

<b>ÍNDICE.....</b>	<b>I</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>VIII</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>XI</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>XVI</b>
<b>RESÚMENES.....</b>	<b>XVIII</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1. El tomate.....	1
1.1. Origen y domesticación.....	1
1.2. Taxonomía.....	2
1.3. Características generales.....	2
1.3.1. Morfología de la planta.....	2
1.3.2. Morfología del fruto.....	3
1.3.3. Composición del fruto.....	4
1.4. Fructificación.....	6
1.4.1. Polinización.....	6
1.4.2. Fecundación.....	6
1.5. Desarrollo del fruto.....	8
1.6. Control hormonal de la fructificación.....	9
1.6.1. Las auxinas y la fructificación en tomate.....	10
1.6.2. Las giberelinas y la fructificación en tomate.....	12
2. Partenocarpia en tomate.....	17
2.1. Tipos y fuentes de partenocarpia.....	17
2.2. Relación entre los genes homeóticos florales y la partenocarpia.....	19
2.3. La androesterilidad y la partenocarpia.....	21
2.3.1. Definición y tipos de androesterilidad.....	21
2.3.2. Importancia de la androesterilidad en especies hortícolas.....	23
2.3.3. Obtención de plantas androestériles mediante ingeniería genética.....	24
3. Características de calidad en tomate.....	27
3.1. Tomates para consumo en fresco.....	27
3.1.1. Caracteres vegetativos y reproductivos.....	27
3.1.2. Caracteres del fruto.....	28
3.1.2.1. Calidad externa.....	29
3.1.2.2. Calidad interna.....	30
3.1.2.3. Calidad nutritiva.....	33
3.2. Tomates para procesado industrial.....	34
3.2.1. Caracteres vegetativos y reproductivos.....	34

---

3.2.2. Caracteres del fruto.....	35
3.2.2.1. Calidad externa.....	35
3.2.2.2. Calidad interna.....	36
3.2.2.3. Calidad nutritiva.....	37
4. Estado actual de la calidad organoléptica del tomate y objetivos de mejora.....	37
5. Dificultades de la mejora de la calidad organoléptica en tomate y perspectivas de futuro.....	38
6. El tomate como sistema modelo para estudios del desarrollo.....	42
6.1. Genómica funcional en plantas.....	43
6.2. Colecciones de ESTs y micromatrices de DNA.....	44
6.3. Aproximación genómico-funcional al desarrollo del fruto de tomate.....	46
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>48</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>49</b>
1. Material vegetal y su manipulación.....	49
1.1. Material vegetal.....	49
1.2. Condiciones de cultivo.....	49
1.3. Polinización cruzada.....	50
1.4. Recolección de ovarios en diferentes estadios del desarrollo floral.....	50
1.5. Tratamientos hormonales.....	51
1.6. Preparación de muestras vegetales para microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido.....	52
1.6.1. Microscopía electrónica de barrido.....	52
1.6.2. Microscopía óptica.....	53
2. Cepas bacterianas.....	53
2.1. Transformación de cepas bacterianas.....	54
3. Métodos de biología molecular.....	54
3.1. Extracción de ácidos nucleicos.....	54
3.1.1. Extracción de DNA plasmídico de <i>E. coli</i> y <i>A. tumefaciens</i> .....	55
3.1.2. Extracción de DNA genómico de tomate.....	55
3.1.3. Extracción de RNA total de ovarios de tomate.....	56
3.2. Southern blot.....	56
3.2.1. Digestión del DNA genómico.....	56
3.2.2. Electroforesis en gel de agarosa y transferencia a membrana.....	56

---

3.2.3. Marcaje de sondas radioactivas.....	57
3.2.4. Hibridación y autoradiografías.....	57
3.3. Amplificación de DNA por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	57
4. Transformación genética de tomate.....	58
4.1. Construcción utilizada para la transformación genética.....	58
4.2. Método de transformación.....	59
4.2.1. Esterilización de semillas.....	59
4.2.2. Obtención de plántulas axénicas y extracción de explantes de cotiledón.....	59
4.2.3. Cultivo de explantes primarios.....	60
4.2.4. Preparación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para la transformación.....	60
4.2.5. Cocultivo.....	60
4.2.6. Inducción de organogénesis.....	61
4.2.7. Propagación clonal.....	61
4.2.8. Aclimatación en condiciones de invernadero.....	62
5. Soluciones minerales, soluciones vitamínicas y medios de cultivo.....	62
5.1. Solución mineral MS de Murashige y Skoog (1962).....	62
5.2. Solución vitamínica.....	62
5.3. Medios de cultivo.....	63
5.4. Medios de cultivo específicos para la transformación genética.....	63
6. Caracterización del material vegetal.....	64
6.1. Evaluación del nivel de sensibilidad a kanamicina.....	64
6.2. Evaluación del nivel de ploidía.....	64
6.3. Evaluación de las características fenotípicas de las plantas transgénicas (TG1) <i>PsEND1::barnasa</i> .....	64
6.3.1. Evaluación de caracteres del desarrollo vegetativo y reproductivo.....	65
6.3.2. Análisis de viabilidad de los granos de polen de plantas de tomate.....	67
7. Evaluación de las características de calidad de los frutos de plantas transgénicas (TG1) <i>PsEND1::barnasa</i> .....	67
7.1. Contenido en sólidos solubles.....	68
7.2. Acidez titulable.....	69
7.3. Índice de sabor.....	69
7.4. Medición del color por colorimetría.....	69

---

7.5. Análisis de compuestos volátiles mediante GC-MS.....	71
7.5.1. Material vegetal.....	71
7.5.2. Preparación de las muestras.....	71
7.5.3. Separación e identificación: Microextracción en fase sólida en espacio de cabeza y cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (HS-SPME-GC-MS).....	72
7.5.4. Cuantificación.....	73
7.5.5. Análisis estadístico.....	73
7.6. Análisis de metabolitos primarios.....	73
7.6.1. Material vegetal.....	73
7.6.2. Extracción de metabolitos.....	73
7.6.3. Derivatización.....	73
7.6.4. Detección y separación.....	74
7.6.5. Identificación y cuantificación.....	74
7.6.6. Análisis estadístico.....	74
8. Análisis de la expresión génica mediante micromatrices de DNA.....	75
8.1. Diseño del experimento con micromatrices.....	75
8.2. Descripción de la micromatriz empleada.....	76
8.3. Amplificación y marcaje del RNA.....	77
8.4. Hibridación de las micromatrices.....	78
8.5. Lavado de los cristales.....	78
8.6. Obtención de los datos de las micromatrices.....	79
8.6.1. Exploración y análisis de imagen.....	79
8.6.2. Análisis estadístico de los datos.....	80
8.6.3. Análisis de agrupamiento.....	81
9. PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR).....	82
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>84</b>
1. Obtención de plantas transgénicas androestériles de <i>Solanum lycopersicum</i> ..	84
1.1. Transformación de <i>Solanum lycopersicum</i> con la construcción <i>PsEND1::barnasa</i> .....	84
2. Caracterización molecular de las plantas transgénicas (TG1) <i>PsEND1::barnasa</i> .....	88
2.1. Amplificación fragmento <i>barnasa</i> mediante PCR.....	88
2.2. Análisis Southern de las plantas transgénicas <i>PsEND1::barnasa</i> .....	89

---

3. Evaluación de las características fenotípicas de las plantas transgénicas (TG1) <i>PsEND1::barnasa</i> .....	91
3.1. Características del desarrollo vegetativo.....	92
3.1.1. Altura de las plantas.....	92
3.2. Características del desarrollo reproductivo.....	93
3.2.1. Tiempo de floración.....	93
3.2.2. Número de inflorescencias por planta.....	95
3.2.3. Número de flores por inflorescencia.....	96
3.2.4. Morfología de la flor.....	97
3.2.5. Morfología de las anteras de las plantas <i>PsEND1::barnasa</i> .....	98
3.2.6. Morfología y análisis de viabilidad de los granos de polen.....	99
3.3. Fructificación de las plantas <i>PsEND1::barnasa</i> .....	101
3.3.1. Estudio histológico del desarrollo del ovario.....	101
3.3.2. Papel de las giberelinas en el desarrollo del ovario transgénico <i>PsEND1::barnasa</i> .....	104
4. Evaluación de las características físicas de calidad de los frutos de plantas transgénicas (TG1) <i>PsEND1::barnasa</i> .....	106
4.1. Peso medio de los frutos, número total de frutos por planta y peso total frutos por planta.....	107
4.2. Anchura, altura y ratio anchura/altura de los frutos.....	110
4.3. Cicatriz peduncular y altura de los hombros de los frutos.....	113
4.4. Espesor del pericarpo y de la piel de los frutos.....	116
4.5. Número de lóculos de los frutos.....	116
5. Evaluación de las características de calidad del fruto procesado de los frutos de plantas transgénicas (TG1) <i>PsEND1::barnasa</i> .....	118
5.1. Contenido en sólidos solubles (°Brix).....	118
5.2. Acidez titulable.....	119
5.3. Índice de sabor.....	121
5.4. Color.....	122
5.5. Análisis de compuestos volátiles de los genotipos <i>PsEND1::barnasa</i> mediante GC-MS.....	128
5.5.1. Identificación de compuestos volátiles en frutos de tomate.....	128
5.5.2. Separación de los genotipos <i>PsEND1::barnasa</i> en base a su perfil de volátiles.....	129

---

5.5.3. Análisis de los compuestos volátiles significativos en los genotipos (MMK TR 39.1, MMK TR 59.1, MMK TR 26.1 y MMK TR 38.1).....	132
5.6. Análisis de metabolitos primarios en los genotipos MMK TR 39.1 y MMK TR 59.1 mediante GC-MS.....	137
5.6.1. Identificación de metabolitos primarios.....	137
5.6.2. Separación de los genotipos <i>PsEND1::barnasa</i> en base a su perfil de metabolitos primarios.....	137
5.6.3. Análisis de los metabolitos primarios en los genotipos MMK TR 39.1 y MMK TR 59.1.....	139
6. Análisis transcriptómico del desarrollo temprano del ovario de plantas transgénicas de tomate <i>PsEND1::barnasa</i> .....	143
6.1. Diseño experimental y obtención del material vegetal.....	143
6.2. Anotación funcional de la micromatriz TOM2.....	144
6.3. Estudio del transcriptoma de los ovarios <i>PsEND1::barnasa</i> en diferentes estadios de desarrollo.....	146
6.3.1. Identificación y análisis de los genes expresados diferencialmente.	146
6.3.2. Clasificación funcional de los unigenes.....	149
6.3.3. Visualización de los cambios transcripcionales mediante el programa Mapman.....	152
6.4. Agrupamiento de los genes expresados diferencialmente en función de patrones comunes de expresión temporal.....	172
7. Análisis de la expresión de genes relacionados con giberelinas y auxinas en ovarios de plantas <i>PsEND1::barnasa</i> mediante qRT-PCR.....	174
7.1. Genes que codifican enzimas del metabolismo de las GAs.....	175
7.2. Genes de señalización de auxinas pertenecientes a las familias Aux/IAA y ARF.....	179
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>182</b>
1. Androesterilidad en plantas transgénicas <i>PsEND1::barnasa</i> .....	183
2. La ablación temprana de las anteras en plantas transgénicas de tomate <i>PsEND1::barnasa</i> provoca el desarrollo de frutos partenocárpico.....	184
3. La producción de los genotipos <i>PsEND1::barnasa</i> es similar a la de los genotipos silvestres.....	187
4. Los frutos de las plantas <i>PsEND1::barnasa</i> presentan mayor índice de sabor que los frutos silvestres.....	189

---

5. Los frutos partenocárpicos de plantas <i>PsEND1::barnasa</i> muestran algunas modificaciones en el color.....	190
6. Los frutos de los genotipos MMK TR 39.1 y MMK TR 59.1 presentan cambios importantes en el perfil de volátiles y metabolitos primarios.....	191
7. La formación de frutos partenocárpicos <i>PsEND1::barnasa</i> está asociada a importantes cambios transcripcionales en estadios tempranos del desarrollo del ovario.....	194
8. Auxinas y giberelinas participan en el desarrollo partenocárpico de los frutos de plantas <i>PsEND1::barnasa</i> .....	196
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>202</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>205</b>
<b>VIII. ANEXOS.....</b>	<b>232</b>