 508-508.
- Tester M. & Bacic A.** (2005). Abiotic stress tolerance in grasses. From model plants to crop plants. *Plant Physiology*, 137: 791-793.
- Tester M. & Davenport R.** (2003). Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Annals of Botany*, 91: 503-527.
- Thitamadee S., Tsuchihara K. & Hashimoto T.** (2002). Microtubule basis for left-handed helical growth in *Arabidopsis*. *Nature*, 417: 193-196.
- Thomas J.C., Sepahi M., Arndall B. & Bohnert H.J.** (1995) Enhancement of seed germination in high salinity by engineering mannitol expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Envr.* 18:801–806.
- Tilney-Bassett R.A.E.** (1975). Genetics of variegated plants. In *Genetics and Biogenesis of Mitochondria and Chloroplasts* (eds. C.W. Birky, P.S. Perlman & T.J. Byers), pp. 268-308. Ohio State University Press, Columbus, OH.
- Tirlapur U.K., Dahse I., Reiss B., Meurer J. & Oelmüller R.** (1999). Characterization of the activity of a plastid-targeted green fluorescent protein in *Arabidopsis*. *European Journal of Cell Biology*, 78: 233-240.
- Tournefort J. P. de.** (1694). *Éléments de botanique*. Paris: l'Imprimerie royale.

- Tuberosa R. & Salvi S.** (2006). Genomics-based approaches to improve drought tolerance of crops. *Trends Plant Science*, 11: 405-412.
- Türkan I. & Demiral T.** (2009). Recent developments in understanding salinity tolerance. *Environmental and Experimental Botany* 67: 2-9.
- Turner N. C. & Jones M. M.** (1980). Turgor maintenance by osmotic adjustment: a review and evaluation. *Adaptation of Plants to Water and High Temperature Stress* (NC Turner and PJ Kramer, Editors). 87-103.
- Tuteja N. & Mahajan S.** (2007). Calcium signaling network in plants: an overview. *Plant signaling & behavior*, 2: 79-85.
- Tuteja N.** (2007). Chapter Twenty-Four-Mechanisms of High Salinity Tolerance in Plants. *Methods in enzymology*, 428: 419-438.
- Tzafrir I., Pena-Muralla R., Dickerman A., Berg M., Rogers R., Hutchens S., Sweeney T.C., McElver J., Aux G., Patton D. & Meinke D.** (2004). Identification of genes required for embryo development in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 135: 1206–1220.
- Umehara M., Hanada A., Yoshida S., Akiyama K., Arite T., Takeda-Kamiya N., ... & Yamaguchi S.** (2008). Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature*, 455: 195-200.
- Uwer U., Willmitzer L. & Altmann T.** (1998). Inactivation of a glycyl-tRNA synthetase leads to an arrest in plant embryo development. *Plant Cell*, 10: 1277–1294
- Vain P., Worland B., Thole V., McKenzie N., Alves S. C., Opanowicz M., Fish L.J., Bevan M.W. & Snape, J. W.** (2008). Agrobacterium-mediated transformation of the temperate grass *Brachypodium distachyon* (genotype Bd21) for T-DNA insertional mutagenesis. *Plant Biotechnology Journal*, 6: 236-245.
- Van Tuinen A., Peters A.H.L.J., Kendrick R.E., Zeevaart J.A.D. & Koornneef M.** (1999). Characterisation of the proceras mutant of tomato and the interaction of gibberellins with end-of-day far-red light treatments. *Physiol. Plant*, 106: 121–128.
- Vannini C., Campa M., Iriti M., Genga A., Faoro F., Carravieri S., ... & Bracale M.** (2007). Evaluation of transgenic tomato plants ectopically expressing the rice *Osm4* gene. *Plant Science*, 173: 231-239.
- Venema K., Quintero F. J., Pardo J. M., & Donaire J. P.** (2002). The Arabidopsis Na^+/H^+ exchanger AtNHX1 catalyzes low affinity Na^+ and K^+ transport in reconstituted liposomes. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 2413-2418.
- Vij S. & Tyagi A.K.** (2007). Emerging trends in the functional genomics of the abiotic stress response in crop plants. *Plant Biotechnology Journal*, 3: 361-380.
- Vizir I., Thorlby G. & Mulligan B.** (1996). Classical mutagenesis and genetic analysis. In *Plant Gene Isolation: Principles and Practice* (eds G.D. Foster & D. Twell), pp. 216- 245. John Wiley & Sons Ltd., New York.

- Vrebalov J., Ruezinsky D., Padmanabhan V., White R., Medrano D., Drake R., Schuch W. & Giovannoni J.** (2002). A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato ripening-inhibitor (rin) locus. *Science*, 296(5566): 343-346.
- Walbot V., Hoisington D.A. & Neuffer M.G.** (1983). Disease lesion mimic mutations. In *Genetic Engineering of Plants* (pp. 431-442). Springer US.
- Wang Q., Sullivan R. W., Kight A., Henry R. L., Huang J., Jones A. M. & Korth K. L.** (2004). Deletion of the chloroplast-localized Thylakoid formation1 gene product in *Arabidopsis* leads to deficient thylakoid formation and variegated leaves. *Plant physiology*, 136: 3594-3604.
- Wang W., Vinocur B. & Altman A** (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218: 1–14
- Webb K.J., Skøt L., Nicholson M.N., Jørgensen B. & Mizen S.** (2000). Mesorhizobium loti increases root-specific expression of a calcium-binding protein homologue identified by promoter tagging in *Lotus japonicus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13: 606-616.
- Weese T.L. & Bohs L.** (2007). A three-gene phylogeny of the genus *Solanum* (Solanaceae). *Systematic Botany*, 32: 445-463.
- Weinl S. & Kudla J.** (2009). The CBL–CIPK Ca²⁺-decoding signaling network: function and perspectives. *New Phytologist*, 184: 517-528.
- Wen C. K. & Chang C.** (2002). *Arabidopsis* RGL1 encodes a negative regulator of gibberellin responses. *Plant Cell*, 14: 87-100.
- Wetzel C.M., Jiang C.Z., Meehan L.J., Voytas D.F. & Rodermel S.R.** (1994). Nuclear-organelle interactions: the immutans variegation mutant of *Arabidopsis* is plastid autonomous and impaired in carotenoid biosynthesis. *Plant Journal*, 6: 161-175.
- Whittington A.T., Vugrek O., Wei K.J., Hasenbein N.G., Sugimoto K., Rashbrooke M.C. & Wasteneys G.O.** (2001). MOR1 is essential for organizing cortical microtubules in plants. *Nature*, 411: 610-613.
- Wildermuth M.C., Dewdney J., Wu G. & Ausubel F.M.** (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*, 414: 562–565.
- Winzeler E. A., Shoemaker D. D., Astromoff A., Liang H., Anderson K., Andre B., ... & Philippsen P.** (1999). Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science*, 285: 901-906.
- Wisman E., Hartmann U., Sagasser M., Baumann E., Palme K., Hahlbrock K., Saedler H. & Weisshaar, B.** (1998). Knock-out mutants from an *En-1* mutagenized *Arabidopsis thaliana* population generate phenylpropanoid biosynthesis phenotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 95: 12432-12437.

- Wu C., Li X., Yuan W., Chen G., Kilian A., Li J., Xu C., Li X., Zhou D.X., Wang Sh. & Zhang Q.** (2003). Development of enhancer trap lines for functional analysis of the rice genome. *The Plant Journal*, 35: 418-427.
- Wu D., Wright D.A., Wetzel C., Voytas D.F. & Rodermeil S.** (1999) The IMMUTANS variegation locus of Arabidopsis defines a mitochondrial alternative oxidase homolog that functions during early chloroplast biogenesis. *Plant Cell*, 11: 43-55.
- Wu S.J., Ding L. & Zhu JK.** (1996). SOS1, a genetic locus essential for salt tolerance and potassium acquisition. *Plant Cell* 8: 617-627.
- Wu Z., Zhang X., He, B., Diao L., Sheng S., Wang, J., ... & Wan, J.** (2007). A chlorophyll-deficient rice mutant with impaired chlorophyllide esterification in chlorophyll biosynthesis. *Plant physiology*, 145: 29-40.
- Wyn Jones R.** (1981). Salt tolerance. *Physiological processes limiting plant productivity*, 271-292.
- Wyn Jones R.G. & Storey R.** (1978) Salt stress and comparative physiology in the Gramineae. II. Glycinebetaine and proline accumulation in two salt- and water-stressed barley cultivars. *Australian Journal of Plant Physiology*, 5: 817–829.
- Xiao J., Li H., Zhang J., Chen R., Zhang Y., Ouyang B., Wang T. & Ye Z.** (2006). Dissection of GA 20-oxidase members affecting tomato morphology by RNAi-mediated silencing. *Plant growth regulation*, 50(2-3): 179-189.
- Xu J., Li H.D., Chen L.Q., Wang Y., Liu L.L., He L. & Wu W.H.** (2006). A protein kinase, interacting with two Calcineurin B-like proteins, regulates K⁺ transporter AKT1 in *Arabidopsis*. *Cell*, 125: 1347–1360.
- Yamaguchi T. & Blumwald E.** (2005). Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities. *Trends in Plant Science*, 10: 615-620.
- Yamamoto Y.Y., Puente P. & Deng X-W.** (2000) An *Arabidopsis* cotyledon-specific albino locus: a possible role in 16S rRNA maturation. *Plant and Cell Physiology*, 41: 68-76.
- Yamasaki H., Abdel-Ghany S.E., Cohu C.M., Kobayashi Y., Shikanai T. & Pilon M.** (2007). Regulation of copper homeostasis by micro-RNA in Arabidopsis. *J Biol Chem*;282(22):16369–78.
- Yancey P. H., Clark M. E., Hand S. C., Bowlus R. D. & Somero G. N.** (1982). Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science*, 217: 1214-1222.
- Yeo A.R. & Flowers T.J.** (1986). Salinity resistance in rice (*Oryza sativa* L.) and a pyramiding approach to breeding varieties for saline soils. *Functional Plant Biology*, 13: 161-173.
- Yeo A.R.** (1998). Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. *Journal of Experimental Botany*, 49(323): 915-929.
- Yin Z. & Wang G.L.** (2000). Evidence of multiple complex patterns of T-DNA integration into the rice genome. *Theoretical and Applied Genetics*, 100: 461-470.

- Yokoi S., Quintero F.J., Cubero B., Ruiz M.T., Bressan R.A., Hasegawa P.M. & Pardo J.M.** (2002). Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na⁺/H⁺ antiporters in the salt stress response. *The Plant Journal*, 30: 529-539.
- Yokota T.** (1997). The structure, biosynthesis and function of brassinosteroids. *Trends in Plant Science*, 2: 137-143.
- Yoshida S., Ito M., Nishida I. & Watanabe A.** (2002). Identification of a novel gene HYS1/CPR5 that has a repressive role in the induction of leaf senescence and pathogen-defence responses in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 29: 427-437.
- Yue B., Cai X., Vick B. & Hu J.** (2009). Genetic characterization and molecular mapping of a chlorophyll deficiency gene in sunflower (*Helianthus annuus*). *Journal of plant physiology*, 166: 644-651.
- Zamir D., Michelson I.E., Zakay Y., Navot N., Zeidan M., Sarfatti M., Eshed Y., Harel E., Pleban T., van Oss H., Kedar N., Rabinowitch H.D. & Czosnek H.** (1994). Mapping and introgression of a *Tomato yellow leaf curl virus* tolerance gene, *Ty-1*. *Theor. Appl. Genet.* 88: 141-146.
- Zhang H.X. & Blumwald E.** (2001). Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nature Biotechnology*, 19:765–768.
- Zhang H.X., Hodson J.N., Williams J.P. & Blumwald E.** (2001). Engineering salt-tolerant Brassica plants: Characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 98: 12832-12836.
- Zhang L., Kato Y., Otters S., Vothknecht U. C. & Sakamoto W.** (2012). Essential role of VIPP1 in chloroplast envelope maintenance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online*, 24: 3695-3707.
- Zhang T., Yuan Y., Yu J., Guo W. & Kohel R.J.** (2003). Molecular tagging of a major QTL for fiber strength in Upland cotton and its marker-assisted selection. *Theoretical and Applied Genetics*, 106: 262-268.
- Zhao F., Guo S., Zhang H. & Zhao Y.** (2006). Expression of yeast SOD2 in transgenic rice results in increased salt tolerance. *Plant Science*, 170: 216–224.
- Zhao T., Palotta M., Langridge P., Prasad M., Graner A., Schulze-Lefert P. & Koprek T.** (2006). Mapped Ds/T-DNA launch pads for functional genomics in barley. *The Plant Journal*, 47: 811-826.
- Zhao Y., Wang M., Zhang Y., Du L. & Pan T.** (2000). A chlorophyll-reduced seedling mutant in oilseed rape, *Brassica napus*, for utilization in F1 hybrid production. *Plant Breeding*, 119: 131-135.
- Zhou W., Li Y., Zhao B. C., Ge R. C., Shen Y. Z., Wang G. & Huang Z. J.** (2009). Overexpression of TaSTRG gene improves salt and drought tolerance in rice. *Journal of plant physiology*, 166: 1660-1671.

-
- Zhou Y., Gong Z., Yang Z., Yuan Y., Zhu J., Wang, M., ... & Liang G.** (2013). Mutation of the light-induced yellow leaf 1 gene, which encodes a geranylgeranyl reductase, affects chlorophyll biosynthesis and light sensitivity in rice. *PloS one*, 8: e75299.
- Zhu B.C., Su J., Chan M.C., Verma D.P.S., Fan Y-L. & Wu R.** (1998). Overexpression of Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthase gene and analysis of tolerance to water-stress and salt-stress in transgenic rice. *Plant Science*, 139: 41-48.
- Zhu J.K.** (2001). Plant salt tolerance. *Trends Plant Science*, 6: 66–71.
- Zhu J.K.** (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual review of plant biology*, 53: 247.
- Zhu J.K.** (2003). Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current opinion in plant biology*, 6: 441-445.
- Zhu J.K., Liu J. & Xiong L.** (1998). Genetic analysis of salt tolerance in *Arabidopsis*: evidence for a critical role of potassium nutrition. *Plant Cell*, 10: 1181–1191.

