



**UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA**

Departamento de Biotecnología

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas

**Caracterización de mutantes insercionales y
somaclonales de tomate y *Solanum galapagense*
alterados en la tolerancia a estrés abiótico y caracteres
del desarrollo relacionados**

TESIS DOCTORAL

Marybel Jáquez Gutiérrez

Dirigido por:

Dr. Vicente Moreno Ferrero

Dr. Alejandro Atarés Huerta

MAYO 2018

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. Alejandro Atarés Huerta, Doctor Ingeniero Agrónomo y Profesor Contratado Doctor del Departamento de Biotecnología, de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural de la Universidad Politécnica de Valencia

Hacen constar que:

D^a. Marybel Jáquez Gutiérrez, Ingeniera Industrial, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo que presenta para optar al grado de Doctor por la Universidad Politécnica de Valencia y que lleva por título:” Caracterización de mutantes insercionales y somaclonales de tomate y *Solanum galapagense* alterados en la tolerancia a estrés abiótico y caracteres del desarrollo relacionados”.

Para que así conste a los efectos académicos oportunos, firma el presente certificado en Valencia a 29 de mayo de 2018.

D. Vicente Moreno Ferrero

D. Alejandro Atarés Huerta

Agradecimientos

En primer lugar quiero expresar mi gratitud y agradecimiento a Vicente Moreno por haberme dado esta oportunidad única y arriesgarse en aceptarme sin conocerme para formar parte de su grupo de investigación. Muchas gracias por dirigir esta tesis, por la orientación, enseñanzas, seguimiento y el apoyo recibido a lo largo de estos años. Me llevo más de lo que yo pude haber dejado. Muchas Gracias por acogerme como un miembro más y darme la oportunidad de aprender un montón de cosas.

Me gustaría agradecer de una manera especial a Alex Atarés por la supervisión continua, el compromiso, dedicación y el interés por mi trabajo. Por los consejos, la enorme paciencia, generosidad, ánimo y todo lo que me ha enseñado. Muchas gracias por el inestimable apoyo durante todo este tiempo. He sido muy afortunada. Sé que sin su ayuda no lo hubiera conseguido. Muchas gracias por todo Alex.

Quiero manifestar mi agradecimiento a todo el grupo. Muchas gracias a Begoña por compartir su experiencia de cultivo *in vitro* así como por sus valiosos consejos para hacer mejor mi trabajo. Le agradezco a Benito sus aportaciones y sugerencias para enriquecer esta tesis. Muchas Gracias por compartir sus conocimientos y experiencias.

Un agradecimiento al grupo de investigación del Dr. Lozano de la Universidad de Almería por su cooperación para esta investigación.

A mis compañeros de doctorado. Jorge por la valiosa ayuda en mí llegada a Valencia, por ser un gran compañero de trabajo. Sibilla por las enseñanzas durante las primeras etapas de mi tesis. Carlos por la ayuda y las anécdotas compartidas. Muchas gracias Jorge, Sibilla y Carlos por su amistad, fue para mí un privilegio haberlos conocido. Muchas gracias también a todos los estudiantes de prácticas, grado y máster que pasaron por el laboratorio hicieron mis días más especiales: Eva, Verónica, Jesús, Eduardo, Esther, Nico, Andrés, Ignacio, Javier, Pablo, Noemia, Alberto, Constanza, Inés, Sara, Laura, Carles y Alicia. Me llevo muy bonitos recuerdos.

Quiero agradecer la ayuda recibida de Jesús en el invernadero y de Pilar en el IBMCP, no cabe duda que todas las tareas son muy importantes.

Agradezco a CONACYT “Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología” de México por el apoyo económico brindado al otorgarme la beca para mis estudios de doctorado.

A la Universidad Politécnica de Valencia.

Me llevo una excelente experiencia, la realización de esta tesis me ha dejado un gran crecimiento profesional y personal. Estoy muy contenta de haber tomado esta decisión y vivir esta aventura. Recuerdo lo difícil que fue hacer a un lado el miedo al fracaso, al no puedo; qué bueno que fueron más fuertes las ganas de intentarlo.

En este camino he conocido personas maravillosas, que me han contagiado de risas, alegría y momentos inolvidables. Muchas gracias Analy por tantas muestras de cariño, por su valiosa amistad, por su tiempo, muchas gracias por tanto; como olvidar las veces que cantamos "Viva México". Marian como no dedicarte unas líneas en este apartado si compartimos tantas cosas aparte del amor a las croquetas, la mayoría de los planes que tenías eran con algo mexicano, muchas gracias por tu amistad, por mimarme tanto. Guardaré con nostalgia tan gratos momentos. Ha sido un placer coincidir.

A mis padres, Gregorio e Imelda por haberme enseñado a ser valiente y la libertad de elección que siempre he tenido. A mis hermanas Mirna y Jimena muchas gracias por aceptar mi ausencia. Porque aunque no hayan estado a mi lado, es muy bonito sentir que en casa siempre hay alguien que no me olvida. Los quiero mucho. Siempre conmigo no muy cerca, pero sí muy dentro.

A todos muchas gracias.

Con cariño para

Mis padres

Gregorio e Imelda

Mis hermanas

Mirna y Jimena

Índice general

Índice.....	I
Índice de figuras.....	V
Índice de tablas.....	XIII
Resúmenes.....	XV

Índice

INTRODUCCIÓN	1
1.1. El tomate.....	3
1.1.1. Importancia.....	3
1.1.2. Taxonomía y clasificación.....	4
1.1.3. Especies silvestres relacionadas con el tomate.....	5
Importancia de las especies silvestres.....	7
1.1.4. El tomate en la investigación científica.....	7
1.1.5. Desarrollo de la planta de tomate.....	8
1.2. El estrés abiótico.....	12
1.2.1. Respuesta de las plantas al estrés.....	12
1.2.2. Estrés salino.....	13
1.2.3. Estrés hídrico.....	22
1.2.4. Relación de caracteres del desarrollo con el estrés abiótico.....	25
1.3. Herramientas biotecnológicas para la identificación de genes.....	27
1.3.1. Mutagénesis insercional.....	28
OBJETIVOS	37
MATERIAL Y MÉTODOS	41
3.1 Material vegetal y técnicas básicas.....	43
3.1.1. Esterilización de semillas.....	44
3.1.2. Obtención de plántulas y plantas axénicas.....	44
3.1.3. Clonación de plantas.....	45
3.1.4. Aclimatación y cultivo en invernadero.....	45
3.2. Esquema de trabajo con las líneas T-DNA.....	46

3.3. Detección de mutantes	47
3.3.1. Detección de mutantes alterados en la tolerancia a salinidad	48
3.3.2. Detección de mutantes alterados en la tolerancia al estrés hídrico	48
3.4. Análisis fenotípico	49
3.4.1. Desarrollo de la planta <i>in vitro</i>	50
3.4.2. Desarrollo de la planta <i>in vivo</i>	51
3.4.3. Técnicas de microscopía	52
3.4.4. Cuantificación de hormonas vegetales endógenas	53
3.4.5. Evaluación del contenido de agua relativo RWC.....	53
3.5. Análisis genético	54
3.5.1. Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante	55
3.5.2. Análisis del número de insertos de T-DNA.....	55
3.5.3. Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante.....	56
3.6. Evaluación de la expresión del gen delator	58
RESULTADOS	59
4.1. Identificación y caracterización de mutantes alterados en su nivel de tolerancia a estreses abióticos	61
Mutante 1389 ET MM	63
Mutante 2149 ET MM	69
Mutante 1560 ET MM	82
Mutante 698 ET MM	93
Mutante 916 ET MM	98
4.2. Identificación y caracterización de mutantes del desarrollo relacionados con la tolerancia a estreses abióticos	102
4.2.1. Mutantes afectados en el desarrollo de la parte aérea.....	103
Mutante 111 ET GA.....	104
Mutante 131 ET GA.....	110
Mutante 2742 ET MM.....	115
Mutante 2647 ET MM M1	122
Mutante 1458 ET MM.....	128
4.2.2. Mutantes afectados en el variegación y clorosis	137
Mutante 2494 ET MM.....	137
Mutante 245 ET GA.....	141
Mutante 2232 ET MM.....	144
4.2.3. Mutantes afectados en senescencia y letalidad	149
Mutante 167 ET GA.....	149

Mutante 199 ET MM.....	157
Mutante 332 ET GA.....	165
Mutante 526 ET 73.....	169
Mutante 1524 ET MM.....	173
Mutante 1641 ET MM.....	174
4.2.4. Mutantes afectados en el desarrollo radicular	180
Mutante 196 ET GA.....	185
Mutante 2647 ET MM M2.....	191
Mutante 2666 ET MM.....	203
Mutante <i>dor</i>	208
Mutante 384 ET MM.....	219
DISCUSIÓN	237
5.1. Identificación de mutantes afectados en su nivel de tolerancia al estrés hídrico	238
5.2. Identificación de mutantes afectados en el grado de tolerancia a la salinidad	240
5.3. Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante	241
5.4. Análisis genético del número de insertos T-DNA.....	242
5.5. Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante	243
5.6. Caracterización de mutantes afectados en la tolerancia al estrés por sequía	245
5.7. Caracterización de mutantes afectados en la tolerancia al estrés salino	248
5.8. Caracterización de mutantes con alteraciones en la parte aérea.....	250
5.9. Caracterización de mutantes cloróticos y variegados	252
5.10. Caracterización de mutantes de senescencia y letalidad.....	253
5.11. Caracterización de mutantes afectados en el desarrollo radicular	256
CONCLUSIONES	261
BIBLIOGRAFÍA	265

Índice de figuras

Figura 1. Producción de tomate en 2014.....	3
Figura 2. Distribución geográfica del tomate silvestre en América del sur.....	5
Figura 3. Hojas de <i>S. cheesmaniae</i> y <i>S. galapagense</i>	9
Figura 4. Diversidad fenotípica del tomate.....	10
Figura 5. Factores hormonales, ambientales y genéticos implicados en el enraizamiento lateral y adventicio.....	11
Figura 6. Vía de señalización implicada en respuesta al estrés abiótico en las plantas.....	13
Figura 7. Regulación de la homeostasis iónica a través de la ruta SOS.....	16
Figura 8. Visión general de la regulación de las hormonas vegetales en la tolerancia a la salinidad.....	19
Figura 9. Respuesta de las plantas al estrés hídrico.....	22
Figura 10. Bases fisiológicas, bioquímicas y moleculares de tolerancia a estrés por sequía.....	23
Figura 11. Esquema de las construcciones utilizadas como trampas génicas y proteínas resultantes de la expresión del gen endógeno y del gen delator....	35
Figura 12. Representación esquemática del plásmido pD991 que incluye la trampa de intensificadores.....	43
Figura 13. Obtención de plántulas y plantas axénicas.....	44
Figura 14. Plantas recién aclimatadas.....	45
Figura 15. Representación del esquema de trabajo general llevado a cabo en nuestro programa de mutagénesis insercional.....	46
Figura 16. Representación del primer ciclo del método para la identificación de mutantes afectados en su tolerancia al estrés hídrico en líneas T-DNA de tomate.....	49
Figura 17. Plántula de 7 días y planta axénica de 30 días de tomate.....	50
Figura 18. Procedimiento para la realización de injertos.....	51
Figura 19. Metodología para calcular el contenido de agua relativo RWC.....	54
Figura 20. Evaluación de la resistencia a la kanamicina en cotiledones, hojas y yemas axilares.....	56
Figura 21. Representación esquemática de los cebadores empleados para rastrear la presencia de fragmentos de T-DNA y del cuerpo del vector en plantas mutantes.....	57
Figura 22. Fenotipo de plantas de la línea 1389 ET MM sometidas a un ciclo de tratamiento de estrés hídrico.....	63
Figura 23. Fenotipo al final de cada ciclo de riego de plantas de la línea 1389 ET MM cultivadas en el invernadero.....	64
Figura 24. Fenotipo de plantas de la línea 1389 ET MM un día después del riego de recuperación tras un tratamiento de estrés hídrico.....	65
Figura 25. Pérdida de agua de folíolos de hojas en distinto estado ontológico procedentes de plantas adultas tras 4 horas a temperatura ambiente de la línea 1389 ET MM.....	65
Figura 26. Fenotipo de la línea 1389 ET MM después de 30 días de riego con solución salina.....	66
Figura 27. Fenotipo de plantas F2 procedentes del cruce de la línea 1389 ET MM con <i>Solanum pimpinellifolium</i> tras el primer ciclo de estrés hídrico y un día después del riego de recuperación.....	68
Figura 28. Fenotipo de plantas axénicas de la línea 2149 ET MM tras 15 días de cultivo en medio base.....	69
Figura 29. Fenotipo del sistema radicular adventicio en plantas axénicas de la línea 2149 ET MM después de 15 días de cultivo en medio básico.....	70

Figura 30. Fenotipo de plantas y de hojas de la línea 2149 ET MM cultivadas en el invernadero durante 40 días.....	71
Figura 31. Fenotipo de plantas, flores y frutos de la línea 2149 ET MM tras 90 días de cultivo en el invernadero	72
Figura 32. Fenotipo de hojas de planta adulta de la línea 2149 ET MM	72
Figura 33. Pérdida de agua de folíolos cortados de plantas de tres meses no sometidas a estrés de la línea 2149 ET MM tras 4 horas a temperatura ambiente.	73
Figura 34. Fenotipo de plantas de la línea 2149 ET MM en diferentes momentos de la evaluación de tolerancia al estrés hídrico.....	74
Figura 35. Evolución del contenido en agua en el primer ciclo de deshidratación y recuperación de la línea 2149 ET MM.....	75
Figura 36. Fenotipo de haz y envés de hoja joven de la línea 2149 ET MM.....	76
Figura 37. Cortes histológicos de limbos de hojas de plantas de la línea 2149 ET MM no sometidas a estrés	76
Figura 38. Fenotipo de las plantas injertadas de la línea 2149 ET MM (izquierda) y de las hojas de dichas plantas (derecha) después de 70 días de cultivo en el invernadero	77
Figura 39. Evaluación de tolerancia a estrés salino mediante cultivo en el invernadero de plantas de la línea 2149 ET MM.....	78
Figura 40. Fenotipo de plantas y hojas en la F2 del cruce del mutante 2149 ET MM con <i>Solanum pimpinellifolium</i>	81
Figura 41. Fenotipo de plántulas de la línea 1560 ET MM después de 30 días de cultivo en medio de germinación con diferentes concentraciones de NaCl....	82
Figura 42. Fenotipo de planta axénica de la línea 1560 ET MM después de 30 días en medio básico sin y con NaCl 100 mM	83
Figura 43. Fenotipo de planta de la línea 1560 ET MM procedente de semilla tras 60 días de cultivo en invernadero.....	84
Figura 44. Fenotipo de plantas aclimatadas y procedentes de semilla de la línea 1560 ET MM cultivadas en el invernadero.....	85
Figura 45. Fenotipo de plántulas de la línea 1560 ET MM cultivadas en el invernadero con un tratamiento de estrés salino con NaCl 100 mM en los días 0, 15 y 30 del tratamiento	86
Figura 46. Fenotipo de injertos (WT/M y M/WT) en plantas procedentes de semilla de la línea 1560 ET MM después de 30 días en experimento <i>in vivo</i> de estrés salino con 100 mM de NaCl	87
Figura 47. Fenotipo plantas injertadas obtenidas a partir de semilla de la línea 1560 ET MM después de 30 días de cultivo en invernadero con estrés salino.....	88
Figura 48. Contenido de agua en hojas de plantas de la línea 1560 ET MM después de 30 días de cultivo en invernadero sin y con estrés salino	89
Figura 49. Pérdida de agua de folíolos tras 4 horas a temperatura ambiente de plantas injertadas de la línea 1560 ET MM tras 30 días de cultivo en invernadero con tratamiento estresante de NaCl 100 mM.	90
Figura 50. Fenotipo de plantas con sistema radicular embrionario de la línea 1560 ET MM durante diferentes etapas del primer ciclo de estrés hídrico	91
Figura 51. Fenotipo de plantas con sistema radicular adventicio de la línea 1560 ET MM durante diferentes etapas del primer ciclo de estrés hídrico	92
Figura 52. Fenotipo de plántulas de la línea 698 ET MM después de 30 días en medio MG con diferentes concentraciones de NaCl	94
Figura 53. Fenotipo de planta axénica de la línea 1560 ET MM después de 30 días en medio básico y medio básico con NaCl 100 mM	95
Figura 54. Fenotipo de plantas procedentes de semilla de la línea 698 ET MM cultivadas en el invernadero con un tratamiento de estrés salino con NaCl 100 mM.....	96

Figura 55. Pérdida de agua de folíolos (RWC) tras 4 horas a temperatura ambiente de plantas injertadas de la línea 698 ET MM tras 30 días de cultivo en invernadero con tratamiento estresante de NaCl 100 mM.....	97
Figura 56. Fenotipo de las plantas mutantes de la línea 916 ET MM obtenidas a partir de semilla tras 0, 15 y 30 días de tratamiento salino en el invernadero.....	98
Figura 57. Fenotipo de injertos M/WT de la línea 916 ET MM tras 20 días de tratamiento control y tratamiento salino.....	99
Figura 58. Fenotipo de injertos WT/M de la línea 916 ET MM tras 20 días de tratamiento control y tratamiento salino.....	100
Figura 59. Fenotipo de planta a partir de semilla de la línea 916 ET MM después del primer ciclo de estrés hídrico.....	101
Figura 60. Pérdida de agua de folíolos tras 4 horas a temperatura ambiente procedentes de plantas de la línea 916 ET MM de un mes no sometidas a estrés.....	101
Figura 61. Fenotipo de plántulas procedente de semilla de la línea 111 ET GA después de 30 días en medio de germinación con NaCl 75 mM.....	104
Figura 62. Fenotipo de plántula procedente de semilla de la línea 111 ET GA después de 10 días en medio de germinación.....	105
Figura 63. Fenotipo de planta axénica de la línea 111 ET GA después de 20 días en medio básico.....	105
Figura 64. Fenotipo de plántula mutante aclimatada de la línea 111 ET GA después de llegar a etapa adulta.....	106
Figura 65. Parte aérea de plántulas TG3 mutantes de la línea 111 ET GA después de 20 días en medio de germinación.....	106
Figura 66. Presencia de meristemos en el epicótilo de plántulas TG3 mutantes de la línea 111 ET GA después de 20 días en medio de germinación.....	107
Figura 67. Fenotipo de plántula TG3 mutante de la línea 111 ET GA después de 30 días en invernadero.....	108
Figura 68. Fenotipo de plántula de la línea 131 ET GA después de 35 días en medio de germinación con NaCl y después de 20 días en medio de germinación.....	110
Figura 69. Fenotipo del SAM de la línea 131 ET GA.....	110
Figura 70. Fenotipo de plantas axénicas de la línea 131 ET GA después de 30 días de cultivo en medio básico.....	111
Figura 71. Fenotipo de plantas procedentes de semilla de la línea 131 ET GA después de 25 días en invernadero.....	112
Figura 72. Fenotipo de plantas procedentes de semilla de la línea 131 ET GA después de 45 y 120 días en invernadero.....	112
Figura 73. Fenotipo de plántula de la línea 2742 ET MM en medio de germinación salino después de 15 días.....	115
Figura 74. Fenotipo de plántula de la línea 2742 ET MM después de 30 días en medio de germinación.....	115
Figura 75. Fenotipo de planta axénica mutante de la línea 2742 ET MM tras 30 días de cultivo en medio básico.....	116
Figura 76. Fenotipo de planta de semilla de la línea 2742 ET MM después de 22 días de cultivo en el invernadero.....	116
Figura 77. Fenotipo de planta adulta y de hojas de la línea 2742 ET MM cultivada en el invernadero.....	117
Figura 78. Fenotipo de botones florales de la línea 2742 ET MM.....	117
Figura 79. Fenotipo de flores en preantesis de la línea 2742 ET MM.....	118
Figura 80. Fenotipo de frutos recién cuajados de la línea 2742 ET MM.....	118
Figura 81. Fenotipo de frutos maduros de la línea 2742 ET MM.....	119
Figura 82. Fenotipo de injertos de la línea 2742 ET MM después de 30 días de cultivo en el invernadero.....	119
Figura 83. Fenotipo de plantas F2 de la línea 2742 ET MM después de 30 días de cultivo en el invernadero.....	121

Figura 84. Fenotipo de plántula del mutante M1 de la línea 2647 ETMM en medio de germinación después de 30 días. La flecha indica la zona necrosada.	122
Figura 85. Fenotipo de planta axénica del mutante M1 de la línea 2647 ETMM en medio básico después de 20 días	123
Figura 86. Sistema radicular de planta axénica del mutante M1 de la línea 2647 ETMM.	123
Figura 87. Plantas mutantes M1 de la línea 2647 ET MM procedentes de semillas TG2 tras 20, 22 y 30 días de cultivo en el invernadero.....	124
Figura 88. Fenotipo de plantas de la línea 2647 ET MM tras 30 días de cultivo en el invernadero	125
Figura 89. Fenotipo de hojas y cortes histológicos de folíolos de la línea 1458 ET MM de plantas cultivadas en invernadero	128
Figura 90. Fenotipo de plantas de la línea 1458 ET MM cultivadas en el invernadero durante 30 días.	129
Figura 91. Fenotipo de plantas de la línea 1458 ET MM cultivadas en el invernadero durante 50 días	129
Figura 92. Fenotipo de planta y fruto mutante de la línea 1458 ET MM.....	130
Figura 93. Formación de brotes a partir de zonas de corte de la línea 1458 ET MM <i>in vivo</i>	131
Figura 94. Formación de yemas y brotes adventicios en zonas de corte de plantas axénicas de la línea 1458 ET MM cultivadas en medio básico	131
Figura 95. Fenotipo de planta mutante aclimatada de la línea 1458 ET MM	132
Figura 96. Planta mutante tetraploide de la línea 1458 ET MM	132
Figura 97. Yema axilar de planta mutante de la línea 1458 ET MM.	133
Figura 98. Contenido hormonal endógeno en hojas de plantas mutantes de la línea 1458 ET MM.	134
Figura 99. Fenotipo de F2 de la línea 1458 ET MM <i>in vivo</i>	136
Figura 100. Fenotipo de una planta TG1 de la línea 2494 ET MM.	138
Figura 101. Fenotipo de planta TG2 mutante de la línea 2494 ET MM aclimatada y cultivada en el invernadero durante 60 días	138
Figura 102. Fenotipo de la hoja de planta axénica de la línea 245 ET GA en cultivo <i>in vitro</i>	141
Figura 103. Fenotipo de la planta de la línea 245 ET GA en condiciones de cultivo en invernadero.....	141
Figura 104. Fenotipo de la hoja y de las flores en anthesis de la línea 245 ET GA	142
Figura 105. Fenotipo de plantulas de la línea 2232 ET MM tras 30 días de cultivo en medio de germinación con NaCl.	144
Figura 106. Fenotipo de plantulas de la línea 2232 ET MM después de 7 días y 12 días de cultivo en medio de germinación	144
Figura 107. Fenotipo de planta axénica de la línea 2232 ET MM después de 25 días de cultivo en medio básico.	145
Figura 108. Fenotipo de plantas de la línea 2232 ET MM procedentes de semillas TG2 tras 25 días de cultivo en invernadero.....	145
Figura 109. Fenotipo de plantas de la línea 2232 ET MM tras 90 días de cultivo en invernadero	146
Figura 110. Fenotipo de hojas de plantas de la línea 2232 ET MM cultivadas en el invernadero	146
Figura 111. Fenotipo de planta y fruto mutante de la línea 2232 ET MM.....	147
Figura 112. Fenotipo de plántula procedente de semilla de la línea 167 ET GA después de 10 días en medio de germinación con NaCl.....	150
Figura 113. Fenotipo de plántulas procedente de semilla después de 5 días en medio de germinación de la línea 167 ET GA.....	150
Figura 114. Fenotipo de plántulas procedente de semilla de la línea 167 ET GA después de 7 días en medio de germinación.	151

Figura 115. Fenotipo de planta axénica de la línea 167 ET GA después de 20 días de cultivo en medio básico	151
Figura 116. Cotiledones e hipocótilos de la línea 167 ET GA después de 30 días en medio organogénico IKZ y 30 días más en medio IK.	152
Figura 117. Plantas regeneradas a partir de explantes de cotiledón de la línea 167 ET GA tras 60 días de cultivo en medio de enraizamiento.....	153
Figura 118. Fenotipo de plántulas procedente de semilla de la línea 167 ET GA después de 15 días en condiciones <i>in vivo</i>	153
Figura 119. Fenotipo de explantes de cotiledón (plantas WT) e hipocótilo (plantas M) de la línea 167 ET GA tras 30 días de cultivo en medio organogénico con kanamicina.....	155
Figura 120. Fenotipo de plantas axénicas de la línea 199 ET MM en diferentes subcultivos y detalle de hoja de planta mutante <i>in vitro</i> con inicios de necrosis	157
Figura 121. Fenotipo de plantas mutantes de la línea 199 ET MM tras 45 días de cultivo en el invernadero.	158
Figura 122. Fenotipo de plantas mutantes de la línea 199 ET MM tras 70 días de cultivo en el invernadero	159
Figura 123. Fenotipo de plantas mutantes de la línea 199 ET MM al final del ciclo de cultivo.....	160
Figura 124. Fenotipo de flores y frutos de la línea 199 ETMM.	161
Figura 125. Fenotipo de cotiledones de la línea 199 ET MM en medio de regeneración IKZ	161
Figura 126. Fenotipo de plántula de la línea 332 ET GA tras 10 días de cultivo en medio de germinación salino.....	165
Figura 127. Fenotipo de plántula de la línea 332 ET GA tras 5 y 10 días de cultivo en medio de germinación.....	165
Figura 128. Fenotipo de planta axénica de la línea 332 ET GA procedente del cultivo del ápice meristemático en medio básico.....	166
Figura 129. Fenotipo plántulas de la línea 332 ET GA después de 10 y 20 días de cultivo en el invernadero	166
Figura 130. Fenotipo de plántula de la línea 526 ET 73 tras 7 días de cultivo en medio de germinación.....	169
Figura 131. Fenotipo de planta axénica de la línea 526 ET 73 tras cultivar los ápices meristemáticos 30 días en medio básico.....	169
Figura 132. Fenotipo de planta axénica de la línea 526 ET 73 tras varios subcultivos en medio básico.....	170
Figura 133. Fenotipo de plantas procedentes de semilla de la línea 526 ET 73 tras 30, 60 y 180 días de cultivo en invernadero	170
Figura 134. Fenotipo de injertos de la línea 526 ET 73 después de 110 días.....	171
Figura 135. Fenotipo de plantas F2 del cruce del mutante 526 ET 73 con <i>S. pimpinellifolium</i> después de 30 días de cultivo en el invernadero.....	173
Figura 136. Fenotipo de plántulas de la línea 1641 ET MM después de 16 y 30 días de cultivo en medio de germinación con NaCl.....	174
Figura 137. Fenotipo de plántula de la línea 1641 ET MM después de 7 días de cultivo en medio de germinación.....	175
Figura 138. Fenotipo de plántulas de la línea 1641 ET MM después de 16 y 30 días de cultivo en medio de germinación.....	175
Figura 139. Fenotipo de plantas axénicas de la línea 1641 ET MM tras cultivar ápices meristemáticos durante 30 días en medio básico.....	176
Figura 140. Respuesta de explantes de cotiledón de la línea 1641 ET MM después de 30 días de cultivo en medio en medio de regeneración IKZ	176
Figura 141. Fenotipo de plántulas de la línea 1641 ET MM después de 7 y 8 días de cultivo en el invernadero.	177

Figura 142. Fenotipo de plantas F2 de la línea 1641 ET MM después de 7 días en medio de germinación	179
Figura 143. Fenotipo <i>in vivo</i> de planta mutante procedente de semilla de la línea 1524 ET MM después de 50 días de cultivo en invernadero	180
Figura 144. Fenotipo <i>in vivo</i> de plantas procedentes de semilla de la línea 1524 ET MM después de 15 días de cultivo en invernadero.....	180
Figura 145. Fenotipo de los injertos M/WT, WT/M y planta mutante de la línea 1524 ET MM tras de 30 días de cultivo en el invernadero.....	181
Figura 146. Fenotipo de los injertos y plantas sin injertar de la línea 1524 ET MM tras 50 días de cultivo en invernadero.....	182
Figura 147. Fenotipo de parte aérea y raíz de plantas injertadas de la línea 1524 ET MM tras 4 meses de cultivo en invernadero	183
Figura 148. Fenotipo de la zona de unión injerto-patrón, el tallo y los órganos reproductivos de plantas injertadas de las línea 1524 ET MM tras 4 meses de cultivo en el invernadero	184
Figura 149. Fenotipo de plántulas procedentes de semilla de la línea 196 ET GA después de 10 días en medio de germinación con 75 mM de NaCl	186
Figura 150. Fenotipo de plántulas de la línea 196 ET GA procedentes de semilla después de 7 días en medio de germinación.	186
Figura 151. Fenotipo de plántulas procedentes de semilla de la línea 196 ET GA después de 30 días en medio de germinación	187
Figura 152. Fenotipo de planta axénica de la línea 196 ET GA después de 30 días de cultivo en medio básico	187
Figura 153. Fenotipo <i>in vivo</i> a partir de semillas de la línea 196 ET GA después de 45 días y 75 días.....	188
Figura 154. Fenotipo de plántulas de la línea 2647 ET MM M2 tras 7 días de cultivo en medio de germinación.....	191
Figura 155. Fenotipo de planta axénica del mutante M2 de la línea 2647 ET MM en medio básico.....	192
Figura 156. Fenotipo de las hojas de planta axénica de la línea 2647 ET MM M2 ...	192
Figura 157. Regeneración adventicia de la línea 2647 ET MM M2 a partir de explantes de raquis cultivados 30 días en IKZ y tras un subcultivo a medio de elongación.....	193
Figura 158. Ausencia de enraizamiento adventicio de la línea 2647 ET MM M2 a partir de explantes de hoja y cotiledón cultivados 30 días en I 4.0	194
Figura 159. Fenotipo del mutante M2 de la línea 2647 ET MM a partir de semilla después de 22 y 45 días <i>in vivo</i>	195
Figura 160. Fenotipo del sistema radicular del mutante M2 de la línea 2647 ET MM a partir de semilla después de 45 días <i>in vivo</i>	195
Figura 161. Fenotipo del mutante M2 de la línea 2647 ET MM tras 90 días de cultivo en el invernadero.	196
Figura 162. Cortes histológicos de raquis de hoja del mutante de la línea 2647 ET MM M2.....	196
Figura 163. Fenotipo de flor en preantesis y antesis de la línea 2647 ET MM M2....	197
Figura 164. Fenotipo de frutos de la línea 2647 ET MM M2.....	197
Figura 165. Fenotipo de plantas injertadas y sin injertar de la línea 2647 ET MM M2 tras 30 y 90 días de cultivo en el invernadero	198
Figura 166. Fenotipo de injertos M/WT y WT/M de la línea 2647 ET MM M2 tras 30 días de cultivo en el invernadero.....	199
Figura 167. Fenotipo de la plántula procedente de semilla de la línea 2666 ET MM en medio de germinación después de 7 días	203
Figura 168. Fenotipo en la planta axénica del mutante 2666 ET MM en medio básico después de 30 días.....	204
Figura 169. Cotiledones de la línea 2666 ET MM después de 30 y 60 días en medio de regeneración IKZ.....	205

Figura 170. Cotiledones de la línea 2666 ET MM después de 30 días en medio I 4.0.....	206
Figura 171. Fenotipo <i>in vivo</i> a partir de semilla de la línea 2666 ET MM después de 90 días	206
Figura 172. Injertos de la línea 2666 ET MM después de 90 días en invernadero ...	207
Figura 173. Fenotipo de plántulas procedentes de semillas del mutante <i>dor</i> después de 7, 20 y 36 días de cultivo en medio de germinación.....	208
Figura 174. Fenotipo de las raíces adventicias de plantas axénicas del mutante <i>dor</i>	209
Figura 175. Fenotipo de plantas axénicas del mutante <i>dor</i> procedentes del cultivo de ápices meristemáticos después de 30 días con diferentes concentraciones de ácido indolacético.....	210
Figura 176. Fenotipo de plantas axénicas del mutante <i>dor</i> procedentes del cultivo de ápices meristemáticos después de 30 días con diferentes concentraciones de ácido indolbutírico	211
Figura 177. Fenotipo de plantas axénicas del mutante <i>dor</i> procedentes del cultivo de ápices meristemáticos después de 30 días con diferentes tipos de auxinas	212
Figura 178. Fenotipo de cotiledones del mutante <i>dor</i> tras 30 días de cultivo en medio de enraizamiento I 4.0.....	213
Figura 179. Fenotipo de cotiledones del mutante <i>dor</i> después de 30 días de cultivo en medio de regeneración IKZ.	213
Figura 180. Fenotipo a partir de semilla del mutante <i>dor</i> después de 15 y 40 días de cultivo en invernadero	214
Figura 181. Fenotipo de injertos entre plantas WT y M del mutante <i>dor</i> después de 30 días de cultivo en invernadero.....	215
Figura 182. Fenotipo de plantas injertadas del mutante <i>dor</i> en etapa adulta y de frutos del injerto M/WT	216
Figura 183. Experimento de riego por goteo y riego manual del mutante <i>dor</i>	217
Figura 184. Fenotipo de la parte apical de plantas mutantes del mutante <i>dor</i> cultivadas en el invernadero con diferentes sistemas de riego.....	218
Figura 185. Fenotipo de plántulas obtenidas a partir de semillas de la línea 384 ET MM después de 38 días en medio de germinación.	219
Figura 186. Fenotipo de planta axénica de la línea 384 ET MM después de 30 días en medio básico.....	220
Figura 187. Fenotipo de plantas axénicas de la línea 384 ET MM procedentes del cultivo de ápices meristemáticos después de 30 días con diferentes concentraciones de ácido indolacético	221
Figura 188. Fenotipo de plantas axénicas de la línea 384 ET MM procedentes del cultivo de ápices meristemáticos después de 30 días con diferentes concentraciones de ácido indolbutírico.....	222
Figura 189. Fenotipo de plantas axénicas de la línea 384 ET MM procedentes del cultivo de ápices meristemáticos después de 30 días con diferentes tipos de auxinas	223
Figura 190. Fenotipo de cotiledones de la línea 384 ET MM tras 30 días de cultivo en medio de enraizamiento I 4.0	224
Figura 191. Fenotipo de cotiledones de la línea 384 ET MM después de 30 días de cultivo en medio de regeneración IKZ	224
Figura 192. Fenotipo de plántulas procedentes de semilla de la línea 384 ET MM después de 15 y 60 días de cultivo en invernadero.....	225
Figura 193. Fenotipo de una plántula mutante de la línea 384 ETMM crecida en el invernadero y de su meristemo apical	226
Figura 194. Fenotipo de plantas aclimatadas de la línea 384 ET MM después de 60 y 130 días de cultivo en invernadero.....	227
Figura 195. Fenotipo de injertos entre plantas WT y M de la línea 384 ET MM después de 30 días de cultivo en invernadero.....	228

Figura 196. Fenotipo de plantas F2 de la línea 384 ET MM después de 30 días de cultivo en medio básico	232
Figura 197. Fenotipo de planta axénica de <i>dor</i> X 384 ET MM después de 30 días en medio básico.....	233
Figura 198. Fenotipo de hojas de plantas RNAi en Moneymaker del mutante <i>dor</i> después de 30 días de cultivo en medio de enraizamiento I 4.0.....	234
Figura 199. Fenotipo de hojas de plantas RNAi en <i>S. pennellii</i> del mutante <i>dor</i> después de 15, 30 y 90 días de cultivo en medio de enraizamiento I 4.0	235
Figura 200. Fenotipo de hojas de plantas RNAi en Moneymaker del mutante <i>dor</i> después de 30 días de cultivo en medio de regeneración IKZ.....	235
Figura 201. Fenotipo de hojas de plantas RNAi de <i>S. pennellii</i> para el gen identificado en el mutante <i>dor</i> después de 30 días de cultivo en medio de regeneración IKZ	236

Índice de tablas

Tabla 1. Taxonomía del tomate.....	4
Tabla 2. Evolución de la clasificación taxonómica del tomate y especies silvestres relacionadas.....	4
Tabla 3. Hábitat y principales característica de especies de <i>Solanum</i> sección <i>Lycopersicon</i>	6
Tabla 4. Medio de germinación MG.....	44
Tabla 5. Medio básico MB3.....	45
Tabla 6. Composición del fijador FAE.....	52
Tabla 7. Composición del X-GLUC.....	58
Tabla 8. Análisis del modo de herencia del mutante 1389 ET MM.....	67
Tabla 9. Análisis del número de insertos ADN-T con el gen <i>nptII</i> funcional de la línea 1389 ET MM.	67
Tabla 10. Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 1389 ET MM.....	68
Tabla 11. Análisis del modo de herencia del mutante 2149 ET MM.....	79
Tabla 12. Análisis del número de insertos T-DNA con el gen <i>nptII</i> funcional de la línea 2149 ET MM.	80
Tabla 13. Análisis del modo de herencia del mutante 111 ET GA.	108
Tabla 14. Análisis del número de insertos T-DNA con el gen <i>nptII</i> funcional de la línea 111 ET GA.	109
Tabla 15. Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 111 ET GA.....	109
Tabla 16. Análisis del modo de herencia del mutante 131 ET GA.	113
Tabla 17. Análisis del número de insertos T-DNA con el gen <i>nptII</i> funcional de la línea 131 ET GA.	113
Tabla 18. Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 131 ET GA.....	114
Tabla 19. Análisis del modo de herencia del mutante 2742 ET MM.....	120
Tabla 20. Análisis del número de insertos T-DNA con el gen <i>nptII</i> funcional de los individuos WT de la línea 2742 ET MM.	120
Tabla 21. Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 2742 ET MM.....	121
Tabla 22. Análisis del modo de herencia de de la línea 2647 ET MM M1.	126
Tabla 23. Análisis del número de insertos T-DNA con el gen <i>nptII</i> funcional para la línea 2647 ET MM.....	126
Tabla 24. Análisis del modo de herencia del mutante 1458 ET MM.....	134
Tabla 25. Análisis del número de insertos T-DNA con el gen <i>nptII</i> funcional de la línea 1458 ET MM.	135
Tabla 26. Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 1458 ET MM.....	135
Tabla 27. Análisis del modo de herencia del mutante 2494 ET MM.....	139
Tabla 28. Análisis del número de insertos T-DNA con el gen <i>nptII</i> funcional de la línea 2494 ET MM.	139
Tabla 29. Análisis de cosegregación en del inserto T-DNA y el fenotipo mutante en TG2 de la línea 2494 ET MM.	140
Tabla 30. Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante en la línea 2232 ET MM.	147
Tabla 31. Análisis del número de insertos T-DNA con el gen <i>nptII</i> funcional de la línea 2232 ET MM.	148
Tabla 32. Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 2232 ET MM.....	148
Tabla 33. Análisis del modo de herencia del mutante 167 ET GA.	154

Tabla 34. Análisis del número de insertos T-DNA con el gen <i>nptII</i> funcional de la línea 167 ET GA.....	155
Tabla 35. Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 167 ET GA.....	156
Tabla 36. Análisis del fenotipo de tres progenies TG3 procedentes de tres plantas TG2 WT Kan ^S de la línea 167 ET GA.....	156
Tabla 37. Análisis del número de insertos T-DNA con el gen <i>nptII</i> funcional de la línea 199 ET MM.	162
Tabla 38. Análisis del número de insertos T-DNA con el gen <i>nptII</i> funcional de progenie TG3 de la línea 199-2 ET MM WT-Kan ^R	163
Tabla 39. Análisis de fenotipo de progenie TG4 de las líneas TG3 WT Kan S de 199-2 ET MM.	163
Tabla 40. Análisis de fenotipo de progenie TG4 de la líneas TG3 WT y mutantes de 199-2 ET MM.	164
Tabla 41. Análisis del modo de herencia del mutante 332 ET GA.	167
Tabla 42. Análisis del número de insertos T-DNA con el gen <i>nptII</i> funcional de los individuos WT de la línea 332 ET GA.....	167
Tabla 43. Análisis de segregación de fenotipo de TG3 WT Kanamicina sensible de la línea 332 ET GA.....	168
Tabla 44. Análisis del modo de herencia del mutante 526 ET 73.....	172
Tabla 45. Análisis del número de insertos T-DNA con el gen <i>nptII</i> funcional de la línea 526 ET 73.	172
Tabla 46. Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 526 ET 73.	173
Tabla 47. Análisis del modo de herencia del mutante 1641 ET MM.....	177
Tabla 48. Análisis del número de insertos T-DNA con el gen <i>nptII</i> funcional de plantas WT de la línea 1641 ET MM.....	178
Tabla 49. Análisis del número de insertos T-DNA con el gen <i>nptII</i> funcional del experimento 3 de la línea 1641 ET MM.....	178
Tabla 50. Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante en la progenie de la línea 1641-23 WT Kan ^S ET MM.	179
Tabla 51. Análisis del modo de herencia del mutante 196 ET GA.	189
Tabla 52. Análisis del número de insertos T-DNA con el gen <i>nptII</i> funcional de la línea 196 ET GA.	189
Tabla 53. Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 196 ET GA.....	190
Tabla 54. Análisis del modo de herencia de la línea 2647 ET MM M2.	200
Tabla 55. Análisis del número de insertos T-DNA con el gen <i>nptII</i> funcional para la línea 2647 ET MM.....	200
Tabla 56. Análisis de progenie TG3 procedente de TG2 WT Kan ^S de la línea 2647 ET MM M2.....	201
Tabla 57. Análisis del modo de herencia de progenie TG3 procedente de TG2 WT Kan ^R de la línea 2647 ET MM M2 en condiciones <i>in vivo</i>	201
Tabla 58. Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 2647-11 ET MM M2.....	202
Tabla 59. Análisis del modo de herencia del mutante 384 ET MM mediante el estudio de la TG2.....	229
Tabla 60. Análisis del modo de herencia del mutante 384 ET MM mediante el estudio de las progenies TG3 segregantes.....	229
Tabla 61. Análisis del número de insertos T-DNA con el gen <i>nptII</i> funcional de la línea 384 ET MM mediante el estudio de las progenies TG3.....	230
Tabla 62. Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 384 ET MM.....	231

Resumen

Uno de los aspectos fundamentales para mejorar un carácter es el conocimiento de los genes que lo controlan. Para llegar a averiguar cuáles son esos genes una de las alternativas es buscar mutantes en esos caracteres y, a partir de ellos, identificar cuáles son los que han variado respecto del material de partida. En comparación con otras alternativas metodológicas el empleo de la mutagénesis insercional presenta una evidente ventaja ya que si el gen alterado en un mutante queda etiquetado molecularmente se facilita enormemente su posterior identificación.

Para identificar genes relacionados con la tolerancia al estrés hídrico y salino en tomate, se ha llevado a cabo el escrutinio de una parte de la colección de líneas T-DNA de tomate y *Solanum galapagense*. Además de caracterizar fenotípica y genéticamente las líneas identificadas, se ha profundizado en el conocimiento de mutantes que previamente habían sido detectados en nuestro grupo por su relación con estos caracteres.

Se han identificado y caracterizado dos nuevos mutantes con alteraciones en su tolerancia al estrés hídrico. Se ha mejorado la caracterización de tres mutantes relacionados con la tolerancia a la salinidad que habían sido identificados previamente. Se han identificado y caracterizado 19 mutantes afectados en caracteres del desarrollo que podrían estar relacionados con la tolerancia a estos tipos de estrés abiótico. Por último, tras la identificación del gen responsable del mutante *dor*, que tenía alterada su capacidad de enraizamiento y organogénesis adventicia, se ha iniciado su análisis funcional mediante la obtención y análisis de las correspondientes líneas RNAi.

Summary

One of the fundamental aspects to improve a character is the knowledge of the genes that control it. One of the alternatives to find out which are those genes is to look for mutants in those characters and to identify which ones have changed with respect to the wild type. In comparison with other methodological alternatives, the use of insertional mutagenesis presents an obvious advantage since if the mutated gene is molecularly labeled, its subsequent identification is greatly facilitated.

In order to identify genes related to tolerance to drought and salt stress in tomato, after developing the necessary methodologies, a part of the tomato T-DNA and *Solanum galapagense* lines of our collection has been scrutinized. In addition to phenotypically and genetically characterizing the identified lines, we have improved the knowledge of mutants previously detected in our group by their relationship with these characters.

Two new mutants have been identified and characterized with alterations in their tolerance to drought. The characterization of three mutants previously identified in our group and related to salinity tolerance has been improved. We have identified and characterized 19 affected mutants in developmental characters that could be related to tolerance to abiotic stresses. Finally, after the identification of the gene responsible for *dor*, a mutant with changes in its capacity for rooting and adventitious organogenesis, its functional analysis was started by obtaining and analyzing the corresponding RNAi lines.

Resum

Un dels aspectes fonamentals per millorar un caràcter és el coneixement dels gens que el controlen. Per arribar a esbrinar quins són aquests gens una de les alternatives és buscar mutants en aquests caràcters i, a partir d'ells, identificar quins són els que han variat respecte del material de partida. En comparació amb altres alternatives metodològiques l'ús de la mutagènesi insercional presenta un evident avantatge ja que si el gen alterat en un mutant queda etiquetat molecularment es facilita enormement la seva posterior identificació.

Per poder identificar gens relacionats amb la tolerància a l'estrès hídric i salí en tomaca, després de la posada a punt de les metodologies necessàries, s'ha dut a terme l'escrutini d'una part de la col·lecció de línies T-DNA de tomaca i *Solanum galapagense*. A més de caracteritzar fenotípicament i genèticament les línies identificades, s'ha aprofundit en el coneixement de mutants prèviament detectats en el nostre grup per la seva relació amb aquests caràcters.

S'han identificat i caracteritzat dos nous mutants amb alteracions en la seva tolerància a l'estrès hídric. S'ha millorat la caracterització de tres mutants identificats prèviament en el nostre grup i relacionats amb la tolerància a la salinitat. S'han identificat i caracteritzat 19 mutants afectats en caràcters del desenvolupament que podrien estar relacionats amb la tolerància als estressos abiòtics. Finalment, després de la identificació del gen responsable del mutant *dor* que tenia alterada la seva capacitat d'arrelament i organogènesi adventícia, s'ha iniciat la seva anàlisi funcional mitjançant l'obtenció i anàlisi de les corresponents línies RNAi.

INTRODUCCIÓN

1.1. El tomate

1.1.1. Importancia

El tomate (*Solanum lycopersicum L.*) es un alimento ancestral originario de los Andes. Fue importado a Europa en el siglo XVI y en la actualidad presenta una amplia gama de variedades que están adaptadas para el uso industrial o de consumo en fresco. Es un cultivo común en todos los climas templados y exhibe una gran variabilidad en la morfología del fruto (forma, tamaño, color,...) y en caracteres organolépticos (sabor, textura, dureza,...). Su producción y consumo aumentan constantemente y es, tras la patata, la especie hortícola con mayor importancia económica a nivel mundial. El tomate tiene un elevado valor nutritivo, ya que es fuente de licopeno, beta-caroteno, flavonoides, vitamina C y derivados del ácido hidroxicinámico. De hecho, ha logrado gran popularidad en los últimos años con el descubrimiento de las actividades antioxidantes y las funciones anticancerígenas de algunos de sus componentes (Gerszberg *et al.*, 2015).

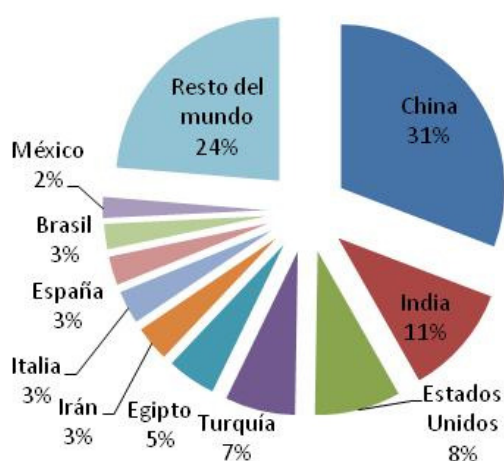


Figura 1. Producción de tomate en 2014. (Fuente: www.fao.org)

Existe un gran número de variedades en el mercado y el consumo de cada tipo de tomate varía en función del país, el tipo de población, su uso, etc. En 2014 la producción superó los 170 millones de toneladas. Esta especie se cultiva en más de cien países, aunque las tres cuartas partes de la producción mundial se concentra en los diez principales productores (Figura 1).

Además de su importancia económica, desde el punto de vista científico, el tomate se ha convertido en una especie modelo en programas de investigación básica y aplicada (Gerszberg *et al.*, 2015), sobre todo para la disección genética del desarrollo de frutos carnosos, la integración de herramientas genómicas, el estudio de la diversidad evolutiva mediante el análisis de los mecanismos genéticos y biológicos que la controlan, así como en estudios fisiológicos, celulares y bioquímicos (Moyle, 2008).

1.1.2. Taxonomía y clasificación

El tomate es una planta dicotiledónea perteneciente a la familia *Solanaceae* Juss. y al género *Solanum* L. *Solanum lycopersicum* es la única especie domesticada en la sección *Lycopersicon* a la que pertenecen trece especies. En la actualidad, su clasificación se divide en cuatro grupos. El grupo *Lycopersicon*, que incluye cuatro especies (*S. lycopersicum*, *S. pimpinellifolium* L., *S. cheesmaniae* (L. Riley) Fosberg y *S. galapagense* S. C. Darwin & Peralta); el grupo *Neolycopersicon*, que incluye únicamente una especie (*S. pennellii* Correll); el grupo *Eriopersicon*, con cinco especies (*S. peruvianum* L., *S. corneliomulleri* J. F. Macbr., *S. huayalense* Peralta, *S. habrochaites* S. Knapp & D. M. Spooner y *S. chilense* (Dunal) Reiche); y el grupo *Arcanum*, con tres especies (*S. arcanum* Peralta, *S. chmielewskii* (C.M.Rick, Kesicki, Fobes & M.Holle) D.M.Spooner, G.J.Anderson & R.K.Jansen y *S. neorickii* D.M.Spooner, G.J.Anderson & R.K.Jansen). Todas estas especies son nativas de América del Sur y su clasificación ha cambiado a lo largo de la historia (Tabla 2).

Reino:	<i>Plantae</i>
Subreino:	<i>Traqueobinta</i>
Superdivisión:	<i>Spermatophyta</i>
Clase:	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase:	<i>Asteridae</i>
Orden:	<i>Solanales</i>
Suborden:	<i>Solanineae</i>
Familia:	<i>Solanaceae</i>
Género:	<i>Solanum</i>
Especie:	<i>Lycopersicum</i>

Tabla 2. Evolución de la clasificación taxonómica del tomate y especies silvestres relacionadas (Peralta *et al.*, 2008).

Muller, 1940	Luckwill, 1943	Rick, 1979	Child, 1990	Peralta <i>et al.</i> , 2008
Subgénero Eulycopersicon <i>L. esculentum</i> <i>L. pimpinellifolium</i>	Subgénero Eulycopersicon <i>L. esculentum</i> <i>L. pimpinellifolium</i>	Complejo esculentum <i>L. esculentum</i> <i>L. pimpinellifolium</i> <i>L. cheesmaniae</i> <i>L. pennelli</i> <i>L. hirsutum</i> <i>L. chmielewskii</i> <i>L. parviflorum</i>	Series lycopersicon <i>S. lycopersicon</i> <i>S. pimpinellifolium</i> <i>S. cheesmaniae</i>	Sección Lycopersicon - <u>Grupo <i>Lycopersicon</i></u> <i>S. lycopersicum</i> <i>S. pimpinellifolium</i> <i>S. cheesmaniae</i> <i>S. galapagense</i> - <u>Grupo</u> <u><i>Neolycopersicon</i></u> <i>S. pennellii</i> - <u>Grupo <i>Eriopersicon</i></u> <i>S. habrochaites</i> <i>S. huayalense</i> <i>S. corneliomulleri</i> <i>S. chilense</i> <i>S. peruvianum</i> - <u>Grupo <i>Arcanum</i></u> <i>S. arcanum</i> <i>S. chmielewskii</i> <i>S. neorickii</i>
Subgenero Eriopersicon <i>L. peruvianum</i> <i>L. cheesmaniae</i> <i>L. hirsutum</i> <i>L. glandulosum</i>	Subgenero Eriopersicon <i>L. pissisi</i> <i>L. peruvianum</i> <i>L. cheesmaniae</i> <i>L. hirsutum</i> <i>L. glandulosum</i>	Complejo Peruvianum <i>L. peruvianum</i> <i>L. chilense</i>	Series Neolycopersicon <i>S. pennellii</i> Series Eriopersicon <i>S. habrochaites</i> <i>S. chmielewskii</i> <i>S. chilense</i> <i>S. peruvianum</i>	Sección Lycopersicoides <i>S. lycopersicoides</i> <i>S. sitiens</i> Sección Juglandifolia <i>S. juglandifolium</i> <i>S. ochranthum</i>
			Sección Neolycopersicon <i>S. pennellii</i> Series Eriopersicon <i>S. habrochaites</i> <i>S. chmielewskii</i> <i>S. chilense</i> <i>S. peruvianum</i>	Sección Lycopersicoides <i>S. lycopersicoides</i> <i>S. sitiens</i> Sección Juglandifolia <i>S. juglandifolium</i> <i>S. ochranthum</i>

1.1.3. Especies silvestres relacionadas con el tomate

Las características geográficas han jugado un papel muy importante en los procesos evolutivos de las especies. Sirven en muchos casos como barreras físicas para el flujo de genes entre poblaciones y/o inducen el aislamiento ecológico debido a diferencias en las condiciones ambientales. En muchas especies la distancia geográfica tiene efectos significativos en los patrones de dispersión, flujo de genes, adaptación, divergencia de especies e hibridación. La comprensión de cómo la geografía afecta la adaptación es un paso fundamental hacia el desciframiento de los mecanismos de los procesos evolutivos en la naturaleza (Nakazato y Housworth, 2011).

El centro de diversificación de las especies silvestres relacionadas con el tomate es el oeste de América del sur en el que hay desde montañas andinas hasta regiones adyacentes al Pacífico. Corresponde con zonas de Chile, Bolivia, Perú, Ecuador, Colombia y las Islas Galápagos (Figura 2). Esta región abarca una serie de variaciones biogeográficas, climáticas, y ambientales que van desde desiertos templados hasta bosques húmedos tropicales. Como consecuencia de esta diversidad, cada especie muestra un patrón de distribución geográfica y un uso del hábitat diferente.

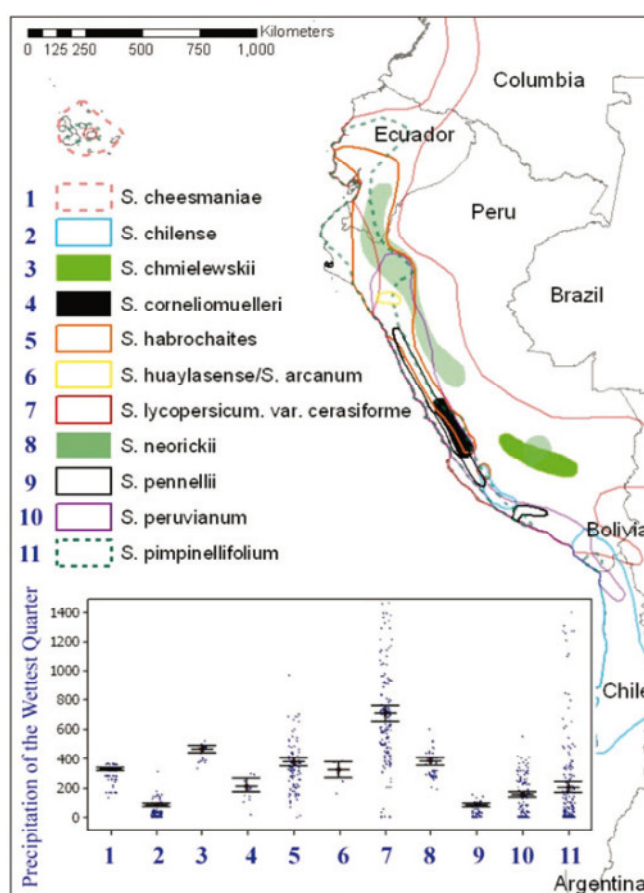


Figura 2. Distribución geográfica del tomate silvestre en América del sur. Fuente (Moyle, 2008)

Las especies silvestres crecen como maleza en su centro de origen. La amplia capacidad de adaptación del género permite encontrarlas en ambientes secos extremos, en ambientes muy húmedos y en altitudes que van desde el nivel del mar hasta los 3300 metros (Peralta y Spooner, 2007). Presentan resistencias a insectos, enfermedades y a condiciones ambientales adversas tales como sequía y/o salinidad. También presentan variabilidad para las características de calidad del fruto (Tabla 3).

Tabla 3. Hábitat y principales característica de especies de *Solanum* sección *Lycopersicon* (Spooner *et al.*, 2005).

Especie	Color de fruto	Distribución y hábitat	Caracteres de importancia
<i>S. cheesmaniae</i>	Amarillo, naranja	Endémica de las Islas Galápagos, Ecuador. Del nivel del mar a 500 m.	Tolerancia a salinidad. Resistencia a Lepidóptera.
<i>S. galapagense</i>	Amarillo	Endémica de las islas Galápagos. Crece en lavas costeras y dentro de zonas de alcance del mar.	
<i>S. pimpinellifolium</i>	Rojo	Ecuador central a Chile central. Hábitats costeros secos. Del nivel del mar a 500 m.	Calidad del fruto y color. Resistencia a insectos, nematodos y enfermedades.
<i>S. chilense</i>	Verde, rayas moradas	Desde el Sur de Perú hasta el Norte de Chile. Desde el nivel del mar hasta 3000 msnm. Simpátrico con <i>L. peruvianum</i> , habita en ríos secos, sobrevive por la profundidad de sus raíces.	Resistencia a sequia
<i>S. chmielewskii</i>	Verde	Nativo del Sur de Perú al Norte de Bolivia. Desde 1500 a 3000 msnm, en sitios ligeramente drenados.	Contribuye al alto contenido de azúcar
<i>S. habrochaites</i>	Verde	Hábitat desde el sur de Ecuador hasta el centro de Perú. En elevaciones entre 500 y 3600 msnm, en bosques nublados.	Resistencia o tolerancia al frío.
<i>S. pennellii</i>	Verde	Desde las costas del Perú al norte de Chile hasta en elevaciones de 50-1500 msnm, en laderas rocosas secas y áreas arenosas.	Resistencia a sequía. Pubescencia densa y pelos glandulares que propician resistencia a insectos.
<i>S. neorickii</i>	Verde	Del sur de Perú al sur de Ecuador, en alturas desde 1950 a 3000 msnm.	Resistencia a bacterias
<i>S. arcanum</i>	Verde	En la zona Costera y en los valles interandinos en el Norte de Perú, desde 100 a 2500 msnm. Se produce en lomas, secas y laderas secas rocosas.	Resistencia a virus, bacterias, hongos, áfidos y nematodos.
<i>S. huaylasense</i>	Verde	Norte de Perú. En las laderas rocosas, a lo largo de ríos desde 1700 a 3000 msnm.	
<i>S. peruvianum</i>	Verde	En el Norte de Perú y norte de Chile. Nivel del mar a 3000 msnm.	
<i>S. corneliomuelleri</i>	Verde	Del centro al sur de Perú. Al oeste de los Andes desde 1000 a 3000 msnm	
<i>S. lycopersicum</i>	Rojo	El tomate cultivado depende de la humedad más que sus parientes silvestres. Esta especie se encuentra cultivada en todo tipo de hábitats, desde los trópicos hasta zonas templadas	Se conocen formas cultivadas en todo el mundo en una gran variedad de hábitats. Conocido también como cultivo asilvestrado.

Importancia de las especies silvestres

Como consecuencia de los procesos que han tenido lugar durante su domesticación, el genoma del tomate cultivado contiene menos del 5% de la variación genética presente en las poblaciones silvestres (Miller y Tanksley, 1990). Como ya se ha comentado, el amplio rango de variación en el hábitat de las especies silvestres ha dado como resultado una gran diversidad genética y representa una oportunidad para el mejoramiento de caracteres de interés agronómico del tomate. Por tanto, el estudio y aprovechamiento de la diversidad genética de las especies silvestres es un importante recurso en los programas de mejora. En concreto, son una fuente ideal para mejorar la tolerancia a diversos tipos de estrés abiótico, como la sequía, la salinidad y las temperaturas extremas. Es por ello que la introducción de genes desde las especies silvestres hacia el tomate representa un recurso clave para el logro de cultivares de tomate con nuevas características (Foolad, 2007).

En nuestro grupo llevamos muchos años trabajando con estas especies silvestres para transferir los genes que determinan algunas de sus características antes mencionadas a las variedades cultivadas de tomate. Durante ese periodo se han puesto a punto métodos de transformación genética (Arrillaga *et al.*, 2001; Gisbert *et al.*, 1999). Además, se ha empleado la fusión de protoplastos con el fin de explotar de forma más eficiente los recursos fitogenéticos disponibles en las especies silvestres relacionadas mediante la hibridación somática con tomate. Más recientemente, gracias a las mejoras en nuestros métodos de transformación, se han podido obtener gran cantidad de plantas transgénicas con las que abordar la identificación de genes mediante mutagénesis insercional en *S. pimpinellifolium*, *S. galapagense* y *S. pennellii* (Atarés *et al.*, 2011).

1.1.4. El tomate en la investigación científica

En los últimos años, el interés de los científicos por el tomate como planta modelo ha aumentado significativamente debido a diversos factores, entre los que destacan la disponibilidad de la secuencia de su genoma (The Tomato Genome Consortium, 2012), su enorme importancia económica y sus características biológicas. Al respecto, cabe resaltar:

- a) La capacidad de medrar bajo diferentes condiciones de cultivo con un ciclo de vida relativamente corto.
- b) Reproducción autógama, aunque admite el cruce con otras especies.
- c) Alta fertilidad y posibilidad de propagación asexual mediante esquejes.

- d) Genoma relativamente pequeño (950 Mb) y diploide con un número básico de 12 cromosomas ($2n=24$).
- e) Posibilidad de regenerar plantas enteras a partir de diferentes explantes.

Además, en contraste con otros organismos modelo como *Arabidopsis thaliana* (L.), Heynh. o arroz (*Oryza sativa* L.), el tomate es la única planta modelo con hojas compuestas y, lo que es más importante desde un punto de vista aplicado, produce frutos carnosos que son muy importantes para la dieta humana. Por todo ello, esta especie está siendo objeto de gran número de estudios, lo cual se ha visto favorecido por la existencia de colecciones de mutantes espontáneos, o inducidos por agentes químicos o irradiación, que están disponibles en el Tomato Genetic Resource Center (Lozano *et al.*, 2009).

1.1.5. Desarrollo de la planta de tomate

En la mayoría de las especies cultivadas, el hábito de crecimiento, su arquitectura y diversos caracteres morfológicos cambiaron de forma drástica como resultado de la domesticación. El cuello de botella ocasionado por la selección a partir de un escaso número de individuos provocó un estrechamiento de la variación y un efecto de deriva génica que en muchos casos se tradujo en un proceso de especiación. La domesticación representa, pues, una forma acelerada de evolución que provoca cambios significativos en el fenotipo de los órganos de mayor interés para los seres humanos como, por ejemplo, semillas, frutos, raíces, tubérculos, etc. Uno de los casos más extremos ha sido la domesticación del tomate, gracias a la cual su fruto es hasta 1000 veces más grande que los de sus progenitores silvestres (Cong *et al.*, 2008). En este apartado se mencionan brevemente las características más importantes relacionadas con el desarrollo de una planta de tomate.

Hábito de crecimiento

La mayoría de los cultivares de tomate, así como los parentales silvestres, muestran un hábito de crecimiento indeterminado, es decir, la estructura del brote primario termina en una inflorescencia y el crecimiento se reanuda desde la yema axilar de la hoja más joven. El proceso se va repitiendo de forma indefinida permitiendo la formación de múltiples inflorescencias y el crecimiento indeterminado del tallo. Se ha comprobado que un gen clave en este carácter es *SELFPRUNING* (Pnueli *et al.*, 1998). En este caso, el crecimiento indeterminado de las variedades se debe al alelo dominante (*sp+*) mientras que la presencia en homocigosis del alelo recesivo (*sp*)

conlleva un crecimiento determinado, con plantas de porte bajo y producción precoz. Estas variedades se usan habitualmente para producir tomates para la industria.

Hoja

Las hojas son órganos fotosintéticos y su forma y tamaño son factores muy importantes que influyen en procesos como la absorción de energía y el intercambio gaseoso. El tomate y sus especies silvestres relacionadas desarrollan hojas compuestas que varían mucho en el grado de disección de la hoja. Un ejemplo de esta variación es la identificada por Hooker en 1851 en *Solanum cheesmaniae* y *S. galapagense*. Las dos especies son sexualmente compatibles, pero existen como poblaciones distintas en el medio silvestre, hibridando y ocupando hábitats distintos. *S. cheesmaniae* presenta hojas compuestas semejantes al tomate cultivado; en cambio, *S. galapagense* presenta mayor complejidad en las hojas, con mayor grado de disección en sus bordes y con folíolos terciarios y cuaternarios no observados en *S. cheesmaniae*.

De acuerdo al estudio realizado por Kimura y colaboradores (2008) se llegó a la conclusión de que la variación fenotípica de las hojas de *S. galapagense* y *S. cheesmaniae* está determinada en parte por la acción del gen *KNOX1* (*KNOTTED-LIKE HOMEODOMAIN*) que codifica para un factor de transcripción (Figura 3).



Figura 3. Hojas de *S. cheesmaniae* y *S. galapagense* (Kimura *et al.*, 2008)

Flor

La transición de la fase vegetativa a la fase reproductiva es un evento muy importante en el ciclo de vida de la planta ya que permite la formación de flores y frutos. Se ha comprobado que existe una variación significativa entre especies estrechamente relacionadas tanto en el número de inflorescencias como en el número de flores que brotan de cada inflorescencia. Actualmente se han identificado varios genes que participan de forma importante en el control de la transición floral, como *FALSIFLORA* (*FA*) y *SINGLE FLOWER TRUSS* (*SFT*) (Molinero-Rosales *et al.*, 1999 y 2004).

Las inflorescencias se desarrollan cada 2 o 3 hojas y normalmente tienen de 7 a 10 flores. La flor de tomate es hermafrodita, regular y actinomorfa. Tiene cinco o más sépalos, con igual número de pétalos que tienen color amarillo y están dispuestos de forma helicoidal. Presenta un cono estaminal con 5-6 estambres unidos a la corola por

filamentos cortos con anteras alargadas y un gineceo central que consta de entre dos a múltiples carpelos con un estilo largo. La primera flor se forma en la yema apical y las demás se disponen lateralmente alrededor el eje principal de la inflorescencia. La flor se une al eje floral por medio de un pedicelo articulado que contiene una zona de abscisión.

Fruto

El fruto que proviene del ovario de la flor está formado por un mesocarpio y un endocarpio carnosos, que encierran y protegen el desarrollo de semillas que se encuentran en los lóculos. Las semillas están envueltas por el tejido placentario formado por un mucilago gelatinoso y su número es variable, dependiendo de las variedades. La domesticación del tomate ha dado lugar a una gran diversidad en el fenotipo de los frutos. Algunas de las características más importantes que se seleccionaron durante la domesticación fueron la apariencia y calidad de los frutos. En comparación con sus parientes silvestres el tomate cultivado tiene frutos de tamaño

más grande y presenta gran diversidad de formas: esférica, alargada, achatada, cordiforme, aperada, etc. (Figura 4). Se han clonado varios genes que controlan el tamaño o la morfología de los frutos de tomate: *FW2.2* (Frary *et al.*, 2000) tiene una cierta contribución en el peso de los frutos; *SUN* (Xiao *et al.*, 2008) y *OVATE* (Liu *et al.*, 2002) controlan la forma de fruto, aperado o alargado; *FASCIATED* (Cong *et al.*, 2008) controla el número de lóculos, el tamaño del fruto y la forma del fruto. Recientemente, se han identificado otros genes, como *FIN* y *FAB*, que tienen un papel importante en el tamaño del meristemo de la flor y del fruto (Xu *et al.* 2015).



Figura 4. Diversidad fenotípica del tomate (Paran y Knaap, 2007).

Además del tamaño y la forma, se pueden encontrar en el mercado variedades con gran diversidad en el color del fruto: rojo, naranja, rosa, verde, amarillo, púrpura, etc. Actualmente se conocen algunos de los genes clave que controlan este carácter (Giovannoni, 2004).

Sistema radicular

El sistema radicular de las plantas es de vital importancia para su desarrollo. Además de la función de anclaje, sus células son las encargadas de absorber y transportar el agua y los nutrientes que hay en el suelo. El sistema radicular presenta una arquitectura de ramificación compleja con numerosos tipos de células cuyo desarrollo debe ser dinámico y tener una elevada plasticidad. El estudio más profundo sobre los tipos celulares presentes en la raíz se ha realizado en *Arabidopsis thaliana*. Sin embargo, teniendo en cuenta las peculiaridades y diferencias entre especies, es necesario ampliar estos estudios a otros genotipos, principalmente las especies de interés agronómico como el tomate (Ron *et al.*, 2013). El desarrollo de raíces en tomate sigue el patrón de las plantas dicotiledóneas (Kalidhasan *et al.*, 2015). El crecimiento comienza con la aparición de la radícula, la primera señal externa de la iniciación de la germinación. A partir de esta raíz embrionaria o primaria se desarrollan las raíces secundarias y a partir de ellas las terciarias, etc. Se puede desarrollar un sistema radicular alternativo a partir de un crecimiento adventicio: son las raíces post-embrionarias o adventicias. Estas raíces se desarrollan a partir del cambium o haces vasculares del hipocótilo, del tallo, etc. (Santisree *et al.*, 2011).

A pesar de la importancia del sistema radicular, su estudio no ha recibido tanta atención como el de los órganos de la parte aérea. Hasta hace poco, los avances del conocimiento sobre la forma en que algunas hormonas o agentes ambientales regulan el desarrollo radicular, no había sido parejo con el de los genes que controlan su crecimiento (Jung y McCouch, 2013). Por fortuna, recientemente se han descubierto algunos de los genes que están implicados en estos procesos (Figura 5).

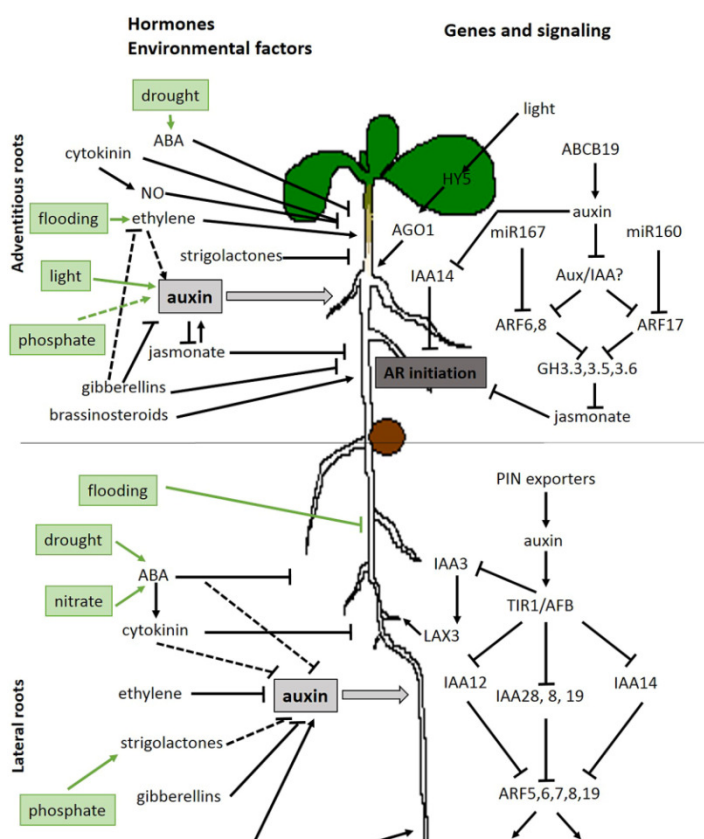


Figura 5. Factores hormonales, ambientales y genéticos implicados en el enraizamiento lateral y adventicio (Verstraeten *et al.*, 2014).

1.2. El estrés abiótico

La definición más práctica para el estrés es una fuerza adversa o una condición que inhibe el funcionamiento normal y el bienestar de un sistema biológico como, en nuestro caso, las plantas (Mahajan y Tuteja, 2005). Como resultado, el estrés puede modificar la expresión de genes y provocar tanto cambios en el crecimiento como daños en células y/o tejidos.

Las plantas están constantemente expuestas a cambios en las condiciones ambientales. Cuando estos cambios son extremos las plantas lo perciben como una señal de estrés (Ciarmiello *et al.*, 2011). El estrés abiótico es la principal causa de pérdidas en los cultivos, reduciendo hasta en un 50% los rendimientos. Las principales causas de estrés son la sequía, la salinidad, las temperaturas extremas y la alta radiación (Wang *et al.*, 2016). En nuestras condiciones climáticas, la sequía y la salinidad son los principales factores abióticos que influyen en el desarrollo óptimo de una planta. Por tanto, uno de los mayores desafíos a los que se enfrenta la agricultura moderna es mejorar la tolerancia de los cultivos frente a estos factores y generar mayores rendimientos con una menor necesidad de recursos.

1.2.1. Respuesta de las plantas al estrés

Las plantas activan diversos mecanismos de defensa para responder a un ambiente desfavorable. Con la disponibilidad de la secuencia de los genomas y diversas herramientas biotecnológicas (genética molecular, diferentes “ómicas”, QTL's y transformación genética) se han logrado importantes avances en el desciframiento de las vías de señalización y componentes involucrados en la respuesta al estrés abiótico en plantas.

La vía de respuesta genérica para una planta sometida a un determinado estrés abiótico se divide en las siguientes fases: percepción de señales, transducción, expresión de genes de respuesta al estrés, y la activación de respuestas fisiológicas y metabólicas (Wang *et al.*, 2016). La señal de estrés se percibe primero por receptores presentes en la membrana de las células. Después, la señal capturada se convierte en intracelular a través de otros mensajeros incluyendo iones de calcio, fosfato de inositol, especies reactivas de oxígeno (ROS), nucleótidos cíclicos (cAMP y cGMP), azúcares y óxido nítrico. Posteriormente, estos segundos mensajeros inician las vías de transducción de señales modulando los niveles de calcio intracelular. Estas variaciones en los niveles de calcio intracelular son detectadas por proteínas llamadas sensores de calcio que inician una cascada de fosforilación de proteínas como algunas

MAP-kinasas, CDPK's u otras. Al final de este proceso de fosforilación se activan o inactivan algunos factores de transcripción por las proteínas quinasas o fosfatasa y se unen a promotores de genes sensibles al estrés para regular su transcripción, conduciendo finalmente a la adaptación de la planta a las condiciones estresantes (Figura 6).

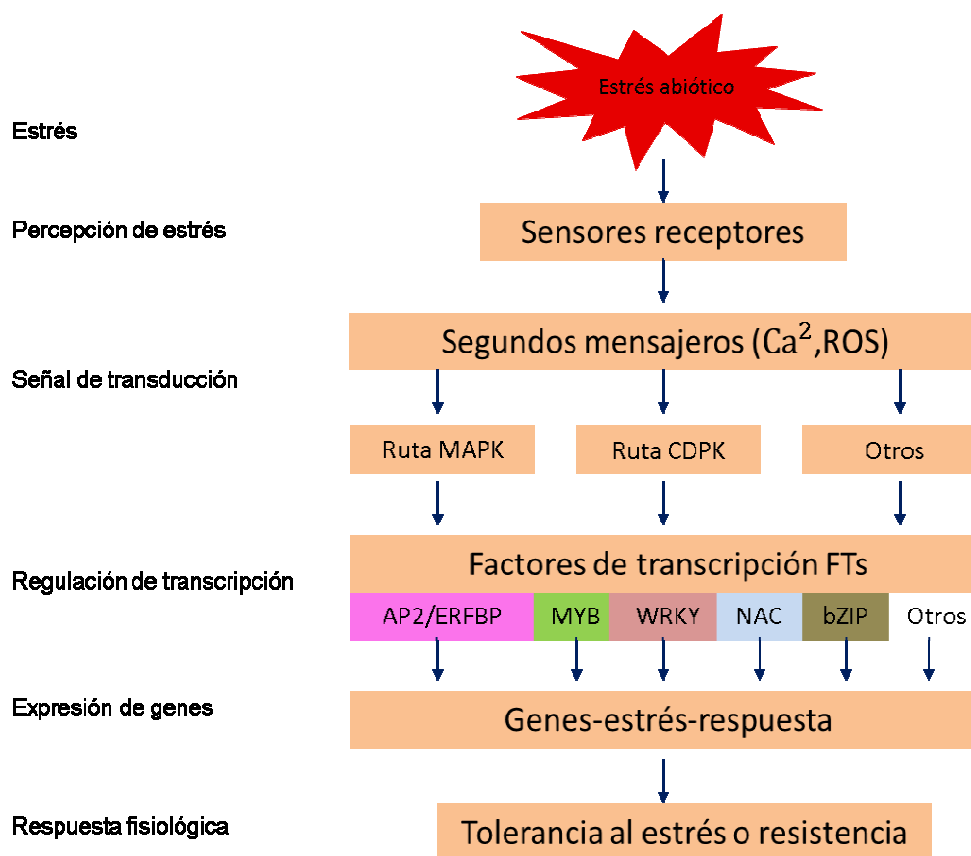


Figura 6. Vía de señalización implicada en respuesta al estrés abiótico en las plantas (modificado a partir de Wang *et al.*, 2016).

1.2.2. Estrés salino

En la agricultura, el término salinidad se refiere a la presencia en el suelo de una elevada concentración de sales que perjudica a las plantas por su efecto tóxico y la disminución del potencial osmótico del suelo. La salinidad es uno de los factores más serios que limitan la productividad de los cultivos. Se estima que más de 45 millones de hectáreas de tierras irrigadas están afectadas por este problema y aproximadamente 1,5 millones de hectáreas dejan de ser tierras cultivables cada año como resultado de la salinización de los suelos (Carrillo *et al.*, 2011).

Una planta afectada por el estrés salino retrasa la germinación, reduce su brotación y el crecimiento de las raíces, reduce la actividad fotosintética, aumenta la respiración, pierde vigor y puede llegar a morir. Estos cambios en el crecimiento de las plantas se deben a tres componentes principalmente: el efecto osmótico que limita la capacidad de absorción de agua por parte de las plantas, la toxicidad iónica producida por la acumulación de sales dentro de la planta y el estrés oxidativo que se produce cuando las plantas se ven sometidas a condiciones de salinidad (Frary *et al.*, 2010).

Las plantas han desarrollado diversos mecanismos para sobrevivir en suelos salinos, entre los que se encuentran: homeostasis y compartimentación iónica, transporte y absorción iónica, biosíntesis de osmoprotectores y solutos compatibles, defensa frente al estrés oxidativo, síntesis de poliamidas, generación de óxido nítrico (NO) y modulación hormonal (Gupta y Huang, 2014).

Homeostasis y compartimentación iónica

En un suelo salino, la elevada concentración de iones Na^+ y Cl^- provoca una interferencia en la absorción y captación de nutrientes como K^+ , Ca^{2+} y NO_3^- . Al mantenimiento del equilibrio iónico de la célula frente a los cambios del medio externo se le denomina homeostasis iónica. El estrés salino altera la homeostasis iónica provocando un exceso de Na^+ en el citoplasma. El exceso de Na^+ desplaza al K^+ reduciendo la actividad de muchas proteínas. Uno de los factores determinantes de la tolerancia celular a la salinidad reside en la capacidad de mantener una alta relación K^+/Na^+ en el citosol. El K^+ es el principal catión y nutriente celular, esencial para mantener la turgencia, el potencial y la integridad de la membrana. Además, es un elemento crítico en la actividad enzimática en diferentes rutas (Ashley *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 1998).

Las plantas emplean varias estrategias para combatir el estrés iónico que les impone la salinidad. Algunas de ellas son la regulación de la absorción de Na^+ por la raíz, el transporte hasta la parte aérea de la planta y la compartimentación en células foliares que pueden secretar Na^+ de las hojas. Mediante estas estrategias las plantas minimizan la presencia de elevadas concentraciones de iones tóxicos en sus órganos más sensibles. Además de estos mecanismos, cuando en un ambiente salino se produce un incremento en la concentración de Na^+ en el citoplasma, por encima de un valor crítico, se inicia el proceso homeostático de exclusión.

La compartimentación del Na^+ es una respuesta para la prevención de la toxicidad en el citosol. La compartimentación iónica es un mecanismo dependiente de un

antiportador activo Na^+/H^+ (sodio/protón) que tiene lugar en el tonoplasto. Este proceso es mediado por dos enzimas, ATPasa (H^+ -ATPasa) y pirofosfatasa (H^+ -PPasa), que se combinan en la membrana y forman una bomba de protones. La ATPasa es la bomba de protones dominante que mantiene el pH en condiciones fisiológicas normales y la enzima pirofosfatasa es un sistema auxiliar que bombea protones cuyo rol se fortalece en etapas de desarrollo y condiciones específicas como la hipoxia y el estrés salino (Liu *et al.*, 2014).

La importancia de la actividad del antiportador Na^+/H^+ para la tolerancia a la salinidad se vio sustentada con el descubrimiento del primer antiportador *AtNHX1* (Apse *et al.*, 1999) identificado en *Arabidopsis thaliana*, cuya sobreexpresión confiere una cierta tolerancia a la salinidad en plantas transgénicas de esa misma especie. En *Arabidopsis thaliana*, sin embargo, la homeostasis iónica está regulada principalmente por la ruta SOS (Salt Overly Sensitive).

La homeostasis iónica y la ruta SOS

Las proteínas SOS son sensores de señal de calcio que activan la maquinaria para la exportación de Na^+ y la discriminación de K^+/Na^+ (Shi *et al.*, 2002). El descubrimiento de la vía de señalización SOS en la regulación de la homeostasis iónica bajo estrés salino ha permitido clarificar cómo detecta el Na^+ el sistema celular (Zhu, 2002). La identificación de mutantes hipersensibles a NaCl de *Arabidopsis thaliana* ha sido clave para la localización y clonación de genes asociados a la tolerancia a salinidad. La vía SOS permite la exclusión de exceso de iones Na^+ fuera de la célula a través de la membrana plasmática y ayuda a reinstaurar la homeostasis iónica.

En particular, *SOS1* codifica un antiportador Na^+/H^+ de membrana plasmática y las plantas de *Arabidopsis thaliana* con mutaciones en este gen son extremadamente sensibles al estrés salino y requieren de mayores niveles de K^+ para un crecimiento normal. El gen *SOS2* codifica una proteína quinasa del tipo serina/treonina (Ser/Thr). El gen *SOS3* codifica una proteína de unión a Ca^{2+} que actúa como efector de los mecanismos celulares de señalización por calcio. El estrés salino induce una señal de Ca^{2+} que activa la interacción de *SOS3* con *SOS2* formando un complejo (Türkan y Demiral, 2009). El complejo de proteína quinasa *SOS3/SOS2* regula la expresión de otros genes y además *SOS2* activa el antiportador Na^+/H^+ (*NHX1*) secuestrando el Na^+ en la vacuola. *SOS4* contribuye a la homeostasis del Na^+ y K^+ a través de la regulación de canales de iones y transportadores (Shi *et al.*, 2002). Por último, *SOS5* codifica una proteína de adhesión superficial celular que ayuda en el mantenimiento de la

integridad y arquitectura de la pared celular y está involucrado en el mantenimiento de la expansión celular (Mahajan *et al.*, 2008; Türkan y Demiral, 2009) (Figura 7).

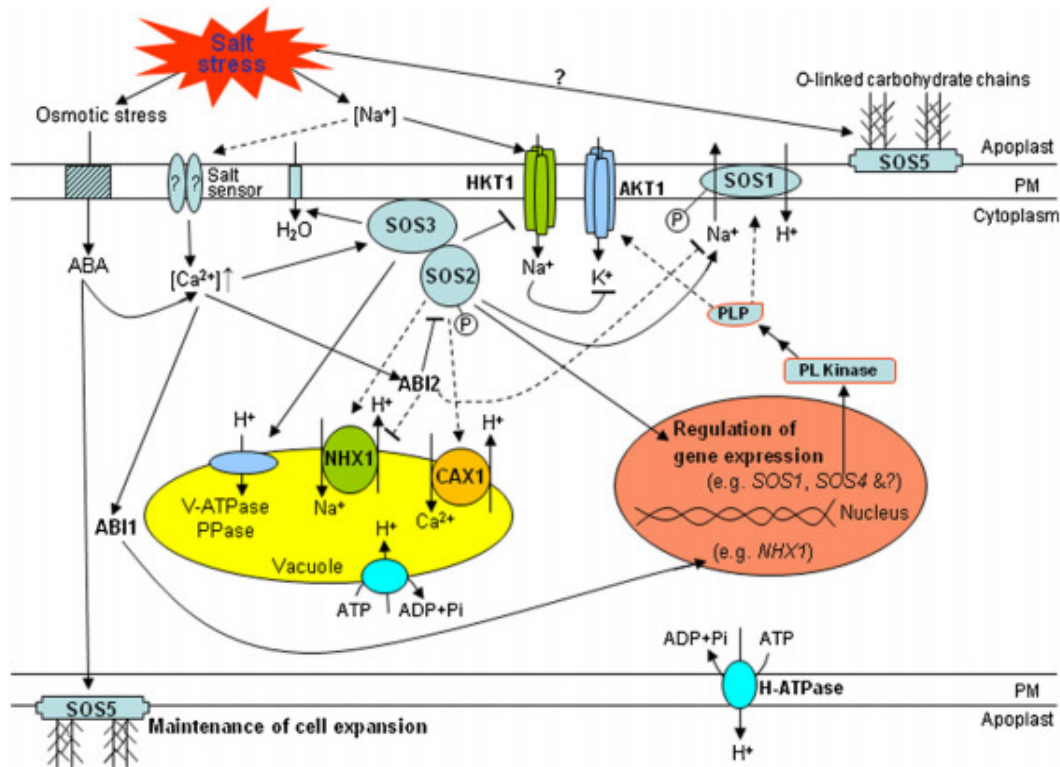


Figura 7. Regulación de la homeostasis iónica a través de la ruta SOS (Türkan y Demiral, 2009).

Cabe destacar por último que se han identificado algunos genes *SOS* en tomate, una especie que, por sus características, podría ser más adecuada que *Arabidopsis* para el estudio de diversos mecanismos como, por ejemplo, el transporte de Na^+ a largas distancias. Olías y colaboradores (2009) clonaron el gen *SISOS1* y comprobaron como las plantas que tenían este gen silenciado eran más sensibles a la salinidad. Además, se pudo demostrar que este gen es clave para el transporte del Na^+ en la raíz y su retención en el tallo, impidiendo que los iones provoquen efectos perjudiciales en tejidos fotosintéticamente activos. También se ha clonado el homólogo funcional en tomate del gen *SOS2* (Huertas *et al.*, 2012). *SISOS2* parece estar implicado en la tolerancia a la salinidad regulando el transporte del Na^+ desde la raíz, activando su carga en el xilema y modulando la compartimentación de Na^+ y K^+ (Belver *et al.*, 2012).

Biosíntesis de osmoprotectores y solutos compatibles

Los solutos compatibles son un grupo de compuestos orgánicos que no interfieren en el metabolismo celular. La principal función de estos osmolitos es proteger la estructura celular y mantener un balance osmótico adecuado cuando se produce un estrés hídrico o salino cuya consecuencia inicial es una pérdida parcial de turgencia (Bohnert *et al.*, 1995). En esas circunstancias las plantas pueden activar mecanismos que disminuyan el potencial osmótico generando metabolitos osmóticamente activos. El tipo de osmolitos que se acumulan es, usualmente, específico de la especie y muchos de estos compuestos también se producen como respuesta a la congelación o el estrés por calor. Además de disminuir el potencial osmótico en el compartimento citosólico, los osmolitos también pueden funcionar como osmoprotectores de proteínas, agregados macromoleculares y membranas, como antioxidantes y como moléculas de señalización.

Los principales osmolitos son prolina, glicinbetaína, los azúcares y los polioles. Desde hace tiempo se sabe que se produce una acumulación de prolina en algunas plantas sometidas a estrés salino (Greenway y Munns, 1980; Storey *et al.*, 1977). Sin embargo, más recientemente se ha concluido que el contenido de prolina no puede servir como indicador del nivel de tolerancia a la salinidad ya que su incremento es una consecuencia del déficit hídrico y no un mecanismo de osmoprotección implicado en la tolerancia (Moftah y Michel, 1987). Por otra parte, se ha comprobado que algunas especies acumulan glicinbetaína en ambientes salinos. En este sentido, a pesar de que se ha obtenido un cierto incremento de tolerancia a estrés salino en plantas transgénicas que acumulan estos compuestos, no parece que dicha tolerancia se deba al ajuste osmótico que producen sino, quizás, a una acción de tipo osmoprotector (Holmström *et al.*, 1996).

Defensa frente al estrés oxidativo

El estrés salino produce un estrés oxidativo en las plantas provocando un desequilibrio de las cadenas electrónicas de transporte (ETC) en los cloroplastos y las mitocondrias. En estas condiciones las plantas reducen su conductancia estomática, lo que limita la entrada de CO₂ al cloroplasto y como consecuencia se produce un menor consumo de NADPH y ATP. Esta respuesta se traduce en una falta de regeneración de aceptores de electrones (NADP⁺, ADP), lo que facilita que el oxígeno (O₂) actúe como aceptor de electrones dando lugar a la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Apel y Hirt, 2004).

El oxígeno puede reducirse a los aniones superóxido (O_2^-), al radical hidroxilo (OH^\cdot) y al peróxido de hidrógeno (H_2O_2), los cuales son compuestos oxidantes altamente tóxicos y, por lo tanto, potencialmente dañinos para la integridad celular. Las especies radicales del oxígeno interactúan con moléculas orgánicas tales como proteínas, lípidos, carbohidratos, incluso con el ADN, provocando en ellas diversos cambios estructurales que conducen a alteraciones de tipo funcional repercutiendo en la fisiología de las células (Groß *et al.*, 2013). El metabolismo antioxidante, incluyendo enzimas antioxidantes y compuestos no enzimáticos, desempeña un papel fundamental en la desintoxicación de ROS inducida por el estrés de salino. La tolerancia a la salinidad se correlaciona positivamente con la actividad de las enzimas antioxidantes, como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatiónperoxidasa (GPX), ascorbatoperoxidasa (APX) y glutatióntransferasa (GR), así como con la acumulación de compuestos antioxidantes no enzimáticos como las vitaminas E y C, el glutatión, los β -carotenos, los flavonoides y algunos oligoelementos.

Regulación de hormonas y estrés salino

Las hormonas vegetales, comúnmente llamadas reguladores de crecimiento, son compuestos que pueden actuar en el sitio de su síntesis o transportarse a otro sitio dentro de la planta para mediar cambios de desarrollo programados genéticamente o respuestas a estímulos ambientales estresantes (Peleg y Blumwald, 2011). El crecimiento y desarrollo de las plantas está regulado de manera coordinada por la acción de varias hormonas como auxinas, citoquininas, ácido abscísico (ABA), giberelinas (GA), etileno, ácido salicílico, brasinosteroides y jasmonatos que controlan muchos procesos fisiológicos y bioquímicos teniendo un rol muy importante en la tolerancia a diversos tipos de estrés abiótico (Ryu y Cho, 2015). Sin embargo, todavía falta mucho por conocer sobre los mecanismos moleculares que subyacen en la influencia de estas sustancias en la tolerancia a la salinidad (Figura 8).

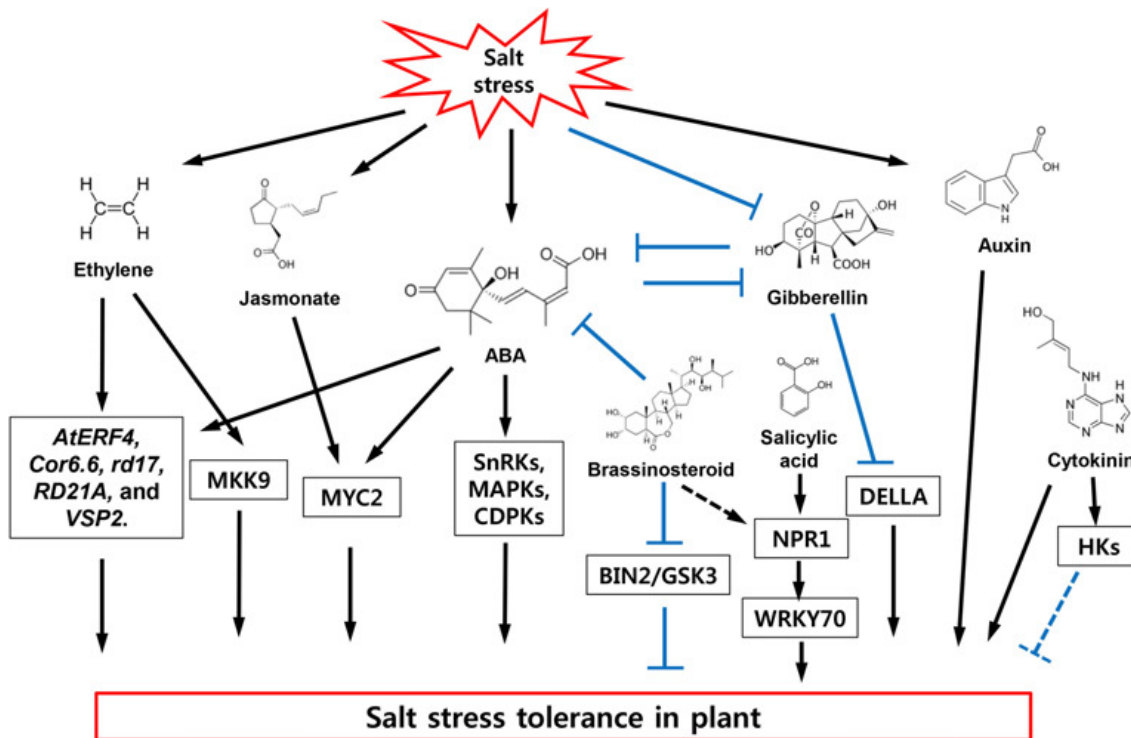


Figura 8. Visión general de la regulación de las hormonas vegetales en la tolerancia a la salinidad. Las líneas discontinuas indican que los mecanismos todavía no se han identificado (Ryu y Cho, 2015).

Etileno: Su biosíntesis se incrementa en plantas sometidas a estrés y se asocia con procesos de senescencia y maduración. Dentro de sus funciones fisiológicas más investigadas, se encuentran las relacionadas con la abscisión de hojas, marchitamiento de flores, maduración de frutos y otros procesos relacionados con el envejecimiento (Santner y Estelle 2009). La modulación del etileno parece que se realiza a través de la regulación de genes que se expresan como respuesta a estrés como *AtERF4*, *Cor6.6*, *rd17*, *RD21A* y *VSP2* (Cao *et al.*, 2008). Por otra parte se ha descubierto que mutantes de pérdida de función *mkk9* muestran fenotipos de insensibilidad al etileno y una menor sensibilidad a la salinidad (Yoo *et al.*, 2008).

Jasmonato (JA): El JA incrementa sus niveles rápidamente en respuesta a perturbaciones mecánicas, ataques de insectos o infecciones por patógenos. También se ha demostrado su papel en la formación de zarcillos, maduración de semillas, producción de polen y crecimiento de las raíces. Al igual que ocurre con el ácido abscísico, la acumulación de JA es mayor en cultivares con mayor tolerancia a la sal (Kang *et al.*, 2005). Además, se ha observado que la actividad biológica de JA aumentó al aplicar un tratamiento salino a las plantas, lo cual indica que esta hormona podría actuar como protector frente a este estrés (Moons *et al.*, 1997). Se ha comprobado también que los factores de transcripción *MYC2* se encargan de la

regulación de genes inducidos por la presencia de JA y ácido abscísico (Kazan y Manners, 2012).

Ácido abscísico (ABA): El ABA debe su nombre a su papel en la abscisión de distintos órganos de las plantas. Desempeña una función muy importante durante muchas etapas del ciclo de vida de la planta, incluyendo el desarrollo de las semillas, la latencia, la apertura estomática, la morfogénesis del embrión y la síntesis y almacenamiento de proteínas y lípidos. El ABA regula los procesos de mantenimiento de turgencia celular y la síntesis de osmoprotectores y enzimas antioxidantes que confieren tolerancia a estrés. También media en las respuestas de la planta a diversos estreses y actúa como molécula de señal endógena responsable de inducir la tolerancia al estrés abiótico; de hecho, se le denomina comúnmente como la hormona del estrés. En respuesta a una situación de estrés los niveles endógenos de ABA aumentan rápidamente activando vías de señalización y modificando la expresión de genes y síntesis de proteínas. En este contexto, se han reportado aumentos en la concentración de ABA tras la exposición de las plantas a la salinidad (Zhang *et al.*, 2006). Además de los factores de transcripción MYC2 comentados en el apartado anterior se ha demostrado la implicación de, entre otras, algunas MAP-quinasas (Rao *et al.*, 2010).

Brasinoesteroides (BR): Estos reguladores se han encontrado principalmente en polen, hojas, yemas, flores y semillas en proporciones y formas diferentes. Tienen un papel esencial en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Sus funciones se relacionan con la elongación y división celular en tallos, el desarrollo de tubo polínico, la diferenciación del xilema y el desarrollo de las hojas. Junto a la gama de respuestas celulares y morfogénicas atribuidas exclusivamente a BR, también se han encontrado respuestas frente a fenómenos de estrés biótico y abiótico. La aplicación exógena de BR reduce de forma efectiva los efectos adversos de los estreses abióticos induciendo una mayor tolerancia (Rao *et al.*, 2002; Fariduddin *et al.*, 2013). De hecho se ha documentado en diversos trabajos el efecto positivo de la aplicación exógena de BR para mejorar el rendimiento de diversas especies sometidas a sequía o salinidad (Wu *et al.*, 2008; Divi y Krishna, 2009; Hao *et al.*, 2013).

Ácido salicílico (SA): Este compuesto fenólico tiene funciones relacionadas con el desarrollo y crecimiento de la planta, los procesos de fotosíntesis, la transpiración y la respuesta a los estreses bióticos. Se ha comprobado que la adición de SA puede incrementar los efectos negativos de la salinidad en algunos casos (Barba-Spin *et al.*, 2011). Cuando la planta se ve sometida a estrés salino, su acción puede estar

mediada por *NPR1* (*NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES1*) que activaría *WRKY70*, un factor de transcripción (Li *et al.*, 2004).

Giberelinas (GA's): Estas hormonas intervienen en el crecimiento y desarrollo, la germinación de las semillas, la expansión foliar, la fotomorfogénesis, la elongación del tallo y la floración. Además, participan activamente en la regulación de las respuestas de las plantas al medio. Esta relación parece estar mediada por las proteínas DELLA que son reguladores negativos de las GA's. En concreto, la exposición a estrés salino induce una reducción en los niveles de GA's bioactivas, lo cual coincide con una mayor acumulación de proteínas DELLA. Estas proteínas actuarían promoviendo una respuesta de la planta relacionada con la reducción de especies de oxígeno reactivo (Achard *et al.*, 2006).

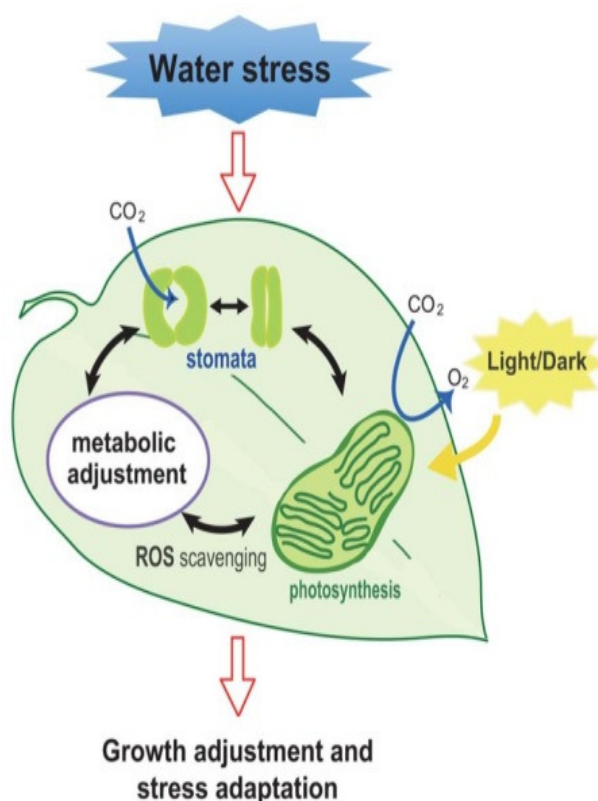
Auxinas: Las auxinas tienen un papel principal en la regulación del desarrollo de las plantas en procesos como la elongación celular, la organogénesis de meristemos apicales y raíces, y la dominancia apical. Se ha estudiado el papel de las auxinas en la superación de varios tipos de estrés. Aunque no se han encontrado los genes que podrían estar relacionados con este efecto, se ha comprobado que las alteraciones observadas en la arquitectura radicular de plantas sometidas a salinidad están causadas por la acumulación y distribución de las auxinas (Wang *et al.*, 2009).

Citoquininas (CK's): Las CK's son un grupo de hormonas que regulan múltiples procesos del crecimiento y desarrollo de las plantas. Desempeñan papeles clave en la división celular a través de una compleja red de señalización, la dominancia apical, la senescencia foliar, la diferenciación vascular, la movilización de nutrientes, la diferenciación de brotes y la producción de antocianinas (Wani *et al.*, 2016). Se ha comprobado que bajo condiciones de estrés salino se reduce la biosíntesis de estos compuestos por la raíz y, como consecuencia, baja su concentración en la parte aérea, lo cual puede alterar los patrones de expresión de los genes que dependen de esta hormona. Además de este efecto, los receptores de citoquininas HK's parecen tener un papel importante en la relación entre las CK's y la tolerancia al estrés salino (Nishiyama *et al.*, 2011).

En conclusión, se ha descrito la importancia que tienen las hormonas en el desarrollo de una planta, tanto en condiciones normales como cuando las plantas se ven sometidas a distintos tipos de estrés. El conocimiento de los mecanismos que regulan estas interacciones pueden ayudar a descubrir nuevas formas de minimizar los efectos negativos que tienen estas condiciones adversas sobre las plantas para hacerlas más tolerantes.

1.2.3. Estrés hídrico

El agua es uno de los factores esenciales para el desarrollo de las plantas y, por tanto, su limitación es una de las principales fuentes de estrés. El estrés hídrico se puede definir como la situación en la que el potencial hídrico y la turgencia se reducen lo suficiente como para afectar a las funciones normales de la planta (Shao *et al.*, 2008). Esta circunstancia se produce cuando la transpiración por las hojas es mayor que la absorción de agua por las raíces. Esta situación se puede dar no sólo cuando hay poca agua en el ambiente, sino también por bajas temperaturas y una elevada salinidad del suelo, ya que en ambos casos se reduce la disponibilidad de agua.



Cuando una planta detecta este problema uno de los primeros efectos para limitar los daños es regular el cierre estomático limitando el intercambio gaseoso. A su vez, la disminución de este intercambio produce una menor disponibilidad de CO₂ y, por tanto, una reducción de la eficacia fotosintética. Estos cambios están interrelacionados con otros procesos como la eliminación de ROS y diversos ajustes metabólicos. Todas estas respuestas colectivas conducen a un ajuste en la tasa de crecimiento como una respuesta adaptativa para la supervivencia (Figura 9).

Figura 9. Respuesta de las plantas al estrés hídrico (Osakabe *et al.*, 2014).

Tras provocar estos efectos como mecanismos de adaptación, el estrés hídrico produce la reducción del contenido de agua, una disminución de la turgencia de los tejidos, la disminución del crecimiento, el marchitamiento y, si persiste dicho estrés, puede provocar la muerte de la planta.

Respuestas fisiológicas, bioquímicas y moleculares a la falta de agua

Las plantas se adaptan a las condiciones de sequía mediante diversos cambios fisiológicos, bioquímicos y moleculares (Figura 10).

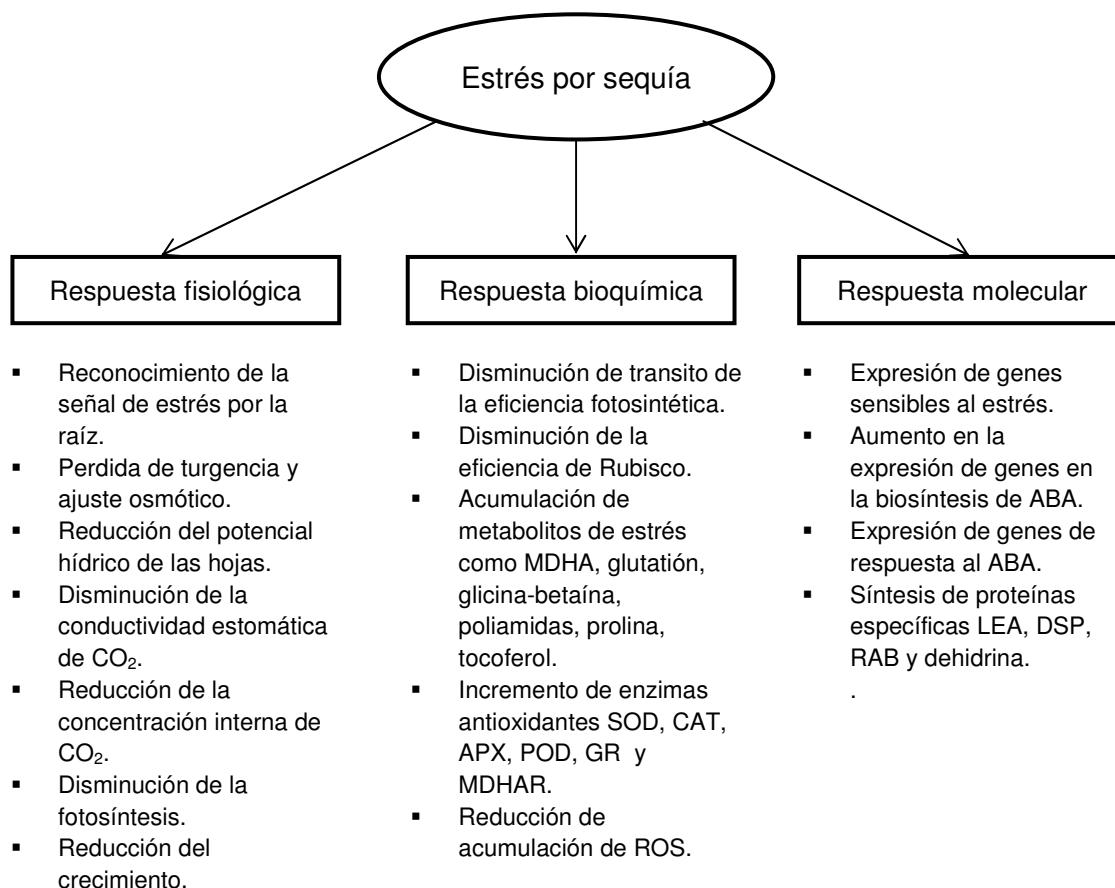


Figura 10. Bases fisiológicas, bioquímicas y moleculares de tolerancia a estrés por sequía (Shao *et al.*, 2008).

Como se puede ver, la respuesta de las plantas a la sequía es altamente compleja e implica cambios deletéreos y/o adaptativos. Además, esta complejidad se debe a factores tales como su genotipo, el estado fenológico de la planta, la duración e intensidad del estrés, el resto de condiciones ambientales, etc.

Efectos del déficit de agua en parámetros fisiológicos y morfológicos

El estrés hídrico es de naturaleza multidimensional y afecta a las plantas en varios niveles de su organización (Zlatev y Lidon, 2012). La sequía reduce el potencial hídrico y la turgencia de la célula de la planta, lo que eleva las concentraciones de los solutos en el citosol y matrices extracelulares. Como resultado, la expansión celular disminuye conduciendo a la inhibición del crecimiento y a problemas en la reproducción de las plantas. Estos cambios son observables en diversos parámetros como la arquitectura de la raíz, la longitud del tallo, las variaciones en el área foliar y la biomasa total de las

plantas (Shao *et al.*, 2008). Además de medir estas características para determinar el nivel de tolerancia de un material concreto, la determinación del contenido relativo de agua (RWC) suministra una información muy valiosa para conocer cuál es la capacidad de retención de agua de una planta, un factor muy importante para determinar su nivel de tolerancia (Slavik, 1974).

Morfología radicular: El sistema radicular es el responsable de proporcionar agua y nutrientes a los diferentes tejidos de la planta así como de proporcionar el soporte estructural. Por tanto, desempeña un papel crítico en la tolerancia al estrés hídrico. En respuesta a los cambios ambientales, la arquitectura de las raíces se modifica para aumentar la eficiencia de absorción. De hecho, en muchas plantas, la sequía provoca un aumento de la elongación de la raíz primaria y una supresión de la ramificación lateral en respuesta al estrés (Basu *et al.*, 2016).

Longitud de tallo: Bajo condiciones de déficit hídrico, el acortamiento de la longitud del tallo y la altura de la planta ha sido reportado en muchas variedades cultivadas. Debido a la limitada disponibilidad de agua, las plantas minimizan su crecimiento adicional de brotes y hojas. En cambio, expanden su sistema radicular para absorber el máximo de agua del suelo (Shahzad *et al.*, 2016).

Área foliar: La plasticidad de las hojas es importante para mantener el control del uso del agua en la planta. El área foliar se reduce significativamente bajo condiciones de estrés hídrico provocando una disminución en la fotosíntesis y, por consiguiente, una disminución en el rendimiento. La deficiencia de agua reduce el número de hojas por planta, su tamaño, y la longevidad de las mismas hasta su abscisión (Shao *et al.*, 2008).

Biomasa total: Las plantas que enfrentan condiciones severas de déficit hídrico están sujetas a una reducción en su biomasa. La caída de las hojas es una respuesta para proteger la pérdida extra de agua en forma de transpiración. Las plantas también pierden turgencia por la ralentización de su desarrollo provocado por la menor capacidad de absorción de agua y nutrientes y por su menor actividad fotosintética (Shahzad *et al.*, 2016).

Contenido de agua relativo (RWC): El crecimiento de una planta depende de la capacidad de sus hojas para mantener las condiciones adecuadas para realizar, entre otras funciones, la fotosíntesis. La reducción del contenido de agua en las hojas afecta seriamente al crecimiento y rendimiento de los cultivos. Así, un genotipo capaz de minimizar el estrés manteniendo la turgencia de las hojas tiene ventajas fisiológicas,

ya que conserva el fotosistema en mejores condiciones. El RWC es uno de los parámetros más utilizados para conocer la capacidad de retención de agua. Se calcula mediante la relación entre el contenido de agua de una hoja que lleva cuatro horas separada de la planta respecto de esa misma hoja recién cortada y re-hidratada para que muestre el mayor contenido de agua que puede alcanzar (Barrs y Weatherley, 1962).

Por último, cabe destacar que para estudiar el efecto del estrés hídrico en las plantas se deben controlar múltiples factores como su intensidad, el momento de inicio del tratamiento estresante, la extensión por del tratamiento, etc. En este contexto, la cuantificación de la tolerancia a este tipo de estrés a menudo presenta serias dificultades cuando se realizan estos análisis en condiciones poco controladas.

1.2.4. Relación de caracteres del desarrollo con el estrés abiótico

El desarrollo final de una planta depende de las interacciones que se produzcan entre diferentes factores endógenos (expresión de genes, reguladores del crecimiento,...) y factores externos (condiciones ambientales, disponibilidad de agua y nutrientes, presencia de algún estrés,...). Además, la respuesta de las plantas frente al estrés tiene efectos inmediatos sobre múltiples procesos del desarrollo, promoviendo numerosos cambios morfológicos en órganos y tejidos, lo que indica que deben existir mecanismos comunes que regulan ambos procesos. Sin embargo, se ha hecho escaso énfasis en el estudio de la relación entre el desarrollo y el estrés ambiental. De hecho, a pesar de que se ha avanzado mucho en el conocimiento de la base genética y molecular del desarrollo, existen muchas lagunas sobre el balance que la planta debe ajustar para mantener el crecimiento en condiciones de estrés abiótico. Así pues, uno de los retos científicos y agronómicos actuales es estudiar cuáles son los nexos de unión entre los procesos de desarrollo y las respuestas a condiciones de estrés abiótico (Hirayama y Shinozaki 2010; Iyer-Pascuzzi *et al.*, 2011; Claeys e Inzé, 2013). Además, mejorando los conocimientos sobre estos procesos pueden surgir nuevas estrategias para que, a través del balance desarrollo-estrés, se pueda mejorar la productividad de los cultivos en condiciones adversas. Por último, el conocimiento adquirido recientemente acerca del desarrollo vegetativo y reproductivo, así como la disponibilidad de especies silvestres afines con mayor tolerancia a estreses abióticos, convierten al tomate en el modelo más adecuado, entre las especies de interés agronómico, para estudiar los procesos que conectan el desarrollo y la respuesta a estrés.

Importancia del desarrollo de la parte aérea en la respuesta al estrés

El crecimiento post-embrionario de la parte aérea de las plantas depende de un equilibrio entre el mantenimiento de la actividad meristemática del SAM (*shoot apical meristem*) y la diferenciación de las células meristemáticas para dar nuevos tejidos con características específicas. En condiciones de estrés, el crecimiento se ralentiza, pero la actividad meristemática se mantiene a través de mecanismos poco conocidos (Ogawa *et al.*, 2011; Van den Ende, 2014). En el caso del estrés salino, las plantas tienen que evitar la acumulación de Na⁺ en el meristemo apical y en las hojas jóvenes para que no se detenga el crecimiento (Cuartero *et al.*, 2006; Pardo, 2010). Además, es posible que las especies silvestres, más tolerantes a la salinidad, hayan desarrollado mecanismos adaptativos aún más eficaces para impedir que el Na⁺ llegue a las zonas en crecimiento activo y, de esta manera, compaginar crecimiento y defensa a estrés en ambientes desfavorables.

Importancia de la arquitectura radicular en la respuesta al estrés

El sistema radicular es clave en la percepción de las señales de estrés cuando una planta se ve sometida a condiciones de sequía o salinidad. Además, su desarrollo se ve profundamente afectado por la disponibilidad de agua en el suelo y por la salinidad. Evidentemente, las modificaciones en la eficacia de absorción de agua y/o exclusión de iones perjudiciales pueden repercutir en la tolerancia de las plantas a estreses como sequía y salinidad. Por otra parte, caracteres del desarrollo radicular como la profundidad, la ramificación o la presencia de raíces adventicias podrían ser tanto o más influyentes que los anteriores en la obtención de plantas con mayor tolerancia a estos tipos de estrés abiótico.

El agua se almacena en las capas más profundas del suelo, debido a que la superficie se seca más rápidamente. Por tanto, las plantas que desarrollan sistemas radiculares más profundos tienen acceso al agua almacenada en estas capas inferiores. Se ha demostrado que un enraizamiento más profundo es beneficioso para la producción y la supervivencia de las plantas en condiciones de déficit hídrico (Comas *et al.*, 2013). Así, por ejemplo, el mutante de *Arabidopsis thaliana* *edt1* (*extremely drought tolerant1*), con raíces más profundas, mostró una alta tolerancia a la sequía (Yu *et al.*, 2008). Se observó que ello se debía a la sobreexpresión del factor de transcripción HD-ZIP *HDG11*, que aumentó la transcripción de genes que promovían el alargamiento celular en la raíz, dando lugar a un sistema radicular más extendido (Xu *et al.*, 2014). La expresión de *HDG11* en otras especies como el arroz, el álamo y el algodón, también confirió tolerancia a la sequía (Yu *et al.*, 2013).

Otro aspecto importante en la arquitectura radicular para la tolerancia a estrés por sequía es su ramificación, es decir, la formación de raíces laterales. En *Arabidopsis thaliana*, Xiong y colaboradores (2006) mostraron un posible vínculo entre la inhibición del crecimiento de raíces laterales y la tolerancia a la sequía mediada por ABA. En ese caso, mutantes con un buen comportamiento en condiciones de sequía mostraron una alta sensibilidad a ABA conduciendo a una inhibición de la longitud de raíces laterales y, como consecuencia, una mayor capacidad de crecimiento de la raíz primaria. Por el contrario, los mutantes menos tolerantes no mostraron ninguna disminución de la longitud de la raíz lateral.

1.3. Herramientas biotecnológicas para la identificación de genes

El conocimiento de los genes que controlan los caracteres de interés agronómico en una especie nos puede ayudar a conseguir resultados relevantes para la mejora de forma rápida y eficaz. Si bien existen diversas vías para llegar a identificar dichos genes, el empleo de mutantes afectados en estos caracteres es una de las aproximaciones más eficaces. Se pueden identificar mutantes espontáneos, pero lo más habitual es crear poblaciones mutagenizadas en las que haya una mayor probabilidad de encontrar fenotipos alterados en los caracteres de interés. Para conseguir estas colecciones se puede recurrir al empleo de mutágenos físicos (radiaciones), químicos (e.g. EMS) o a la mutagénesis insercional. En todos estos casos el objetivo fundamental es crear colecciones lo más amplias posible, ya que el proceso de mutagénesis es totalmente aleatorio y no se puede controlar a priori el gen afectado en cada mutante.

En el caso del tomate se dispone de diferentes colecciones de mutantes. La que se mantiene en el Tomato Genetic Resource Center (TGRC, Univ. California, Davis) es una de las más utilizadas e incluye 978 mutantes espontáneos y variantes naturales. Otros investigadores han generados algunas poblaciones mutagenizadas con EMS (Meissner *et al.*, 1997; Gady *et al.*, 2009; Minoia *et al.*, 2010) o mediante irradiación (David-Schwartz *et al.*, 2001). Con el empleo de ambos métodos, radiaciones y EMS, Saito y colaboradores (2011) consiguieron más de 15.000 familias mutantes de tomate cv Micro-tom dentro de las cuales ya se han identificado 1048 mutantes. No obstante, cuando se emplean mutantes espontáneos o inducidos por agentes físicos o químicos la identificación y clonación del gen responsable de la mutación requiere mucho esfuerzo. Para ello es necesario el empleo de técnicas como el clonaje posicional o las

nuevas estrategias de mapeo por secuenciación. En este sentido, la mutagénesis insercional permite llegar a clonar el gen responsable de la mutación de forma más sencilla que con las técnicas anteriormente descritas.

1.3.1. Mutagénesis insercional

La mutagénesis insercional es una herramienta biotecnológica con la que se puede obtener una mayor variabilidad intraespecífica gracias a que un fragmento de ADN de secuencia conocida, ya sea un transposón o un T-DNA, actúa como mutágeno. El método se basa en que la integración del T-DNA o del transposón dentro de la secuencia estructural o de los elementos reguladores de un determinado gen endógeno puede producir su disrupción y la consecuente pérdida de función o, alternativamente, una ganancia de función o una alteración de su nivel de expresión. En comparación con la mutagénesis por métodos clásicos (radiación, EMS,...), la mutagénesis insercional presenta una ventaja evidente: el gen mutado queda etiquetado por un fragmento de DNA de secuencia conocida, lo cual hace que su clonación sea mucho más sencilla.

En todos los tipos de mutagénesis, uno de los aspectos clave es la generación del mayor número posible de individuos mutagenizados, ya que, cuantos más individuos se obtengan, mayor será la probabilidad de que un determinado gen quede afectado por el tratamiento. Por lo que se refiere a la mutagénesis insercional, es necesario disponer de un protocolo de transformación genética, si empleamos un T-DNA, o de activación de elementos transponibles de secuencia conocida, en el caso de los transposones, con una eficacia suficientemente alta como para obtener grandes cantidades de líneas mutagenizadas.

Cuando se detecta un mutante, hay que comprobar que su fenotipo se debe al fragmento de DNA de secuencia conocida empleado como mutágeno y no está causada por ninguna otra fuente de variación genética inherente a la producción de las líneas mutagenizadas (por ejemplo, variación somaclonal o activación de elementos transponibles de secuencia no conocida). Para ello, se pueden llevar a cabo análisis moleculares en poblaciones segregantes (por ejemplo, descendencias de autofecundación de la planta mutante) en las que se compruebe que el fragmento de DNA que se usa como mutágeno está presente en todas las plantas con fenotipo mutante.

Como alternativa al empleo de estas técnicas de biología molecular, se podría estudiar si existe cosegregación entre el fenotipo mutante y alguna característica que confiera

dicho DNA al integrarse en una planta mutagenizada. Por ejemplo, si se emplea un T-DNA con el gen marcador *nptII*, se podría analizar la resistencia a la kanamicina de las plantas para saber si existe una asociación entre el gen marcador y el fenotipo mutante. Tras comprobar que hay cosegregación, se pueden emplear técnicas de clonación como TAIL-PCR (Singer y Burke, 2003) o Anchor-PCR (Schupp *et al.*, 1999) para identificar el gen afectado con relativa rapidez.

La mutagénesis insercional se ha convertido en una excelente herramienta para la generación de mutantes y la clonación de genes clave en diferentes procesos del desarrollo o en la tolerancia a estrés. A continuación se comentarán las principales características y las ventajas e inconvenientes de los sistemas más utilizados, transposones y T-DNA, así como algunos ejemplos de aplicación de estas estrategias.

Transposones

Los transposones son secuencias repetitivas de DNA que tienen la capacidad de moverse (transponerse) de un lugar a otro en el genoma. El movimiento del transposón puede dar como consecuencia la interrupción de un gen endógeno, la alteración de sus niveles de expresión, la inducción de reordenamientos cromosómicos y, si se produce un aumento del número de copias, el incremento del tamaño del genoma (Kazazian, 2004). Los trabajos de McClintock en maíz en los años 40 y 50 del siglo pasado fueron los que revelaron la existencia de estas secuencias móviles en el genoma con capacidad de duplicarse y cambiar su posición. Después de identificar las secuencias *Ac* y *Ds*, que son las responsables de la translocación e integración (Fedoroff *et al.*, 1983), se ha podido aplicar este sistema a otras especies distintas del maíz como *Arabidopsis thaliana* (Van Sluys *et al.*, 1987), patata (Knapp *et al.*, 1988), tabaco (Hehl y Baker, 1990) y arroz (Enoki *et al.*, 1999).

En tomate, se ha demostrado que este sistema también funciona (Yoder *et al.*, 1988; Yoder, 1990; Osborne *et al.*, 1991; Rommens *et al.*, 1992; Carroll *et al.*, 1995). De hecho, con esta aproximación, se han podido clonar genes que confieren resistencias a diferentes razas de *Cladosporium fulvum* (Jones *et al.*, 1994; Takken *et al.*, 1998) y al virus del mosaico del tomate (Lanfermeijer *et al.*, 2003). Se identificaron también los genes *Dwarf*, que codifica un citocromo P₄₅₀ (Bishop *et al.*, 1996), *DCL* (*DEFECTIVE CHLOROPLASTS AND LEAVES*), que participa en el desarrollo de los cloroplastos y el parénquima en empalizada (Keddie *et al.*, 1996), *FEEBLY*, que tiene funciones en el metabolismo y desarrollo (Van der Biezen *et al.*, 1996), *DEM* (*DEFECTIVE EMBRYO AND MERISTEMS*), que organiza el tejido apical durante el desarrollo de los embriones y la división celular en el meristemos de la raíz (Keddie *et al.*, 1998), y

TAP3, que codifica un factor de transcripción de la familia MADS-box necesario para la especificación de la identidad de pétalos y estambres (Meissner *et al.*, 2000). Recientemente, Carter y colaboradores (2013) utilizaron este sistema en combinación con la técnica de activación transcripcional para generar más de 500 líneas independientes que únicamente contienen elementos *Ds*. Aparte de su utilidad para investigar mutantes presentes en esta colección, esta población puede servir para completar el mapa del genoma de tomate con las localizaciones de elementos *Ds*.

Aunque se han conseguido resultados muy interesantes, tanto con el sistema *Ac/Ds* como con otros parecidos basados en los transposones, esta estrategia tiene ciertas desventajas y limitaciones. En maíz (Greenblatt, 1984; Dooner y Belachew, 1989), tabaco (Jones *et al.*, 1990; Dooner *et al.*, 1991) y *Arabidopsis thaliana* (Keller *et al.*, 1993) se ha observado que los elementos móviles tienden a transponerse en posiciones cercanas a su lugar de origen, es decir, su inserción no es del todo aleatoria. Como es lógico, para su utilización en un programa de mutagénesis insercional esta característica no es nada deseable, ya que lo que se pretende es que se puedan producir mutaciones en todo el genoma de la planta. Además, otro problema es la posibilidad de que los transposones no se inserten de forma estable en el genoma y cambien su posición a lo largo de varias generaciones, como se ha observado en *Arabidopsis thaliana* (Goodrich *et al.*, 1997).

T-DNA

El T-DNA es un fragmento de DNA presente en los plásmidos de algunas especies de *Agrobacterium* (e.g. *A. tumefaciens*). Estas bacterias han desarrollado un complejo mecanismo que les permite transferir este fragmento de DNA hasta el núcleo de las células vegetales para que sintetizen sustancias beneficiosas para ellas. Este fragmento está flanqueado por dos regiones de 25 pares de bases que se denominan bordes (izquierdo y derecho). Para generar mutantes insercionales, el T-DNA se debe insertar en el genoma de las plantas mediante transformación con *Agrobacterium tumefaciens* u otro método alternativo.

Diversos investigadores han estudiado el mecanismo de transferencia e integración del T-DNA en plantas y se ha demostrado qué factores de las plantas juegan un papel importante en su integración (Zupan *et al.*, 2000; Gelvin, 2000, 2003). La distribución del T-DNA a lo largo del genoma es aleatoria (al menos hasta cierto punto), ya que no existen puntos calientes o preferenciales de integración (Franzmann *et al.*, 1995). Diversos autores (Miyao *et al.*, 2003; Kolesnik *et al.*, 2004) han demostrado que el T-DNA es menos propenso a integrarse en puntos calientes, a diferencia de los patrones

de integración de los transposones *Tos17* y *Ds* en arroz. Se ha recalcado desde hace tiempo que el T-DNA suele integrarse en regiones del genoma transcripcionalmente activas (André *et al.*, 1986; Koncz *et al.*, 1989; Herman *et al.*, 1990), lo cual sería una ventaja porque es en estas regiones donde residen la mayor parte de los genes.

El análisis de varias colecciones de mutantes de inserción con T-DNA en *Arabidopsis* ha indicado una tendencia a la integración en regiones reguladoras 5' de genes y en regiones ricas en adenina y timina (Brunaud *et al.*, 2002; Szabados *et al.*, 2002). Además, el análisis de más de 140.000 líneas T-DNA de *Arabidopsis* reveló que proporcionalmente había menos inserciones en regiones centroméricas que en regiones de eucromatina ricas en genes, lo cual sugiere de nuevo que los eventos de inserción del T-DNA tienen preferencia por las zonas del genoma con alta densidad de genes (Alonso *et al.*, 2003). De igual forma, el análisis de mutantes T-DNA de arroz indica una preferencia del T-DNA a insertarse en regiones ricas en genes, con obvia predisposición de integración en regiones reguladoras 5' y 3' (Sallaud *et al.*, 2004). Por otra parte, la caracterización de sitios de inserción del T-DNA de una colección de 108 plantas de fresa (*Fragaria vesca* L.) mediante técnicas de PCR (hiTAIL-PCR) y análisis bioinformático revelaron una preferencia del T-DNA a integrarse en sitios que contienen guanina y citosina (Ruiz-Rojas *et al.*, 2010).

Además de lo dicho anteriormente, la mutagénesis con T-DNA presenta la ventaja, respecto a los transposones, de que las inserciones de T-DNA dentro de una región concreta son química y físicamente estables a lo largo de las generaciones (Radhamony *et al.*, 2005). Por todos estos motivos los mutantes insercionales obtenidos con T-DNA se han utilizado como herramienta biotecnológica para la identificación de genes clave en diferentes procesos biológicos de las plantas.

Se han generado diferentes colecciones de líneas T-DNA en *Arabidopsis thaliana* (Li *et al.*, 2003, Krysan *et al.*, 1999, Sessions *et al.*, 2002, Alonso *et al.*, 2003). En esta especie modelo se estima que al menos el 88% de los genes han sido "afectados" al menos una vez. La utilidad de este material es evidente y, de hecho, las líneas T-DNA representan el 80% de las semillas distribuidas entre la comunidad científica. Se han reportado más de 225.000 líneas de inserción de T-DNA de *Arabidopsis thaliana* que representan la casi saturación del espacio genético de dicha especie. Además, se han determinado los lugares precisos para más de 88.000 inserciones de T-DNA, lo que ha llevado a la identificación de mutaciones en más de 21.700 de los cerca de 30.000 genes predichos de *Arabidopsis thaliana* (Alonso *et al.*, 2003).

En arroz, también existen grandes colecciones de T-DNA desde hace varios años (Hsing *et al.*, 2007; Jeon *et al.*, 2000; Jeong *et al.*, 2002; Wan *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2003). En este caso se estima que se han generado más de 518.000 líneas de inserción. Con este número de líneas es probable que el genoma de arroz, con sus 42.000 genes predichos, esté cerca de su saturación con este tipo de mutaciones (Droc *et al.*, 2008).

Además, se han descrito colecciones de líneas de T-DNA en otras especies, como *Lotus japonicus* L. (Webb *et al.*, 2000), *Medicago truncatula* Gaertn. (Trieu *et al.*, 2000; Scholte *et al.*, 2002), *Salvia miltiorrhiza* Bunge (Lee *et al.*, 2008), *Brachyponium distachyon* (L.) Bauv. (Vain *et al.*, 2008), *Populus tremula* L. x *Populus alba* L. (Harrison *et al.*, 2007), *Brassica rapa* L. (Lee *et al.*, 2004), *Brassica napus* L. (Bade *et al.*, 2003), *Hordeum vulgare* L. (Zhao *et al.*, 2006), *Fragaria vesca* L. (Zhao *et al.*, 2004), *Prunus domestica* L. (Nagel *et al.*, 2008), *Malus domestica* Borkh. (Flachowsky *et al.*, 2012) *Solanum tuberosum* L. (Butler *et al.*, 2016), *Beta vulgaris* L. (Mohammadzadeh *et al.*, 2012), *Cucumis melo* L. (Kakutani *et al.*, 2016). Por lo que respecta al tomate, algunos investigadores han obtenido algunas líneas T-DNA en tomate (Mathews *et al.*, 2003; Gidoni *et al.*, 2003), aunque su número es limitado.

Nuestro grupo es el que ha generado la mayor colección de líneas T-DNA de tomate y especies silvestres relacionadas (más de 7.500 líneas). Estos trabajos se han llevado a cabo con *Solanum pennellii* (Atarés *et al.*, 2011), *Solanum lycopersicum* (Pérez-Martín *et al.*, 2017), *Solanum pimpinellifolium* (el ancestro del tomate) y *Solanum galapagense* (resultados no publicados).

Para llevar a cabo un programa de mutagénesis insercional se puede emplear cualquier T-DNA, pero lo habitual es utilizar construcciones que aporten un valor añadido a las plantas transgénicas obtenidas. Una opción es el empleo de vectores que activen la transcripción de los genes vecinos a su punto de inserción para obtener mutantes dominantes de ganancia de función (*Activation Tagging*). Para ello, se suele utilizar un T-DNA con varios promotores 35S (Hayashi *et al.*, 1992; Suzuki *et al.*, 2001) u otros similares. En este caso, la integración del T-DNA corriente arriba de un gen endógeno podría provocar un aumento en su nivel de expresión y la aparición de un fenotipo alterado como consecuencia de dicha sobreexpresión. Estas construcciones presentan dos ventajas respecto del empleo de otros T-DNA. En primer lugar, permite identificar genes redundantes para una función (Kirik *et al.*, 2004). La anulación de función de uno de estos genes redundantes no tendría por qué dar un fenotipo mutante, ya que el otro gen situado en cualquier zona del genoma podría asumir su

función. En segundo lugar, la activación transcripcional permite identificar genes cuya anulación de función produce un fenotipo sutil (i. difícil de detectar), lo que sí puede ser factible mediante su sobreexpresión (Zhao *et al.*, 2001; Van der Graaff *et al.*, 2002; Wen *et al.*, 2004).

Con este sistema se han identificado varios genes en *Arabidopsis* (Kakimoto, 1996; Kardailaky *et al.*, 1999; Borevitz *et al.*, 2000; Ito y Meyerowitz, 2000; Huang *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2001). Por ejemplo, Weigel y colaboradores (2000) han identificado 30 mutantes dominantes de *Arabidopsis* a partir de 10.000 líneas transformadas con una construcción que promovía la activación transcripcional. En esa misma especie modelo, Marsch-Martinez y colaboradores (2006), emplearon un método de activación transcripcional basado en el transposón *En-1* de maíz y, tras analizar 2.900 líneas, encontraron 31 mutantes dominantes. En arroz, Wan y colaboradores (2009) generaron, durante seis años, una colección de 50.000 plantas transgénicas utilizando el vector pER38 de activación transcripcional y detectaron alrededor de 400 mutantes dominantes. También se ha utilizado este sistema en *Petunia x hybrida* Hort. Ex E. Vilm. (Zubko *et al.*, 2002), *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. (Van der Fits *et al.*, 2001) y en *Populus tremula* L. x *Populus alba* L. (Busov *et al.*, 2011). En tomate, Mathews y colaboradores (2003) generaron 10.427 líneas transgénicas independientes con una construcción de activación transcripcional que portaba cuatro copias del promotor 35S e identificaron 1.338 líneas (12.83%) con alteraciones fenotípicas relacionadas con el desarrollo de la planta.

Sin embargo, se ha visto que este sistema presenta algunos inconvenientes. Por ejemplo, en *Arabidopsis* se ha encontrado una correlación entre el número de inserciones de T-DNA, el estado de metilación de la secuencia del intensificador 35S y la actividad del mismo (Chalfun-Junior *et al.*, 2003). Los autores de este trabajo observaron que todas las plantas que portaban más de una inserción de T-DNA mostraban metilación del intensificador 35S y un dramático descenso en la actividad del mismo. Esto indicaba que, en la mayoría de las líneas obtenidas mediante activación transcripcional, el intensificador 35S era silenciado debido a la metilación inducida por la integración de múltiples insertos de T-DNA. Como lo habitual en los vectores de activación transcripcional es poner varios promotores 35S en tándem, existe la posibilidad de que la sobreexpresión de un gen conlleve a un mecanismo de silenciamiento postranscripcional, es decir, en lugar de mutantes de ganancia de función, lo que se obtienen son mutantes de pérdida de función. Otros inconvenientes asociados al empleo de esta aproximación son la alta frecuencia de plantas que muestran efectos pleiotrópicos y la dificultad a la hora de clonar el gen afectado, ya

que la influencia de las señales reguladores se puede producir aunque el inserto esté situado lejos del gen endógeno, es decir, no siempre el gen queda etiquetado por el inserto.

Trampas génicas

Se han desarrollado otros tipos de vectores, denominados genéricamente como 'trampas génicas' (*trapping*), que pueden aportar un valor añadido a las líneas T-DNA en el contexto de un programa de mutagénesis insercional. En este caso, el T-DNA porta, además de un gen marcador, un gen delator con un promotor mínimo, sin promotor, con un sitio aceptor de *splicing*. Se pueden diferenciar, pues, tres tipos de trampas génicas: trampas de intensificadores, trampas de promotores y trampas de genes (Springer, 2000).

Cuando se emplea una trampa génica en un programa de mutagénesis insercional hay dos alternativas para identificar nuevos genes. La primera es evaluar el fenotipo y ver si la inserción del T-DNA en un gen endógeno ocasiona un cambio cualitativo. La segunda consiste en evaluar la expresión del gen delator en diferentes órganos y tejidos, y a lo largo de diversos estados del desarrollo, para ver si aparecen patrones de expresión del gen delator asociados a un cierto gen endógeno. La información de ambas estrategias puede ser complementaria, ya que una vez identificado un fenotipo mutante se puede obtener información adicional sobre el gen endógeno mediante el análisis del patrón de expresión del gen delator en las plantas mutantes.

El gen delator más utilizado en una trampa génica es el gen *uidA* que codifica la proteína GUS. Una de las ventajas de este delator frente a otras alternativas es que la observación microscópica de la tinción de la proteína GUS es tremendamente más sensible que la de otros genes delatores (e.g. *GFP* o *Luc*), ya que permite su detección en una o pocas células (Topping *et al.*, 1994; Sundaresan *et al.*, 1995; Campisi *et al.*, 1999; He *et al.*, 2001).

Como ya se ha comentado, existen tres tipos de trampas génicas. En la trampa de intensificadores ("*enhancer trap*"; Figura 11 A), el gen delator se fusiona con un promotor mínimo (caja TATA con un sitio de inicio de la transcripción). El promotor mínimo es incapaz de promover un nivel de transcripción detectable, pero su inserción en el área de acción de un determinado intensificador, y en la dirección correcta, activa la expresión del delator, imitando el patrón de expresión que dicho intensificador confiere al gen endógeno. El sistema se describió por primera vez en un trabajo con *Drosophila* (O'Kane y Gehring, 1987) y, desde entonces, ha sido utilizado con éxito en

especies vegetales como *Arabidopsis thaliana* (Geisler *et al.*, 2002; He *et al.*, 2001; Sundaresan *et al.*, 1995), arroz (Johnson *et al.*, 2005; Peng *et al.*, 2005; Sallaud *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2003), *Solanum pennellii* (Atarés *et al.*, 2011), *Solanum lycopersicum* (Pérez-Martín *et al.*, 2017), *Solanum pimpinellifolium* y *Solanum galapagense* (resultados no publicados).

La trampa de promotores (*promoter trap*) tiene una estructura idéntica a la anterior, pero sin el promotor mínimo. En este caso, para que se exprese el delator es necesario que el T-DNA se inserte en uno de los exones de un gen endógeno (Figura 11 B). Este tipo de construcciones han sido muy valiosas para identificar marcadores específicos de determinados tipos celulares (Lindsey *et al.*, 1993). En particular, descubrir genes que se expresen de forma específica a lo largo del desarrollo de un embrión representa un desafío importante por las limitaciones de tamaño y accesibilidad. Pese a ello, Blanvillain y Gallois (2008) comprobaron que mediante la utilización de una trampa de promotores se pueden solventar estos problemas y alcanzar el objetivo deseado.

Por último, la trampa de genes (*gene trap*) no tiene promotor, sino un sitio aceptor de *splicing* justo antes de la región estructural del delator (Sundaresan *et al.*, 1995). En este caso, para que se exprese el delator es necesario que el T-DNA se inserte en uno de los intrones de un gen endógeno y en la misma orientación (Figura 11 C).

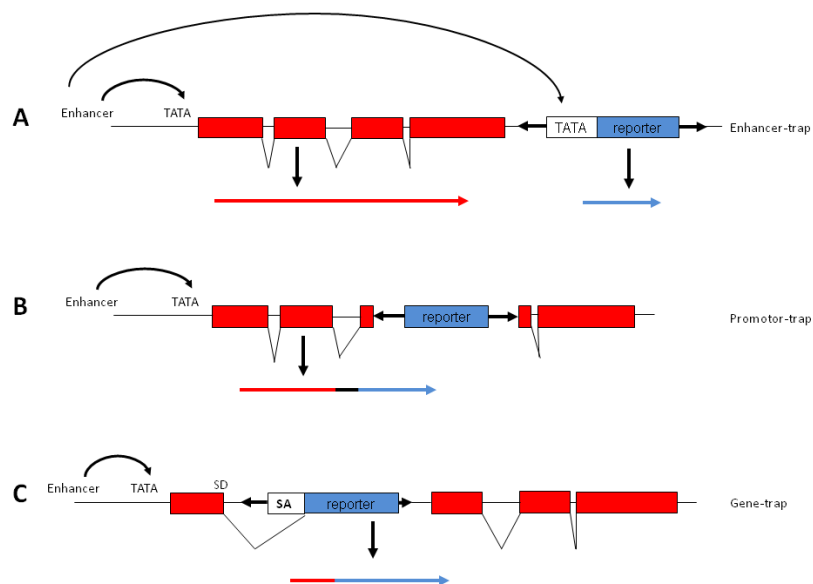


Figura 11. Esquema de las construcciones utilizadas como trampas génicas y proteínas resultantes de la expresión del gen endógeno y del gen delator. A) trampa de intensificadores. B) trampa de promotores. C) trampa de genes. En color rojo el gen endógeno y la proteína correspondiente; en azul el gen delator. (Springer, 2000).

Por tanto, cada tipo de trampa tiene sus ventajas e inconvenientes. En el caso de la trampa de intensificadores, como basta que se inserte en el área de acción de un intensificador (región promotora, exones, intrones e incluso fuera del gen endógeno), el número de eventos donde se observa la expresión del gen delator es mayor. El inconveniente estriba en que, como el intensificador puede activar la expresión del gen delator a una distancia considerable, el esfuerzo a la hora de clonar el gen puede ser mayor. Por otro lado, el inconveniente principal de las trampas de promotores y de genes, es que para que funcionen deben integrarse dentro de un exón o de un intrón, respectivamente, y, por tanto, el número de genes que van a detectarse es menor. Por el contrario, en este caso, el gen queda estrictamente etiquetado por el T-DNA.

El interés de esta estrategia estriba en la naturaleza dual de las trampas. Por un lado generan mutaciones de inserción como cualquier T-DNA y, por otro, permiten estudiar el patrón de expresión del gen etiquetado. De esta forma, además de poder inferir la función del gen etiquetado a partir del fenotipo mutante, se puede obtener información relacionada con el patrón de expresión espacio-temporal de dicho gen, ya que, por el diseño de las trampas, la expresión del gen delator puede imitar la expresión del gen endógeno etiquetado. Además, el empleo de trampas génicas tiene grandes ventajas sobre la mutagénesis insercional *sensu stricto* porque, gracias al estudio del patrón de expresión del delator, se pueden identificar genes con funciones redundantes, genes que se expresan en múltiples estados de desarrollo y producen efectos pleiotrópicos, genes cuya disrupción provoca letalidad temprana, y genes cuya disrupción ocasiona un fenotipo tan sutil que a veces no llega a detectarse en la evaluación fenotípica de las plantas (Springer, 2000).

OBJETIVOS

En nuestro grupo se ha generado una colección de más de 7000 líneas T-DNA de tomate y especies silvestres relacionadas con el fin de encontrar mutantes que permitan identificar los genes que controlan diferentes caracteres. En colaboración con los grupos del Dr. Lozano (Universidad de Almería) y la Dra. Bolarín (CEBAS-Murcia) se han identificado más de quinientos mutantes y se han clonado unos treinta genes implicados en diversos caracteres del desarrollo o en la tolerancia al estrés salino.

Hasta hace poco, la selección de mutantes relacionados con estrés abiótico se realizaba en función de su capacidad para mostrar un desarrollo normal en condiciones control y un comportamiento diferencial en condiciones estresantes. No obstante, nuestros resultados recientes han revelado la íntima relación entre ciertos caracteres del desarrollo y la tolerancia a estrés abiótico. Por ejemplo, un mutante con mayor desarrollo del sistema radicular podría ser más tolerante a situaciones de sequía. Alternativamente, ciertas condiciones de estrés provocan cambios en el color de la hoja o en la senescencia foliar y, por ello, la detección de mutantes alterados en estos procesos puede ayudar a identificar genes relacionados con estrés abiótico. Asimismo, nuestros resultados previos han revelado una conexión funcional entre el desarrollo del meristemo apical y la tolerancia a estrés salino. En conjunto, estos resultados han abierto el camino para identificar genes directa o indirectamente relacionados con la tolerancia a estrés abiótico a través del análisis de ciertos mutantes del desarrollo que muestran un fenotipo alterado en condiciones control.

Con estos antecedentes se establecen los siguientes objetivos:

1. Poner a punto un método para identificar mutantes afectados en su tolerancia al estrés hídrico y realizar un escrutinio en líneas T-DNA.
2. Caracterizar fenotípica y genéticamente los mutantes con cambios en el nivel de tolerancia a estrés hídrico.
3. Continuar con el escrutinio de líneas T-DNA de tomate y *Solanum galapagense* en condiciones de estrés salino.
4. Caracterizar fenotípica y genéticamente los mutantes de tomate y *Solanum galapagense* alterados en el nivel de tolerancia a estrés salino.
5. Caracterizar fenotípica y genéticamente mutantes alterados en caracteres del desarrollo que pueden estar directa o indirectamente relacionados con la tolerancia a diversos tipos de estrés abiótico.
6. Iniciar el análisis funcional del gen identificado en el mutante *dor* (*defective in organogenesis and rooting*).

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Material vegetal y técnicas básicas

En este trabajo se han utilizado líneas T-DNA de tomate (*Solanum lycopersicum*) de los cultivares MoneyMaker y P73 y líneas T-DNA de *Solanum galapagense*, una especie silvestre del mismo género, obtenidas en nuestro grupo a través de la transformación genética con una trampa de intensificadores (Atarés *et al.*, 2011) con el vector pD991 (Figura 12) cedido amablemente por el Dr. Thomas Jack (Dpto. de Ciencias Biológicas de la Universidad de Dartmouth).

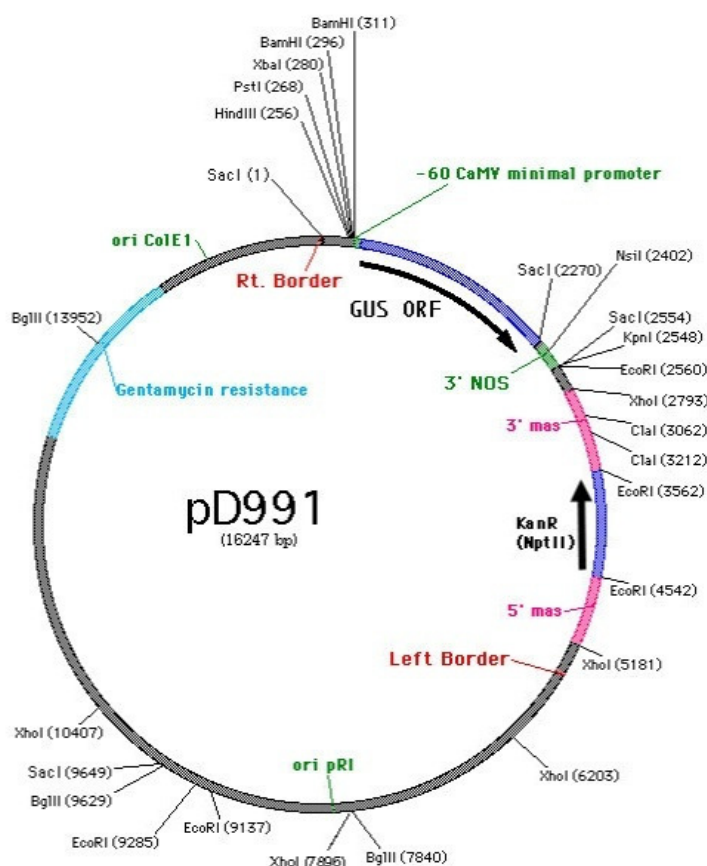


Figura 12. Representación esquemática del plásmido pD991 que incluye la trampa de intensificadores.

Las líneas T-DNA de tomate cultivado se nombraron con números consecutivos seguidos del acrónimo ET MM o ET 73 por la construcción utilizada (i.e. Enhancer Trapping) y el genotipo transformado, MoneyMaker o P73 respectivamente. En el caso de las líneas T-DNA de *Solanum galapagense* se nombraron con las letras ET GA. Para la realización de esta tesis el material de partida fueron semillas TG2 obtenidas de la autofecundación de plantas transformantes diploides TG1.

3.1.1. Esterilización de semillas

El cultivo *in vitro* en condiciones axénicas requiere de una esterilización superficial del material vegetal antes de su implantación. El método empleado para la esterilización de las semillas de las dos especies fue el mismo y consistió en sumergirlas en una solución de hipoclorito de sodio al 2% m/v (lejía comercial diluida a 50%). Para mejorar el contacto del material vegetal con la solución esterilizante se añadieron unas gotas de un agente tensoactivo, 7X-0-matic (Flow Laboratories, Inc, Virginia, EEUU). Después de sumergir las semillas durante 30 minutos en esta solución, se realizaron tres lavados consecutivos de 5, 10 y 15 minutos en agua destilada estéril para eliminar los restos del agente esterilizante en una cabina de flujo laminar.

3.1.2. Obtención de plántulas y plantas axénicas

Las semillas esterilizadas se sembraron en placas Petri a las que previamente se había introducido dos hojas de papel de filtro y 7 mL de agua estéril. Las placas se cultivaron en una cámara a 25°C y oscuridad hasta que las radículas de las semillas emergen. Una vez que las semillas germinan se transfieren al medio de germinación (Tabla 4) para que sigan con su crecimiento.

Tabla 4. Medio de germinación MG

Componente	(g·L ⁻¹)
Solución mineral	MS*
Sacarosa	10
Agar bacteriológico (Duchefa®)	8

* Murashige y Skoog, 1962

Las plantas axénicas se obtuvieron a partir del cultivo de los ápices meristemáticos de las plántulas (Figura 13).

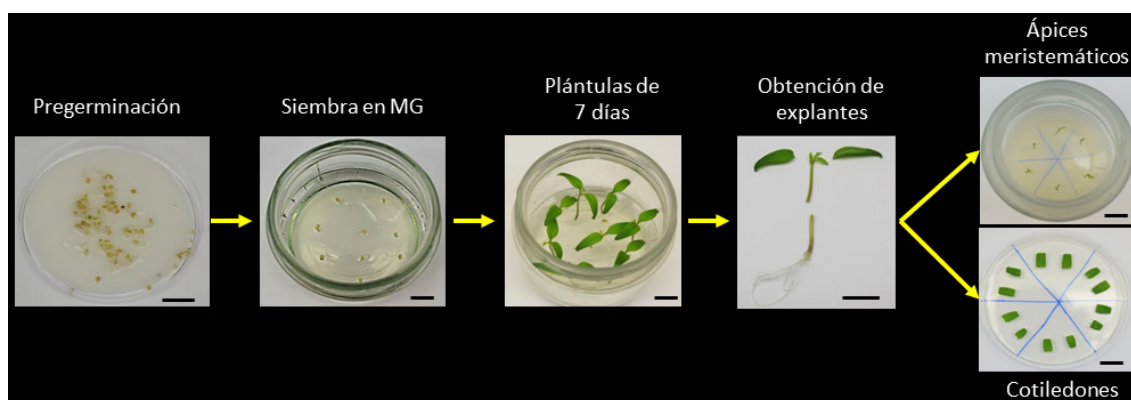


Figura 13. Obtención de plántulas y plantas axénicas. La barra representa 1 cm.

Una vez añadidos los componentes de los medios de cultivo el pH se ajustó a 5.7 con KOH y HCl antes de añadir el agente gelificante. Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 115°C durante 30 minutos. El medio de germinación salino es el medio MG suplementado con NaCl 100 mM para el caso de las líneas T-DNA de tomate cultivado y 75 mM para las líneas de *Solanum galapagense*.

Los ápices meristemáticos se cultivaron en recipientes de vidrio (105 mm de altura x 95 mm de diámetro) con 50 mL de medio básico MB3 (Tabla 5) durante un periodo de 25 a 30 días. Las cámaras de cultivo empleada para éste y el resto de experimentos tenían fotoperiodo (16 horas luz / 8 horas oscuridad) y una intensidad luminosa de 70 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y una temperatura constante de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Tabla 5. Medio básico MB3

Componente	g·L ⁻¹
Solución mineral	MS*
Sacarosa	30
Myo-inositol	0,1
Tiamina clorhídrica	0,001
Agar bacteriológico (Duchefa®)	8

3.1.3. Clonación de plantas

La propagación clonal tuvo como objetivo la obtención de plantas genéticamente idénticas a través de la multiplicación vegetativa. Para la clonación se utilizaron ápices meristemáticos o yemas axilares que se cultivaron en recipientes de vidrio (150 mm de altura x 60 mm de diámetro) con 40 mL de medio básico MB3 (Tabla 5).

3.1.4. Aclimatación y cultivo en invernadero

Las plantas axénicas con 30 días de cultivo en medio básico, tras desarrollar un sistema radicular suficiente, estaban listas para ser aclimatadas. En primer lugar, se extraía la planta del recipiente de vidrio, eliminando los restos de agar de la raíz y procurando no dañarla. Después, se trasplantaba a una maceta (9 cm de diámetro) que contenía fibra de coco estéril y se cubría con un vaso de plástico transparente para evitar la deshidratación (Figura 14). A los 10-15 días se trasplantaban a una maceta de mayor



Figura 14. Plantas recién aclimatadas. La barra representa 1 cm.

tamaño (28 cm de diámetro) con fibra de coco y se retiraba el vaso de plástico sin que las plantas se deshidrataran, dándose por concluida la etapa de aclimatación.

Las plantas se cultivaron en invernadero, entutoradas a una guía, con sistema de refrigeración por aire acondicionado, iluminación artificial (lámparas de mercurio de 400 W) y abonado mediante fertirrigación.

3.2. Esquema de trabajo con las líneas T-DNA

Éste es el esquema de trabajo que se ha seguido con las líneas T-DNA de tomate y *Solanum galapagense* obtenidas previamente en nuestro grupo (Figura 15).

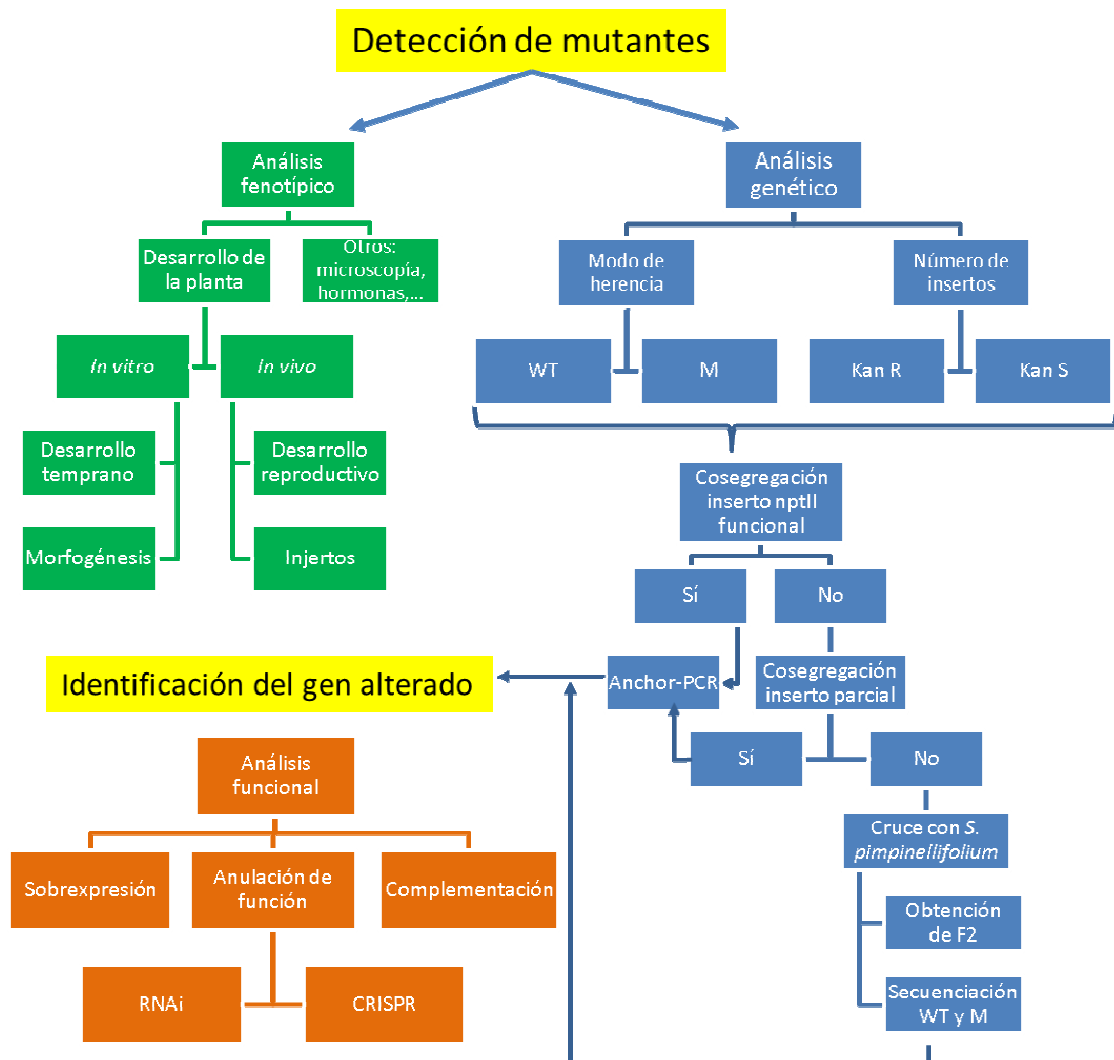


Figura 15. Representación del esquema de trabajo general llevado a cabo en nuestro programa de mutagénesis insercional

El primer paso del programa de mutagénesis insercional fue identificar los mutantes. Para ello, se emplearon un número suficiente de plantas TG2 (24 plantas por cada línea T-DNA) para poder detectar tanto las mutaciones dominantes como las de carácter recesivo (en ese caso sólo se observa el fenotipo mutante en una cuarta parte de las plantas analizadas). En nuestro caso, se identificaron mutantes mediante el cultivo de plantas TG2 en invernadero y también empleando el cultivo *in vitro* como método de escrutinio. Además, en algunos de los experimentos de identificación de mutantes se incluyeron agentes estresantes para poder detectar mutantes afectados en la tolerancia a esos estreses.

Una vez se identificaba un presunto mutante y se corroboraba dicho resultado, se llevaba en paralelo su análisis fenotípico, para ver qué caracteres estaban afectados, y su análisis genético, para saber el modo de herencia del carácter y si el gen afectado ha quedado etiquetado por algún fragmento de ADN de secuencia conocida. Este punto es muy importante ya que si existía cosegregación se abordaba un Anchor-PCR para intentar secuenciar las regiones flanqueantes al T-DNA y lograr así identificar el gen alterado. En cambio, si no se puede establecer ninguna cosegregación entre un fragmento de ADN de secuencia conocida (sea un inserto total o un inserto parcial del T-DNA y/o del cuerpo del vector) y el fenotipo mutante, se procedía de forma diferente: cruzando una planta mutante con *Solanum pimpinellifolium*, obteniendo la generación F2 de ese cruce, identificando suficientes plantas mutantes en esa generación e identificando los genes candidatos por técnicas de secuenciación (mapeo por secuenciación). Obviamente esta opción conllevaba mucho más tiempo y esfuerzo hasta lograr saber cuál era el gen alterado.

Por último, una vez se había identificado el gen que podía ser el responsable del fenotipo detectado se procedía a su análisis funcional mediante su sobreexpresión y anulación de función en la línea parental o mediante la complementación del mutante para revertir su fenotipo. A continuación se explica con detalle la metodología llevada a cabo en esta tesis en cada uno de los pasos del esquema de trabajo.

3.3. Detección de mutantes

Se llevó a cabo el escrutinio de líneas T-DNA para identificar los mutantes afectados en su tolerancia tanto para estrés salino como para estrés hídrico. Para el estrés salino se han evaluado 175 líneas T-DNA de tomate cultivado y 202 líneas T-DNA de *Solanum galapagense*. En cuanto al estrés hídrico, se han evaluado 83 líneas de T-DNA de tomate. Todos estos escrutinios se han llevado a cabo en la generación TG2 de cada línea para poder identificar mutaciones recesivas y tener una buena fiabilidad

en dicha detección. Esto ha supuesto cultivar más de 11.000 plantas TG2 (24 plantas de cada línea) para cada condición evaluada.

3.3.1. Detección de mutantes alterados en la tolerancia a salinidad

Para identificar mutantes afectados en su tolerancia a la salinidad mediante el escrutinio de una colección de líneas T-DNA, se decidió utilizar la metodología previamente puesta a punto en nuestro grupo (Sánchez-Sauceda, 2016). Como material de partida se emplearon semillas TG2 que, una vez esterilizadas y pregerminadas, se transfirieron a medio de germinación con cloruro sódico (NaCl) y se mantuvieron en la cámara de cultivo (ver apartado 3.1.2) durante 30 días. Las líneas identificadas como mutantes se cultivaron de nuevo para corroborar el fenotipo observado. Además, al detectar un mutante en condiciones de cultivo con salinidad, también se evaluó en condiciones control (i.e. medio de germinación sin NaCl) para determinar si el fenotipo detectado era específico de estrés salino (sólo se observaron alteraciones en condiciones salinas) o, por el contrario, era un mutante afectado en caracteres del desarrollo.

3.3.2. Detección de mutantes alterados en la tolerancia al estrés hídrico

Para abordar el escrutinio de una colección de líneas T-DNA y conseguir la identificación de mutantes afectados en su tolerancia al estrés hídrico se decidió poner a punto un método que permitiera conseguir esto de forma eficiente. En este caso se probaron tres tipos de evaluaciones, una con cultivo *in vitro* y otras dos cultivando las plantas en el invernadero. Tras analizar los resultados de estos experimentos (datos no mostrados) se decidió realizar el escrutinio en condiciones de cultivo *in vivo* con tres ciclos de ausencia de riego de diez días de duración cada uno.

Por tanto, la metodología para el escrutinio de líneas T-DNA alteradas en su tolerancia al estrés hídrico consistió en someter a plántulas con tres hojas verdaderas cultivadas en macetas de 14 cm de diámetro con fibra de coco a tres ciclos consecutivos de falta de riego (10 días cada ciclo). El experimento se llevó a cabo durante 30 días en los que se regó los días 0, 10, 20 y 30. La ventaja de esta metodología es que, en principio, se podían detectar tanto mutantes sensibles al estrés hídrico como tolerantes respecto al WT (Figura 16).

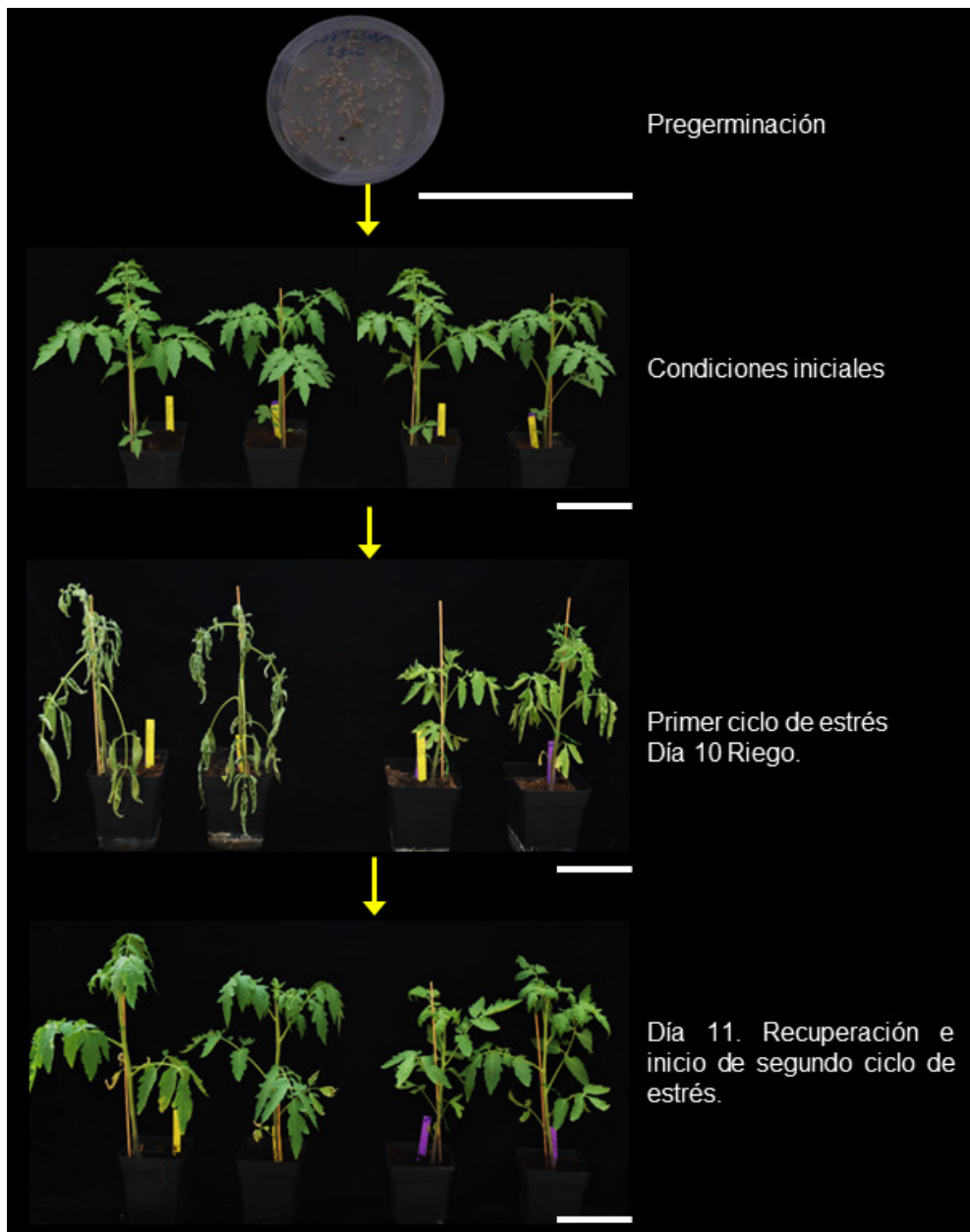


Figura 16. Representación del primer ciclo del método para la identificación de mutantes afectados en su tolerancia al estrés hídrico en líneas T-DNA de tomate. Las barras representan 10 cm.

3.4. Análisis fenotípico

El análisis fenotípico de los mutantes identificados se realizó en condiciones *in vitro* e *in vivo* y en diversas etapas de su desarrollo que iban desde el estudio de la plántula y de la planta axénica hasta el desarrollo reproductivo variando según la naturaleza del mutante. A continuación se describen los principales caracteres que se estudiaban en cada etapa del desarrollo.

3.4.1. Desarrollo de la planta *in vitro*

El análisis fenotípico *in vitro* presentó algunas ventajas respecto del crecimiento *in vivo*: condiciones ambientales más controladas, menor necesidad de espacio, mayor rapidez, posibilidad de visualizar continuamente las raíces y evaluación de caracteres imposibles de analizar *in vivo* (e.g. capacidad de regeneración adventicia).

Desarrollo temprano y morfogénesis

El análisis fenotípico comenzó con la evaluación del desarrollo de las plántulas que se obtenían tras la germinación de las semillas (Figura 17). En esta etapa se observaba la formación de la raíz embrionaria, el desarrollo del ápice meristemático, el desarrollo de las primeras hojas y la presencia de eventos de muerte temprana, senescencia, clorosis, etc. Además, los cotiledones e hipocótilos de las plántulas de 7 días se emplearon para evaluar su capacidad de regeneración adventicia cultivándolos en medio IKZ 4.0 4.0 1.0 (MB3 + ácido indolacético $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + kinetina $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + zeatina $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) o para evaluar su capacidad de enraizamiento adventicio cultivándolos en medio I 4.0 (MB3 + ácido indolacético $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Estos experimentos se podían complementar empleando los mismos medios pero utilizando como material de partida explantes de hoja.

Los ápices meristemáticos se utilizaron para obtener plantas axénicas (Figura 17), evaluar la parte aérea de la planta (desarrollo del ápice, morfología foliar, etc.) y para estudiar el desarrollo de las raíces adventicias en medio base o añadiendo al MB3 diferentes tipos (ácido indolacético, ácido indolbutírico, etc.) y concentraciones de auxinas. También se emplearon para evaluar el efecto del estrés salino sobre los mutantes añadiendo al medio base MB3 diferentes concentraciones de NaCl.



Figura 17. Plántula de 7 días y planta axénica de 30 días de tomate (izquierda y derecha respectivamente). La barra representa 1 cm.

3.4.2. Desarrollo de la planta *in vivo*

El análisis fenotípico *in vivo* se realizó a partir de semillas o a partir de plantas aclimatadas. Las plantas cultivadas en el invernadero se caracterizaron tanto en su desarrollo vegetativo como reproductivo mediante toma de imágenes y mediciones de diferentes partes de las plantas. Se especifica en cada mutante las características de estos análisis.

Injertos

En algunas ocasiones se han realizado injertos entre plantas mutantes y plantas WT para evaluar la influencia que tiene la parte aérea y la parte radicular sobre el fenotipo mutante observado o para conseguir semillas de un mutante que tuviera muy afectado el desarrollo radicular y no pudiera crecer hasta dar frutos.

El proceso para la realización de injertos fue el siguiente (Figura 18):

- Una vez esterilizadas y pregerminadas las semillas WT y M se sembraron en una maceta con sustrato en el invernadero.
- Tras 10 días de cultivo, cuando comenzaron a aparecer las primeras hojas verdaderas, se eliminaron los cotiledones y las hojas expandidas del ápice meristemático de la plántula que iba a ser la parte aérea del injerto.
- Después se realizó un corte en bisel por debajo de los cotiledones en ambas plántulas de tal manera que tuvieran un diámetro similar y se juntaron ambas partes (patrón-injerto) uniéndose con una pinza.

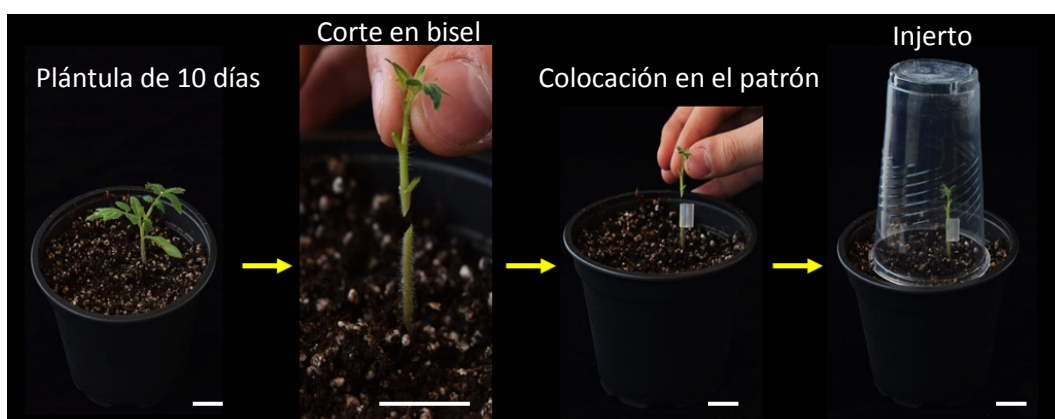


Figura 18. Procedimiento para la realización de injertos. La barra representa 1 cm.

Los injertos se representan como una fracción indicando el genotipo de la parte aérea en la parte superior y el genotipo de la raíz en la parte inferior.

3.4.3. Técnicas de microscopía

En algunos mutantes se realizaron estudios histológicos utilizando un microscopio óptico (LEICA 5000) con cámara digital DS-Ri. La preparación de las muestras se realizó mediante la siguiente metodología.

Fijación de las muestras e inclusión en parafina

Se introdujeron pequeñas secciones de tejido vegetal en el fijador FAE (Tabla 6) y se sometieron a vacío durante 5 minutos.

Tabla 6. Composición del fijador FAE

Componente	Concentración
Etanol absoluto	50%
Formaldehido 37%	10%
Ácido acético glacial	5%

Posteriormente se cambió el fijador utilizado por fijador fresco y se mantuvieron las muestras de 4 a 16 horas a 4°C. Transcurrido este tiempo se eliminó el fijador y se fueron haciendo cambios cada media hora a soluciones de etanol con concentraciones crecientes (50%, 70%, 85%, 95% y 100%). Después, se pasaron las muestras por concentraciones crecientes de HistoClear en etanol absoluto (33%, 50%, 67% y 100%). Tras esto, se pasaron las muestras por concentraciones crecientes de Parafina en HistoClear (33%, 50%, 67% y 100%) manteniendo una temperatura de 58°C. Una vez las muestras quedaron incluidas en Parafina ya se pudieron montar los bloques para que el tejido pudiera ser cortado con un micrótopo y obtener así las secciones correspondientes para montarlas sobre portaobjetos con Polysina.

Eliminación de la parafina y tinción con azul de toulidina

Para eliminar la parafina y teñir los tejidos de los cortes se sumergieron los portaobjetos en las siguientes soluciones: HistoClear durante 10 minutos, EtOH 100% durante 10 minutos, EtOH 90% durante 5 minutos, EtOH 70% durante 5 minutos y agua durante 10 minutos. Después de realizar estos pasos se sumergieron los portaobjetos en una solución de azul de toulidina 0,02% durante 2 minutos, se lavaron con agua para eliminar los restos de colorante y se dejaron secar. Por último la muestra se visualizó en el microscopio capturando las imágenes correspondientes.

3.4.4. Cuantificación de hormonas vegetales endógenas

Para la cuantificación de las hormonas endógenas se tomaron muestras de 100 a 200 mg de tejido vegetal fresco de las plantas que se deseaban analizar (3 réplicas biológicas por cada genotipo). Las muestras se molieron con nitrógeno líquido antes de realizar la cuantificación que se llevó a cabo en el Servicio de Cuantificación de Hormonas del IBMCP. El protocolo utilizado en este análisis incluyó la extracción y purificación de las muestras con 2-3 columnas de extracción en fase sólida (SPE; de fase reversa e intercambio iónico), el uso de estándares internos deuterados (excepto para el caso de JA, que se utilizó dihidrojasmonico) y el análisis mediante UPLC-espectrometría de masas (UPLC acoplada a Q-Exactive, Orbitrap). Las hormonas cuantificadas fueron:

- a) Giberelinas (GA's): incluyendo dos GA's de las rutas biosíntesis de GA1 y GA4.
- b) Hormonas ácidas: incluyendo el ácido jasmónico (JA), el ácido salicílico (SA), el ácido indolacético (IAA) y el ácido abscísico (ABA).
- c) Citoquininas (CK's): Incluyendo la dihidrozeatina (DHZ), la isopenteniladenina (IP) y la trans-zeatina (tZ).

Se ha representado la diferencia relativa de cada hormona analizada del mutante respecto del cv. Moneymaker ((M-WT)/WT) y si existió diferencia significativa mediante el test t entre la media de la concentración del WT y del mutante para cada hormona analizada.

3.4.5. Evaluación del contenido de agua relativo RWC

Para evaluar si algunas de las líneas con fenotipos relacionados con la tolerancia a sequía o salinidad tenían alterados los procesos de transpiración se decidió medir su capacidad de retención del agua. Esto se llevó a cabo mediante la aplicación de la metodología descrita por Fanourakis y colaboradores (2011). La metodología fue la siguiente (Figura 19).

- a) Se cortaron 20 folíolos para cada condición y se mantuvieron durante 1 hora en un medio con el 100% de humedad relativa para conseguir una hidratación máxima. Esto se consiguió dejando los folíolos sobre un papel de filtro humedecido e introduciendo todo ello en bolsas de plástico cerradas.
- b) Se procedió a pesar los folíolos después de este periodo, determinando el peso fresco saturado (SFW).

- c) Inmediatamente después se dejaron los folíolos fuera de la bolsa sobre una gradilla durante 4 horas y se pesaron para determinar el peso fresco (FW).
- d) Por último, se colocaron los folíolos en una estufa a 80°C durante 24 horas para eliminar toda el agua y se pesaron para obtener el peso seco (DW).
- e) Finalmente se calculó el contenido de agua relativo (RWC) mediante la siguiente fórmula:

$$RWC = \frac{FW - DW}{SFW - DW} \times 100$$

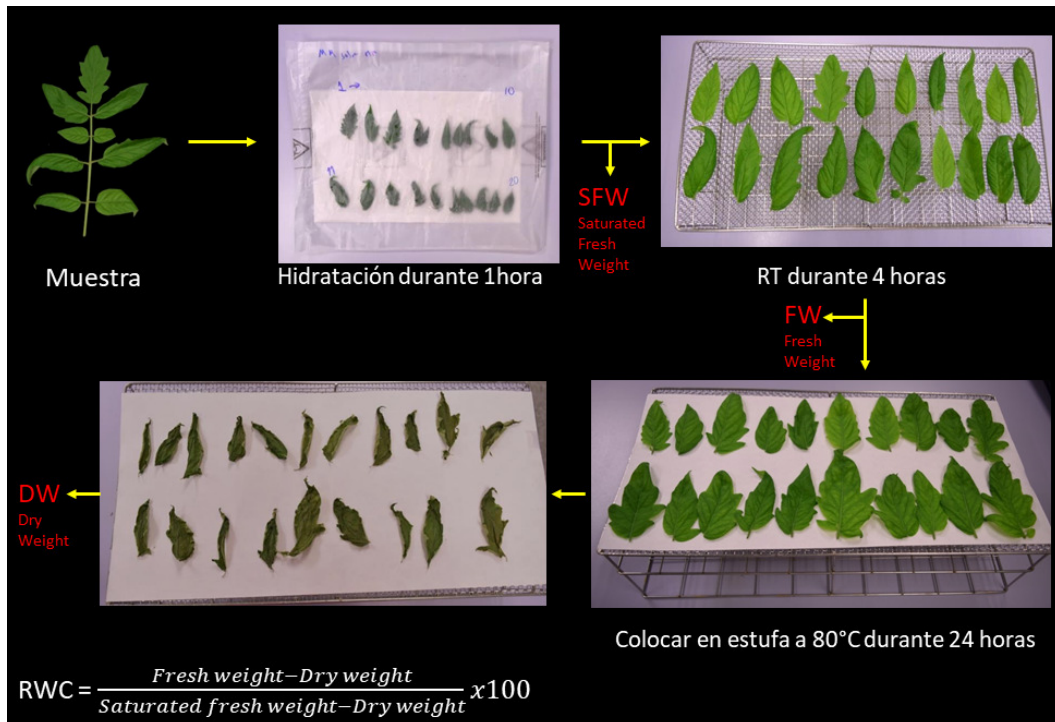


Figura 19. Metodología para calcular el contenido de agua relativo RWC.

3.5. Análisis genético

El análisis genético de los mutantes identificados se llevó a cabo para averiguar cuál era su modo de herencia así como para saber el número de insertos T-DNA que portaban. Además, combinando los resultados de fenotipo y presencia o ausencia de un inserto de T-DNA se pudo averiguar cuál de ellos presentaba cosegregación y, por tanto, podía ser identificado el gen alterado mediante Anchor-PCR.

3.5.1. Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante

Mediante los análisis del fenotipo de las plantas transformadas (TG1) y las segregaciones observadas en sus descendencias (plantas TG2 obtenidas mediante autofecundación de las TG1 o plantas procedentes de retrocruces) se vio qué tipo de mutación se había producido. Como ya se ha comentado, el material vegetal empleado en este trabajo fueron plantas TG2, por tanto, si el modo de herencia de la mutación fuera dominante, la planta TG1 mostraría un fenotipo mutante y en la descendencia TG2 obtenida por autofecundación se esperaría que $\frac{3}{4}$ de los individuos fueran mutantes (homocigotos y hemocigotos) y $\frac{1}{4}$ WT (acigotos). En cambio, si el modo de herencia de la mutación fuera recesivo, la TG1 mostraría el fenotipo WT y en la descendencia se esperaría que $\frac{3}{4}$ tuvieran fenotipo WT (acigotos y hemocigotos) y $\frac{1}{4}$ fenotipo mutante (homocigotos). Con este análisis, además del modo de herencia, se pudo analizar la influencia de la mutación en la viabilidad de las plantas mutantes o, dicho de otro modo, la presencia de mecanismos de subletalidad asociados a la mutación.

Por último, el ajuste de los datos observados a los datos esperados para cada una de las segregaciones posibles se realizó mediante el Test χ^2 aceptando la hipótesis de partida cuando la probabilidad de fallo era menor del 5%. En el caso de realizar varios experimentos donde se analizaba la segregación fenotípica, se llevó a cabo el Test χ^2 de homogeneidad para asegurarnos de que se podían unir todos esos datos y tratarlos como si estuvieran obtenidos en un único experimento.

3.5.2. Análisis del número de insertos de T-DNA

Para saber si en una planta había algún inserto T-DNA el primer paso fue determinar si esa planta era resistente a la kanamicina. De esta forma se detectaban todas aquellas plantas que portaban, al menos, un inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional. En esta Tesis se utilizó principalmente el análisis de la resistencia a la kanamicina como método para estimar el número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional. Para saber si una planta era resistente o sensible a la kanamicina se cultivaron semillas en medio de germinación, yemas axilares en medio de enraizamiento o explantes de cotiledón u hoja en medio organogénico, todos ellos con $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de kanamicina (Figura 20). Tras estos análisis, en el caso de que hubiera un único inserto de T-DNA con el gen *nptII* funcional, la segregación observada en TG2 se ajustaría a $3 \text{ Kan}^{\text{R}} : 1 \text{ Kan}^{\text{S}}$; mientras que si hubieran dos insertos de T-DNA con el gen *nptII* funcional, la TG2 se ajustaría a una segregación de $15 \text{ Kan}^{\text{R}} : 1 \text{ Kan}^{\text{S}}$.

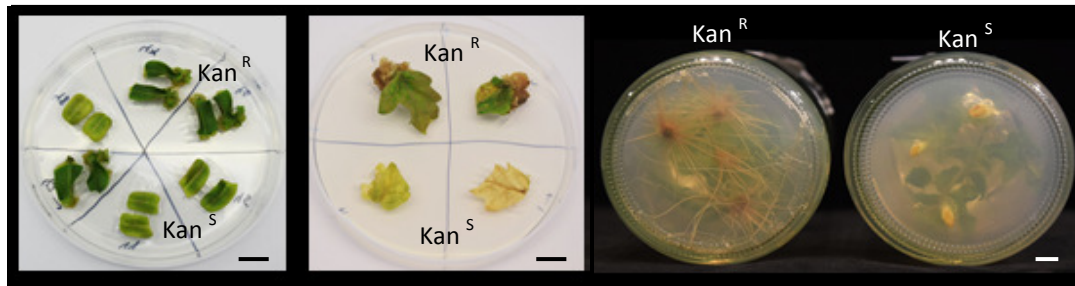


Figura 20. Evaluación de la resistencia a la kanamicina en cotiledones, hojas y yemas axilares (izquierda, centro y derecha respectivamente). La barra representa 1 cm.

El ajuste de los datos observados a los datos esperados se hizo de forma análoga al visto en el análisis del modo de herencia.

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

La determinación de si existía cosegregación de un inserto T-DNA (sea completo o parcial) y el fenotipo mutante fue un aspecto clave en el estudio de estas líneas. Mediante técnicas de cultivo *in vitro* se pudo establecer la cosegregación entre la presencia de un inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional y el fenotipo mutante. Para ello hubo que comparar en plantas de poblaciones segregantes (TG2 y TG3 habitualmente) las segregaciones respecto de su fenotipo y de su resistencia a la kanamicina. En estos experimentos se modelizó la segregación esperada para los casos de cosegregación y de ausencia de cosegregación. Por ejemplo, en un mutante recesivo, si se encontraba una planta mutante (M) sensible a la kanamicina (Kan^S) se podía establecer que no existía cosegregación de un inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional y el fenotipo mutante.

El ajuste de los datos observados a los datos esperados se hizo de forma análoga al visto en el análisis del modo de herencia.

Análisis de cosegregación mediante PCR

Cuando se evalúa la resistencia a la kanamicina mediante cultivo *in vitro*, sólo se podía saber si se había integrado algún inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional. En el caso de los mutantes que presentaban alguna planta de fenotipo mutante sensible a la kanamicina (el fenotipo mutante no estaba causado por la inserción de un T-DNA con el gen *nptII* funcional), se comprobaba si la mutación estaba causada por la inserción de un fragmento parcial del T-DNA o del cuerpo del vector (el mutante sería sensible a la kanamicina pero el gen afectado podría estar etiquetado por un fragmento de ADN de secuencia conocida). La alternativa para evaluar la presencia de estas secuencias fue realizar varias reacciones de PCR diseñando diferentes parejas de cebadores para amplificar fragmentos del T-DNA o diferentes regiones del cuerpo del vector del plásmido pD991 (Figura 21). Las condiciones de la PCR utilizadas fueron: desnaturalización inicial de 5 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 60°C y 1 min a 72°C, terminando con una extensión final de 5 min a 72°C. Las reacciones de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa, teñidas con BrEt al 1% y se visualizaron con luz U.V.

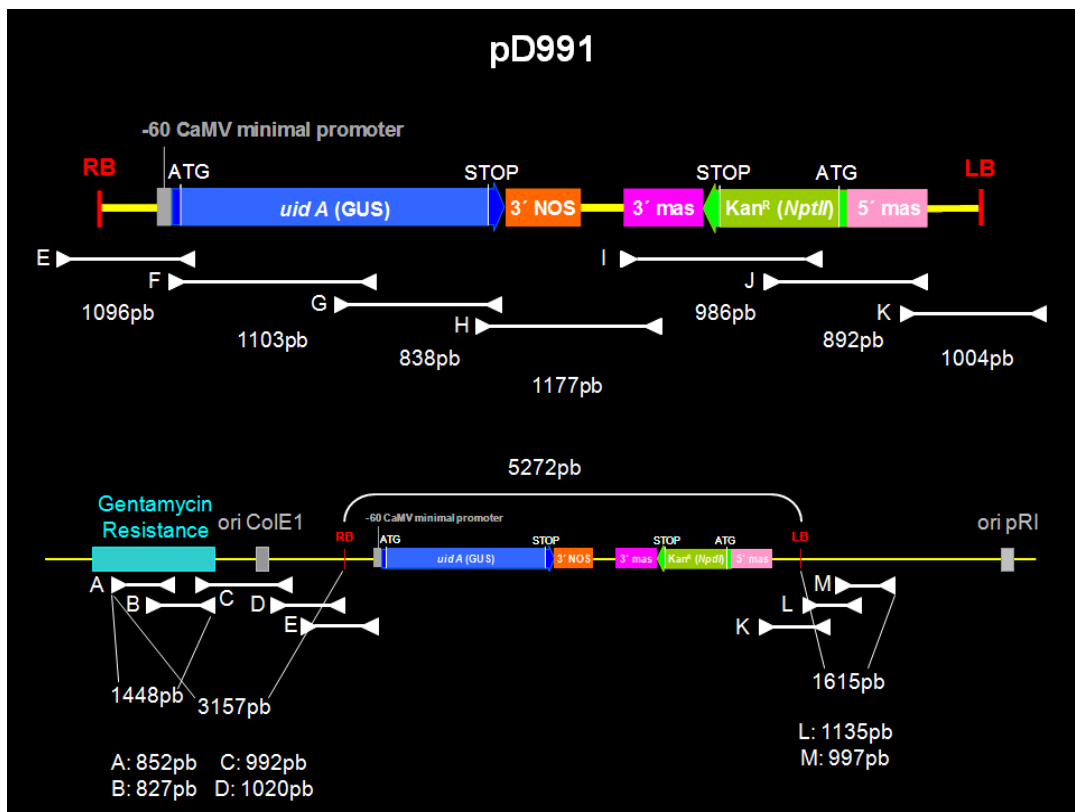


Figura 21. Representación esquemática de los cebadores empleados para rastrear la presencia de fragmentos de T-DNA y del cuerpo del vector en plantas mutantes (arriba y abajo respectivamente).

3.6. Evaluación de la expresión del gen delator

En los genotipos en los que se estableció la existencia de cosegregación entre el inserto T-DNA se utilizó la estrategia Anchor-PCR (Schupp *et al.*, 1999), con la que se pudo determinar las secuencias flanqueantes a ambos extremos del T-DNA (Gidoni *et al.*, 2003). Además, se llevó a cabo el análisis histoquímico X-GLUC para detectar la expresión del gen delator *uidA*. Tras recoger las muestras, se les añadía X-GLUC (Tabla 7) en cantidad suficiente para que las cubriera. Estas muestras se dejaron durante 24 horas incubando en oscuridad, a 37°C para que tuviera lugar la reacción histoquímica.

Tabla 7. Composición del X-GLUC

Componente	Concentración
X-GLUC (Disolver en DMSO 1%)	1.0 mM
Tampón Na₂HPO₄	100 mM
Tampón NaH₂PO₄	100 mM
EDTA	10 mM
K-Ferricyanide (FeIII)	0.5 mM
K-Ferricyanide (FeII)	0.5 mM
Triton X-100	0.1%
Agua destilada	Hasta volumen final

Tras la incubación, se eliminó la solución X-GLUC y se realizaron varios lavados con etanol 70% para eliminar la clorofila de los tejidos y poder detectar mejor la tinción azul que producía la expresión del gen *uidA*. Las fotografías de estas muestras se tomaron con la ayuda de una lupa (MZFLIII; Leica).

RESULTADOS

4.1. Identificación y caracterización de mutantes alterados en su nivel de tolerancia a estrés hídrico o salino

En nuestro grupo hemos generado una amplia colección de líneas T-DNA de tomate y de especies silvestres relacionadas (*Solanum pennellii*, *Solanum pimpinellifolium* y *Solanum galapagense*). A partir de las más de 7500 plantas transgénicas diploides obtenidas se han realizado diversos escrutinios para identificar líneas mutantes. Este trabajo se ha realizado mediante la evaluación de las propias plantas transgénicas (TG1), a fin de detectar mutaciones dominantes, o mediante el escrutinio de un número suficiente de semillas TG2, para identificar mutaciones de naturaleza recesiva. Gracias al esfuerzo realizado, tanto en nuestro grupo como en los grupos con los que colaboramos en esta línea de investigación, el del Dr. Rafael Lozano (Universidad de Almería) y el de la Dra. M^a Carmen Bolarín (CEBAS, Murcia), se han identificado más de 570 líneas T-DNA que presentan alguna alteración en caracteres del desarrollo vegetativo, del desarrollo reproductivo y/o de la tolerancia a estreses abióticos.

En este trabajo nos hemos centrado en la identificación y caracterización de mutantes afectados de forma específica en su tolerancia al estrés salino o hídrico, así como en la identificación y caracterización de mutantes del desarrollo cuyas alteraciones pueden estar relacionadas con el crecimiento de una planta en condiciones de estrés.

En trabajos previos del grupo se habían realizado diversos escrutinios para identificar mutantes afectados en su nivel de tolerancia a la salinidad. El método que ofreció mejores resultados fue el cultivo *in vitro* de semillas TG2 en medio de germinación con NaCl. Este sistema nos ha dado muy buenos resultados, ya que proporciona unas condiciones controladas que permiten identificar los cambios fenotípicos asociados a un cambio en el nivel de tolerancia a la salinidad. De hecho, en esta tesis se han evaluado 175 líneas T-DNA de tomate y 202 líneas T-DNA de *S. galapagense* con este método, lo que ha permitido identificar algunos de los mutantes que se describen más adelante.

Sin embargo, al empezar este trabajo, no disponíamos de un método para evaluar la tolerancia al estrés hídrico. Ciertamente, en la bibliografía se pueden encontrar diferentes métodos, pero, en nuestra opinión, algunos de ellos ofrecen resultados un tanto cuestionables. Por tanto, la primera tarea fue encontrar un método que pudiera estimar adecuadamente el nivel de tolerancia al estrés hídrico en plantas de tomate.

En primer lugar, ensayamos un método basado en la adición de polietilenglicol (PEG) al medio de cultivo, ya que se ha descrito que el PEG secuestra o limita la

disponibilidad de agua por parte de las células vegetales. Sin embargo, tras cultivar plántulas de tomate y de varias especies silvestres relacionadas en medio de germinación con nueve concentraciones de PEG, descartamos este método porque los resultados no eran representativos del nivel de tolerancia real. En efecto, a diferencia de lo que ocurre con el tomate, algunas de las especies silvestres exhiben un elevado nivel de tolerancia a la sequía, hasta el punto de que algunas accesiones son capaces de medrar en ambientes de tipo semidesértico, o incluso tan extremos como el desierto de Atacama. Pese a ello, los ensayos *in vitro* o con PEG no permitían discriminar entre la tolerancia al estrés hídrico del tomate y de algunas de estas accesiones. Es posible que ello se deba a que en cultivo *in vitro* la humedad dentro del recipiente es cercana al cien por cien. Por ello, pensamos que la evaluación *in vivo* podría ser más adecuada para evaluar la tolerancia a este tipo de estrés.

Se realizaron una serie de ensayos para ver cuál podría ser el más adecuado para identificar mutantes hipersensibles o más tolerantes al estrés hídrico. En todos los casos intentamos que las condiciones afectaran claramente a la planta pero que, al mismo tiempo, no condujeran a un colapso a corto plazo. Tras evaluar la adición de PEG a la solución nutritiva, la eliminación total del riego, la reducción del caudal de riego y tres ciclos de ausencia de riego durante diez días y restauración del riego tras cada ciclo, se llegó a la conclusión de que este último método era el que producía los mejores resultados.

Las principales ventajas eran que las plantas WT se recuperaban tras los diez días de ausencia de riego, aunque los síntomas de deshidratación eran evidentes al final de cada ciclo, y que el fenotipo se puede ir corroborando en los tres ciclos de sequía. Por tanto, éste fue el método empleado para el escrutinio de 83 líneas T-DNA. A continuación se muestran los resultados más destacados de esta evaluación, que condujo a la identificación y caracterización de los mutantes 1389 ET MM y 2149 ET MM. Además, también se presentan los resultados de la caracterización de tres mutantes identificados previamente en nuestro grupo por su mayor sensibilidad al estrés salino: las líneas 1560 ET MM, 698 ET MM y 916 ET MM.

Mutante 1389 ET MM

Este mutante fue el primero que detectamos en el escrutinio de tolerancia a estrés hídrico. A partir del cultivo de plantas procedentes de semillas TG2 en el invernadero y la aplicación de un régimen de tres ciclos de riego de diez días cada uno, se identificó este mutante por su mayor sensibilidad al tratamiento estresante que las plantas WT. El carácter más evidente fue la pérdida de turgencia en las hojas en la parte final de cada ciclo de riego (Figura 22).



Figura 22. Fenotipo de plantas de la línea 1389 ET MM sometidas a un ciclo de tratamiento de estrés hídrico. La barra representa 5 cm.

Tras la identificación de las presuntas plantas mutantes en el primer ciclo de ausencia de riego, el fenotipo se confirmó en los otros dos ciclos de estrés en los que las mismas plantas mostraron mayor sensibilidad al estrés hídrico (Figura 23).

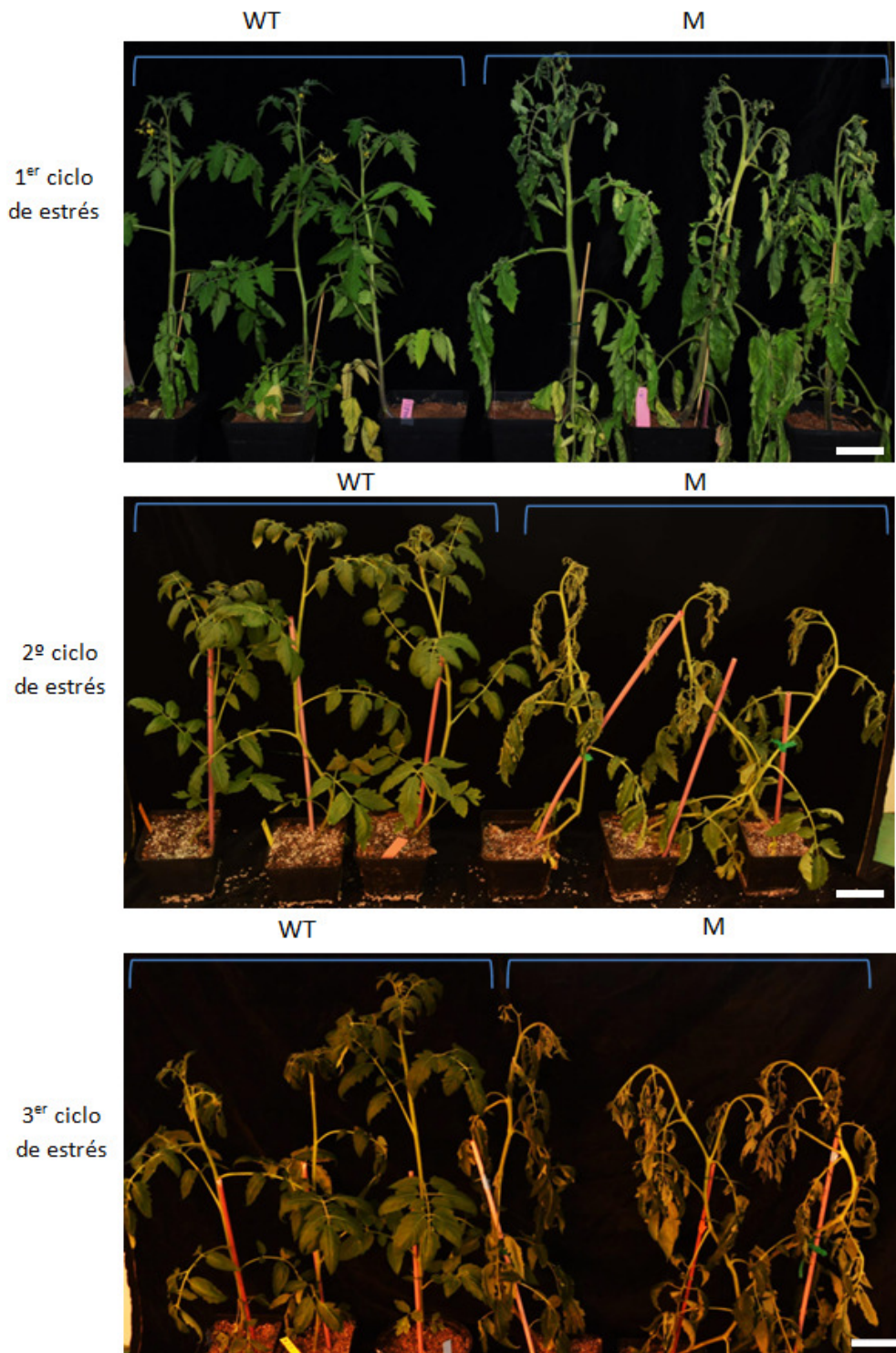


Figura 23. Fenotipo al final de cada ciclo de riego de plantas de la línea 1389 ET MM cultivadas en el invernadero. La barra representa 5 cm.

Pese a las diferencias en el grado de marchitamiento de las hojas al final de cada ciclo de estrés, tanto las plantas WT como las mutantes se recuperaban tras el riego de recuperación que se aplicaba a los 10, 20 y 30 días (Figura 24).



Figura 24. Fenotipo de plantas de la línea 1389 ET MM un día después del riego de recuperación tras un tratamiento de estrés hídrico. La barra representa 5 cm.

Se calculó el contenido de agua relativo (RWC) en hojas procedentes de plantas WT y mutantes para evaluar la capacidad de retención de agua en las hojas (Figura 25).

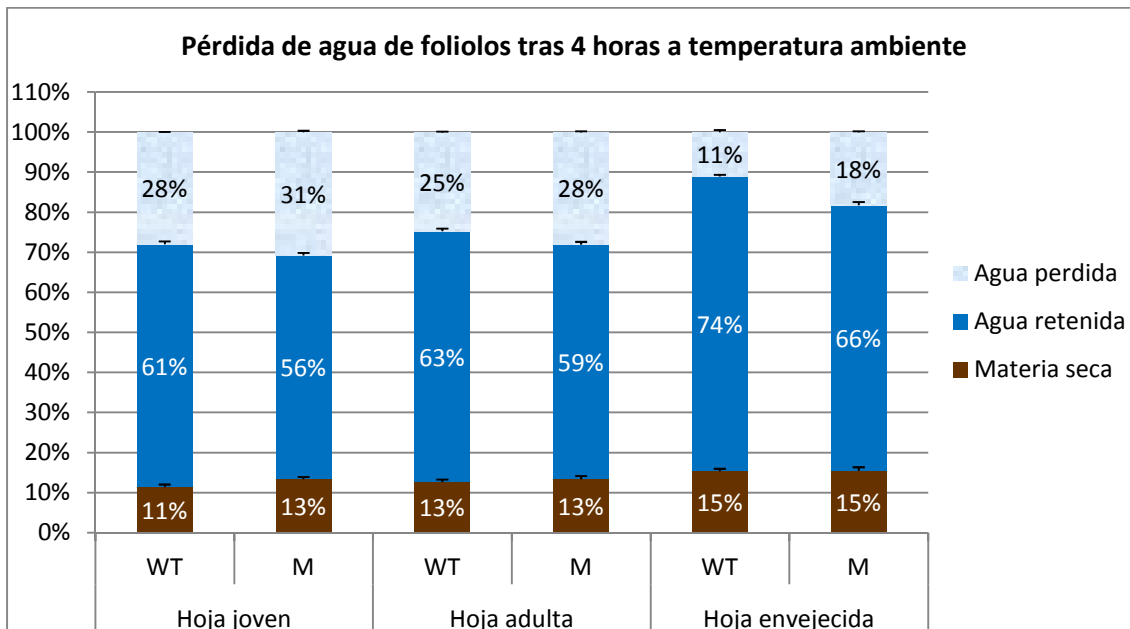


Figura 25. Pérdida de agua de folíolos de hojas en distinto estado ontológico procedentes de plantas adultas tras 4 horas a temperatura ambiente de la línea 1389 ET MM.

Al realizar este experimento en diversos momentos del desarrollo de la hoja se ha comprobado que en todas las etapas ontogénicas existe una ligera mayor pérdida de agua en las plantas mutantes. Además, conviene resaltar que esta diferencia entre las plantas WT y mutantes se incrementaba conforme aumentaba la edad de las hojas evaluadas.

Se obtuvo progenie de las plantas mutantes y se evaluó el comportamiento de esta línea bajo condiciones de estrés salino en invernadero regando plantas de 25 días con solución nutritiva a la que se le añadió 100 mM de NaCl. No se observaron diferencias entre el comportamiento de las plantas WT y mutantes (Figura 26).

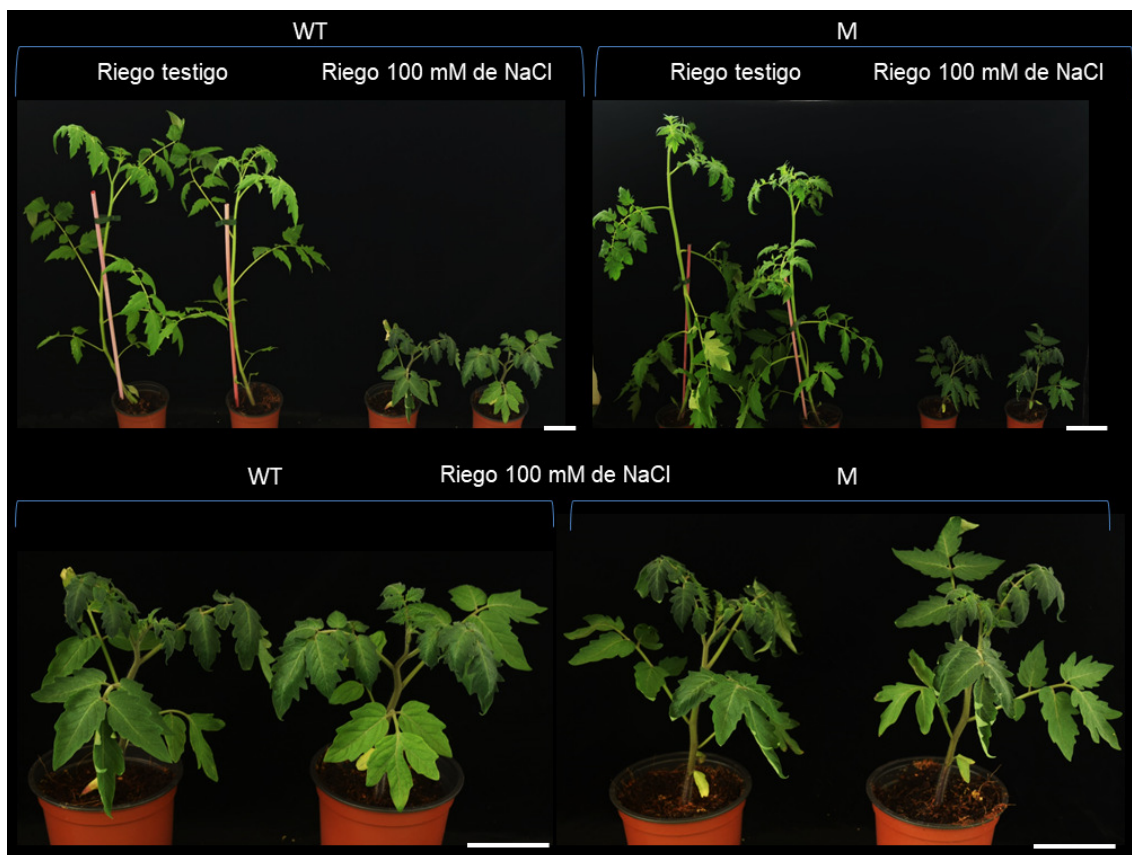


Figura 26. Fenotipo de la línea 1389 ET MM después de 30 días de riego con solución salina (100 mM de NaCl). La barra representa 5 cm.

En función de los resultados obtenidos en estos experimentos podemos afirmar que esta línea presenta una mutación que disminuye de forma significativa la tolerancia al estrés hídrico, aunque el gen alterado no tiene un papel relevante en la tolerancia al estrés salino.

Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante

Se evaluaron 42 individuos de la línea 1389 ET MM, observando una segregación de 31 plantas WT y 11 mutantes. El análisis χ^2 de datos acumulados indicó que el fenotipo estaba causado por una mutación monogénica recesiva (Tabla 8).

Tabla 8. Análisis del modo de herencia del mutante 1389 ET MM.

	Segregación	WT	M	Total	χ^2
Experimento 1	Observada	16	5	21	0.02
	Esperada (3:1)	15.7	5.3		
Experimento 2	Observada	15	6	21	0.14
	Esperada (3:1)	15.7	5.3		
Datos acumulados ^a	Observada	31	11	42	0.03
	Esperada (3:1)	31.5	10.5		

^a El análisis χ^2 de homogeneidad ($\chi^2_H = 0.13$) indica que las muestras son homogéneas ($P > 0.05$; $\chi^2_{1 g.l.} = 3.84$)

Análisis genético del número de insertos T-DNA

Al haber observado que el fenotipo no se detecta *in vitro*, sino en plantas cultivadas en el invernadero, para llevar a cabo el análisis del número de insertos en medio con kanamicina se esterilizaron segmentos nodales de cinco plantas de fenotipo mutante y siete de fenotipo WT para poder evaluarlas en condiciones axénicas. En estos doce individuos se observaron 8 plantas Kan^R y 4 Kan^S. Aunque fueron pocos los individuos evaluados, los resultados sugieren que la línea 1389 ET MM porta un único inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional (Tabla 9).

Tabla 9. Análisis del número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional de la línea 1389 ET MM.

	Segregación	Kan ^R	Kan ^S	Total	χ^2
Experimento 1	Observada	8	4	12	0.44
	Esperada (3:1)	9.0	3.0		

^a Análisis χ^2 ($P > 0.05$; $\chi^2_{1 g.l.} = 3.84$)

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

De las cuatro plantas sensibles a la kanamicina, dos tenían fenotipo mutante. Por tanto, se comprobó que no existe cosegregación entre el inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional y el fenotipo mutante en la línea 1389 ET MM (Tabla 10).

Tabla 10. Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 1389 ET MM.

	WT		M		Total
	Kan ^R	Kan ^S	Kan ^R	Kan ^S	
Experimento 1	5	2	3	2	12

Después de comprobar la ausencia de cosegregación, realizamos cruces entre plantas mutantes sensibles a la kanamicina y plantas de *Solanum pimpinellifolium*. Se obtuvo la F2 correspondiente de ese cruce y se identificaron en esta población plantas con el fenotipo mutante y WT (Figura 27). En este momento, disponemos del material necesario para la identificación del gen mediante mapeo por secuenciación.

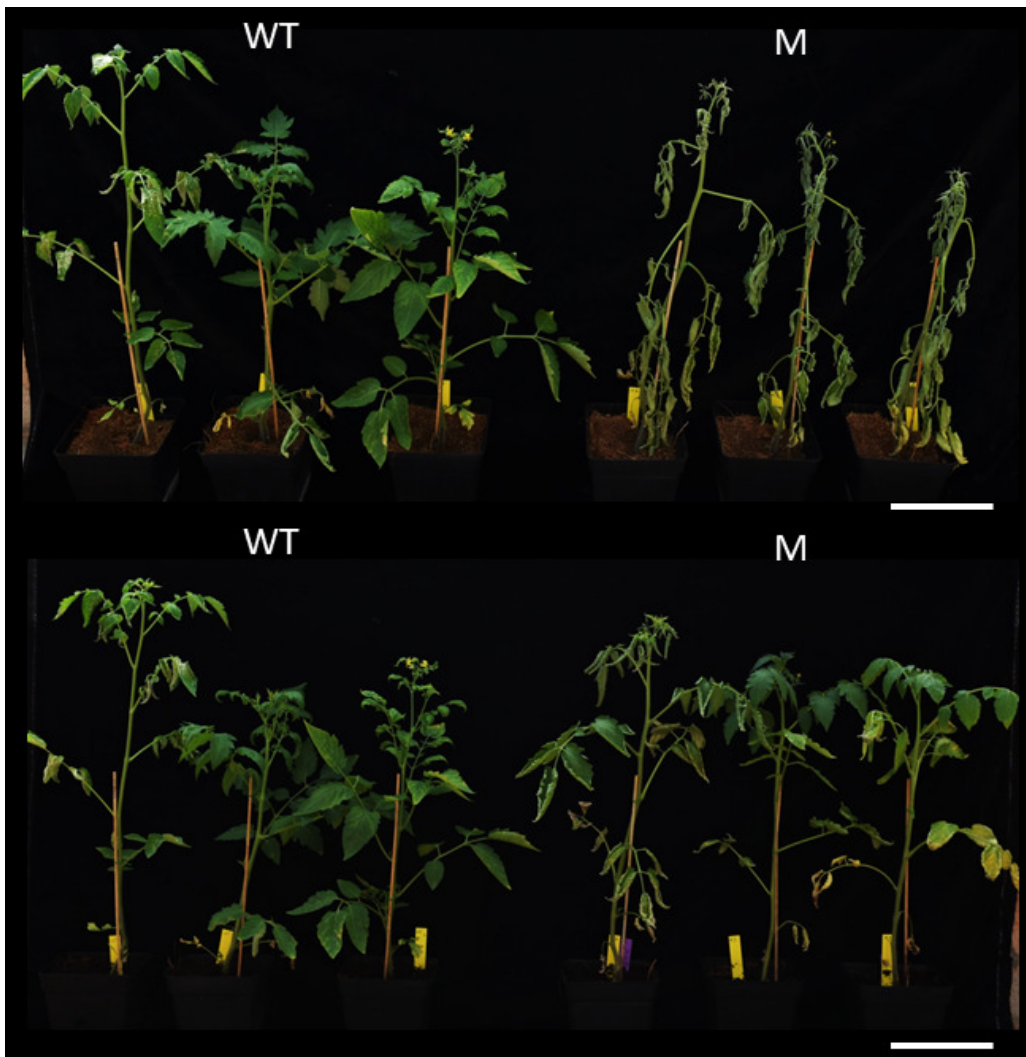


Figura 27. Fenotipo de plantas F2 procedentes del cruce de la línea 1389 ET MM con *Solanum pimpinellifolium* tras el primer ciclo de estrés hídrico y un día después del riego de recuperación (arriba y abajo respectivamente). La barra representa 10 cm.

Mutante 2149 ET MM

Se evaluaron en condiciones axénicas plántulas procedentes de semillas TG2. Durante los primeros siete días de cultivo en medio de germinación no se observó ningún fenotipo, pero tras el cultivo del ápice meristemático en medio base se identificaron algunas plantas con el fenotipo alterado. En concreto, a los 15 días de cultivo, aparecieron plantas con las hojas cloróticas y con una menor ramificación de los haces vasculares del limbo foliar (Figura 28).

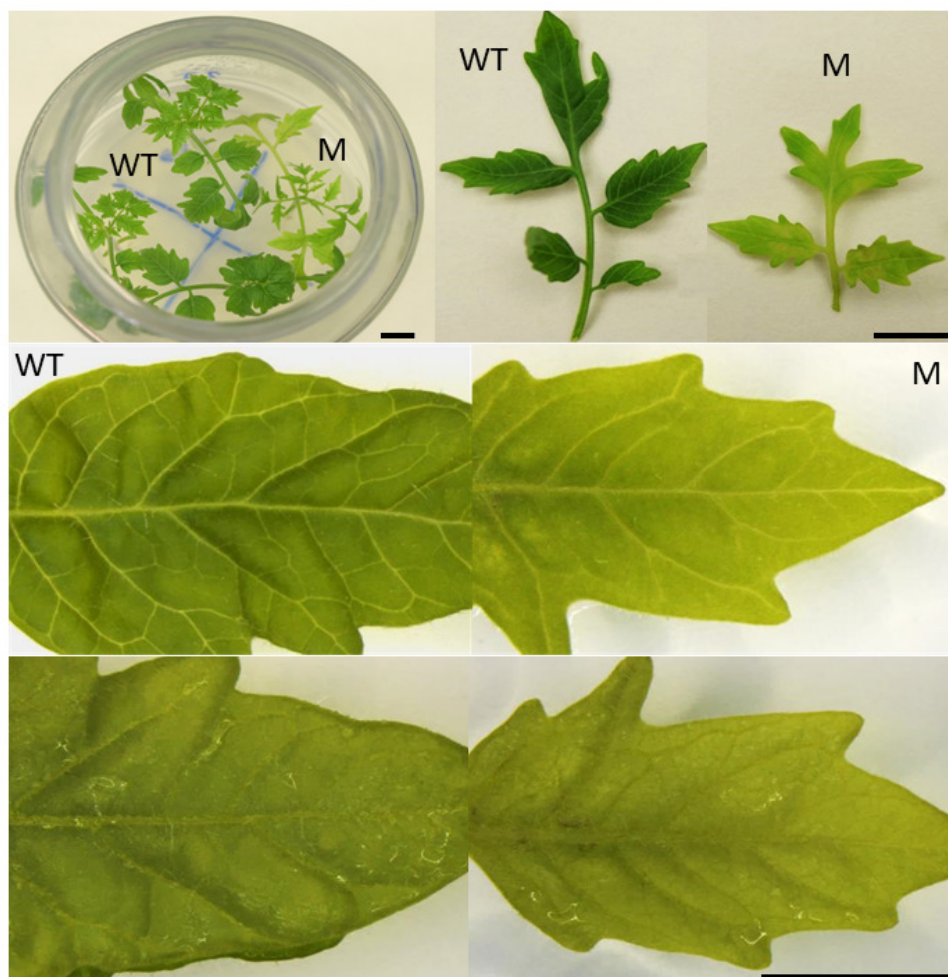


Figura 28. Fenotipo de plantas axénicas de la línea 2149 ET MM tras 15 días de cultivo en medio base. Haz (centro) y envés (abajo) de limbo de foliolo. La barra representa 1 cm.

El sistema radicular adventicio era diferente con respecto al WT y, además, las plantas mutantes tenían raíces primarias de menor longitud y mayor grosor (Figura 29).

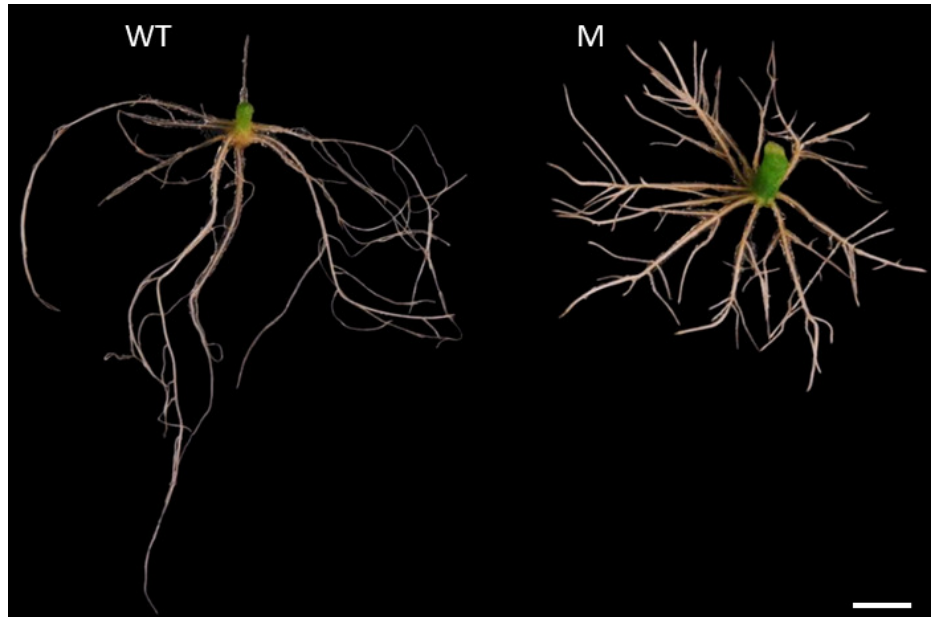


Figura 29. Fenotipo del sistema radicular adventicio en plantas axénicas de la línea 2149 ET MM después de 15 días de cultivo en medio básico. La barra representa 1 cm.

Una vez identificado el fenotipo en condiciones *in vitro*, se evaluó esta línea en el invernadero. Se cultivaron semillas TG2 y se observó que las hojas de las plantas mutantes tenían un color verde pálido, similar a lo que ocurría *in vitro*. En cuanto al sistema radicular, el crecimiento fue similar al WT (Figura 30).

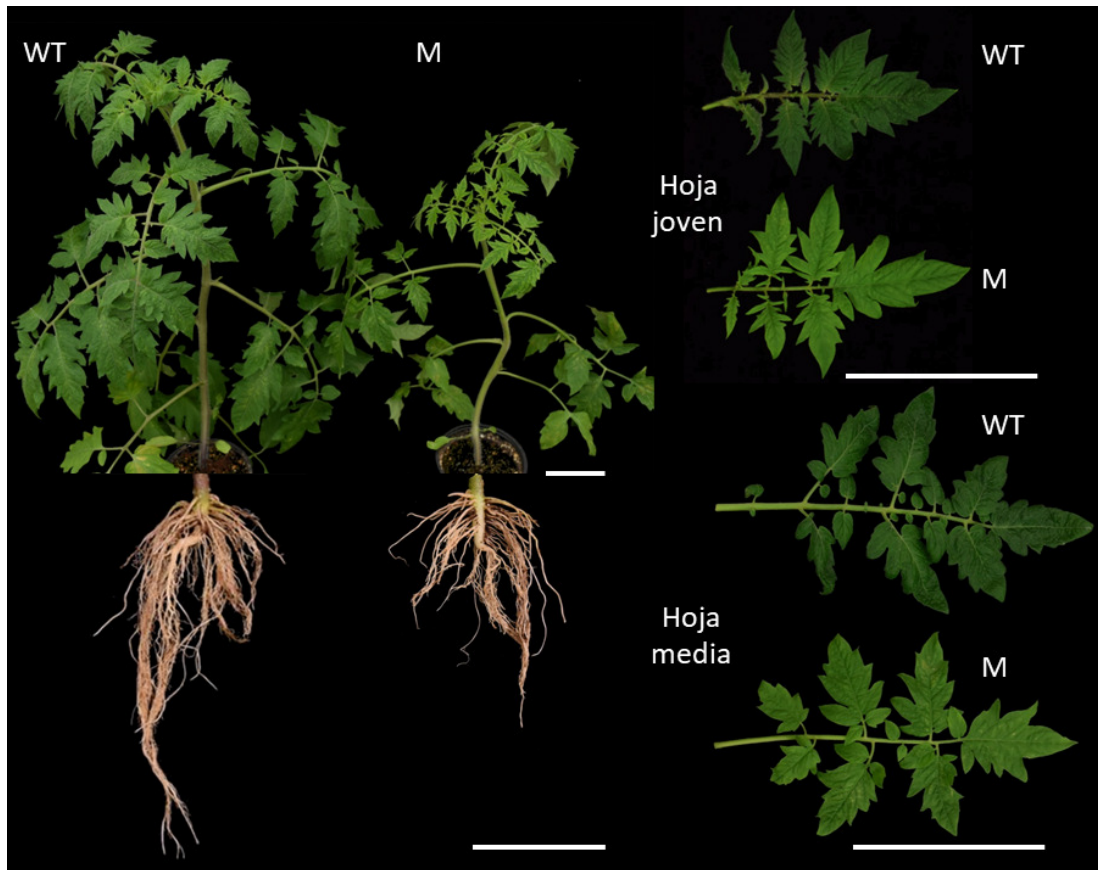


Figura 30. Fenotipo de plantas y de hojas de la línea 2149 ET MM cultivadas en el invernadero durante 40 días. La barra representa 5 cm.

Las plantas mutantes cultivadas en el invernadero continuaron su desarrollo produciendo flores y frutos. En etapa de capullo floral y preantesis no se observaron diferencias respecto a las flores de plantas WT. Sin embargo, en anthesis se vio que las flores tenían los pétalos algo más estrechos. Los frutos que cuajaron y llegaron a la madurez eran de tamaño muy inferior al WT y sin semillas (Figura 31).



Figura 31. Fenotipo de plantas, flores y frutos de la línea 2149 ET MM tras 90 días de cultivo en el invernadero. La barra representa 5 cm.

Conforme el tiempo pasaba se observó cómo las hojas de las plantas mutantes, además de su color verde claro, mostraban un cierto enrollamiento o curvatura del limbo foliar (Figura 32).



Figura 32. Fenotipo de hojas de planta adulta de la línea 2149 ET MM. La barra representa 5 cm.

Al observar las características de las hojas se decidió evaluar la capacidad de retención de agua, calculando el contenido de agua relativo (RWC) con el método descrito en Material y Métodos. En el primer ensayo, tras analizar 30 folíolos de cada tipo, se observó que el mutante tenía una mayor capacidad de retención del agua. En efecto, mientras que las hojas del mutante sólo perdían un 18% de su peso total, las hojas WT perdían el 33%. Debido a lo sorprendente del resultado, este experimento se repitió por segunda vez, obteniendo datos consistentes con los anteriores (20% de agua perdida en el mutante y 32 % en el WT) (Figura 33).

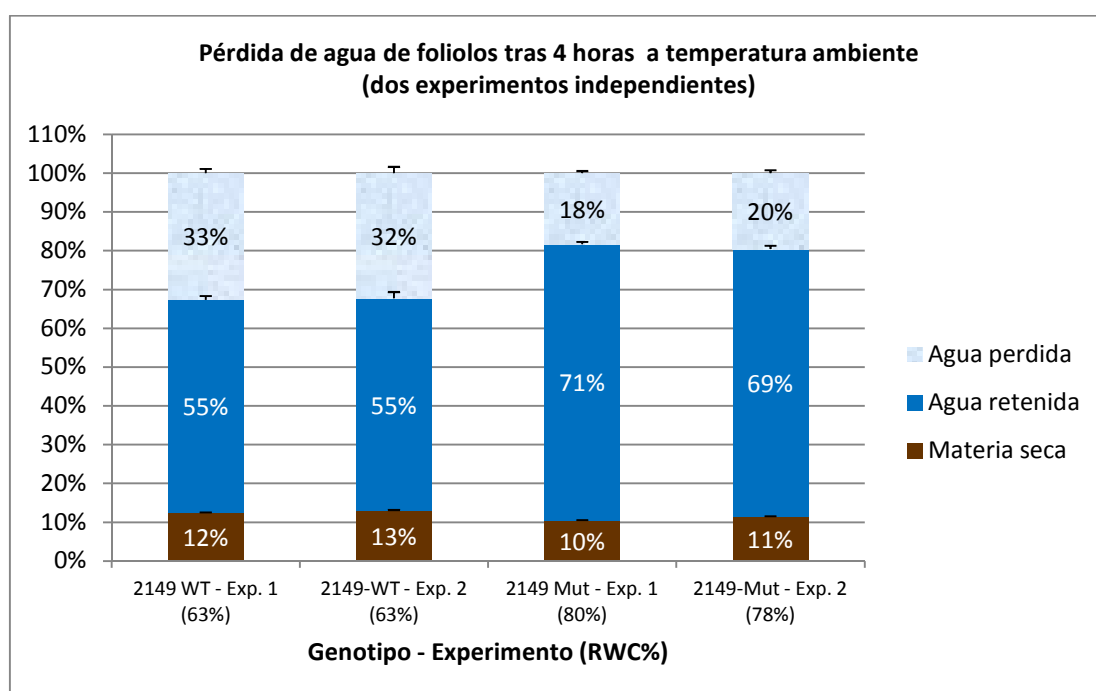


Figura 33. Pérdida de agua de folíolos cortados de plantas de tres meses no sometidas a estrés de la línea 2149 ET MM tras 4 horas a temperatura ambiente. Se muestran los resultados de dos experimentos independientes. La barra representa la desviación estándar.

Como en los dos experimentos realizados se vio que el mutante presentaba una mayor capacidad de retención de agua, se decidió evaluar la tolerancia al estrés hídrico de esta línea. Para ello se cultivaron plantas en el invernadero y, una vez que tenían tres hojas verdaderas, se inició el tratamiento estresante sometiendo a las plantas a tres ciclos consecutivos de diez días de ausencia de riego. El resultado obtenido fue que las plantas mutantes mostraban una mayor tolerancia al estrés hídrico que las WT (Figura 34).

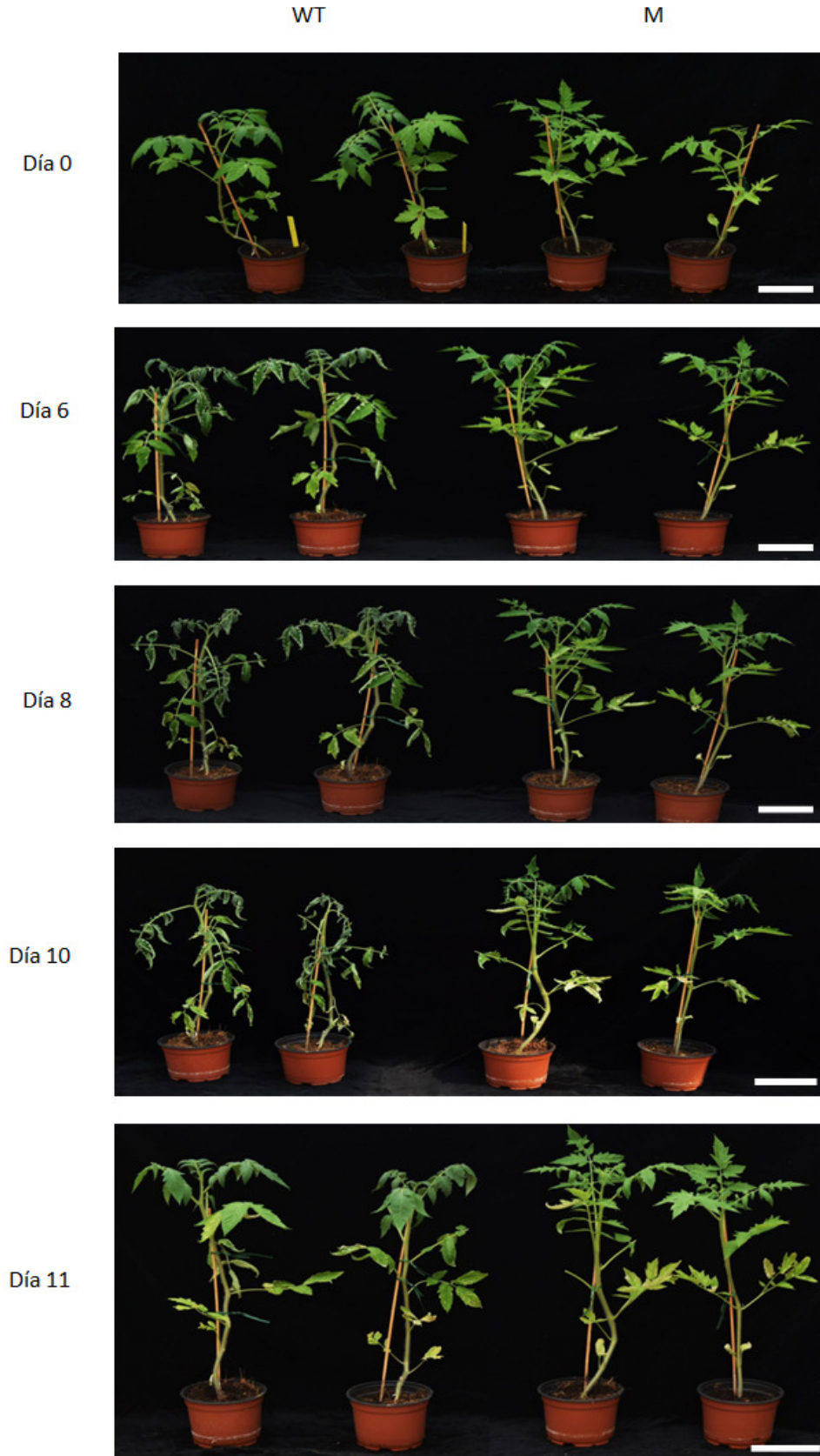


Figura 34. Fenotipo de plantas de la línea 2149 ET MM en diferentes momentos de la evaluación de tolerancia al estrés hídrico mediante interrupción de riego (10 días) y recuperación (riego el día 11). La barra representa 10 cm.

Durante el experimento de tolerancia al estrés hídrico se utilizaron algunas hojas para calcular el contenido de agua (FW-DW/FW) cuando las plantas son sometidas a estrés. Los resultados indicaron que, aunque al inicio del ciclo de sequía el mutante y el WT tenían un contenido de agua similar (cerca del 87%), el contenido de agua de las plantas mutantes estuvo siempre por encima del 85% durante el primer ciclo de deshidratación, mientras que el de las plantas WT fue menor del 80% al final del ciclo. Tras el riego del día 10, tanto las plantas WT como las mutantes se recuperaron hasta alcanzar valores cercanos al inicio del tratamiento estresante (Figura 35).

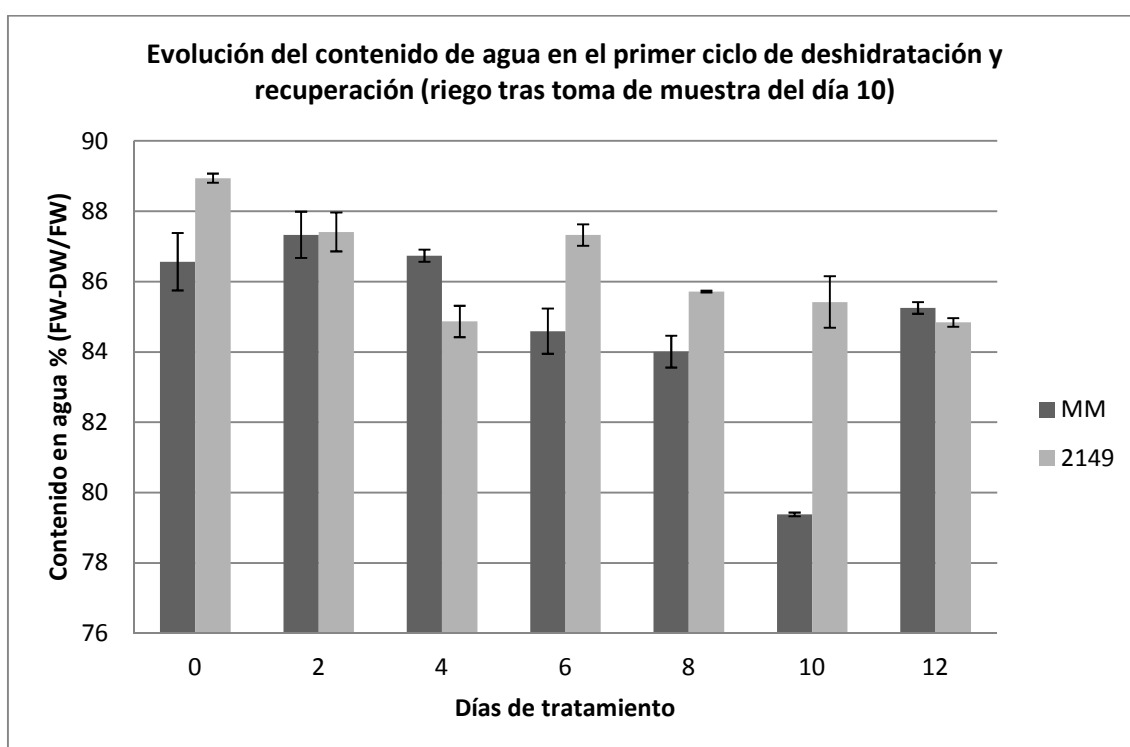


Figura 35. Evolución del contenido en agua en el primer ciclo de deshidratación y recuperación de la línea 2149 ET MM. La barra representa la desviación estándar.

Para intentar profundizar en la posible causa de la mayor tolerancia al estrés hídrico se analizó la densidad de estomas y tricomas en el haz y el envés del limbo de hojas de plantas mutantes y WT cultivadas en el invernadero. No se observaron diferencias significativas en la densidad de estomas en el haz y el envés de hojas del mutante respecto al WT (datos no mostrados). En cambio, se observó que las hojas de las plantas mutantes tenían menor cantidad de tricomas globulares (tipo VI) respecto al WT (Figura 36).

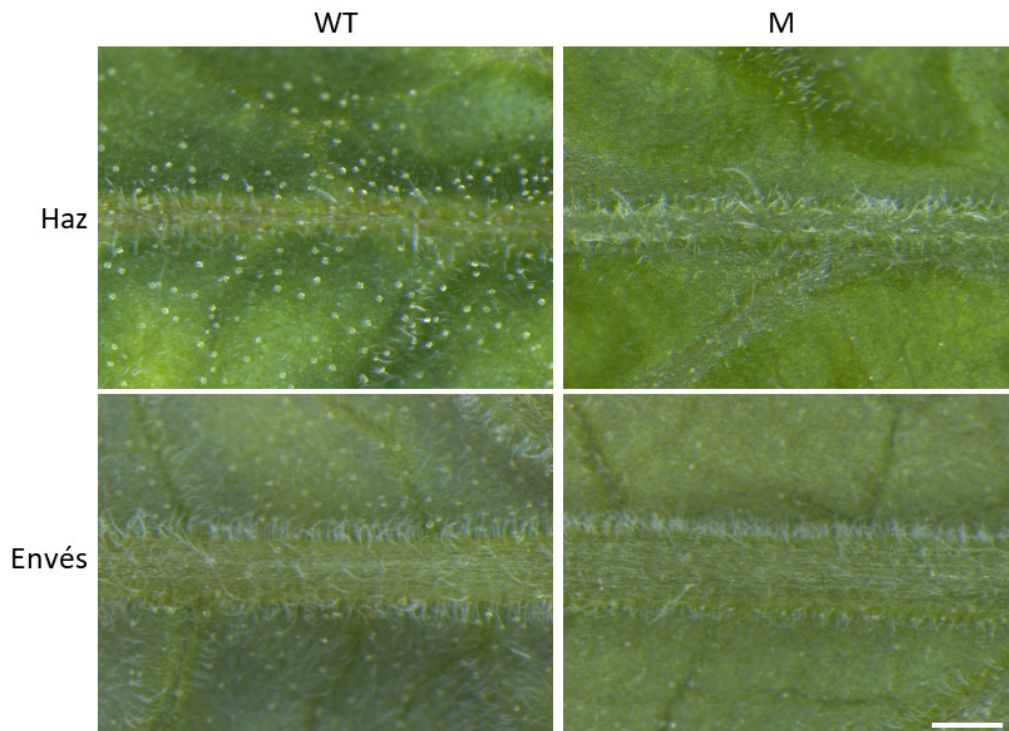


Figura 36. Fenotipo de haz y envés de hoja joven de la línea 2149 ET MM. La barra representa 1 mm.

También se realizaron cortes histológicos de diferentes partes de las plantas, como tallo, peciolo o limbo (Figura 37), no llegando a detectarse cambios apreciables con respecto a las plantas WT.

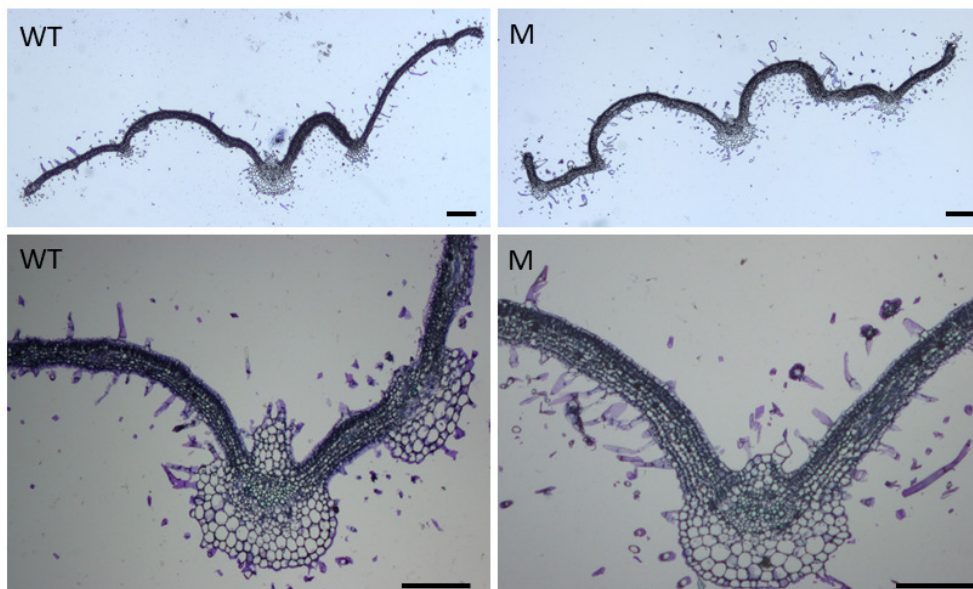


Figura 37. Cortes histológicos de limbos de hojas de plantas de la línea 2149 ET MM no sometidas a estrés. La barra representa 200 μ m.

Debido a los datos anteriores se consideró conveniente realizar el experimento de injertos. Para ello, se cultivaron plantas en el invernadero y se realizaron los injertos recíprocos: $\frac{WT}{M}$ y $\frac{M}{WT}$ (Figura 38).

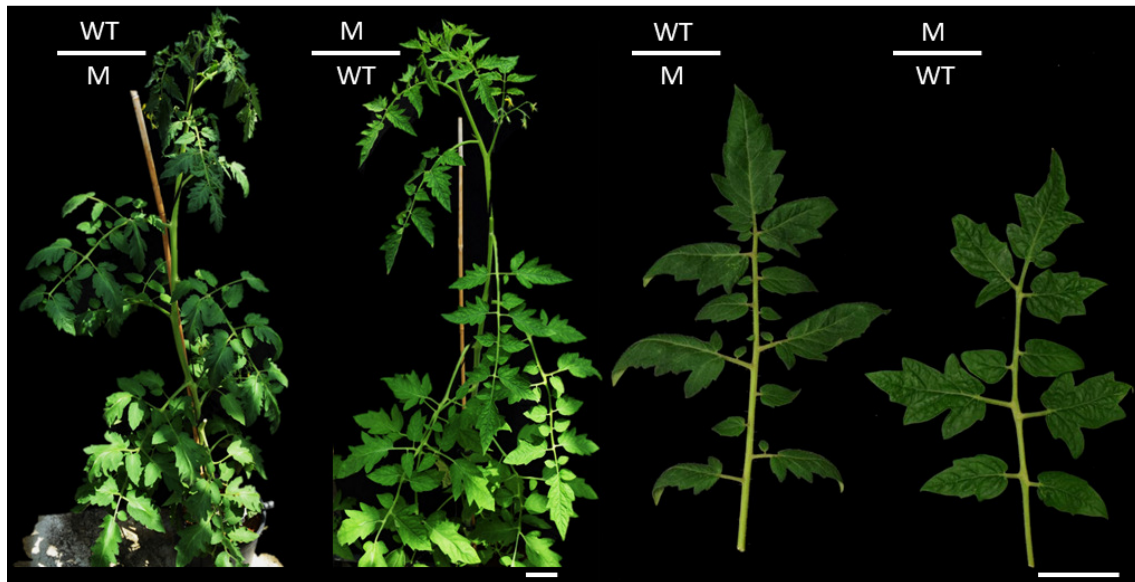


Figura 38. Fenotipo de las plantas injertadas de la línea 2149 ET MM (izquierda) y de las hojas de dichas plantas (derecha) después de 70 días de cultivo en el invernadero. La barra representa 5 cm.

Después de 70 días de cultivo en el invernadero se observó que la parte aérea del mutante sobre patrón WT era similar al de una planta mutante no injertada, mientras que el injerto recíproco presentó un aspecto igual al de las plantas WT no injertadas. Por tanto, en este mutante no parece que el sistema radicular intervenga en el fenotipo alterado.

Por último, se realizó un experimento *in vivo* para evaluar el nivel de tolerancia al estrés salino de este mutante. Para ello se regaron durante 30 días plantas WT y mutantes con solución de fertirrigación a la que se le añadió NaCl 150 mM. Se observó que no había diferencias significativas en la disminución de la altura de las plantas WT y mutantes, pero, tras 30 días de tratamiento salino, la disminución de la masa foliar de las plantas WT era muy superior a la observada en los mutantes. Es decir, los resultados apuntan hacia una mayor tolerancia del mutante al estrés salino (Figura 39).

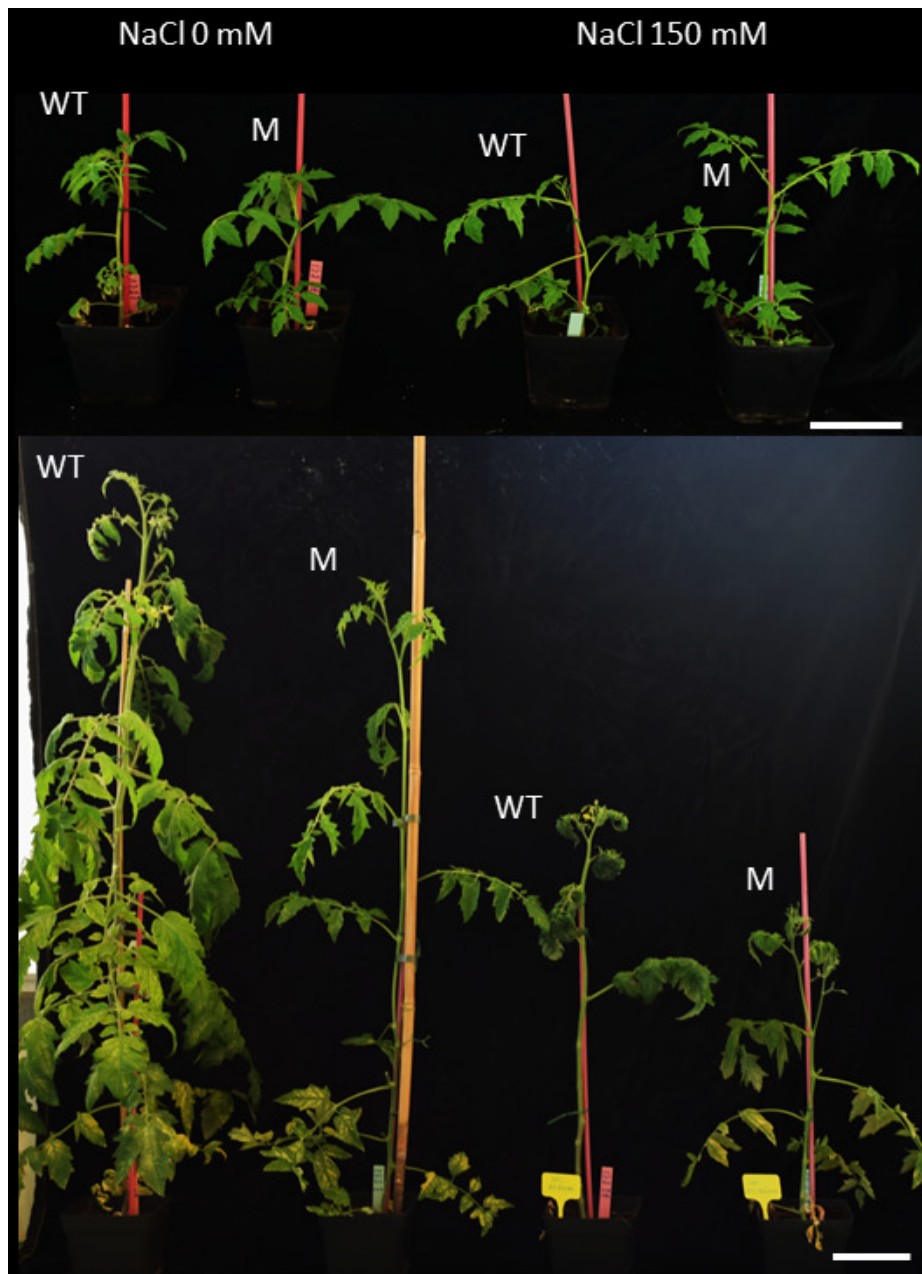


Figura 39. Evaluación de tolerancia a estrés salino mediante cultivo en el invernadero de plantas de la línea 2149 ET MM. En la parte superior se aprecia el fenotipo de las plantas al inicio del experimento y en la parte inferior tras 30 días de tratamiento estresante. La barra representa 10 cm.

En conclusión, este mutante presenta características muy interesantes, ya que es capaz de retener el agua de las hojas con mayor eficacia que el WT, lo cual parece conferirle una mayor tolerancia al estrés hídrico. En función de los resultados obtenidos en un experimento a corto plazo (30 días), es posible que el mutante tenga una mayor tolerancia al estrés salino, aunque esto habría que corroborarlo en posteriores experimentos a largo plazo.

Por lo que respecta a caracteres del desarrollo, las hojas exhiben un cierto grado de clorosis, tienen menor número de tricomas tipo VI, y, en las plantas adultas, el limbo se curva hacia la cara abaxial. Las flores no parecen tener ninguna alteración, excepto en el estado de antesis, en el que los pétalos son más estrechos. Los frutos son mucho más pequeños y partenocárpicos. Puesto que no se ha detectado cuajado temprano en las etapas de capullo floral o preantesis, lo más probable es que la ausencia de semillas en los frutos se deba a infertilidad del polen. Por último, conviene resaltar que los experimentos de injerto indican que la raíz del mutante no juega un papel clave en las alteraciones observadas en la parte aérea.

Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante

Se realizaron tres experimentos independientes en los que se observó una segregación de 100 plantas WT y 6 mutantes. El análisis χ^2 indica que no se puede aceptar el ajuste a una segregación 3 WT : 1 M.

Los datos se ajustan a una segregación 15 WT : 1 M, lo que es acorde con una mutación doble recesiva. Alternativamente, es posible que la mutación sea monogénica recesiva, pero que exista un cierto grado de subletalidad, lo cual haría que la categoría de plantas mutantes estuviera infrarrepresentada y de ahí la falta de ajuste a una segregación 3 WT : 1 M (Tabla 11).

Tabla 11. Análisis del modo de herencia del mutante 2149 ET MM.

	Segregación	WT	M	Total	χ^2
Experimento 1	Observada	26	2	28	4.76
	Esperada (3:1)	21.0	7.0		
	Esperada (15:1)	26.3	1.7		
Experimento 2	Observada	28	2	36	5.38
	Esperada (3:1)	22.5	7.5		
	Esperada (15:1)	28.1	1.9		
Experimento 3	Observada	46	2	48	11.11
	Esperada (3:1)	36.0	12.0		
	Esperada (15:1)	45.0	3.0		
Datos acumulados ^a	Observada	100	6	106	21.14
	Esperada (3:1)	79.5	26.5		
	Esperada (15:1)	99.3	6.7		

^a Análisis χ^2 homogeneidad para una segregación 3:1 ($\chi^2_{H}=0.11$) y para una segregación 15:1 ($\chi^2_{H}=0.34$) indica que las muestras son homogéneas ($P>0.05$; ($\chi^2_{2\text{ g.l.}}=5.99$))

Análisis genético del número de insertos T-DNA

En cuanto a la segregación de resistencia a la kanamicina, se evaluaron un total de 58 plantas, de las cuales sólo tres fueron sensibles (Tabla 12).

Tabla 12. Análisis del número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional de la línea 2149 ET MM.

	Segregación	Kan ^R	Kan ^S	Total	χ^2
Experimento1	Observada	26	2	28	4.76
	Esperada (3:1)	21.0	7.0		
	Esperada (15:1)	26.3	1.7		
Experimento 2	Observada	29	1	30	7.51
	Esperada (3:1)	22.5	7.5		
	Esperada (15:1)	28.1	1.9		
Datos acumulados ^a	Observada	55	3	58	12.16
	Esperada (3:1)	43.5	14.5		
	Esperada (15:1)	54.3	3.7		

^a Análisis χ^2 homogeneidad para una segregación 3:1 ($\chi^2_{H=0.11}$) y para una segregación 15:1 ($\chi^2_{H=0.36}$) indica que las muestras son homogéneas ($P>0.05$; $\chi^2_{1.g.l.}=3.84$)

El análisis χ^2 de los datos acumulados no se ajustó a una segregación 3 Kan^R : 1 Kan^S, sino a una segregación 15 Kan^R : 1 Kan^S, lo cual indica que esta línea porta dos insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional

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

Las tres plantas TG2 sensibles a la kanamicina (Tabla 12) eran WT, por lo que no cabía descartar la existencia de cosegregación. Se aclimataron estas tres plantas y se obtuvieron las correspondientes progenies TG3. Tras analizar estas progenies TG3, se observó que en una de ellas (2149-28 ET MM) aparecieron ocho plantas con fenotipo mutante, por lo que se concluyó que no existe cosegregación.

A partir de ese resultado se realizaron cruces de plantas mutantes sensibles a la kanamicina con *Solanum pimpinellifolium*, se obtuvo la F2 correspondiente, y se identificaron en esta población plantas con fenotipo mutante y WT (Figura 40). Este material nos permitirá llevar a cabo la identificación del gen alterado por clonaje posicional y métodos de secuenciación de última generación (NGS).

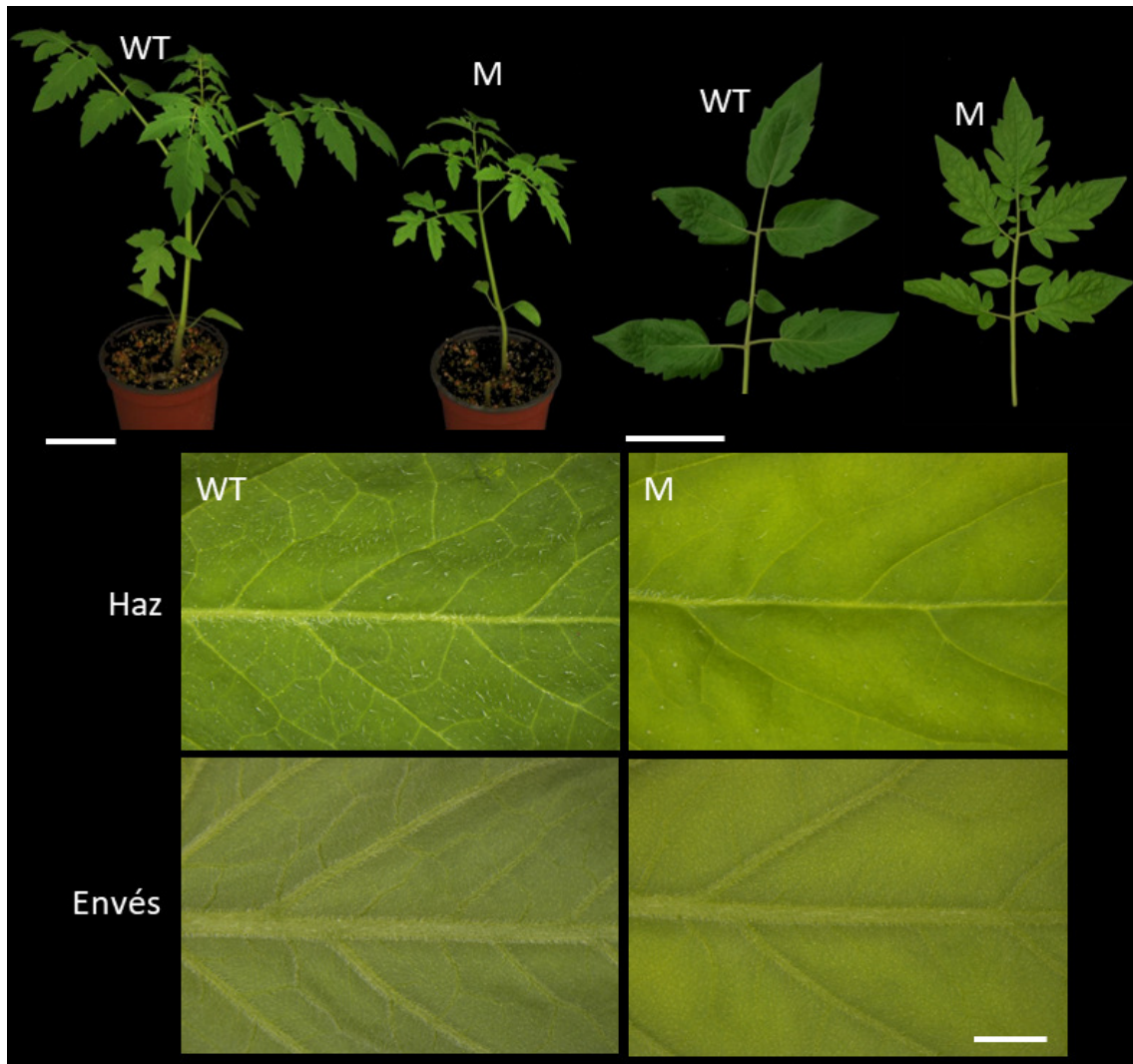


Figura 40. Fenotipo de plantas y hojas en la F2 del cruce del mutante 2149 ET MM con *Solanum pimpinellifolium*. La barra representa 5 cm (arriba) y 1 mm (abajo).

Mutante 1560 ET MM

El mutante 1560, exhibía hipersensibilidad al estrés salino, fue identificado en un trabajo previo del grupo (Sánchez-Sauceda, 2016). Los datos anteriores habían indicado que la línea segregaba para un inserto de *nptII* funcional y que no había cosegregación fenotipo – *nptII*. En esta tesis se realizaron experimentos adicionales para caracterizar con mayor detalle el fenotipo mutante.

En primer lugar, con el fin de profundizar en la caracterización *in vitro* en etapa de plántula, se cultivaron semillas en medio de germinación con diferentes concentraciones de NaCl (0, 25, 50, 100 y 150 mM). Los resultados confirmaron que el mutante 1560 ET MM presentaba una mayor sensibilidad al estrés salino. Las plántulas exhibieron síntomas de clorosis en las hojas desde NaCl 25 mM, la menor de las concentraciones evaluadas. En la concentración de 150 mM de NaCl ni el WT ni el mutante fueron capaces de expandir sus cotiledones (Figura 41).

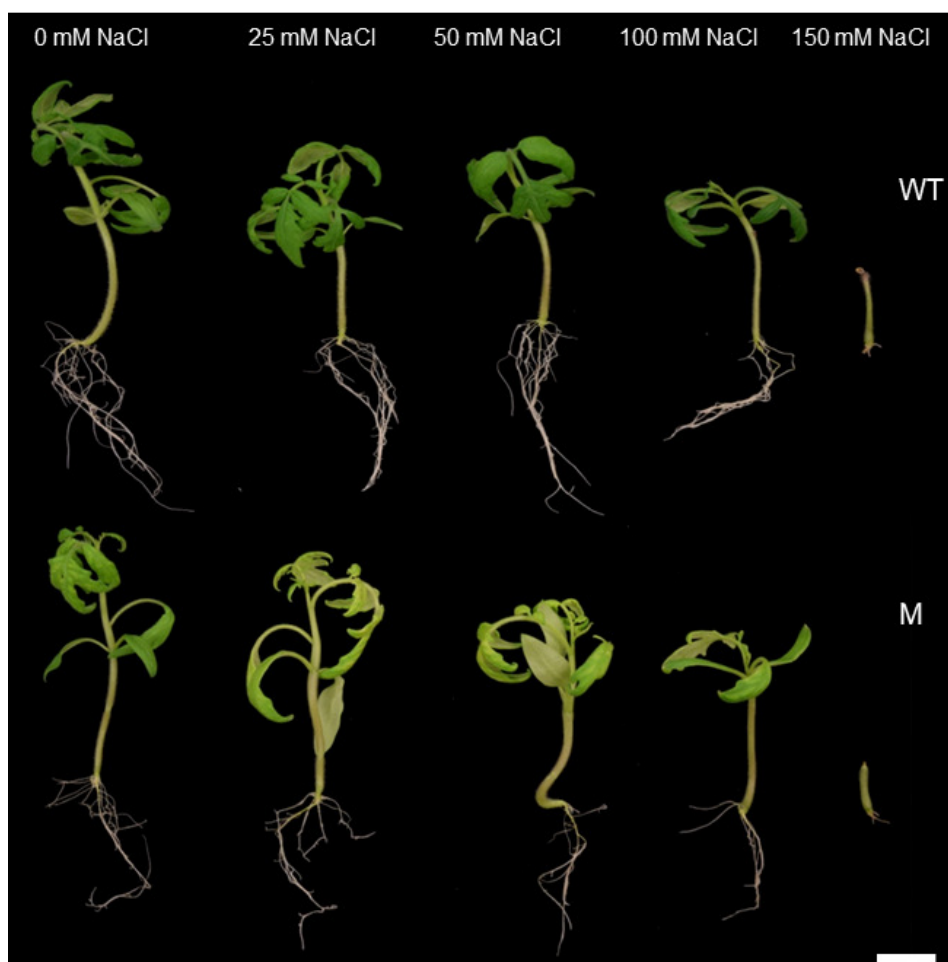


Figura 41. Fenotipo de plántulas de la línea 1560 ET MM después de 30 días de cultivo en medio de germinación con diferentes concentraciones de NaCl. La barra representa 1 cm.

En cuanto al fenotipo de la planta axénica, tras el cultivo de ápices meristemáticos durante 30 días en medio base suplementado con 100 mM de NaCl no se observaron diferencias significativas entre las plantas WT y las mutantes (Figura 42).

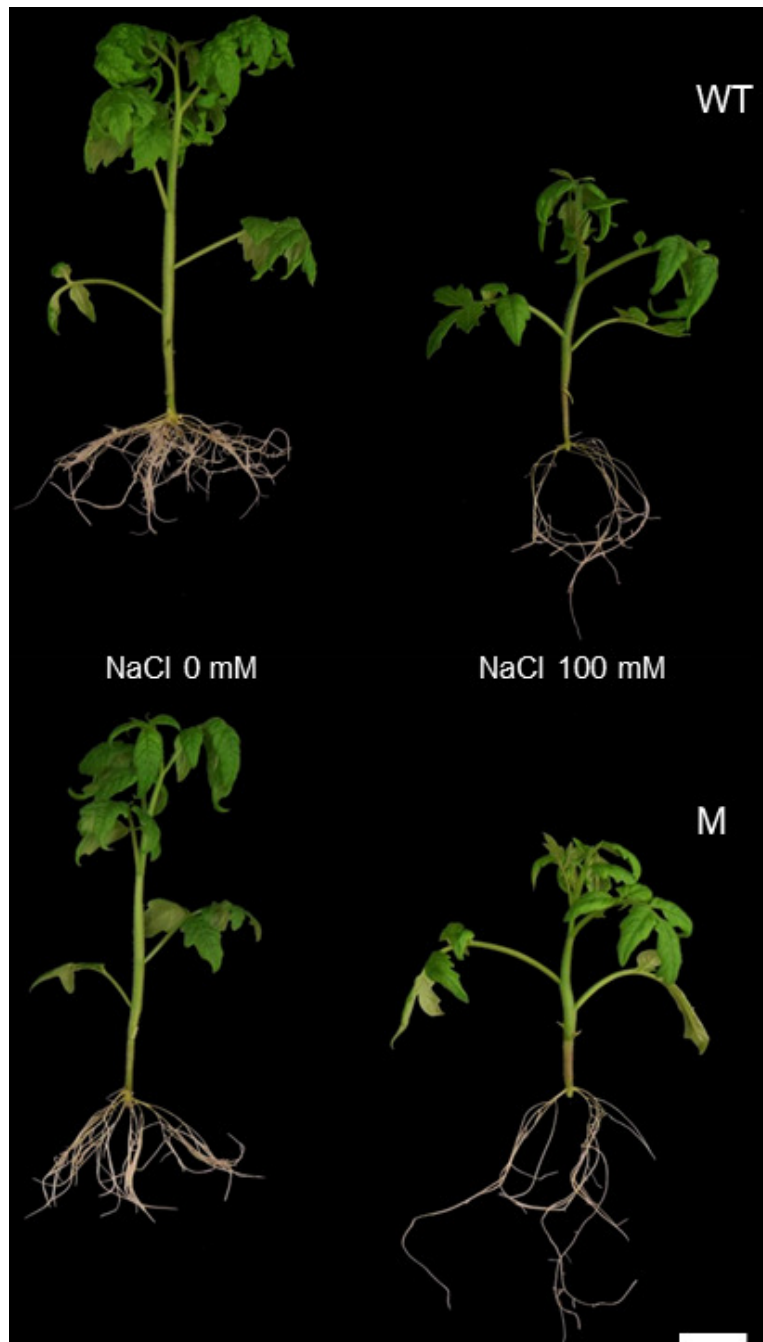


Figura 42. Fenotipo de planta axénica de la línea 1560 ET MM después de 30 días en medio básico sin y con NaCl 100 mM. La barra representa 1 cm.

Es de destacar que no se observó ninguna diferencia apreciable en el desarrollo de las raíces embrionaria y adventicia cuando las plantas se cultivaban en ausencia de estrés.

En experimentos previos (Sánchez-Sauceda, 2016) se vio que cuando se cultiva en un medio básico el ápice meristemático de una plántula mutante tratada con NaCl, y por tanto clorótica, la planta axénica que se obtiene es de fenotipo WT. Estos datos y los que hemos obtenido en el experimento anterior apuntan hacia una diferencia significativa en el comportamiento de la planta mutante en función del origen de su sistema radicular: si tiene un origen embrionario las plantas muestran un fenotipo de hipersensibilidad al ser cultivadas con sal, mientras que si el sistema radicular es adventicio las plantas mutantes no muestran ninguna alteración en su fenotipo.

Para ver si este comportamiento diferencial se observaba también *in vivo* se cultivaron, por un lado, plantas procedentes de semilla y, por otro, plantas axénicas aclimatadas en el invernadero. Cuando las plantas procedían de semilla se observaba una diferencia clara entre el desarrollo del mutante y el WT aunque no se aplicara ningún tratamiento estresante. En general, las plantas mutantes crecieron mucho menos que las plantas WT (Figura 43). Conforme aumentó el tiempo de cultivo, las diferencias entre las plantas WT y mutantes procedentes de semilla se hicieron más notables. El tamaño y la masa foliar eran inferiores y aparecían síntomas de clorosis y senescencia.



Figura 43. Fenotipo de planta de la línea 1560 ET MM procedente de semilla tras 60 días de cultivo en invernadero. La barra representa 10 cm.

En cambio, si las plantas habían sido aclimatadas a partir de plantas axénicas, aunque el mutante crecía un poco más lento que el WT, su desarrollo era mucho más parecido que el de las plantas procedentes de semilla (Figura 44).

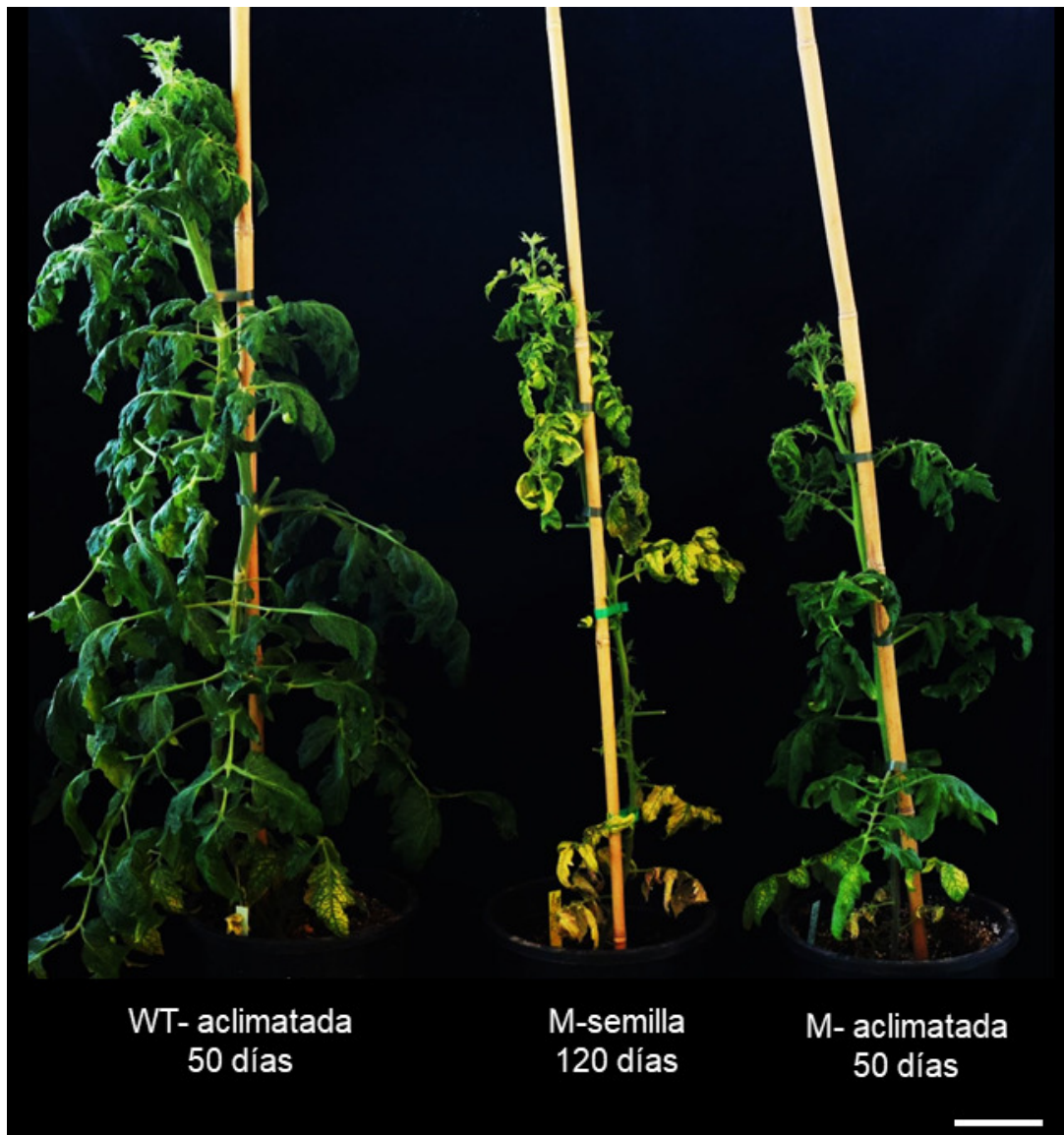


Figura 44. Fenotipo de plantas aclimatadas y procedentes de semilla de la línea 1560 ET MM cultivadas en el invernadero. La barra representa 10 cm.

Después de comprobar las diferencias de crecimiento sin la aplicación de ningún tipo de estrés, se realizó un experimento con estrés salino *in vivo* en plántulas de 20 días procedentes de semillas regando con solución salina con NaCl 100 mM.

A los 15 días con tratamiento salino, las plantas mutantes presentaron clorosis en las hojas. Al final del experimento, después de 30 días de tratamiento se observó una mayor sensibilidad de las plantas mutantes respecto al WT presentando un menor crecimiento y una clorosis que afectaba a toda la parte aérea de la planta (Figura 45).

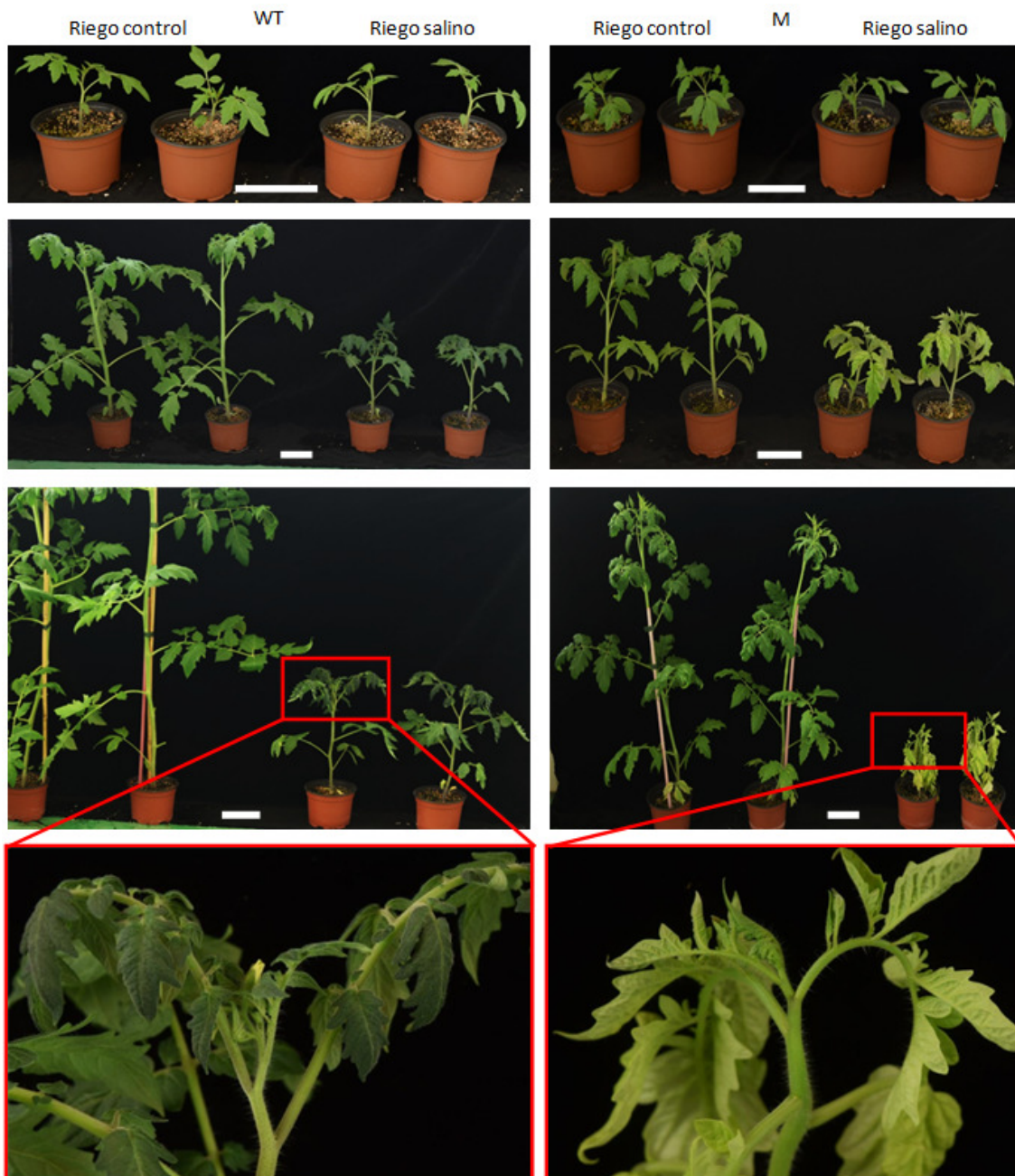


Figura 45. Fenotipo de plántulas de la línea 1560 ET MM cultivadas en el invernadero con un tratamiento de estrés salino con NaCl 100 mM en los días 0 (arriba), 15 (centro) y 30 (abajo) del tratamiento. La barra representa 10 cm.

Para discernir la importancia que tenían la raíz y la parte aérea en el fenotipo mutante, se llevó a cabo un tratamiento salino en plantas injertadas. Se utilizaron injertos en las cuatro combinaciones posibles entre parte aérea y parte radicular, es decir, $\frac{WT}{WT}$, $\frac{WT}{M}$, $\frac{M}{WT}$ y $\frac{M}{M}$, así como plantas WT y M sin injertar. Se inició el experimento de estrés salino cuando los injertos tenían 30 días y presentaban el tamaño más uniforme posible. El riego se realizó con solución salina con NaCl 100 mM durante 1 mes. Como testigos

del experimento se cultivaron los mismos injertos y plantas WT y M con un riego sin NaCl.

Se observó que los injertos de parte aérea WT sobre patrón mutante, es decir $\frac{WT}{M}$, fenocopiaban a la planta mutante sin injertar en respuesta al tratamiento estresante, presentado las mismas características de hojas amarillas y débiles típicas del mutante. Por el contrario, los injertos de parte aérea mutante sobre patrón WT, es decir $\frac{M}{WT}$, presentaron las características de una planta WT regada con solución salina, esto es, con las hojas de un color verde intenso (Figura 46).

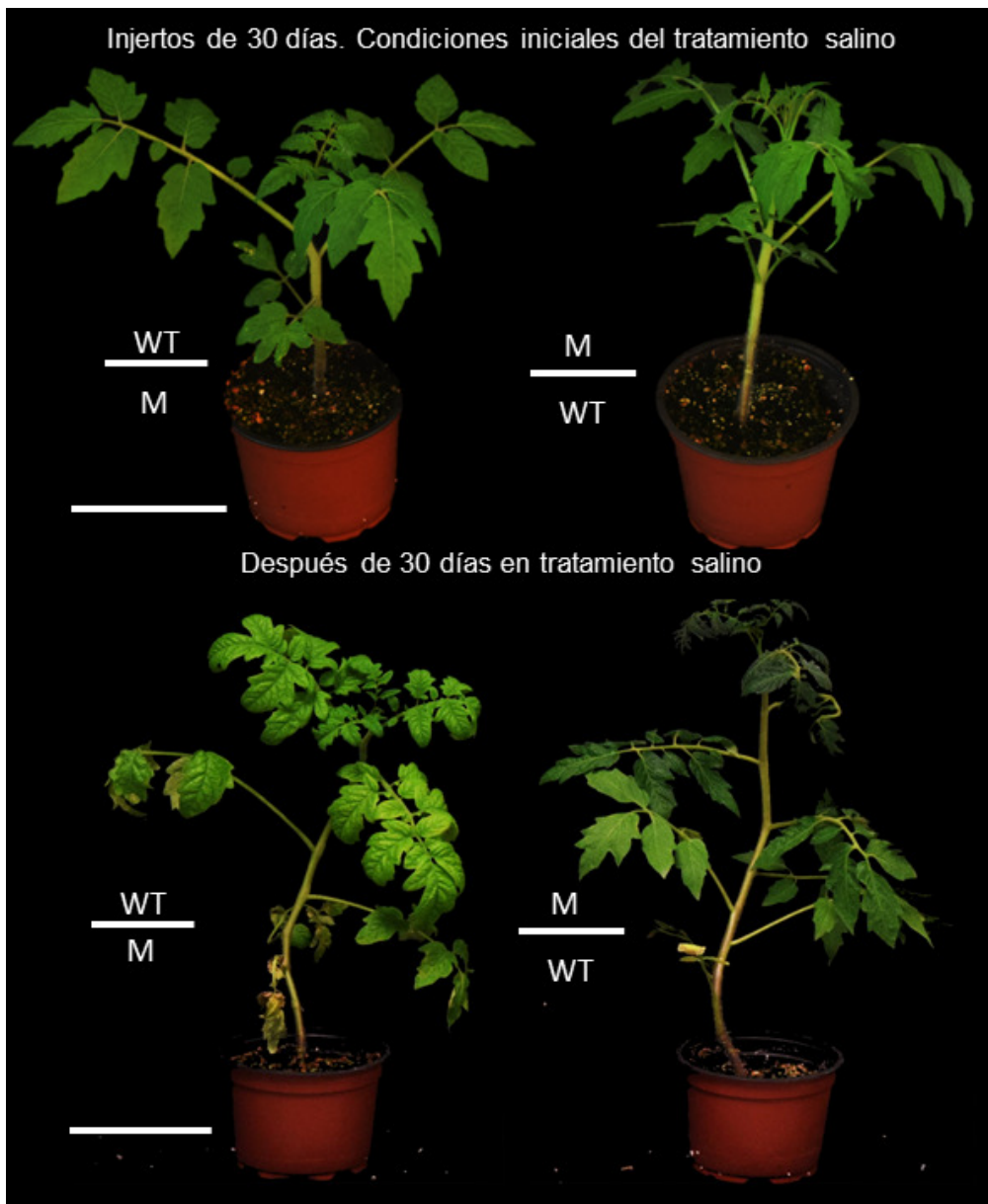


Figura 46. Fenotipo de injertos ($\frac{WT}{M}$ y $\frac{M}{WT}$) en plantas procedentes de semilla de la línea 1560 ET MM después de 30 días en experimento *in vivo* de estrés salino con 100 mM de NaCl. La barra representa 10 cm.

Al comparar todas las plantas se observó que en los injertos en los que se utilizó como patrón el mutante ($\frac{WT}{M}$ y $\frac{M}{M}$) exhibían un fenotipo similar al de la planta mutante sin injertar. De la misma manera, en los injertos en los que se utilizó como patrón el WT, ($\frac{M}{WT}$ y $\frac{WT}{WT}$) tenían un fenotipo similar al de la planta WT sin injertar (Figura 47).



Figura 47. Fenotipo plantas injertadas obtenidas a partir de semilla de la línea 1560 ET MM después de 30 días de cultivo en invernadero con estrés salino (100 mM de NaCl). La barra representa 10 cm.

La conclusión de este experimento es que el fenotipo de hipersensibilidad al estrés salino del mutante 1560 ET MM se debe a un defecto en el sistema radicular.

Al ver que el carácter más claramente afectado en el mutante era la clorosis foliar se evaluó el contenido en agua de las hojas de plantas injertadas y sin injertar antes de empezar el tratamiento estresante y tras 30 días de cultivo en condiciones de salinidad.

Los resultados muestran que todas las plantas tenían un contenido de agua similar antes de empezar el tratamiento, entre 84% y 86%. Al final del tratamiento estresante las hojas de las plantas cuya raíz era WT habían disminuido un poco su contenido en agua (82-84%), mientras que las hojas de las plantas cuyas raíces eran mutantes habían incrementado de forma significativa su contenido en agua (90-91%) (Figura 48).

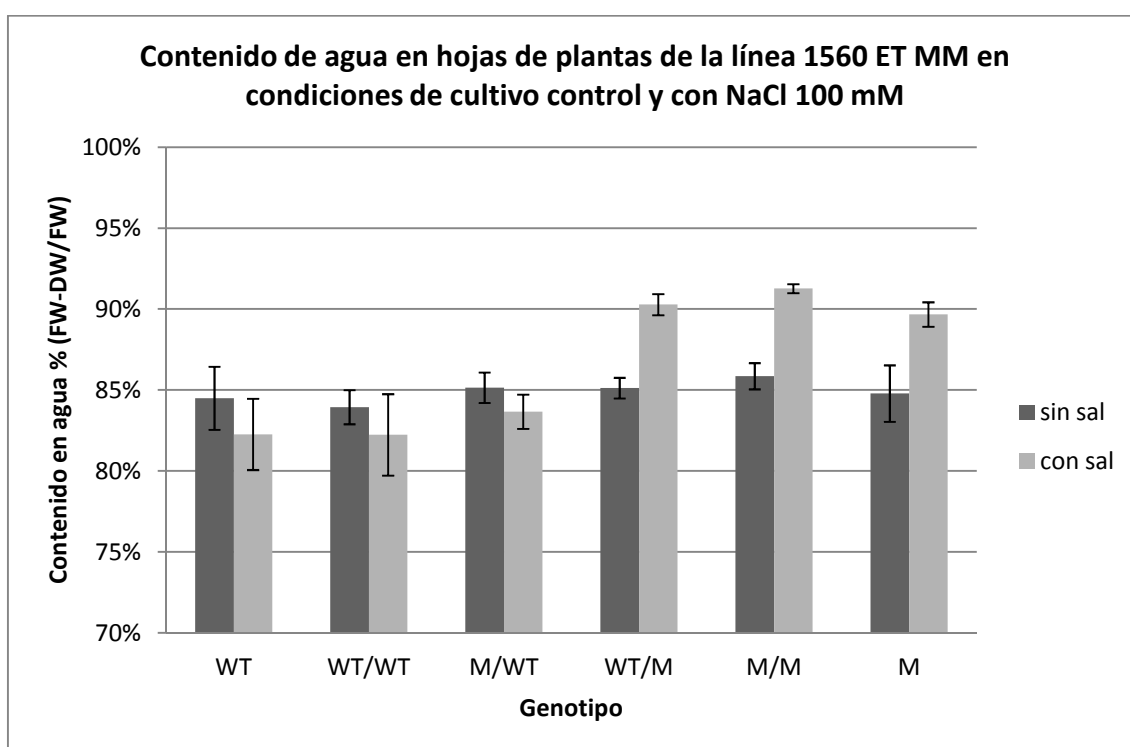


Figura 48. Contenido de agua en hojas de plantas de la línea 1560 ET MM después de 30 días de cultivo en invernadero sin y con estrés salino (100 mM de NaCl). La barra representa la desviación estándar.

Además, en este caso se evaluó al final del tratamiento salino la pérdida de agua de los folíolos (RWC) con la metodología descrita previamente. Los datos obtenidos indicaron que las hojas de las plantas con la raíz mutante tenían una menor cantidad de materia seca (9-10%) que las hojas de las plantas con raíz WT (16-18%). Pese a la gran diferencia en el contenido de agua que tenían las hojas, el porcentaje de agua

perdida durante las cuatro horas de tratamiento es muy similar entre los seis tipos de plantas (14-19%) (Figura 49).

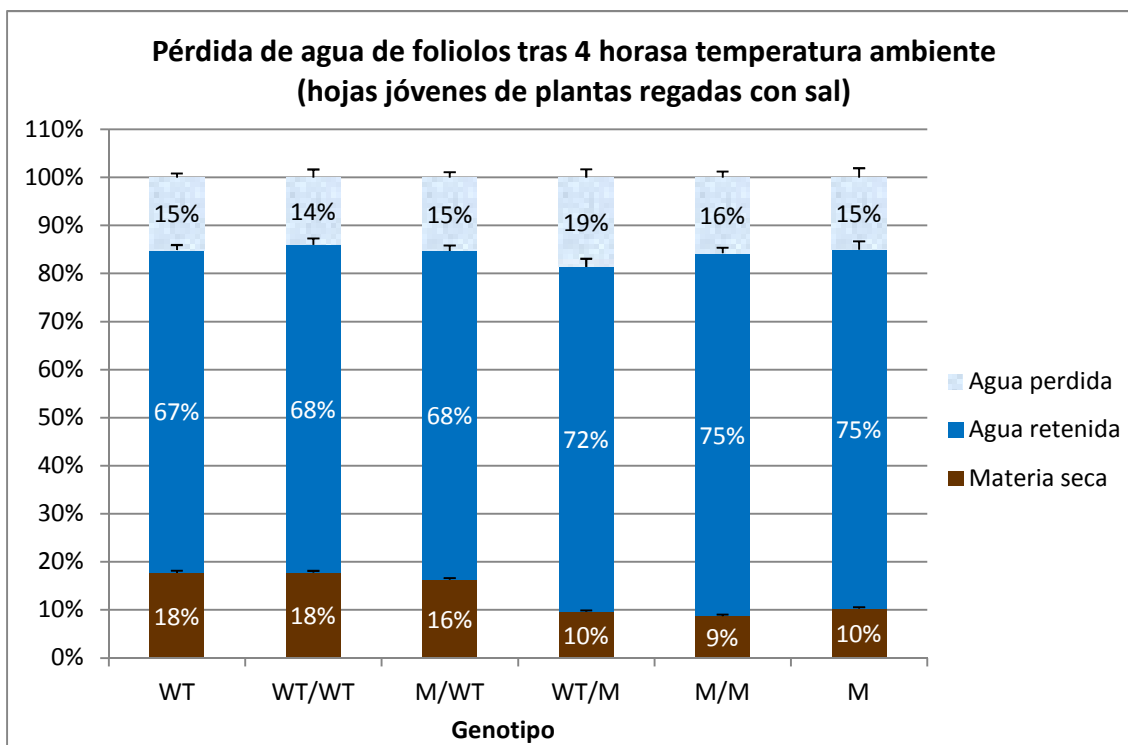


Figura 49. Pérdida de agua de folíolos (RWC) tras 4 horas a temperatura ambiente de plantas injertadas de la línea 1560 ET MM tras 30 días de cultivo en invernadero con tratamiento estresante de NaCl 100 mM. La barra representa la desviación estándar.

Por lo visto en estos experimentos, independientemente del genotipo de la parte aérea (WT o M), las raíces del mutante son capaces de absorber y transportar una mayor cantidad de agua en condiciones de estrés salino. Este mayor aporte de agua con elevadas dosis de iones perjudiciales para la planta podría ser el motivo de una intoxicación iónica que determinaría la aparición de clorosis y el fenotipo de hipersensibilidad al estrés salino.

Si esta hipótesis fuera correcta y la raíz de la planta mutante tuviera mayor capacidad de absorción de agua podría tener un comportamiento interesante en un tratamiento de estrés hídrico donde se limite el aporte de agua sin incrementar los niveles de salinidad. Se llevaron a cabo estos experimentos tanto en plantas procedentes de semilla (i.e. con el sistema radicular embrionario) como en plantas aclimatadas (i.e. con un sistema radicular adventicio) (Figura 50 y 51 respectivamente). En ambos casos el resultado fue el mismo, las plantas mutantes mostraron una clara tolerancia a las condiciones de estrés hídrico impuestas por el régimen de riego

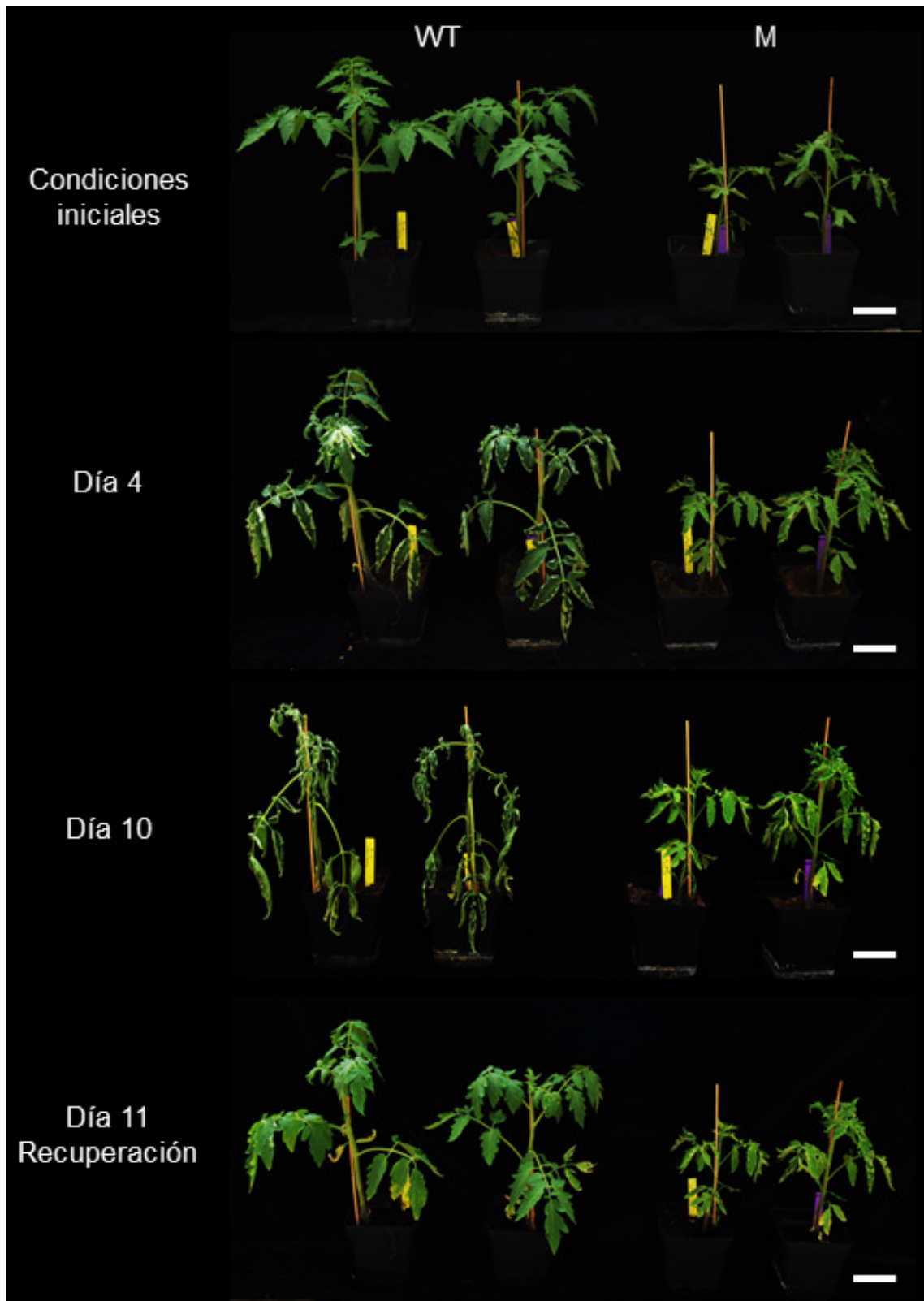


Figura 50. Fenotipo de plantas con sistema radicular embrionario de la línea 1560 ET MM durante diferentes etapas del primer ciclo de estrés hídrico. La barra representa 5 cm.

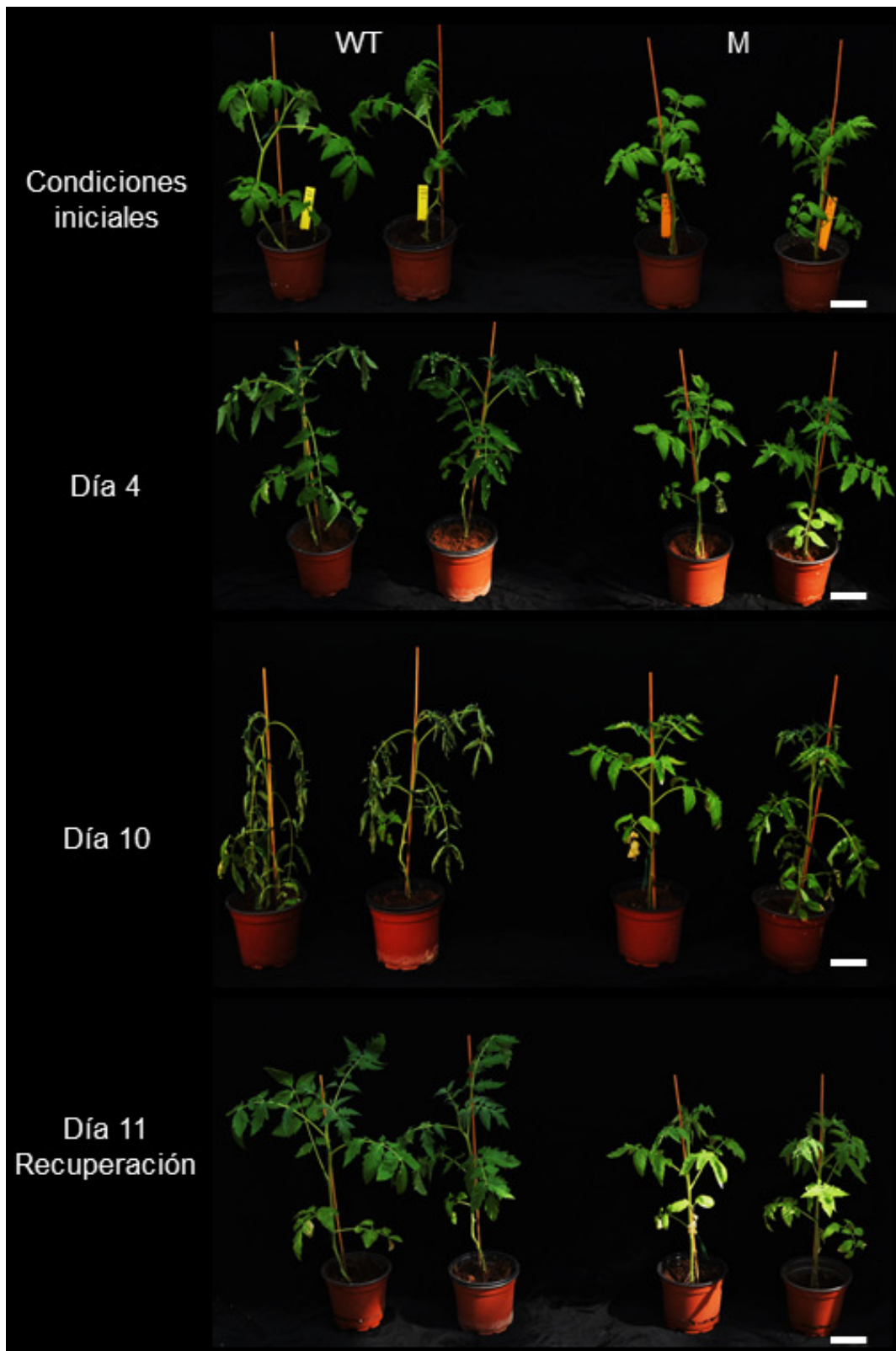


Figura 51. Fenotipo de plantas con sistema radicular adventicio de la línea 1560 ET MM durante diferentes etapas del primer ciclo de estrés hídrico. La barra representa 5 cm.

Mutante 698 ET MM

La línea 698 ET MM presentó un fenotipo mutante identificado en un trabajo previo de nuestro grupo. Esta línea segregaba para un inserto T-DNA y se comprobó la ausencia de cosegregación. La característica principal del mutante 698 ET MM es su hipersensibilidad al estrés salino, aunque en condiciones de cultivo sin estrés presentó un fenotipo WT.

Debido a las similitudes fenotípicas encontradas entre los mutantes 698 ET MM y 1560 ET MM se realizó un ensayo de alelismo para determinar si ambos fenotipos estaban causados por una alteración en el mismo gen o en genes distintos. Los resultados de dicho test apuntaban a que efectivamente ambas mutaciones estaban causadas por la alteración de un mismo gen.

En el contexto de esta tesis, se han realizado similares evaluaciones que con la línea 1560 ET MM a fin de corroborar este resultado y, además, se han realizado otros ensayos para caracterizar el fenotipo de hipersensibilidad del mutante 698 ET MM.

Se cultivaron semillas en medio de germinación con diferentes concentraciones de NaCl (0, 25, 50, 100 y 150 mM) para realizar la caracterización fenotípica *in vitro* en etapa de plántula. Los resultados confirmaron que el mutante 698 ET MM presentaba una mayor sensibilidad al estrés salino que el WT. Al igual que sucede en la línea 1560 ET MM, las plántulas de 698 ET MM exhibieron síntomas de clorosis en las hojas, incluso en medio con NaCl 25 mM, la menor de las concentraciones evaluadas. En la concentración de 150 mM de NaCl ni el WT ni el mutante fueron capaces de expandir sus cotiledones. Por otra parte, cuando las plántulas se cultivaron en medio sin estrés salino no se apreció ninguna diferencia entre las plántulas WT y mutantes (Figura 52).

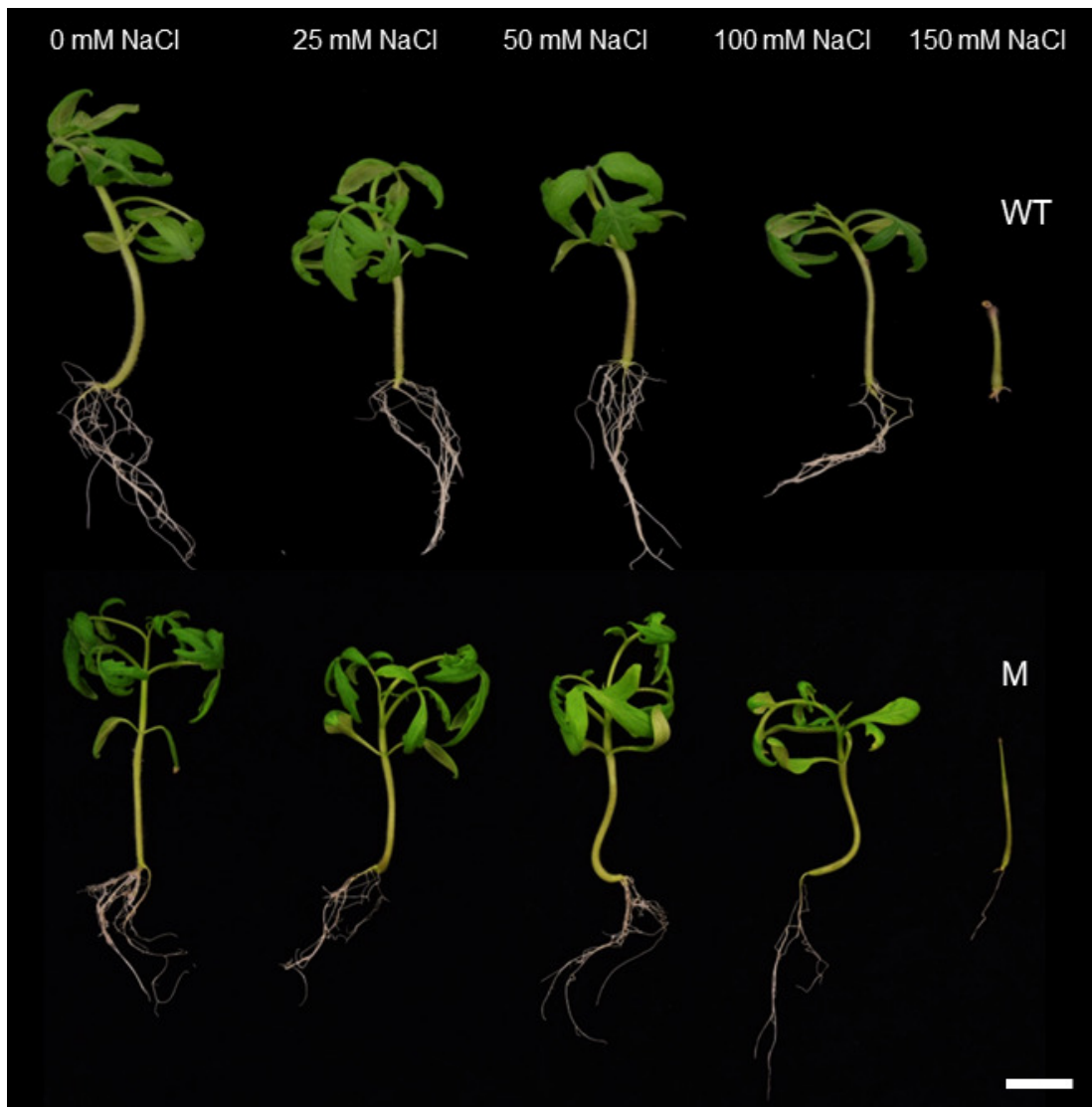


Figura 52. Fenotipo de plántulas de la línea 698 ET MM después de 30 días en medio MG con diferentes concentraciones de NaCl. La barra representa 1 cm.

Tras el cultivo de los ápices meristemáticos durante 30 días en medio básico sin y con 100 mM de NaCl no se observaron diferencias significativas entre las plantas axénicas WT y las mutantes (Figura 53). Esto indica que, al igual que ocurre con el mutante 1560 ET MM, el fenotipo de hipersensibilidad depende del tipo de raíz: cuando el sistema radicular es embrionario las plantas de 698 ET MM son sensibles a la salinidad; en cambio, si el sistema radicular es de tipo adventicio las plantas tienen un comportamiento idéntico al del WT.

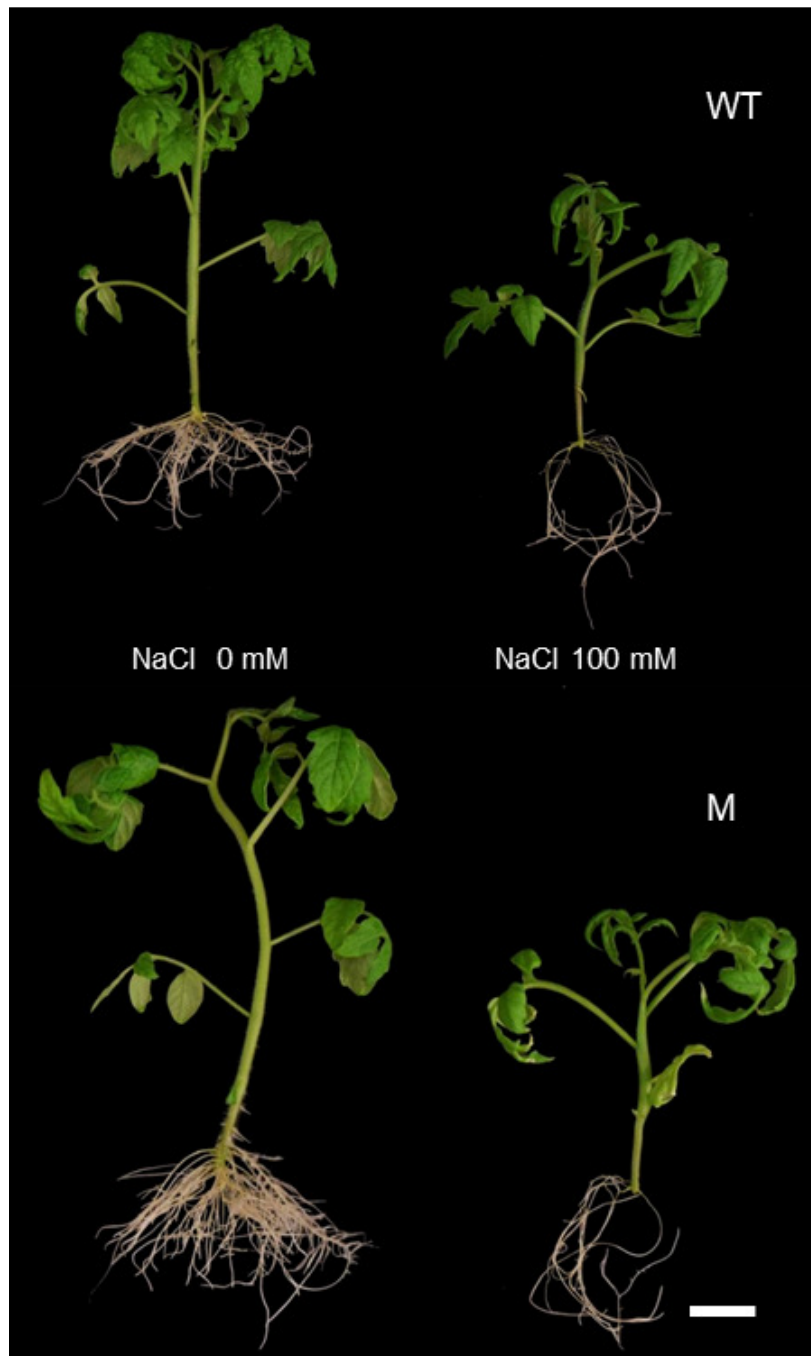


Figura 53. Fenotipo de planta axénica de la línea 1560 ET MM después de 30 días en medio básico y medio básico con NaCl 100 mM. La barra representa 1 cm.

A continuación, se estudió el comportamiento del mutante en cultivo *in vivo* bajo estrés salino. Se cultivaron semillas pregerminadas WT y mutantes en el invernadero y, cuando las plantas tenían las dos primeras hojas verdaderas y un tamaño uniforme, se inició el tratamiento salino regando con una solución de NaCl 100 mM. Desde los primeros 15 días del tratamiento estresante se observó una mayor sensibilidad del

mutante, presentando clorosis en las hojas, mientras que el WT adquirió el color verde intenso característico al ser regado con solución salina. Conforme aumentó el tiempo de exposición al estrés salino las plantas mutantes presentaron un porte más débil y clorótico (Figura 54).

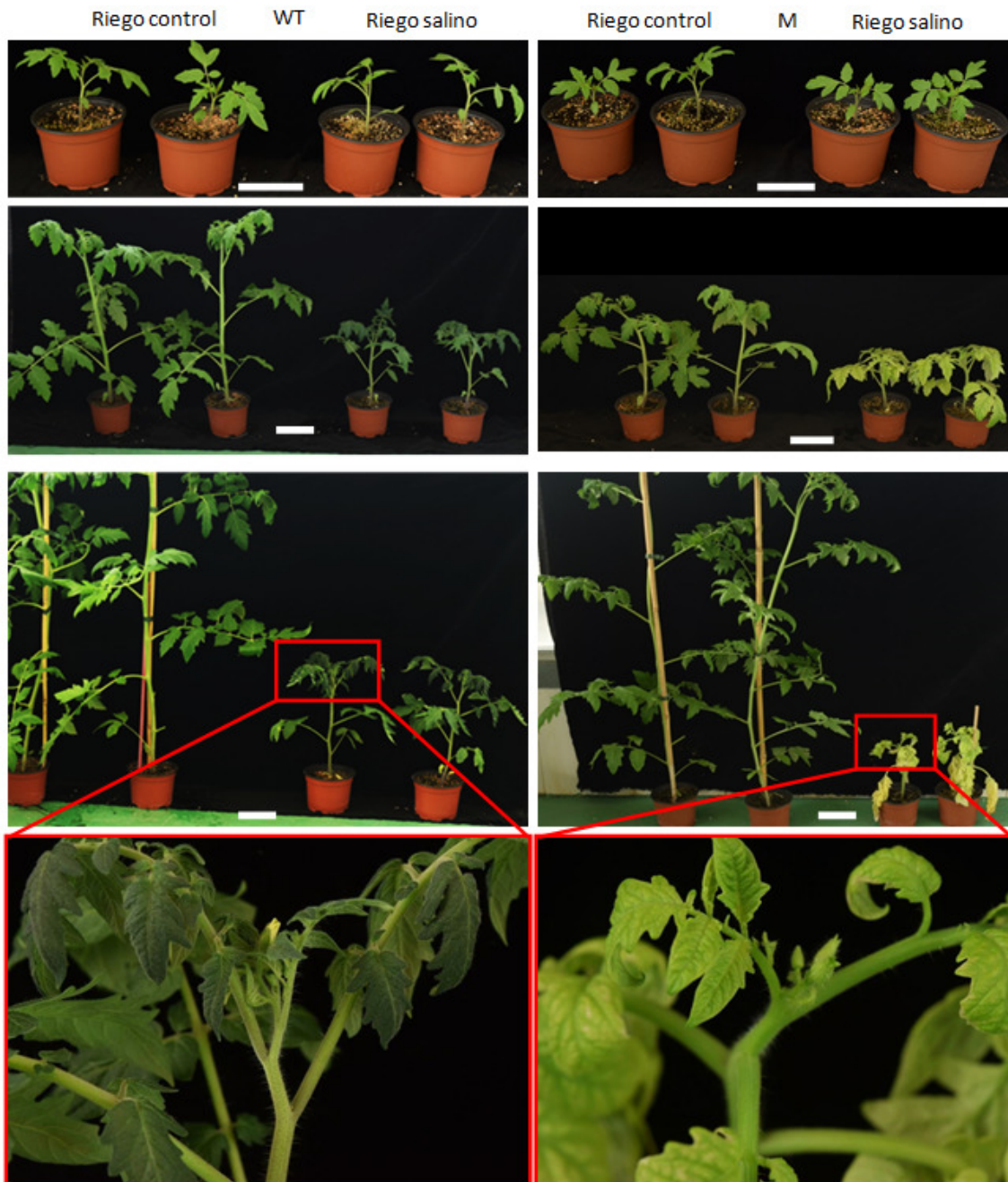


Figura 54. Fenotipo de plantas procedentes de semilla de la línea 698 ET MM cultivadas en el invernadero con un tratamiento de estrés salino con NaCl 100 mM en los días 0 (arriba), 15 (centro) y 30 (abajo) del tratamiento. La barra representa 10 cm.

Además, se realizaron injertos en las diferentes combinaciones entre parte aérea y raíz, WT y mutante, y las plantas injertadas se trataron con estrés salino. Los resultados fueron similares a los observados en la línea 1560 ET MM. El fenotipo de

menor crecimiento y clorosis en las hojas se observaba en las plantas cuyas raíces eran de genotipo mutante independientemente del genotipo de la parte aérea.

Además, en este caso se evaluó al final del tratamiento salino la pérdida de agua de los folíolos (RWC) con la metodología descrita previamente. Los datos obtenidos indicaron que las hojas de las plantas con la raíz mutante tenían una menor cantidad de materia seca (8-9%) que las hojas de las plantas con raíz WT (18-20%). Pese a la gran diferencia en el contenido de agua que tenían las hojas, el porcentaje de agua perdida durante las cuatro horas de tratamiento es muy similar entre los cuatro tipos de plantas (14-16%) (Figura 55).

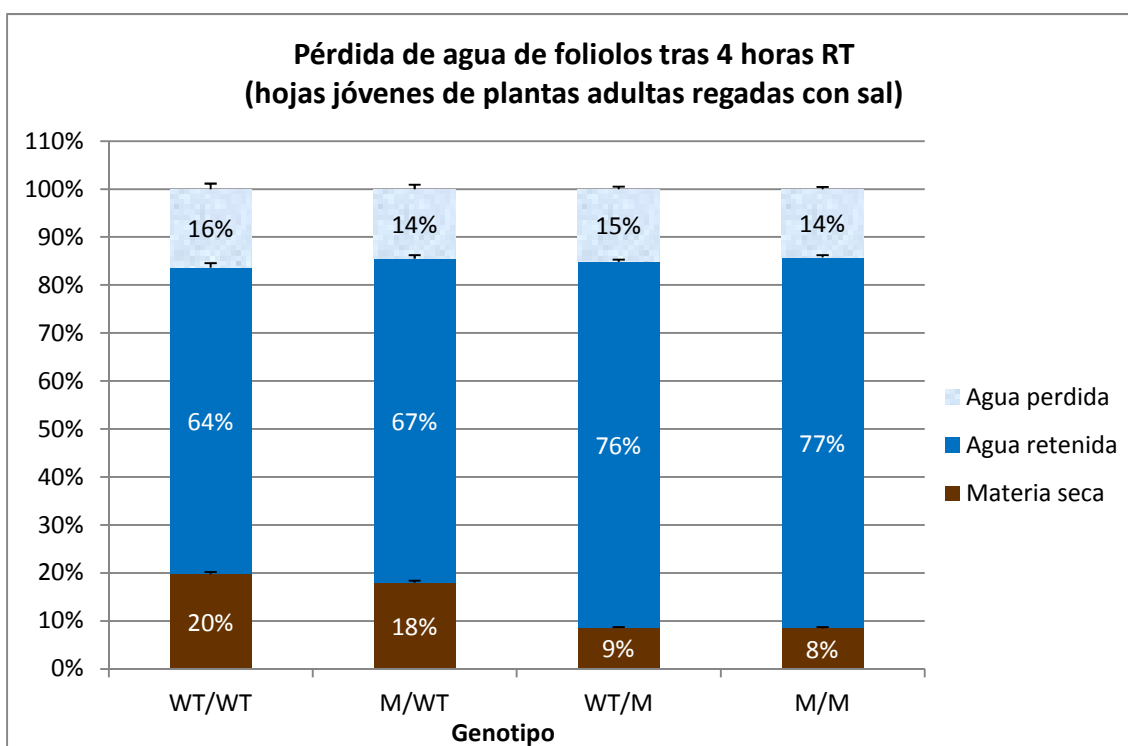


Figura 55. Pérdida de agua de folíolos (RWC) tras 4 horas a temperatura ambiente de plantas injertadas de la línea 698 ET MM tras 30 días de cultivo en invernadero con tratamiento estresante de NaCl 100 mM. La barra representa la desviación estándar.

Este comportamiento relacionado con la transpiración foliar de plantas sometidas a estrés salino es muy parecido al observado en la línea 1560 ET MM (Figura 49). Esto parece confirmar que en estos mutantes alélicos no está afectada ninguna característica relacionada con la transpiración y que la mayor acumulación de agua en las hojas es debida exclusivamente al comportamiento diferencial de la raíz mutante.

Mutante 916 ET MM

Este mutante recesivo hipersensible al estrés salino fue identificado y caracterizado en trabajos previos del grupo (Sánchez-Sauceda, 2016). Las plántulas mutantes, que se comportaron como el WT en ausencia de estrés, fueron extremadamente sensibles al estrés salino ya que su hipocótilo se engrosaba y se inhibía totalmente el desarrollo de la parte aérea. Tras observar este fenotipo *in vitro* se comprobó que las plantas de esta línea tenían un comportamiento similar en el invernadero. En ausencia de estrés no había diferencias con el WT, mientras que a los pocos días de aplicación de estrés salino la parte apical del tallo se mostraba claramente afectada, detuvo su crecimiento y el ápice meristemático acabó por colapsar (Figura 56).

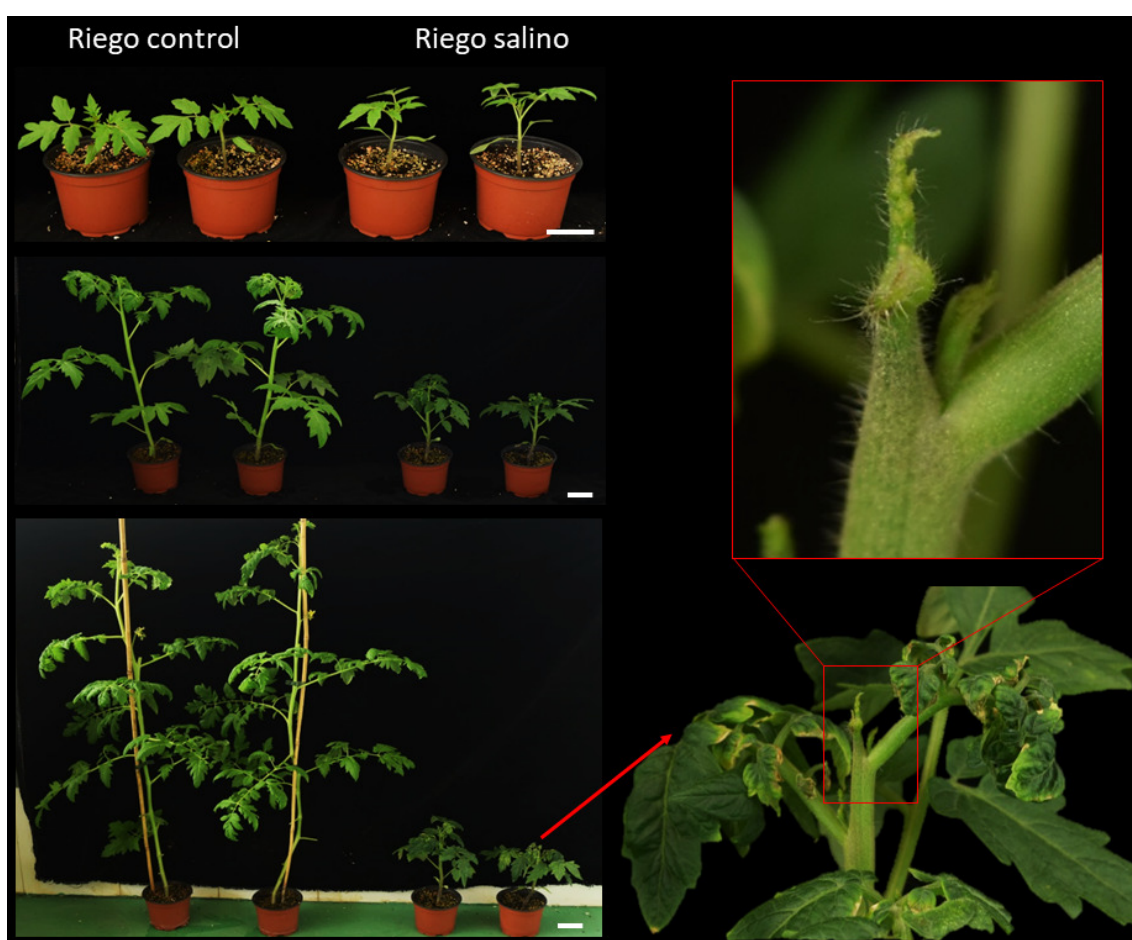


Figura 56. Fenotipo de las plantas mutantes de la línea 916 ET MM obtenidas a partir de semilla tras 0 (arriba), 15 (medio) y 30 (abajo) días de tratamiento salino en el invernadero. La barra representa 5 cm.

Los análisis realizados en trabajos previos del grupo determinaron que esta línea segregaba para dos insertos T-DNA. Se llevó a cabo la segregación del inserto responsable del fenotipo mutante y se confirmó la existencia de cosegregación entre el

fenotipo y el T-DNA con el gen *nptII* funcional. Se consiguió identificar el gen responsable de esta mutación al que se le denominó SICBL10 (Egea *et al.*, 2017) o *PMS* (*Protecting Meristems against Salinity*) por el papel que tiene en la protección de esta estructura cuando la planta se ve sometida a estrés salino.

Debido a la importancia de este mutante, en esta tesis se han realizado experimentos adicionales encaminados a profundizar en su caracterización fenotípica. Para intentar separar los efectos de la parte aérea y de la raíz se hicieron injertos entre plantas WT y mutantes. Además, se han realizado varios experimentos para estudiar si tiene alterada su capacidad de transpiración foliar y para ver su comportamiento frente al estrés hídrico en condiciones de cultivo en invernadero.

En primer lugar se cultivaron semillas en el invernadero y se realizaron injertos en las diferentes combinaciones: $\frac{WT}{WT}$; $\frac{WT}{M}$; $\frac{M}{WT}$; $\frac{M}{M}$. Treinta días después de realizar los injertos las plantas se sometieron a un tratamiento de estrés salino con 100 mM de NaCl. Al evaluar el desarrollo de la parte apical se observó que los injertos de plantas mutantes sobre patrón WT exhibieron las mismas características que el mutante, es decir, la parte apical estaba afectada y detenía su crecimiento (Figura 57).

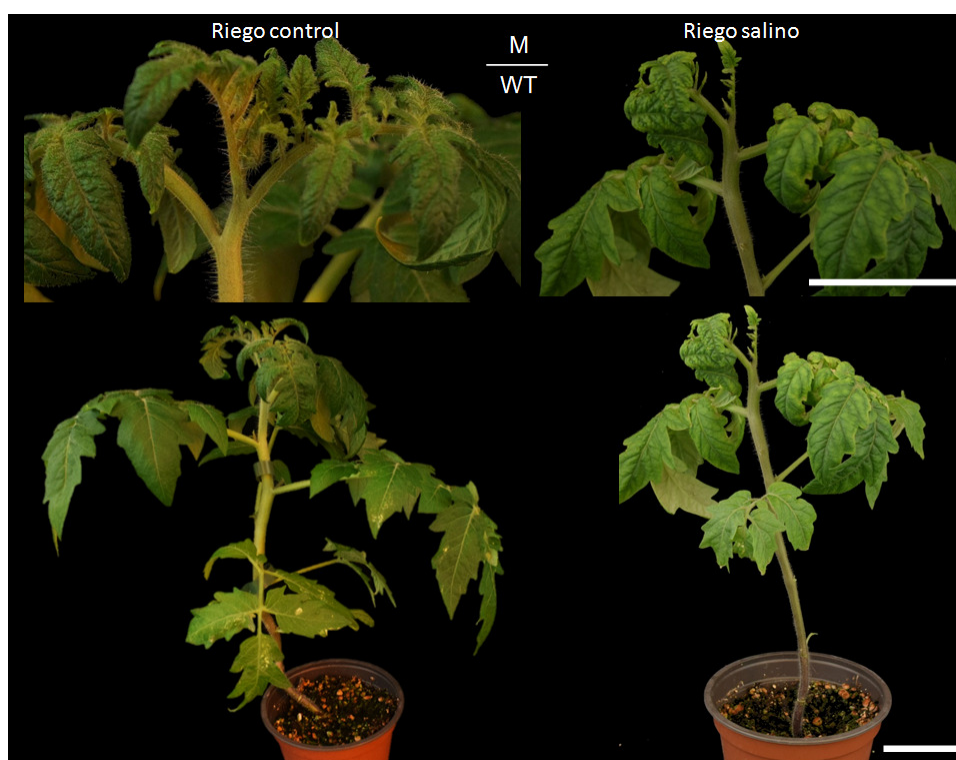


Figura 57. Fenotipo de injertos $\frac{M}{WT}$ de la línea 916 ET MM tras 20 días de tratamiento control y tratamiento salino. La barra representa 5 cm.

Además, en los injertos de plantas WT sobre patrón mutante las plantas tenían un fenotipo similar al de las plantas WT (Figura 58).



Figura 58. Fenotipo de injertos $\frac{WT}{M}$ de la línea 916 ET MM tras 20 días de tratamiento control y tratamiento salino. La barra representa 5 cm.

Con este experimento se concluyó que el fenotipo de sensibilidad del mutante al estrés salino no está influido por el sistema radicular de la planta.

Por otra parte, se realizó la evaluación de esta línea en condiciones de estrés hídrico con la metodología ya descrita de ciclos de diez días de ausencia de riego. Se observó que, tras seis días de tratamiento, las plantas mutantes presentaban claros síntomas de pérdida de turgencia mientras que las plantas WT prácticamente no se veían afectadas. Tras diez días de tratamiento, aunque las plantas WT ya estaban decaídas, la pérdida de turgencia era muy superior en las plantas mutantes. Un día después del riego que se da en el día 10, tanto las plantas WT como las mutantes se habían recuperado y no presentaban síntomas de marchitamiento (Figura 59). En los dos ciclos siguientes el comportamiento fue similar al del primer ciclo.

Tras este resultado, se realizó la evaluación de la pérdida de agua en folíolos de plantas no sometidas a estrés (Figura 60).



Figura 59. Fenotipo de planta a partir de semilla de la línea 916 ET MM después del primer ciclo de estrés hídrico. La barra representa 5 cm.

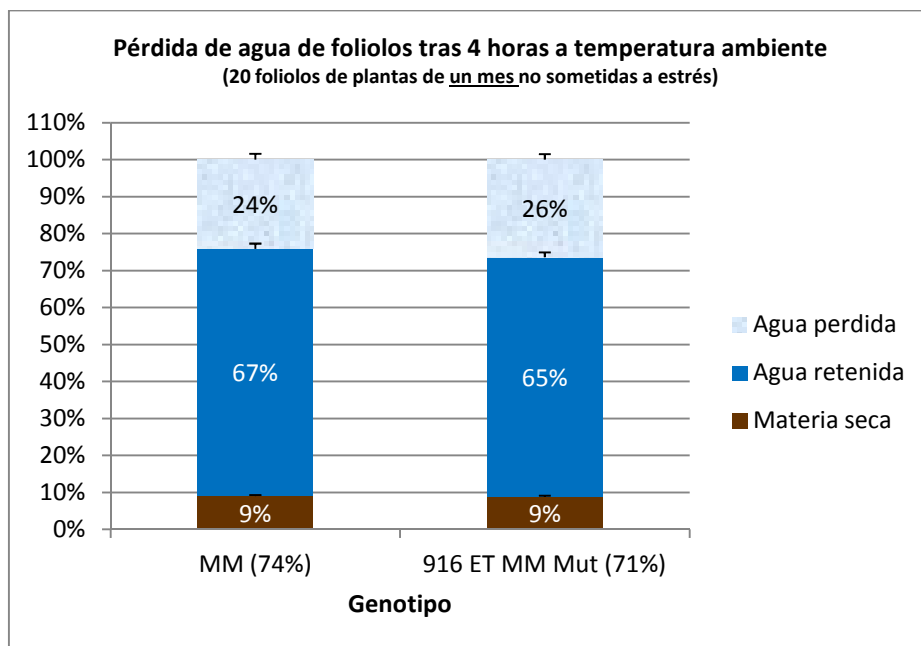


Figura 60. Pérdida de agua de folíolos tras 4 horas a temperatura ambiente procedentes de plantas de la línea 916 ET MM de un mes no sometidas a estrés. La barra representa la desviación estándar.

No se vieron diferencias en el contenido en materia seca, pero sí se observó una ligera mayor pérdida de agua en los folíolos de las plantas mutantes (RWC 74% vs 71%), es decir, la hojas de las plantas mutantes transpiraron algo más que las de las plantas WT.

4.2. Identificación y caracterización de mutantes del desarrollo que pueden tener relación con la tolerancia a estrés abiótico

Como se ha planteado en la introducción de esta tesis, los mecanismos que permiten a una planta resistir situaciones estresantes pueden tener diversa naturaleza. Se han encontrado mecanismos que actúan a nivel celular (i.e. transporte de sodio y potasio, compartimentación de calcio) y otros que lo hacen gracias a cambios morfológicos que afectan a órganos de las plantas (i.e. hojas de las plantas crasas convertidas en espinas para disminuir la superficie foliar y, por tanto, la transpiración). Por tanto, la búsqueda de los genes que controlan estos caracteres se debe acometer tanto en mutantes cuyo fenotipo se manifieste únicamente en condiciones estresantes como aquellos cuya modificación en ausencia de estrés pueda significar alguna alteración en su comportamiento cuando se vea sometido a salinidad, sequía, etc.

En este apartado se ha incluido la caracterización de diversos mutantes cuyo fenotipo se observa en condiciones control (i.e. sin estrés adicional) pero que podrían estar implicados en diferentes mecanismos de tolerancia a estreses. Se ha llevado a cabo una caracterización fenotípica y genética y, en la mayor parte de los casos, se ha evaluado su comportamiento frente a salinidad y/o estrés hídrico para evaluar cómo afectan los cambios fenotípicos a su nivel de tolerancia. Además, estos mutantes se han ido agrupando por bloques en función de cuál es su fenotipo principal.

En resumen, se presentan cinco mutantes del desarrollo de la parte aérea, tres mutantes variegados y/o cloróticos, cuatro mutantes con alteraciones en los mecanismos de senescencia y/o letalidad y, por último, cinco mutantes que exhiben alteraciones en el sistema radicular, la parte de la planta más importante en la absorción de agua y sales minerales.

4.2.1. Mutantes afectados en el desarrollo de la parte aérea

Las plantas han tenido que desarrollar respuestas adaptativas a un entorno en constante cambio (temperatura, disponibilidad de agua, salinidad, ataque de plagas, enfermedades,...). Al estudiar las relaciones que hay entre los mecanismos del desarrollo y las situaciones estresantes podemos encontrar nuevas estrategias que permitan abordar los efectos negativos que provocan éstas en las plantas. Un ejemplo de esta relación es el mutante el 916 ET MM, severamente afectado en desarrollo de la parte aérea en condiciones de estrés salino. El estudio de otros mutantes afectados en el desarrollo de la parte aérea nos puede ayudar a descubrir algunos de estos mecanismos que permiten adaptarse a las plantas a estas situaciones estresantes.

En este primer apartado se presentan los resultados de la caracterización de cinco líneas que tuvieron algún fenotipo mutante en el desarrollo de la parte aérea de la planta. Las cinco líneas se identificaron como mutantes en el transcurso de esta Tesis. En concreto, las tres primeras se identificaron en el escrutinio *in vitro* bajo condiciones de estrés salino (111 ET GA, 131 ET GA y 2742 ET MM). Otra línea, la 2647 ET MM M1, se identificó durante un experimento de corroboración en TG2 ya que se había seleccionado por haber observado un fenotipo curioso en TG1 que debía comprobarse si se transmitía a la descendencia. La última, la 1458 ET MM, se identificó durante el cultivo de plantas TG2 en el invernadero para realizar la identificación de plantas alteradas en su tolerancia al estrés hídrico.

Mutante 111 ET GA

El primer experimento con esta línea fue el cultivo de semillas TG2 *in vitro* en medio de germinación con sal. Se observaron, después de 30 días de cultivo, plántulas que prácticamente no desarrollaron la parte aérea y en las que no se veía un ápice meristemático como el de las plántulas WT. Esta alteración afectaba también al desarrollo de las hojas, que tenían menor tamaño y forma diferente. Pese a los múltiples cambios observados en la parte aérea de la planta, en ese primer experimento, no se observaron alteraciones destacables en el sistema radicular embrionario (Figura 61).

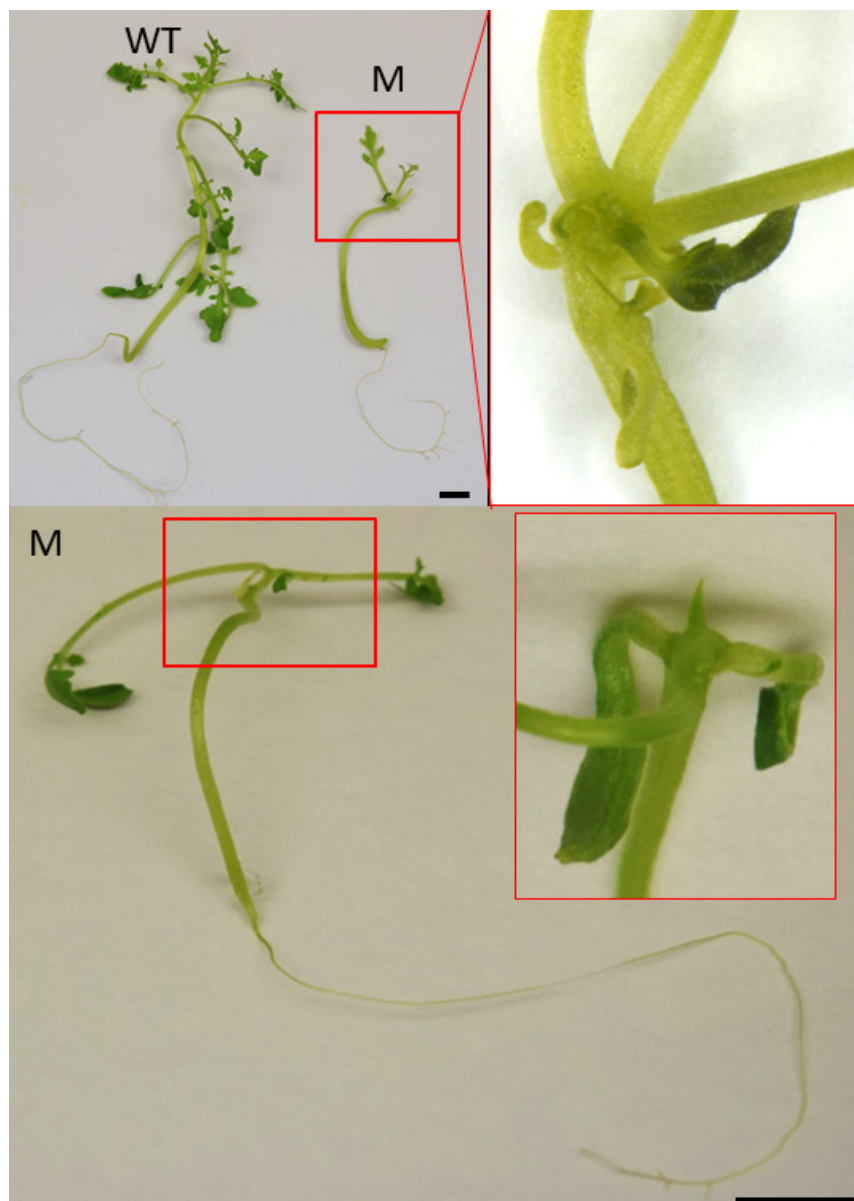


Figura 61. Fenotipo de plántulas procedente de semilla de la línea 111 ET GA después de 30 días en medio de germinación con NaCl 75 mM. La barra representa 1 cm.

Después de detectar el fenotipo mutante en un medio con 75 mM de NaCl, se evaluó la línea en medio de germinación sin NaCl. En esas condiciones, también se identificaron algunas plántulas con fenotipo mutante (Figura 62).



Figura 62. Fenotipo de plántula procedente de semilla de la línea 111 ET GA después de 10 días en medio de germinación. La barra representa 1 cm.

A continuación, se cultivaron ápices meristemáticos de plántulas WT y M en medio básico para ver el desarrollo de las plantas axénicas. La planta mutante presentó un tallo menos elongado, con cambios en su dirección de crecimiento, pero que poco a poco iba normalizando su desarrollo (Figura 63).

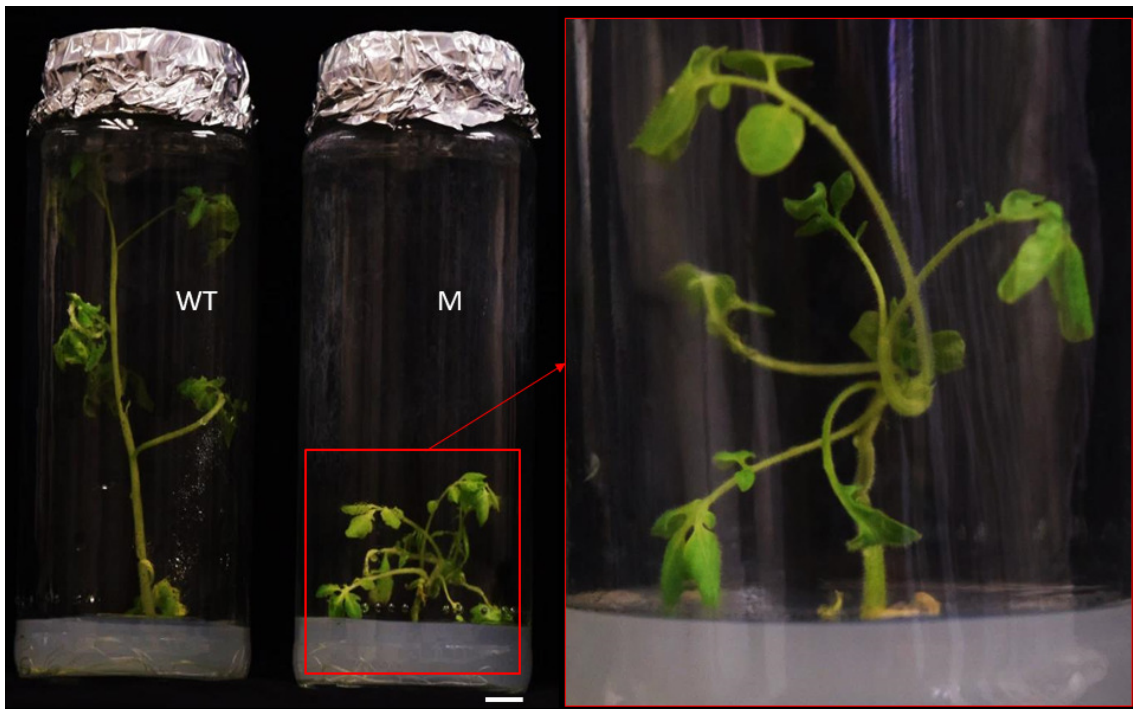


Figura 63. Fenotipo de planta axénica de la línea 111 ET GA después de 20 días en medio básico. La barra representa 1 cm.

Tras diversas clonaciones, la planta mutante presentaba una morfología más similar a una planta WT. Se aclimataron plantas mutantes para conocer su fenotipo *in vivo*. Las plantas mutantes se desarrollaron sin problema, como una planta WT, llegando a producir flores y frutos de los que se obtuvieron descendencias TG3 (Figura 64).



Figura 64. Fenotipo de plántula mutante aclimatada de la línea 111 ET GA después de llegar a etapa adulta. La barra representa 10 cm.

Se evaluaron las progenies obtenidas de las plantas mutantes, tanto *in vitro* como *in vivo*. En cultivo *in vitro*, se observaron alteraciones en el desarrollo del ápice meristemático de las plántulas procedentes de semillas. En sus primeras etapas del desarrollo, los primordios foliares y las hojas diferían del WT (Figura 65).



Figura 65. Parte aérea de plántulas TG3 mutantes de la línea 111 ET GA después de 20 días en medio de germinación. La barra representa 1 cm.

Además, conforme avanzaba el crecimiento de las plantas, se comprobó cómo aparecían algunas estructuras meristemáticas de forma ectópica, es decir, en lugares diferentes al WT. En concreto, se observó el desarrollo de meristemas en zonas del epicótilo (Figura 66).

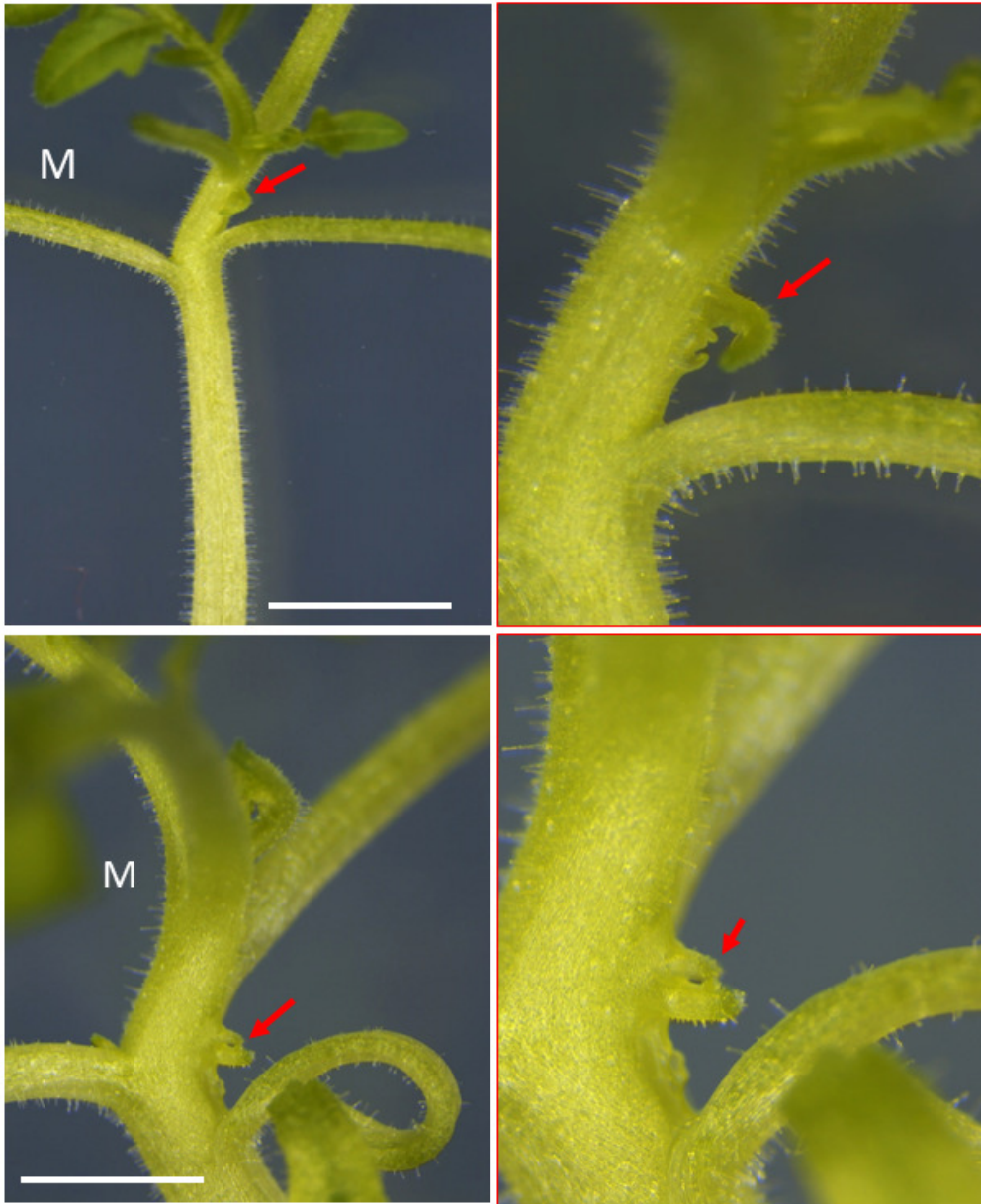


Figura 66. Presencia de meristemas en el epicótilo de plántulas TG3 mutantes de la línea 111 ET GA después de 20 días en medio de germinación. La barra representa 0.5 cm.

En el experimento de cultivo *in vivo* de semillas TG3 mutantes la única alteración observada fue el desplazamiento de algunas yemas axilares respecto de su localización habitual (Figura 67).



Figura 67. Fenotipo de plántula TG3 mutante de la línea 111 ET GA después de 30 días en invernadero. La barra representa 5 cm.

En resumen, esta línea presentaba alteraciones en la parte aérea de la planta, fundamentalmente en las primeras etapas del desarrollo.

Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante

El fenotipo mutante se observó en los dos experimentos llevados a cabo con semillas TG2. Tras hacer la prueba de homogeneidad se comprobó que ambos experimentos se podían estudiar de forma agregada. Al comparar la segregación de los datos acumulados con respecto a los esperados para una mutación monogénica recesiva se concluyó que no había motivos para dudar de que esta hipótesis fuera correcta (Tabla 13).

Tabla 13. Análisis del modo de herencia del mutante 111 ET GA.

	Segregación	WT	M	Total	χ^2
Experimento 1	Observada	13	5	18	0.07
	Esperada (3:1)	13.5	4.5		
Experimento 2	Observada	19	5	24	0.22
	Esperada (3:1)	18.0	6.0		
Datos acumulados ^a	Observada	32	10	42	0.03
	Esperada (3:1)	31.5	10.5		

^a Análisis χ^2 homogeneidad ($\chi^2_H = 0.26$) indica que la muestras son homogéneas ($P > 0.05$; $\chi^2_{1 g.l.} = 3.84$)

Análisis genético del número de insertos T-DNA

En cuanto a la resistencia a la kanamicina, en la TG2 se observó una segregación de 30 plantas resistentes y 12 sensibles. Tras realizar la prueba de χ^2 no había motivos para dudar de que la línea 111 ET GA era portadora de un único inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional (Tabla 14).

Tabla 14. Análisis del número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional de la línea 111 ET GA.

	Segregación	Kan ^R	Kan ^S	Total	χ^2
Experimento1	Observada	12	6	18	0.67
	Esperada (3:1)	13.5	4.5		
Experimento 2	Observada	18	6	24	0.00
	Esperada (3:1)	18.0	6.0		
Datos acumulados ^a	Observada	30	12	42	0.29
	Esperada (3:1)	31.5	10.5		

^a Análisis χ^2 homogeneidad ($\chi^2_H = 0.38$) indica que la muestras son homogéneas ($P > 0.05$; $\chi^2_{2g.l.} = 3.84$)

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

Al analizar los resultados anteriores de forma conjunta se concluyó que no existe cosegregación entre el fenotipo mutante y el inserto de T-DNA con el gen *nptII* funcional, ya que se encontraron cinco plantas mutantes sensibles a la kanamicina (Tabla 15).

Tabla 15. Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 111 ET GA.

	WT		M		Total
	Kan ^R	Kan ^S	Kan ^R	Kan ^S	
Experimento1	11	2	1	4	18
Experimento 2	13	5	5	1	24
Datos acumulados	24	7	6	5	42

Mutante 131 ET GA

Este mutante se identificó en el escrutinio *in vitro* de estrés salino. En concreto, se detectaron plántulas procedentes de semilla con un menor crecimiento en medio de germinación con sal. A continuación se evaluó la línea en medio de germinación sin NaCl y también se observó el fenotipo mutante. En ambos casos las plántulas mutantes presentaron un desarrollo menor de la parte aérea aunque el sistema radicular parecía no verse afectado de forma importante (Figura 68).



Figura 68. Fenotipo de plántula de la línea 131 ET GA después de 35 días en medio de germinación con NaCl (izquierda) y después de 20 días en medio de germinación (derecha). La barra representa 1 cm.

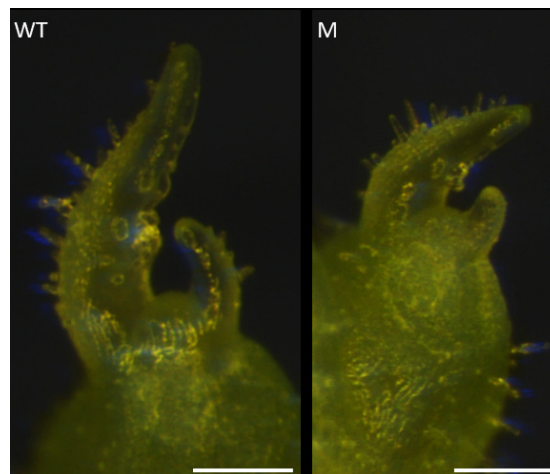


Figura 69. Fenotipo del SAM de la línea 131 ET GA. La barra representa 0.1 mm.

Con la ayuda de una lupa binocular se estudió la morfología y tamaño del SAM, no observando anomalías en el de las plantas mutantes (Figura 69).

Se cultivaron ápices meristemáticos en medio básico para conocer el fenotipo de la planta axénica y, al igual que en las plántulas, se observó menor crecimiento en el mutante. En este caso, el desarrollo radicular adventicio sí era claramente diferente al de las plantas testigo, ya que prácticamente no había raíces secundarias bien desarrolladas en las plantas mutantes (Figura 70).

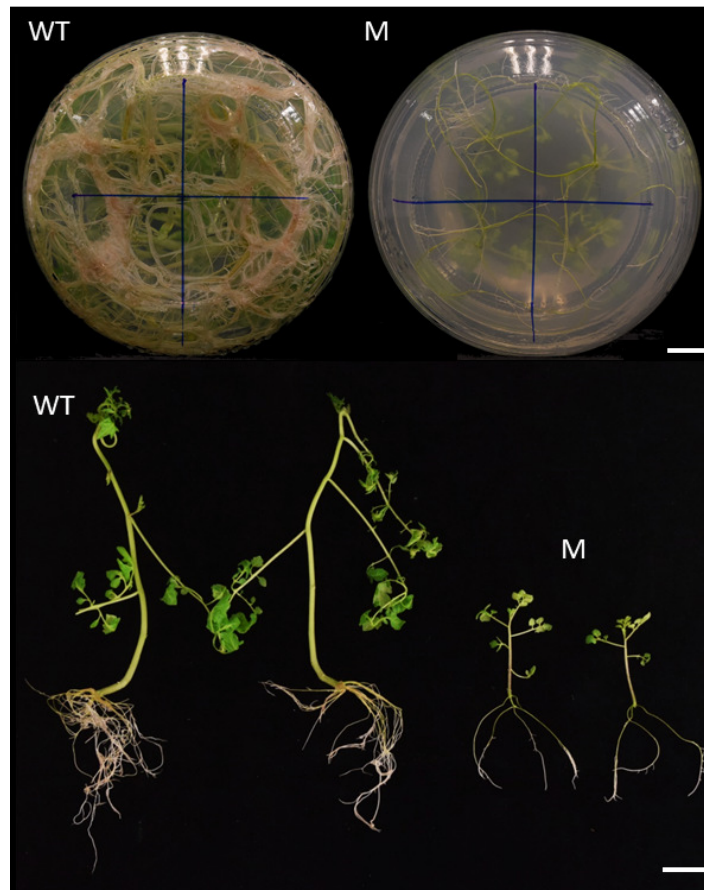


Figura 70. Fenotipo de plantas axénicas de la línea 131 ET GA después de 30 días de cultivo en medio básico. La barra representa 1 cm.

Además de los experimentos llevados a cabo *in vitro*, también se cultivaron semillas para observar el fenotipo de las plántulas crecidas en el invernadero. Tras unos pocos días de cultivo, se vieron las mismas diferencias en el desarrollo que se observaron *in vitro*, es decir, las plantas mutantes no alcanzaban el tamaño de las plantas WT (tallo menos elongado) y las hojas no alcanzaban el tamaño de las del testigo (Figura 71).

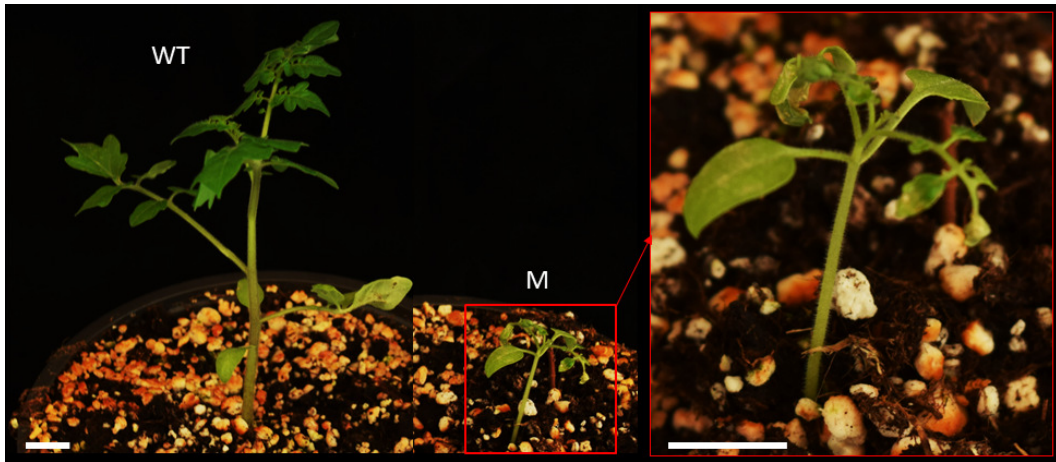


Figura 71. Fenotipo de plantas procedentes de semilla de la línea 131 ET GA después de 25 días en invernadero. La barra representa 1 cm.

A más largo plazo, se vio cómo las diferencias en el desarrollo se mantenían a lo largo de toda la vida de la planta, tanto en la parte aérea como en la raíz (Figura 72).



Figura 72. Fenotipo de plantas procedentes de semilla de la línea 131 ET GA después de 45 y 120 días en invernadero. La barra representa 5 cm.

Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante

Se evaluaron 104 individuos en cuatro experimentos independientes, observando en todos ellos alguna planta con fenotipo mutante. La segregación final fue de 83 WT y 21 mutantes. El análisis χ^2 de los datos acumulados indicó que el fenotipo se debe a una mutación monogénica recesiva (Tabla 16).

Tabla 16. Análisis del modo de herencia del mutante 131 ET GA.

	Segregación	WT	M	Total	χ^2
Experimento 1	Observada	15	4	19	0.16
	Esperada (3:1)	14.3	4.7		
Experimento 2	Observada	31	4	35	3.44
	Esperada (3:1)	26.3	8.7		
Experimento 3	Observada	18	6	24	0.00
	Esperada (3:1)	18.0	6.0		
Experimento 4	Observada	19	7	26	0.05
	Esperada (3:1)	19.5	6.5		
Datos acumulados ^a	Observada	83	21	104	1.28
	Esperada (3:1)	76.0	26.0		

^a Análisis χ^2 homogeneidad ($\chi^2_{H=2.37}$) indica que las muestras son homogéneas ($P>0.05$; $\chi^2_{3\text{ g. l.}} = 7.82$)

Análisis genético del número de insertos T-DNA

En cuanto a la segregación de resistencia a kanamicina, se analizaron 78 individuos obteniendo una segregación de 60 plantas resistentes a la kanamicina frente a 18 sensibles. Con el cálculo de la χ^2 de los datos acumulados se concluyó que la línea 131 ET GA porta un inserto con el gen *nptII* funcional (Tabla 17).

Tabla 17. Análisis del número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional de la línea 131 ET GA.

	Segregación	Kan ^R	Kan ^S	Total	χ^2
Experimento 1	Observada	13	6	19	0.44
	Esperada (3:1)	14.3	4.7		
Experimento 2	Observada	28	7	35	0.22
	Esperada (3:1)	26.3	8.7		
Experimento 3	Observada	19	5	24	0.47
	Esperada (3:1)	18.0	6.0		
Datos acumulados ^a	Observada	60	18	78	0.15
	Esperada (3:1)	58.5	19.5		

^a Análisis χ^2 homogeneidad ($\chi^2_{H=0.97}$) indica que las muestras son homogéneas ($P>0.05$; $\chi^2_{2\text{ g. l.}} = 5.99$)

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

Se comprobó que no existe cosegregación entre el inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional y el fenotipo mutante, ya que se detectaron cinco plantas mutantes sensibles a la kanamicina en los experimentos realizados (Tabla 18).

Tabla 18. Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 131 ET GA.

	WT		M		Total
	Kan ^R	Kan ^S	Kan ^R	Kan ^S	
Experimento1	11	4	2	2	19
Experimento 2	25	6	3	1	35
Experimento 3	15	3	4	2	24
Datos acumulados	51	13	9	5	78

Mutante 2742 ET MM

El mutante 2742 ET MM se identificó en el escrutinio de plántulas TG2 cultivadas en medio de germinación con NaCl. Tras 15 días de cultivo se observaron algunas plántulas con las hojas enrolladas y arrugadas. El ápice y el sistema radicular no presentaban alteraciones evidentes (Figura 73).



Figura 73. Fenotipo de plántula de la línea 2742 ET MM en medio de germinación salino después de 15 días. La barra representa 1 cm.

Se realizó la evaluación en medio de germinación sin NaCl y se observó también el fenotipo mutante, aunque en estas condiciones el fenotipo apareció a partir de los 30 días de cultivo (Figura 74).



Figura 74. Fenotipo de plántula de la línea 2742 ET MM después de 30 días en medio de germinación. La barra representa 1 cm.

Se cultivaron los ápices meristemáticos en medio básico para conocer el fenotipo de la planta axénica. De nuevo, se observó la formación de hojas arrugadas y el tallo crecía con un cierto grado de curvatura. Sin embargo, el sistema radicular parecía normal (Figura 75).



Figura 75. Fenotipo de planta axénica mutante de la línea 2742 ET MM tras 30 días de cultivo en medio básico. La barra representa 1 cm.

Se cultivaron semillas TG2 en macetas en el invernadero para conocer el fenotipo *in vivo*. Se observó un desarrollo más lento de las plantas con fenotipo mutante. Las hojas tenían un aspecto arrugado desde los primeros días de desarrollo (Figura 76).



Figura 76. Fenotipo de planta de semilla de la línea 2742 ET MM después de 22 días de cultivo en el invernadero. La barra representa 5 cm.

Las plantas mutantes se desarrollaron hasta la etapa adulta alcanzando el tamaño de una planta WT y durante todo el periodo de crecimiento las hojas seguían con una morfología anómala (Figura 77).



Figura 77. Fenotipo de planta adulta (izquierda) y de hojas (derecha) de la línea 2742 ET MM cultivada en el invernadero. La barra representa 10 cm.

Respecto al desarrollo floral, se observaron anomalías en las flores desde las primeras etapas del desarrollo (Figura 78).

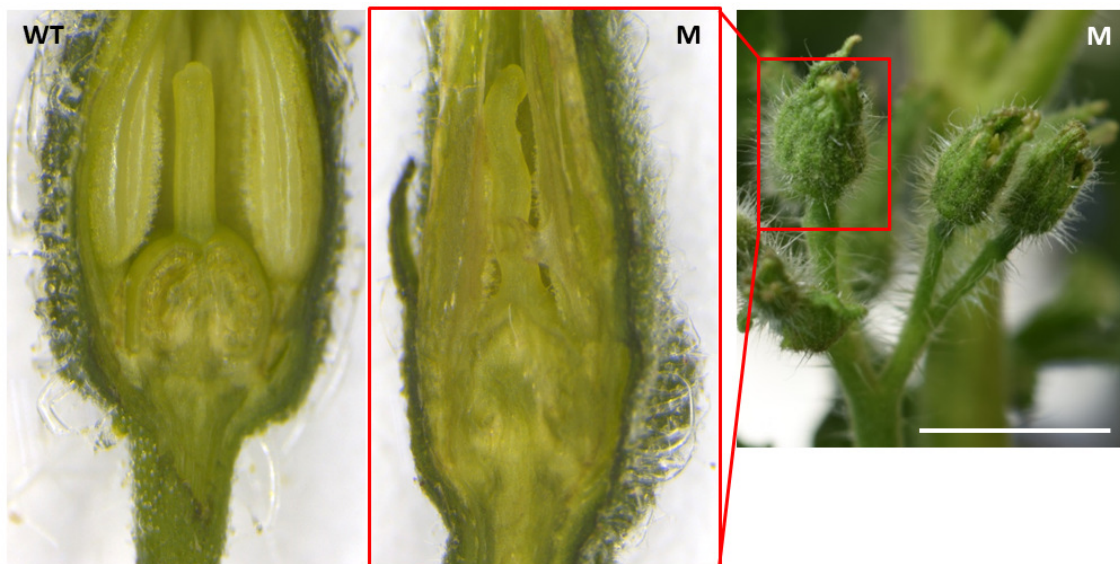


Figura 78. Fenotipo de botones florales de la línea 2742 ET MM. La barra representa 1 cm.

Los sépalos de los botones florales tenían un aspecto rugoso, las anteras eran diferentes a las del WT, el estilo presentaba curvatura y el ovario era algo más alargado. En las flores en etapa de preantesis se observó un engrosamiento en la zona del ovario que indicaba un cuajado independiente de la polinización (Figura 79).

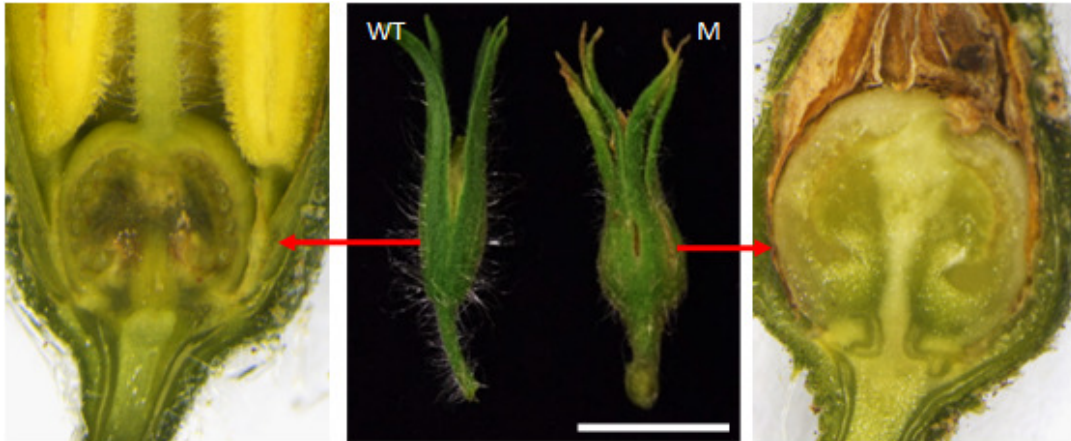


Figura 79. Fenotipo de flores en preantesis de la línea 2742 ET MM. La barra representa 1 cm.

En las primeras etapas del desarrollo del fruto se observó que los pétalos se quedaban adheridos al fruto (Figura 80). En las etapas de fruto verde inmaduro y verde maduro la cutícula era muy rugosa, lo que quizá explica la tendencia al agrietado de una buena parte de los frutos. Algunos de ellos alcanzaban un calibre similar a los de WT y maduraban normalmente. Aún así, estos frutos, que tenían mayor número de lóculos, no dieron semillas TG3 (Figura 81).

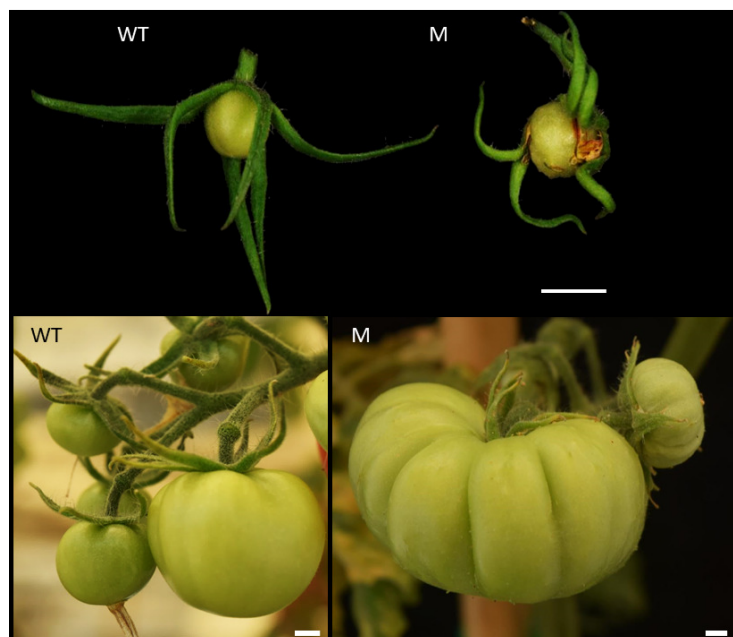


Figura 80. Fenotipo de frutos en diferentes momentos del desarrollo de la línea 2742 ET MM. La barra representa 1 cm.

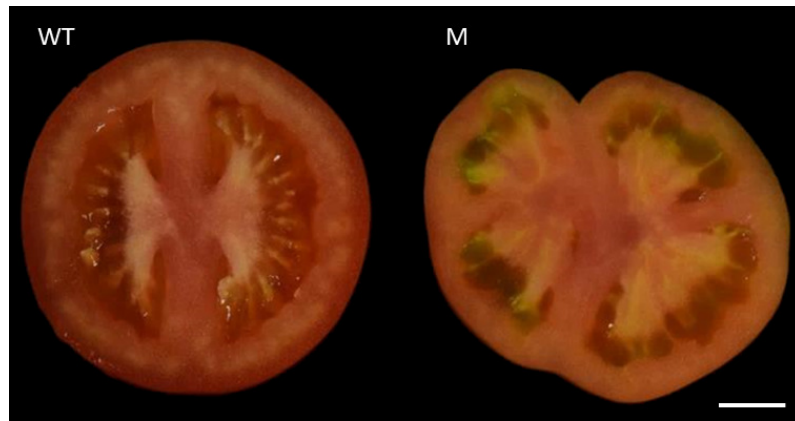


Figura 81. Fenotipo de frutos maduros de la línea 2742 ET MM. La barra representa 1 cm.

Se realizaron injertos entre plantas WT y mutantes. El resultado indicó que el fenotipo mutante sólo se observaba en las plantas con la parte aérea mutante (Figura 82). No obstante, cuando la planta tenía el sistema radicular mutante y la parte aérea WT, el desarrollo de la parte aérea, de aspecto WT, era inferior al observado en el injerto WT sobre WT, lo que indica que, pese a que la raíz del mutante no parecía distinto al del WT (Figura 75), su sistema radicular no funciona con absoluta normalidad.

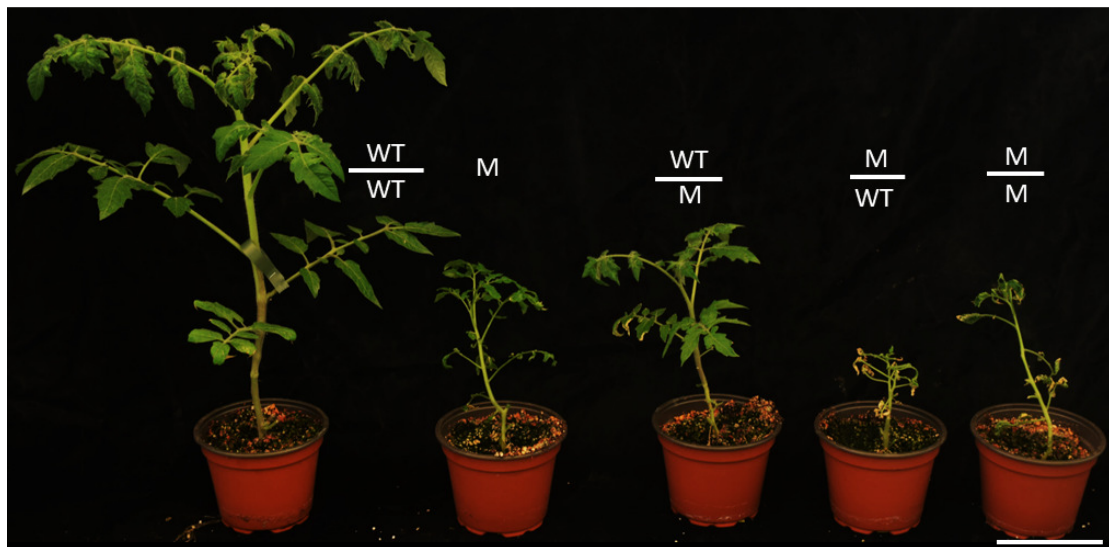


Figura 82. Fenotipo de injertos de la línea 2742 ET MM después de 30 días de cultivo en el invernadero. La barra representa 10 cm.

Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante

Se realizaron tres experimentos para analizar un total de 94 plantas TG2. Tras comprobar que los datos se podían estudiar de forma conjunta, el análisis χ^2 indicó que no había motivos para dudar de un modelo de herencia monogénica recesiva (Tabla 19).

Tabla 19. Análisis del modo de herencia del mutante 2742 ET MM.

	Segregación	WT	M	Total	χ^2
Experimento 1	Observada	21	7	28	0.00
	Esperada (3:1)	21.0	7.0		
Experimento 2	Observada	17	4	21	0.40
	Esperada (3:1)	15.7	5.3		
Experimento 3	Observada	37	8	45	1.25
	Esperada (3:1)	33.7	11.3		
Datos acumulados ^a	Observada	75	19	94	1.15
	Esperada (3:1)	70.5	23.5		

^a Análisis χ^2 homogeneidad ($\chi^2_H=0.50$) indica que las muestras son homogéneas ($P>0.05$; $\chi^2_{2 g. l.}=5.99$)

Análisis genético del número de insertos T-DNA

En cuanto a la resistencia a la kanamicina, se realizaron dos experimentos independientes. De un total de 49 individuos se obtuvo una segregación de 34 resistentes y 15 sensibles. El análisis de χ^2 de estos datos acumulados indicó que no había motivos para dudar de que la línea 2742 ET MM porte un único inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional (Tabla 20).

Tabla 20. Análisis del número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional de la línea 2742 ET MM.

	Segregación	Kan ^R	Kan ^S	Total	χ^2
Experimento1	Observada	21	7	28	0.00
	Esperada (3:1)	21.0	7.0		
Experimento 2	Observada	13	8	21	1.92
	Esperada (3:1)	15.7	5.3		
Datos acumulados ^a	Observada	34	15	49	0.82
	Esperada (3:1)	36.7	12.3		

^a Análisis χ^2 homogeneidad ($\chi^2_H=1.10$) indica que las muestras son homogéneas ($P>0.05$; $\chi^2_{1 g. l.}=3.84$)

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

Se comprobó que no existía cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante en la línea 2742 ET MM, debido a que se observaron cuatro plantas mutantes sensibles a kanamicina (Tabla 21).

Tabla 21. Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 2742 ET MM.

	WT		M		Total
	Kan ^R	Kan ^S	Kan ^R	Kan ^S	
Experimento1	17	4	4	3	28
Experimento 2	10	7	3	1	21
Datos acumulados	27	11	7	4	49

Como los cruces de planta mutante con *S. pimpinellifolium* no dieron semillas, se realizó el cruce con una planta WT sensible a la kanamicina cuya descendencia segregaba para el fenotipo mutante, es decir, la planta era hemicigótica para la mutación. Se obtuvieron semillas F1 y, a partir de algunas de ellas, las correspondientes progenies F2. Se realizó la evaluación fenotípica en varias F2 y en una de ellas se obtuvieron plantas WT y M (Figura 83). Se han congelado suficientes muestras de estas plantas para llevar a cabo la identificación del gen mediante mapeo posicional y secuenciación NGS en un futuro próximo.



Figura 83. Fenotipo de plantas F2 de la línea 2742 ET MM después de 30 días de cultivo en el invernadero. La barra representa 10 cm.

Mutante 2647 ET MM M1

Al cultivar en el invernadero la planta TG1 de la línea 2647 ET MM, se observó la formación de brotes adventicios en los nervios de algunas hojas, siendo el resto de caracteres similares a los del WT. Además, al realizar la evaluación *in vitro* de las plantas TG2 se observaron dos fenotipos mutantes. El primero, denominado M1, mostraba una alteración en el ápice, mientras que el segundo, denominado M2, exhibía alteraciones en las hojas y el sistema radicular. En este apartado se explican los resultados y caracterización del fenotipo M1.

Se identificó el fenotipo mutante M1 en plántulas cultivadas en medio de germinación durante 30 días. Se observaron plántulas en las que aparecía una zona necrótica a pocos milímetros del ápice impidiendo que la plántula siguiera creciendo. Se vio que esto ocurría tras la formación de las primeras hojas, cuya morfología y tamaño eran similares a las de las plántulas WT, al igual que pasaba con las raíces (Figura 84).

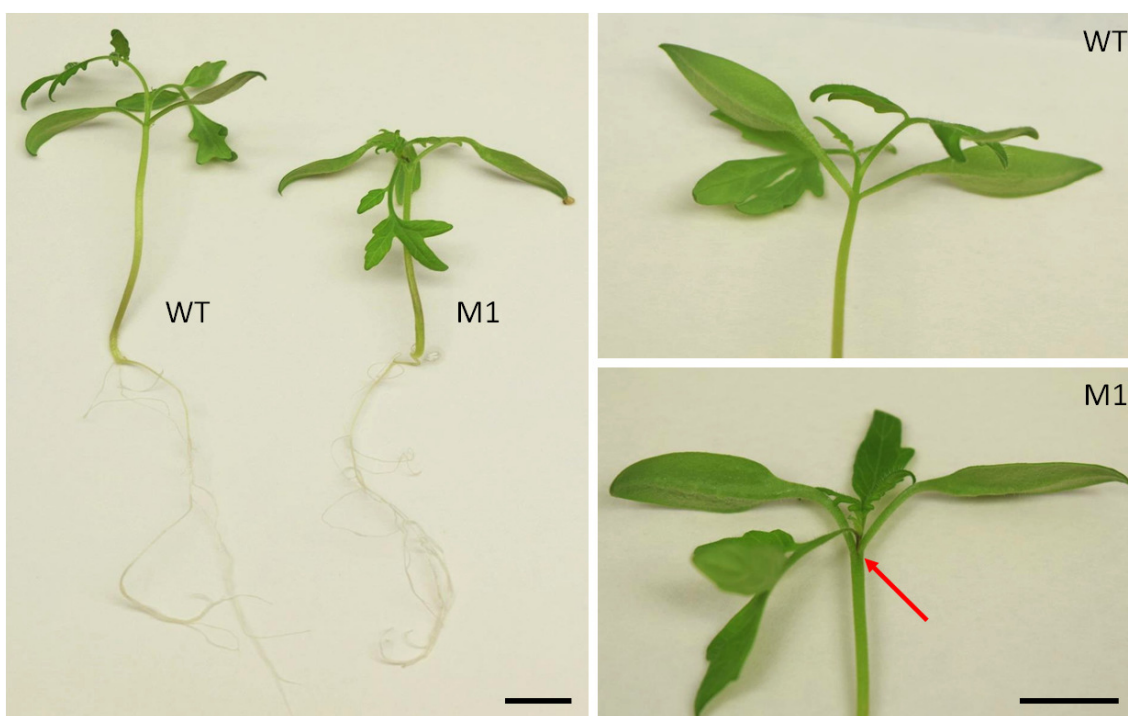


Figura 84. Fenotipo de plántula del mutante M1 de la línea 2647 ETMM en medio de germinación después de 30 días. La flecha indica la zona necrosada. La barra representa 1 cm.

Para conocer el fenotipo de la planta axénica se cultivaron semillas TG2 en medio de germinación y se subcultivó el ápice meristemático a medio básico cuando las plántulas tenían siete días y aun no se veía la necrosis en el ápice. En las plantas axénicas el ápice también se necrosaba tras desarrollarse las primeras dos hojas de la planta, lo cual detenía su crecimiento (Figura 85).

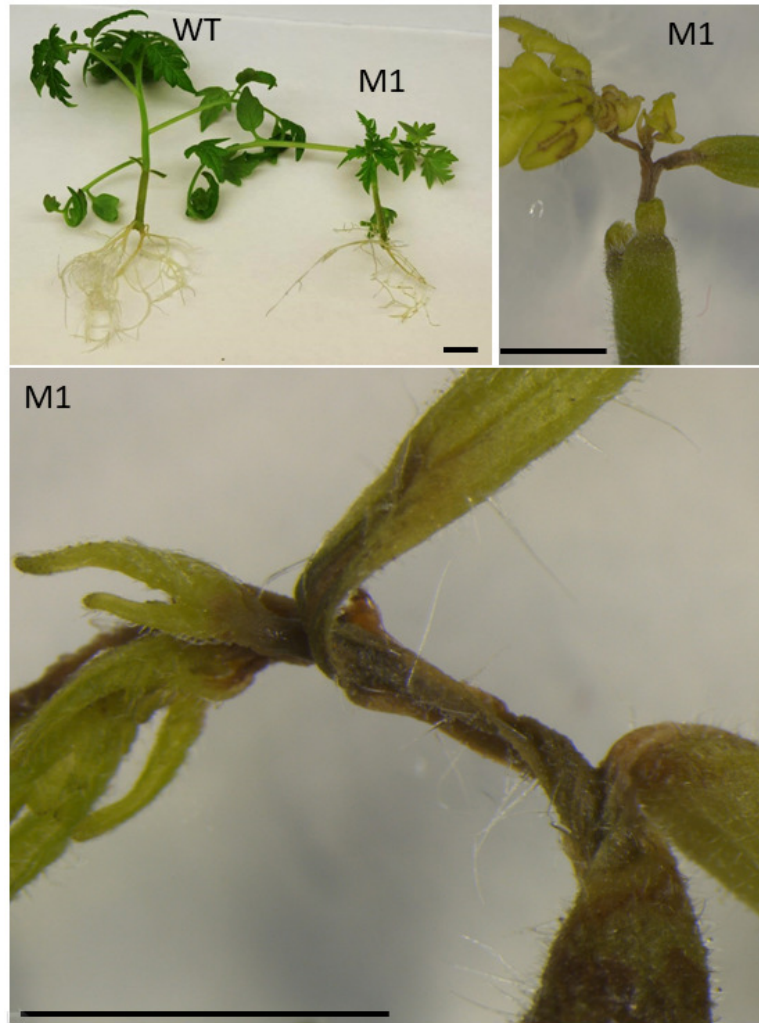


Figura 85. Fenotipo de planta axénica del mutante M1 de la línea 2647 ETMM en medio básico después de 20 días. La barra representa 5 mm.

En cuanto al sistema radicular de la planta axénica mutante, se apreciaron dificultades para que los primordios de las raíces secundarias se desarrollaran normalmente (Figura 86).



Figura 86. Sistema radicular de planta axénica del mutante M1 de la línea 2647 ETMM. La barra representa 1 cm.

Para evaluar mejor el fenotipo *in vivo* se cultivaron semillas TG2 en el invernadero. Los primeros días de desarrollo no se observó ninguna planta con fenotipo mutante. Tras 20 días de cultivo algunas plantas presentaron dos hojas totalmente expandidas por debajo de las cuales comenzó a aparecer una zona de necrosis. A continuación, el tallo que quedaba por debajo de esa zona empezó a engrosar y el ápice a perder turgencia. Finalmente, unos días después de haberse iniciado este proceso, el ápice colapsó y la parte aérea de la planta dejó de crecer (Figura 87).



Figura 87. Plantas mutantes M1 de la línea 2647 ET MM procedentes de semillas TG2 tras 20, 22 y 30 días de cultivo en el invernadero. La barra representa 5 cm.

Tras la necrosis del ápice terminal, algunas plantas mutantes activaron la formación de brotes a partir de alguna de las yemas axilares que estaban por debajo de la zona de necrosis. A los pocos días de iniciar su desarrollo, el brote axilar sufría un proceso similar al experimentado en la parte terminal del tallo, llegando a colapsar como le ocurría al ápice meristemático. Como resultado de este proceso las plantas mutantes no podían mantener un crecimiento vegetativo suficiente y acababan por morir de forma temprana (Figura 88).

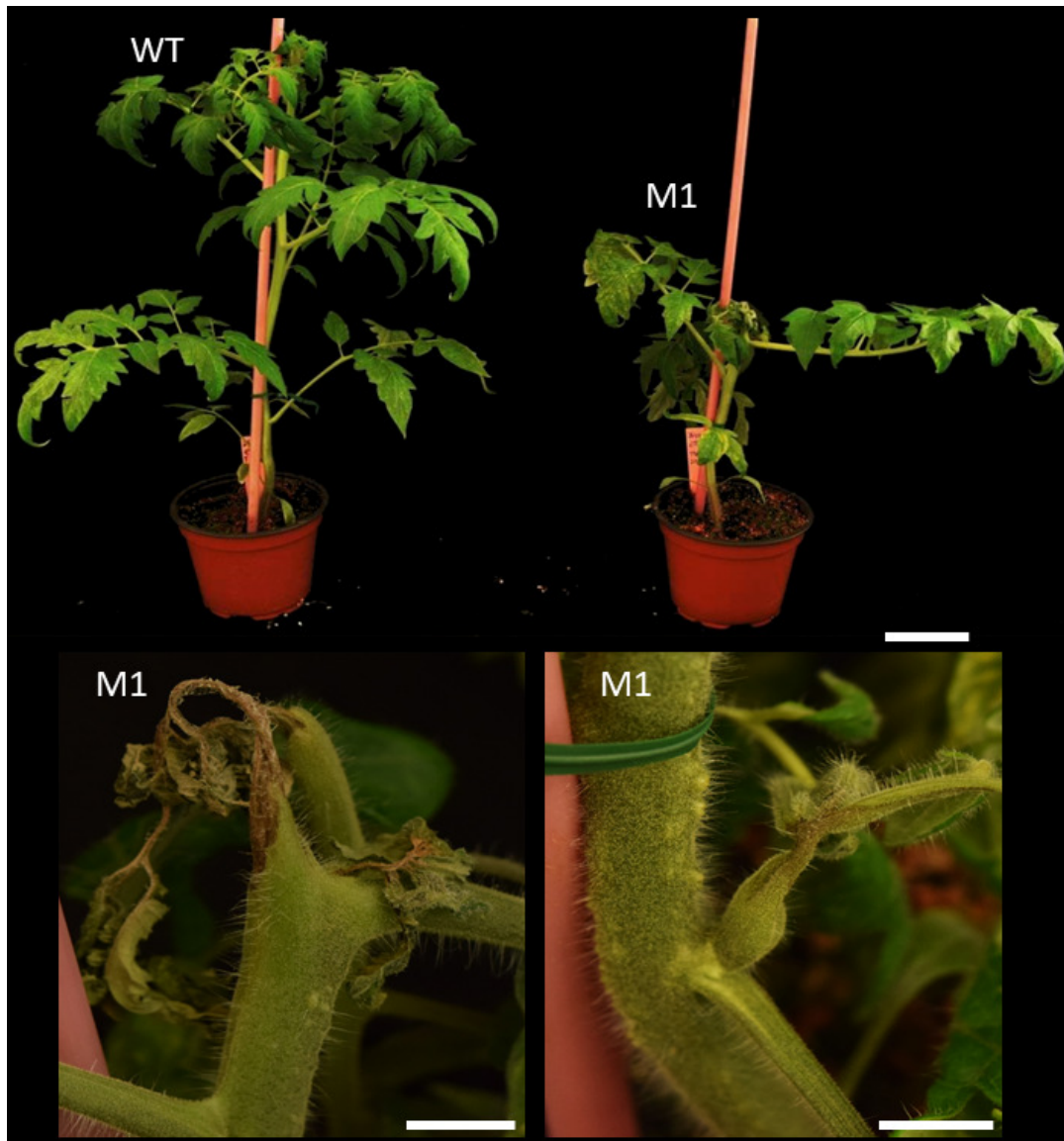


Figura 88. Fenotipo de plantas de la línea 2647 ET MM tras 30 días de cultivo en el invernadero. Detalle de ápice meristemático (abajo a la izquierda) y yema axilar (abajo a la derecha) de una planta mutante M1. La barra representa 5 cm (arriba) y 1 cm (abajo).

Las plantas M1 fueron incapaces de desarrollar flores y frutos debido a las alteraciones que producía la mutación.

Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante

Se realizaron tres experimentos *in vitro* y uno *in vivo* y en todos ellos se observó el fenotipo mutante. El análisis de homogeneidad indicó que las muestras eran homogéneas y se podían tratar de forma agregada. Sin embargo, el análisis de los datos acumulados no se ajustó a la segregación esperada para una mutación monogénica recesiva (3 WT : 1 M) (Tabla 22).

Tabla 22. Análisis del modo de herencia de de la línea 2647 ET MM M1.

	Segregación	WT	M	Total	χ^2
Experimento 1	Observada	22	6	28	0.19
	Esperada (3:1)	21.0	7.0		
Experimento 2	Observada	35	5	40	3.33
	Esperada (3:1)	30.0	10.0		
Experimento 3	Observada	48	6	54	5.56
	Esperada (3:1)	40.5	13.5		
Experimento 4	Observada	21	1	22	4.91
	Esperada (3:1)	16.5	5.5		
Datos acumulados ^a	Observada	126	18	144	12.00
	Esperada (3:1)	108.0	36.0		

^a Análisis χ^2 homogeneidad ($\chi^2_H = 1.99$) indica que las muestras son homogéneas ($P > 0.05$; $\chi^2_{3 g.l.} = 7.82$)

Como puede verse en la Tabla 22, la falta de ajuste a la segregación 3 WT : 1 M se debe en todos los casos a que hay menos plantas mutantes de lo esperado. La explicación más probable para este caso es que exista cierta subletalidad asociada al fenotipo mutante.

Análisis genético del número de insertos T-DNA

El análisis genético del número de insertos de T-DNA basado en la evaluación de la resistencia a la kanamicina no se ajustaba a una hipótesis de un único inserto con el gen *nptII* funcional. Por tanto, se realizaron los cálculos para una segregación de 15 Kan^R : 1 Kan^S y los resultados indicaron no hay motivos para dudar de que esta línea porte dos insertos de T-DNA con el gen *nptII* funcional (Tabla 23).

Tabla 23. Análisis del número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional para la línea 2647 ET MM.

	Segregación	Kan^R	Kan^S	Total	χ^2
Experimento 1	Observada	36	4	40	4.80
	Esperada (3:1)	30.0	10.0		
	Esperada (15:1)	37.5	2.5		
Experimento 2	Observada	50	4	54	8.91
	Esperada (3:1)	40.5	13.5		
	Esperada (15:1)	50.6	3.4		
Datos acumulados ^a	Observada	86	8	94	13.63
	Esperada (3:1)	70.5	23.5		
	Esperada (15:1)	88.1	5.9		

^a Análisis χ^2 homogeneidad ($\chi^2_H = 0.26$) indica que las muestras son homogéneas ($P > 0.05$; $\chi^2_{1 g.l.} = 3.84$)

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

Para determinar la existencia o ausencia de cosegregación se aclimataron seis plantas TG2 WT Kan^S y se analizó su descendencia. En tres de estas líneas se observaron plantas de fenotipo mutante M1 (4, 2 y 1 plantas en cada línea) por lo que se concluyó que no existe cosegregación entre un inserto de T-DNA con el gen *nptII* funcional y el fenotipo mutante M1.

Mutante 1458 ET MM

Este mutante se identificó durante el escrutinio *in vivo* para identificar líneas afectadas en su nivel de tolerancia al estrés hídrico a partir de semillas TG2. Habida cuenta de que el fenotipo mutante se observó desde las primeras etapas de crecimiento de las plantas, no se aplicó el tratamiento de estrés y se procedió a caracterizar dicho fenotipo. Las plantas mutantes tenían la parte aérea alterada, crecían menos y las hojas presentaban distintas alteraciones. En los cortes histológicos de algunos folíolos de estas hojas con morfología alterada se observó que presentaban dos haces vasculares en el nervio central además de un mayor grosor del limbo (Figura 89).

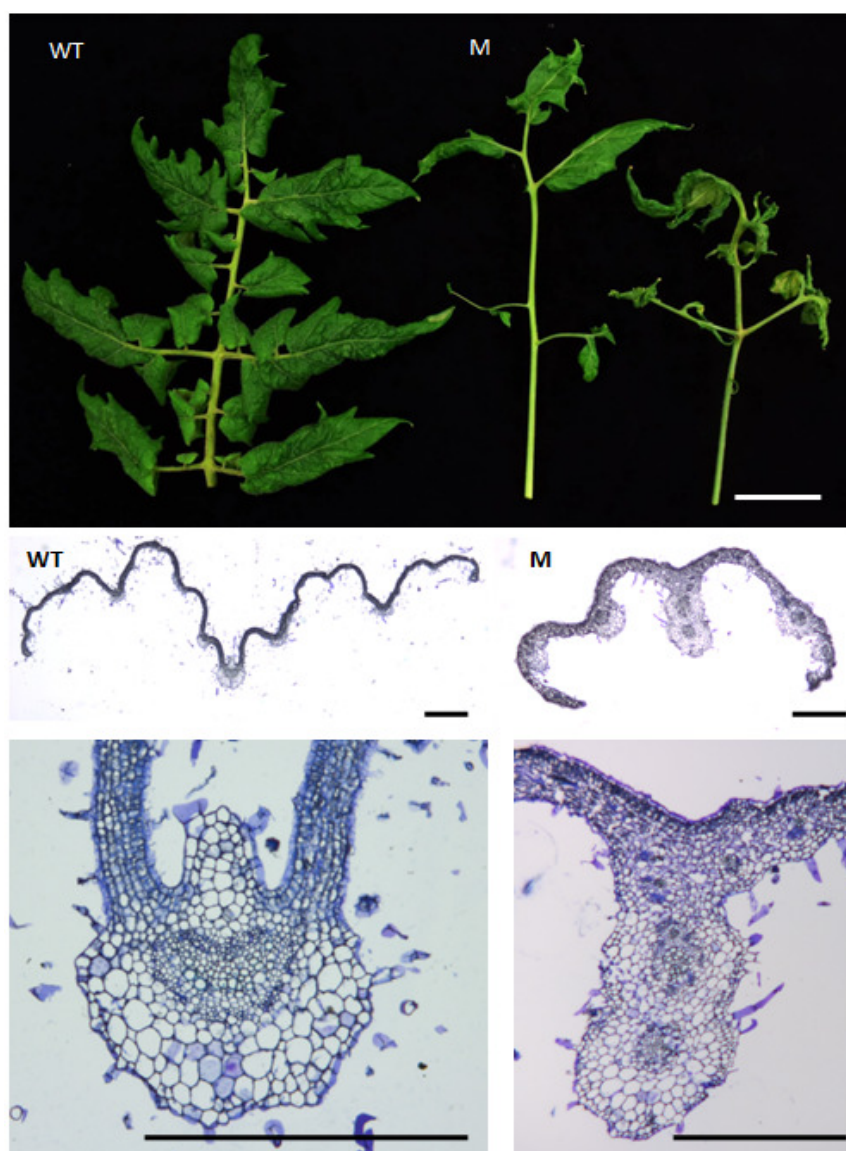


Figura 89. Fenotipo de hojas y cortes histológicos de folíolos de la línea 1458 ET MM de plantas cultivadas en invernadero. La barra representa 5 cm y 500 μ m.

Conforme avanzaba el desarrollo de las plantas las alteraciones se hacían más intensas. Si las hojas basales mostraban algunas alteraciones respecto al WT, las hojas apicales que aparecían en ese momento tenían una morfología completamente filiforme (Figura 90).

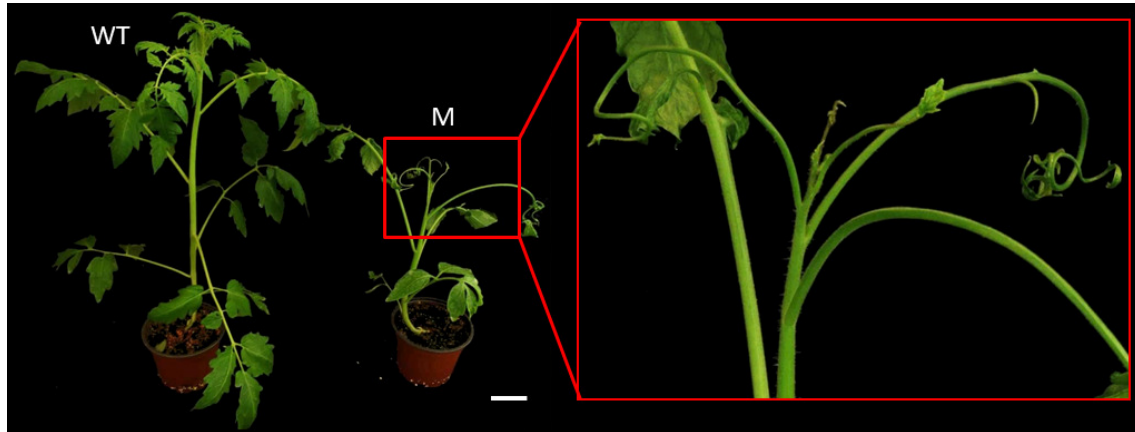


Figura 90. Fenotipo de plantas de la línea 1458 ET MM cultivadas en el invernadero durante 30 días. La barra representa 5 cm.

Al continuar su desarrollo se observó que, pese a las alteraciones comentadas, las plantas mutantes formaron algunas flores aisladas en el ápice de morfología similar a las WT (Figura 91).

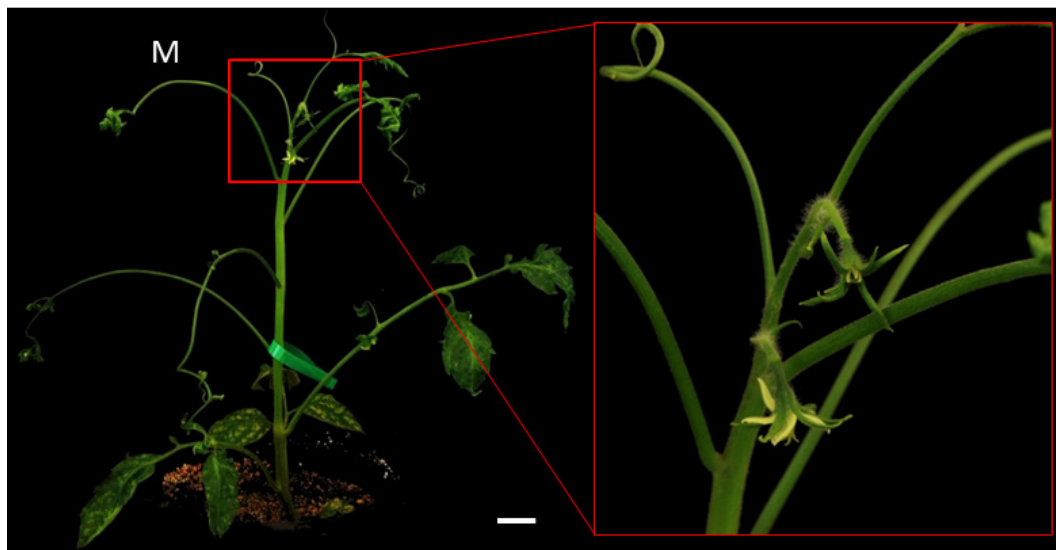


Figura 91. Fenotipo de plantas de la línea 1458 ET MM cultivadas en el invernadero durante 50 días. La barra representa 5 cm.

En la parte final del ciclo de cultivo de estas plantas, se desarrollaron algunos frutos, de tamaño similar al WT, algo acostillados, con alteraciones en su epidermis, pero que llegaron a madurar y dar bastantes semillas (Figura 92).



Figura 92. Fenotipo de planta y fruto mutante de la línea 1458 ET MM. La barra representa 5 cm.

Al realizar las podas de los brotes laterales durante el cultivo de estas plantas en el invernadero, se observó la formación de brotes adventicios en las zonas de corte de los tallos (Figura 93).

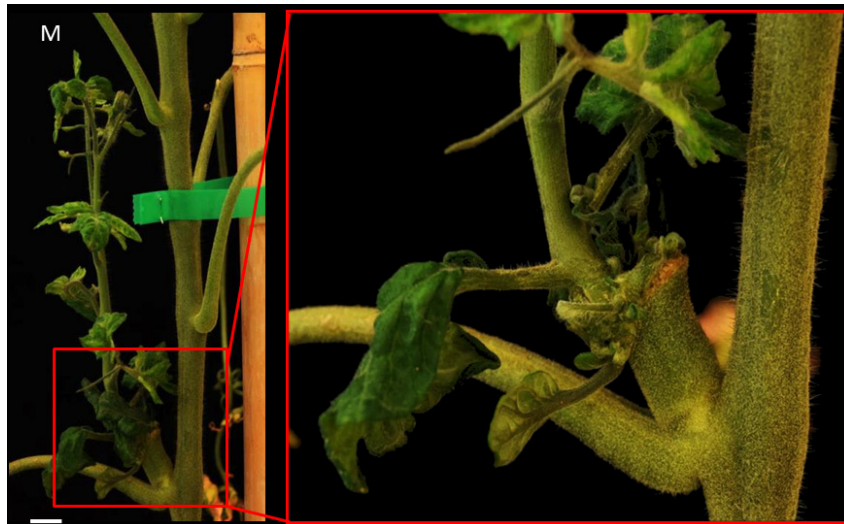


Figura 93. Formación de brotes a partir de zonas de corte de la línea 1458 ET MM *in vivo*. La barra representa 1 cm.

Se estudió esta nueva característica en cultivo *in vitro* por las implicaciones que podría tener la capacidad de regeneración adventicia del mutante. Se comprobó que en plantas axénicas mutantes obtenidas a partir de la esterilización de semillas TG2 también aparecía este fenotipo. Tras varios subcultivos se vio que en algunas zonas de corte de los explantes se formaba un pequeño callo y, a partir de él, se producía la regeneración de nuevos brotes adventicios (Figura 94).

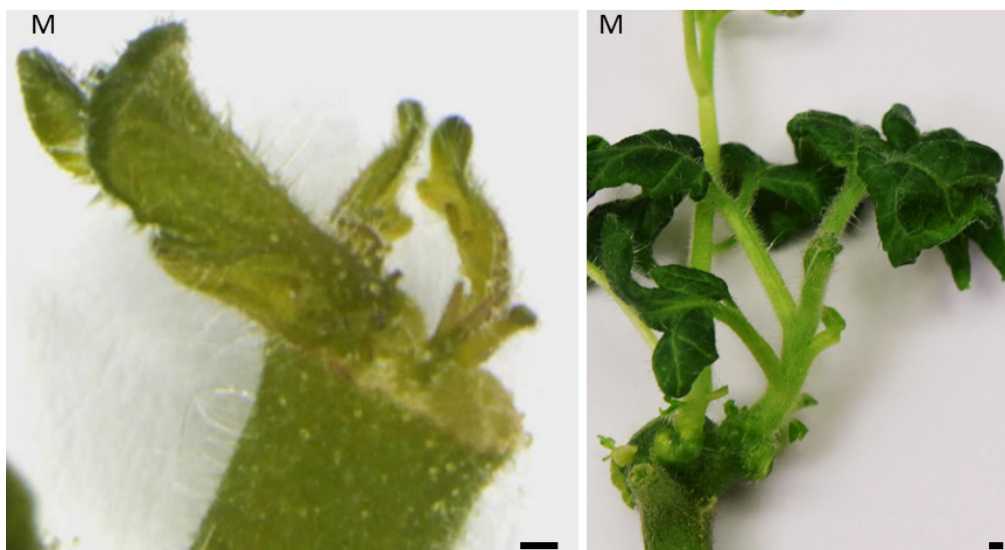


Figura 94. Formación de yemas y brotes adventicios en zonas de corte de plantas axénicas de la línea 1458 ET MM cultivadas en medio básico. La barra representa 1 mm.

Para comprobar que el fenotipo observado *in vitro* era el mismo que se había detectado en el invernadero, se aclimataron plantas catalogadas como mutantes *in vitro* (Figura 95).



Figura 95. Fenotipo de planta mutante aclimatada de la línea 1458 ET MM. La barra representa 10 cm.

Tras confirmar que el fenotipo observado *in vivo* e *in vitro* corresponden a la misma mutación, se analizó la ploidía de algunas plantas regeneradas *in vitro* de forma adventicia a partir de zonas de corte del tallo. Como era de esperar, se detectaron algunas plantas tetraploides dado su origen adventicio. En concreto, de 17 plantas analizadas, se detectaron 3 plantas tetraploides (Figura 96).



Figura 96. Planta mutante tetraploide de la línea 1458 ET MM. La barra representa 10 cm.

Además, también se reintrodujeron *in vitro* algunos explantes de las plantas mutantes cultivadas en el invernadero. En estos explantes se reprodujo el fenotipo observado anteriormente y se obtuvieron brotes adventicios a partir de las zonas de corte. Además, se comprobó cómo algunas yemas axilares tenían alterado su desarrollo temprano lo cual impedía su crecimiento normal (Figura 97).

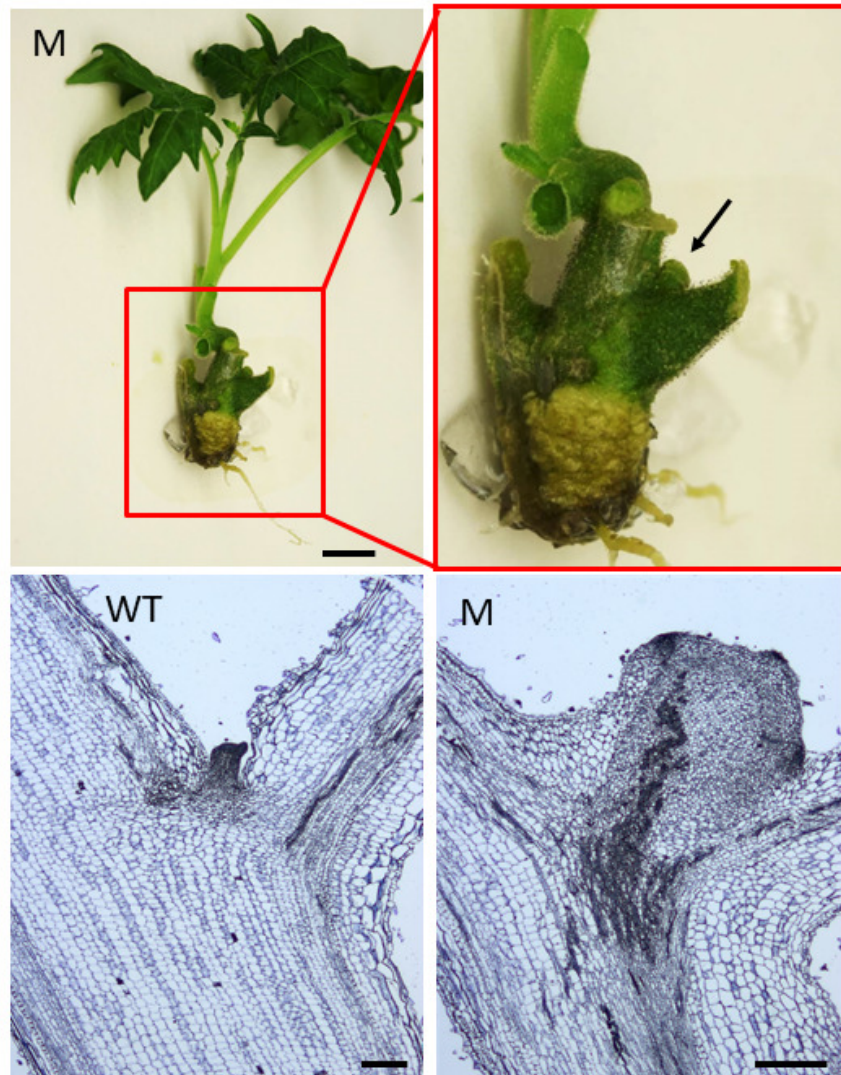


Figura 97. Yema axilar de planta mutante de la línea 1458 ET MM. En la parte superior se muestra un explante nodal reintroducido *in vitro* y cultivado en medio básico. La flecha muestra la morfología anómala del meristemo axilar. En la parte inferior se muestran cortes histológicos de una yema axilar WT y una mutante. La barra representa 1 cm (arriba) y 100 μm (cortes histológicos).

Por las implicaciones que presenta este mutante en aspectos relacionados con la regeneración y morfogénesis, se ha analizado el contenido hormonal endógeno. En la Figura 98 se representa el contenido relativo de las tres citoquininas analizadas respecto de su testigo correspondiente.

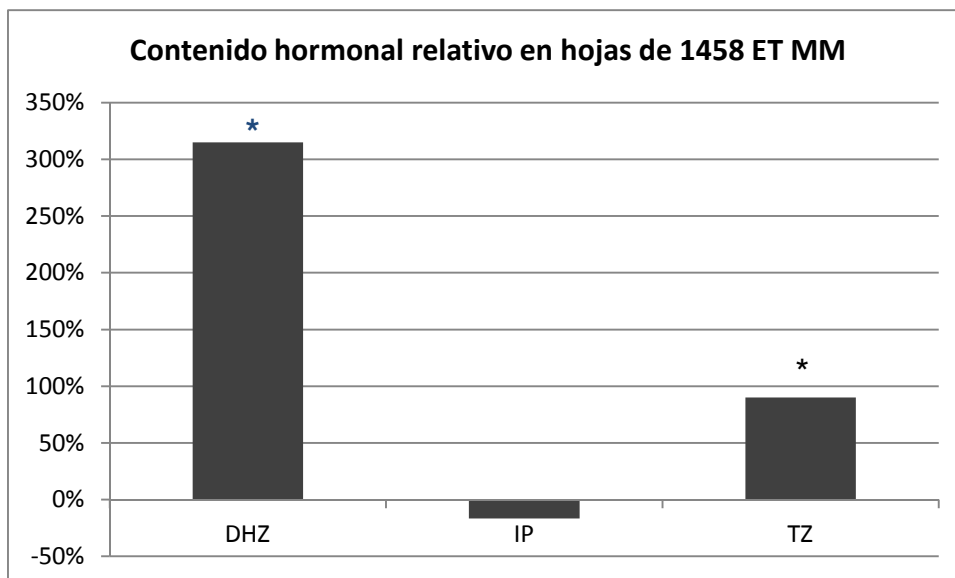


Figura 98. Contenido hormonal endógeno en hojas de plantas mutantes de la línea 1458 ET MM. Se representa la diferencia relativa del mutante respecto del WT de cada hormona analizada ((M-WT)/WT). DHZ = dihidrozeatina; IP = 2-isopentenil-adenina; TZ = trans-zeatina. El asterisco representa que existe diferencia significativa (test t: $P < 0,05$) entre la media de la concentración del WT y del mutante.

Como puede verse, el contenido de dos de las tres citoquininas analizadas (dihidrozeatina y trans-zeatina) es significativamente superior al del WT. En estudios posteriores se intentará averiguar cómo está relacionado este incremento de contenido endógeno de citoquininas con el fenotipo mutante.

Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante

Se realizaron dos experimentos para analizar el modo de herencia del fenotipo mutante, uno *in vivo* y otro *in vitro*, con un total de 98 individuos TG2 de la línea 1458 ET MM. Se observaron 75 plantas de fenotipo WT y 23 mutantes. El análisis χ^2 de los datos acumulados indicó que no había motivos para dudar de un modelo de herencia monogénica recesiva para esta línea (Tabla 24).

Tabla 24. Análisis del modo de herencia del mutante 1458 ET MM.

	Segregación	WT	M	Total	χ^2
Experimento 1	Observada	18	5	23	0.13
	Esperada (3:1)	17.3	5.7		
Experimento 2	Observada	57	18	75	0.04
	Esperada (3:1)	56.3	18.7		
Datos acumulados^a	Observada	75	23	98	0.12
	Esperada (3:1)	73.5	24.5		

^a Análisis χ^2 homogeneidad ($\chi^2_{H=0.05}$) indica que las muestras son homogéneas ($P > 0.05; \chi^2_{1 g. l.} = 3.84$)

Análisis genético del número de insertos T-DNA

En lo que respecta a la resistencia a la kanamicina de las plantas cultivadas en el experimento *in vitro*, se observó una segregación de 51 plantas resistentes y 24 plantas sensibles. Al realizar el análisis de χ^2 se concluyó que la línea 1458 ET MM porta un inserto con el gen *nptII* funcional (Tabla 25).

Tabla 25. Análisis del número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional de la línea 1458 ET MM.

	Segregación	Kan ^R	Kan ^S	Total	χ^2
Experimento1	Observada Esperada (3:1)	51 56.3	24 18.7	75	1.96

^a Análisis χ^2 ($P > 0.05$; $\chi^2_{1 \text{ g. l.}} = 3.84$)

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

Se comprobó que no existe cosegregación entre el inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional y el fenotipo mutante en la línea 1458 ET MM, ya que se observaron cuatro plantas mutantes sensibles a la kanamicina (Tabla 26).

Tabla 26. Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 1458 ET MM.

	WT		M		Total
	Kan ^R	Kan ^S	Kan ^R	Kan ^S	
Experimento1	37	20	14	4	75

Al comprobar que no existía cosegregación, se realizaron cruces entre plantas mutantes y plantas de *S. pimpinellifolium*. Se obtuvieron semillas F2 de ese cruce y se realizó la evaluación fenotípica de estas plantas. Tras su cultivo en el invernadero se identificaron plantas WT y plantas mutantes en este cruce (Figura 99).

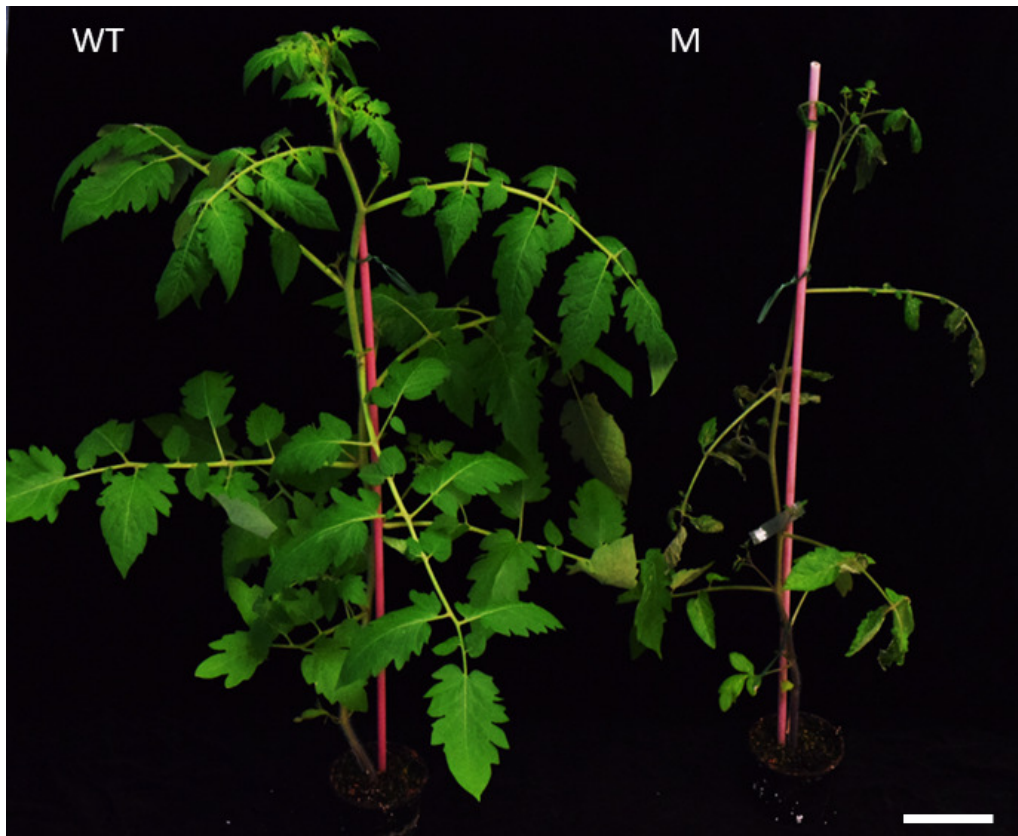


Figura 99. Fenotipo de F2 de la línea 1458 ET MM *in vivo*. La barra representa 10 cm.

Gracias a este material, del que se han tomado y congelado muestras, se podrá llevar a cabo en un futuro próximo el mapeo por secuenciación del gen alterado en este mutante.

4.2.2. Mutantes afectados en variegación y clorosis

El contenido total de clorofila disminuye cuando una planta se ve sometida a estrés salino durante largos periodos de tiempo. En esos casos aparece habitualmente un fenotipo de clorosis. El estudio de los procesos relacionados con el contenido de clorofila y el desarrollo y concentración de cloroplastos en las células puede abrir nuevas estrategias para evitar los daños que producen el estrés salino sobre las plantas cultivadas. Los mutantes variegados y los que muestran un fenotipo clorótico en ausencia de ningún tipo de estrés nos pueden ayudar a identificar los genes que están relacionados con estos procesos biológicos.

En este apartado se han incluido tres mutantes, uno clorótico y dos variegados. En este segundo apartado se muestran los resultados correspondientes a la caracterización de tres líneas que presentaron cambios en la coloración de sus órganos vegetativos, es decir, variegación o clorosis. Las dos primeras líneas (2494 ET MM y 245 ET GA) se identificaron en TG1, donde se observó un fenotipo variegado en el limbo de las hojas. La tercera línea (2232 ET MM) se identificó en el escrutinio de progenies TG2 en condiciones de estrés salino.

Mutante 2494 ET MM

Este mutante se detectó en plantas TG1 cultivadas *in vitro*, debido a la variegación sectorial en las hojas. Se aclimataron plantas TG1 en el invernadero para conocer su fenotipo y obtener progenie TG2. Se confirmó el fenotipo *in vivo*, observándose variegación tanto en las hojas como el tallo. Los frutos obtenidos a partir de estas plantas, aunque de menor tamaño que los del WT, llegaron a madurar y tenían algunas semillas (Figura 100).



Figura 100. Fenotipo de una planta TG1 de la línea 2494 ET MM. Hoja en cultivo *in vitro* (izquierda) y tallo, hojas, frutos de plantas cultivadas en el invernadero (centro y derecha). La barra representa 1 cm.

Tras la germinación de las semillas procedentes de la TG1, se evaluaron las plantas TG2 en cultivo *in vitro*. Se observaron algunas plantas con pequeñas zonas variegadas en las hojas, y, tras su aclimatación, se confirmó el fenotipo mutante en el invernadero (Figura 101).



Figura 101. Fenotipo de planta TG2 mutante de la línea 2494 ET MM aclimatada y cultivada en el invernadero durante 60 días. La barra representa 5 cm.

Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante

Al detectarse el fenotipo mutante en la planta TG1 nos encontramos ante un mutante de naturaleza dominante. Se obtuvieron pocas semillas TG2, cuya segregación se ajusta perfectamente a la proporción 1 WT : 3 M esperada para un mutante monogénico dominante (Tabla 27).

Tabla 27. Análisis del modo de herencia del mutante 2494 ET MM.

	Segregación	WT	M	Total	χ^2
Experimento 1	Observada	2	6	8	10.67
	Esperada (3:1)	6.0	2.0		
	Esperada (1:3)	2.0	6.0		

^a Análisis $\chi^2=0.00$ ($P>0.05$; $\chi^2_{1g.l.}=3.84$)

Análisis genético del número de insertos T-DNA

Se analizaron los 8 individuos TG2 para tratar de inferir la segregación de la resistencia a la kanamicina. Como era de esperar, debido al escaso tamaño de muestra, el análisis χ^2 no permite determinar cuántos insertos con el gen *nptII* funcional porta la línea 2494 ET MM. Lo único que se puede afirmar es que los datos se ajustan tanto a uno como a dos insertos (Tabla 28).

Tabla 28. Análisis del número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional de la línea 2494 ET MM.

	Segregación	Kan ^R	Kan ^S	Total	χ^2
Experimento1	Observada	7	1	8	0.67
	Esperada (3:1)	6.0	2.0		
	Esperada (15:1)	7.5	0.5		

^a Análisis $\chi^2=0.67$ ($P>0.05$; $\chi^2_{1g.l.}=3.84$)

Para llegar a una conclusión concreta, se obtuvieron semillas de retrocruce utilizando plantas TG1 como parental femenino. Se llevó a cabo el test de resistencia a la kanamicina y, de 20 plantas analizadas, 9 presentaron resistencia y 11 fueron sensibles. Esta segregación no se ajusta a la proporción 3 Kan^R : 1 Kan^S correspondiente a una línea con dos insertos ($\chi^2=9.60>3.84$), pero se ajusta perfectamente a un modelo 1 Kan^R : 1 Kan^S ($\chi^2=0.20<3.84$), que sería el esperado para una línea con un único inserto de T-DNA con el gen *nptII* funcional.

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

Al tratarse de un mutante de naturaleza dominante, las plantas WT deberían ser sensibles a kanamicina y las plantas mutantes resistentes. Como en el test de resistencia a la kanamicina realizado en TG2 se observó una planta WT resistente a la kanamicina se concluyó que no existía cosegregación (Tabla 29).

Tabla 29. Análisis de cosegregación en del inserto T-DNA y el fenotipo mutante en TG2 de la línea 2494 ET MM.

	WT		M		Total
	Kan ^R	Kan ^S	Kan ^R	Kan ^S	
Experimento1	1	1	6	0	8

Otra prueba de la ausencia de cosegregación fue la detección de una planta de retrocruce que mostró el fenotipo mutante en cultivo *in vitro* y fue sensible a la kanamicina. Si el fenotipo de esa planta se corroborara *in vivo*, se dispondría del material necesario para llevar a cabo los cruces con *S. pimpinellifolium* y abordar el mapeo por secuenciación.

Mutante 245 ET GA

Este fenotipo mutante se observó en plantas TG1 *in vitro*. Las hojas del mutante eran variegadas, mientras que el sistema radicular y la morfología de las hojas eran WT (Figura 102).

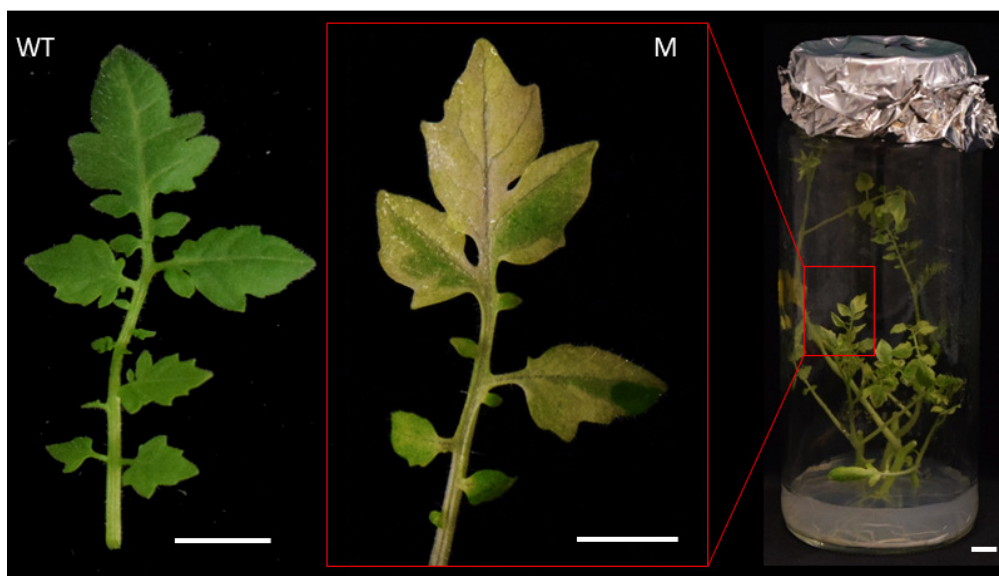


Figura 102. Fenotipo de la hoja de planta axénica de la línea 245 ET GA en cultivo *in vitro*. La barra representa 1 cm.

Se aclimataron plantas TG1 para ver si este fenotipo también se observaba *in vivo*. Las plantas presentaron un desarrollo muy parecido al de las plantas WT, pero las hojas seguían siendo variegadas (Figura 103).



Figura 103. Fenotipo de la planta de la línea 245 ET GA en condiciones de cultivo en invernadero. La barra representa 10 cm.

Además de la variegación de las hojas, en estas plantas cultivadas en el invernadero, se vio que también estaba afectado el color de las flores, ya que presentaban un tono amarillo más pálido que el WT, aunque su tamaño y morfología eran similares a las del WT (Figura 104)

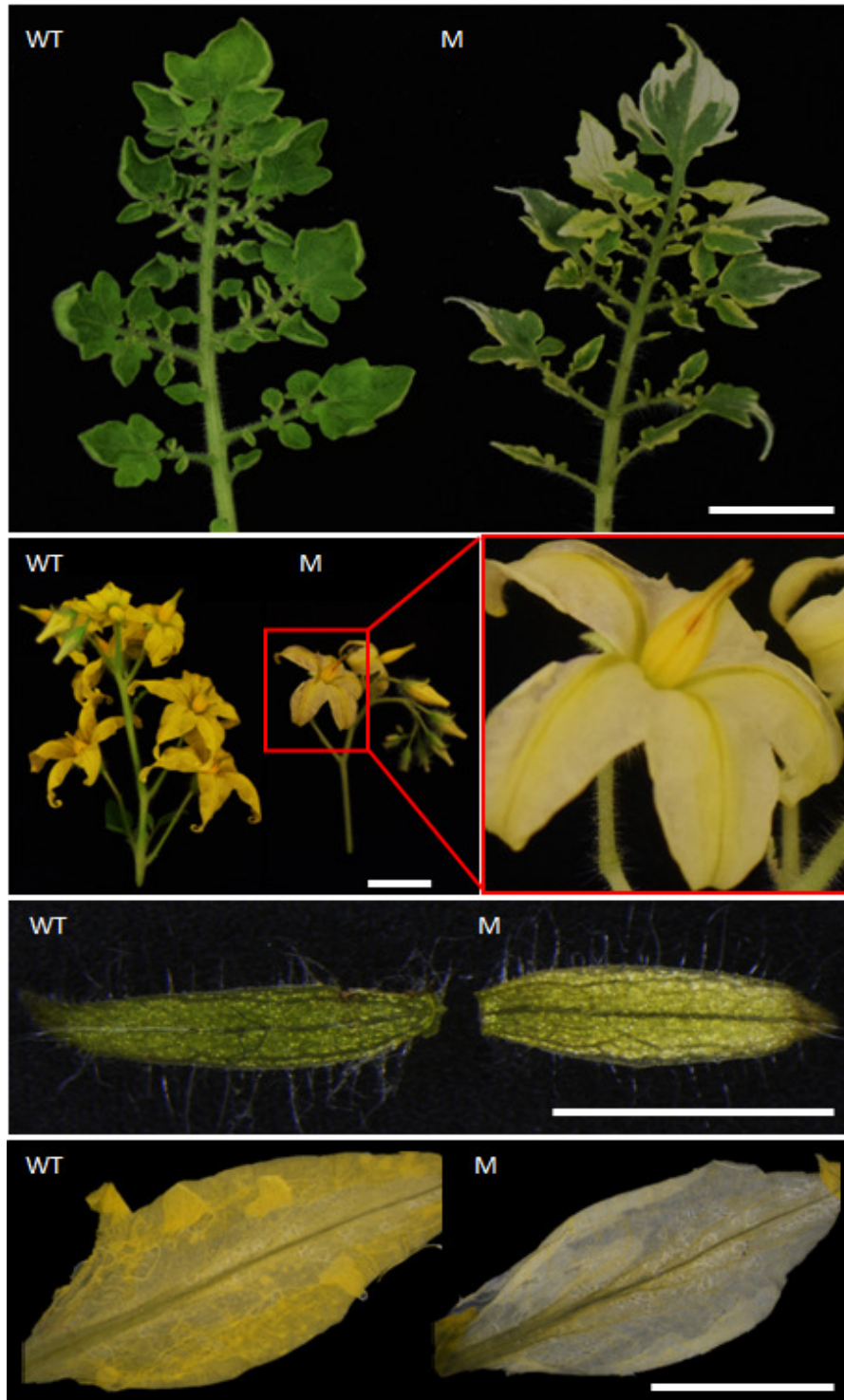


Figura 104. Fenotipo de la hoja y de las flores en antesis (detalle de sépalos y pétalos) de la línea 245 ET GA. La barra representa 1cm.

No se pudieron obtener semillas TG2 a partir de las plantas TG1 cultivadas en el invernadero, ya que no cuajó ningún fruto de autofecundación.

Como consecuencia, se intentó la obtención de semillas de retrocruce. En este caso sí se obtuvieron algunas semillas al utilizar las plantas TG1 como parental masculino. El cruce inverso (i.e. 245 ET MM x WT) se intentó en repetidas ocasiones, pero no se obtuvo ninguna semilla.

Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante

En este caso, al haber detectado el fenotipo mutante en las plantas TG1, nos encontramos ante un mutante de naturaleza dominante. Como las plantas TG1 no desarrollaron frutos de autofecundación, no se ha podido ver el fenotipo de las plantas homocigóticas para la mutación. Tampoco se han obtenido, hasta el momento, semillas en el retrocruce del mutante con polen del WT. Sin embargo, sí que se obtuvieron siete plantas del retrocruce con el mutante como parental masculino. Todas estas plantas presentaron un fenotipo WT. Al haberse utilizado el mutante como parental masculino, esto podría indicar un efecto de letalidad en los gametos masculinos que portan el T-DNA. Para poder confirmar esta cuestión sería necesario seguir insistiendo en la obtención de semillas de retrocruce en ambos sentidos y de autofecundación cultivando las plantas TG1 en diferentes condiciones ambientales.

Análisis genético del número de insertos

Se evaluó la resistencia a la kanamicina de las plántulas de retrocruce y, en todos los casos, las plantas eran sensibles a la kanamicina. Por tanto, lo más probable es que esta línea haya integrado una única copia de T-DNA con el gen *nptII* funcional.

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

Aunque haría falta realizar nuevos estudios para ver si existe cosegregación, los datos de que disponemos hasta el momento no permiten desechar esta posibilidad. En concreto, si hubiera un efecto de letalidad de los gametos masculinos se esperaría que todas las plantas del retrocruce WT x 245 ET MM fueran sensibles a la kanamicina, como así ocurrió. Por último, dada la dificultad que ha mostrado este mutante para la obtención de semillas de retrocruce y autofecundación, lo más práctico en este caso sería realizar la amplificación mediante Anchor-PCR a partir de la planta TG1 para ver si se detecta algún gen candidato responsable del fenotipo mutante.

Mutante 2232 ET MM

El mutante 2232 ET MM se identificó en el escrutinio de líneas T-DNA en medio de germinación con NaCl. Se observó que algunas plántulas tenían los cotiledones y las hojas de color verde pálido (Figura 105). Al evaluar la línea en medio de germinación sin NaCl también se detectaron plántulas con fenotipo mutante (Figura 106).

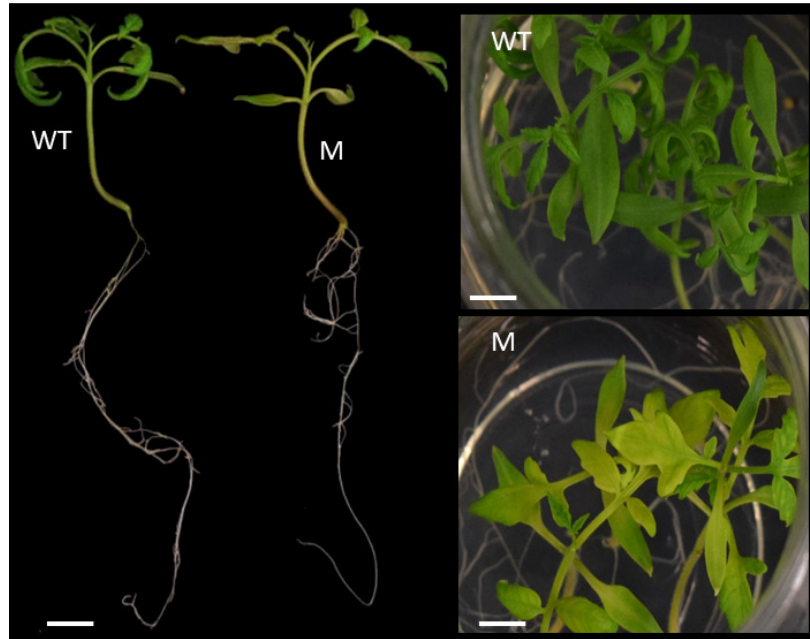


Figura 105. Fenotipo de plántulas de la línea 2232 ET MM tras 30 días de cultivo en medio de germinación con NaCl. La barra representa 1 cm.

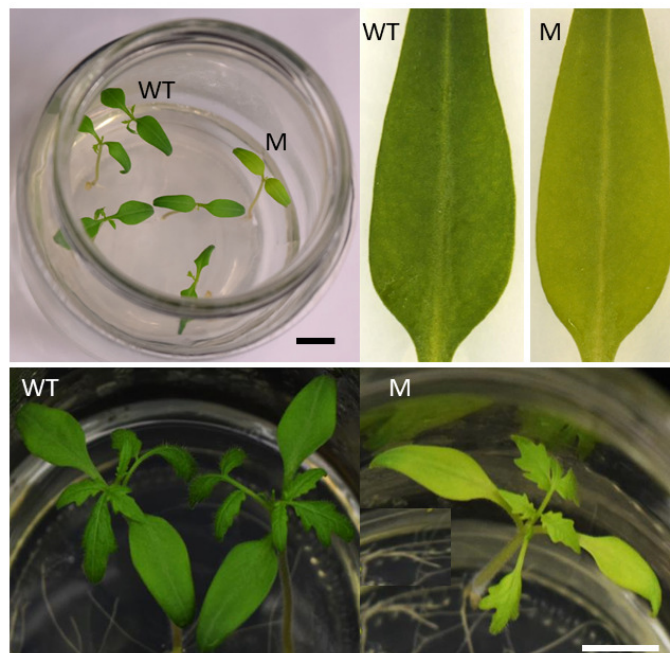


Figura 106. Fenotipo de plántulas de la línea 2232 ET MM después de 7 días (arriba) y 12 días (abajo) de cultivo en medio de germinación. La barra representa 1 cm.

En cuanto al fenotipo de la planta axénica, se cultivaron ápices meristemáticos en medio básico y se observó el fenotipo mutante con un crecimiento más lento y clorosis en toda la planta (Figura 107).



Figura 107. Fenotipo de planta axénica de la línea 2232 ET MM después de 25 días de cultivo en medio básico. La barra representa 1 cm.

También se vio el fenotipo mutante en plantas cultivadas en el invernadero a partir de semillas TG2. Al igual que en cultivo *in vitro*, las plantas tenían un crecimiento más lento y clorosis en las hojas (Figura 108).



Figura 108. Fenotipo de plantas de la línea 2232 ET MM procedentes de semillas TG2 tras 25 días de cultivo en invernadero. La barra representa 10 cm.

Se siguió el desarrollo de las plantas con fenotipo mutante en el invernadero y, en todos los casos, tenían menor tamaño que sus correspondientes WT (Figura 109).



Figura 109. Fenotipo de plantas de la línea 2232 ET MM tras 90 días de cultivo en invernadero. La barra representa 10 cm.

La morfología de las hojas no estaba alterada. Por tanto, la característica más evidente de este mutante fue la clorosis en todas las etapas de crecimiento (Figura 110).

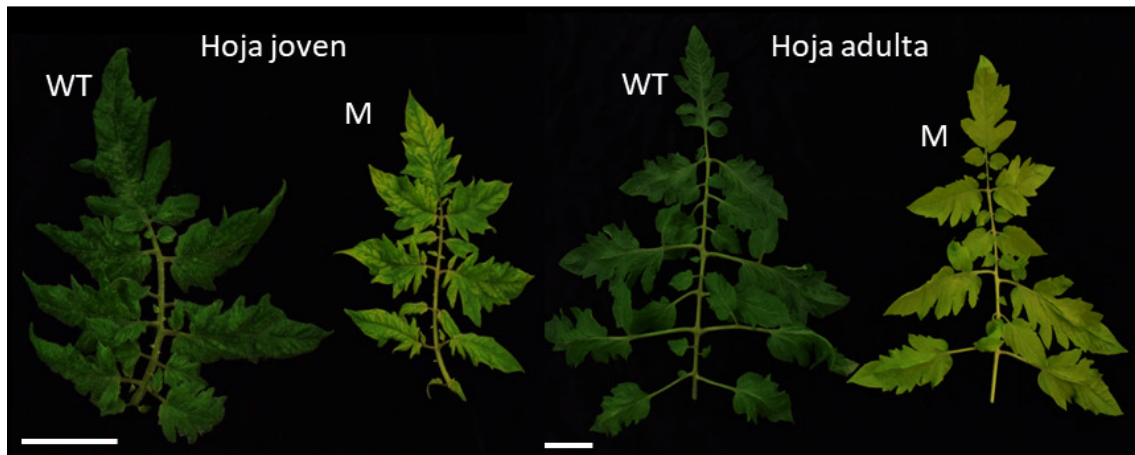


Figura 110. Fenotipo de hojas de plantas de la línea 2232 ET MM cultivadas en el invernadero. La barra representa 5 cm.

Las plantas mutantes llegaron a desarrollar frutos al final de su ciclo de cultivo, en el que muchas de las hojas estaban prácticamente senescentes. Los frutos obtenidos fueron de pequeño tamaño, pero llegaron a madurar normalmente y a dar alguna semilla (Figura 111).



Figura 111. Fenotipo de planta y fruto mutante de la línea 2232 ET MM. La barra representa 10 (izquierda) y 1 (derecha) cm.

Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante

En dos experimentos independientes se analizaron un total de 58 plantas TG2, de las cuales 39 tenían fenotipo WT y 19 fenotipo mutante. Tras comprobar que los dos experimentos se podían analizar de forma conjunta, se vio que los datos acumulados se ajustaban a un modo de herencia monogénico recesivo (Tabla 30).

Tabla 30. Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante en la línea 2232 ET MM.

	Segregación	WT	M	Total	χ^2
Experimento 1	Observada	25	11	36	0.59
	Esperada (3:1)	27.0	9.0		
Experimento 2	Observada	14	8	22	1.52
	Esperada (3:1)	16.5	5.5		
Datos acumulados^a	Observada	39	19	58	1.86
	Esperada (3:1)	43.5	14.5		

^a Análisis χ^2 homogeneidad ($\chi^2_H=0.25$) indica que las muestras son homogéneas ($P>0.05$; $\chi^2_{1 g. l.} = 3.84$)

Análisis genético del número de insertos T-DNA

Se determinó que la línea 2232 ET MM seguramente portaba un inserto *nptII* funcional, ya que las plantas TG2 se ajustaban a una segregación de 3 Kan^R : 1 Kan^S (Tabla 31).

Tabla 31. Análisis del número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional de la línea 2232 ET MM.

	Segregación	Kan ^R	Kan ^S	Total	χ^2
Experimento1	Observada Esperada (3:1)	31 27.0	5 9.0	36	2.37

^a Análisis χ^2 ($P > 0.05$; $\chi^2_{1 \text{ g. l.}} = 3.84$)

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

Se comprobó que no existe cosegregación entre el inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional y el fenotipo mutante en la línea 2232 ET MM al observar una planta mutante sensible a la kanamicina (Tabla 32).

Tabla 32. Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 2232 ET MM.

	WT		M		Total
	Kan ^R	Kan ^S	Kan ^R	Kan ^S	
Experimento1	21	4	10	1	36

Para corroborar la ausencia de cosegregación, se obtuvo progenie TG3 de plantas WT Kan^S. En una de ellas se detectaron algunas plantas de fenotipo mutante, lo cual confirma el resultado previo de ausencia de cosegregación. En la actualidad se están llevando a cabo las tareas necesarias para poder abordar el mapeo por secuenciación del gen alterado en este mutante.

4.2.3. Mutantes afectados en senescencia y letalidad

Durante el desarrollo de las plantas se producen fenómenos de senescencia de determinados órganos. Además, estos procesos intervienen en la respuesta de las plantas a determinados tipos de estrés. Por ejemplo, la senescencia y abscisión de algunas hojas reducen la pérdida de agua por transpiración e incrementan la transferencia de nutrientes de dichas hojas hacia los meristemos y otros órganos de reserva en condiciones de estrés. Cuando estas condiciones se hacen más extremas pueden aparecer también respuestas necróticas que acaben con la muerte de la planta. El estudio de todos estos mecanismos puede ayudar a encontrar nuevos genes que permitan minimizar los efectos negativos de estos estreses sobre las plantas.

En este tercer apartado se muestran los resultados de la caracterización de seis líneas que presentaron algún fenotipo mutante de senescencia y letalidad. Tres de estos mutantes se identificaron en el escrutinio de líneas T-DNA en condiciones de estrés salino *in vitro* (167 ET GA, 332 ET GA y 1641 ET MM), otro se había identificado previamente en el contexto de una tesis del grupo (1524 ET MM) y los otros dos se identificaron al cultivar en el invernadero plantas TG2 (199 ET MM y 526 ET 73).

Los fenotipos observados abarcan desde un marchitamiento leve, que permite a la planta desarrollarse casi normalmente, hasta una letalidad que se manifiesta cuando la plántula tiene pocos días impidiendo su desarrollo. Entre uno y otro extremo, se muestra un fenotipo similar a la respuesta hipersensible que exhiben algunas plantas al ser atacadas por ciertas enfermedades, aunque, en este caso, el fenotipo aparece sin la presencia de ningún patógeno.

Mutante 167 ET GA

Este mutante se observó en un experimento de escrutinio *in vitro* en condiciones de estrés salino. Las plántulas mutantes presentaron un porte débil, con cotiledones de color verde pálido y síntomas de marchitamiento y senescencia (Figura 112).

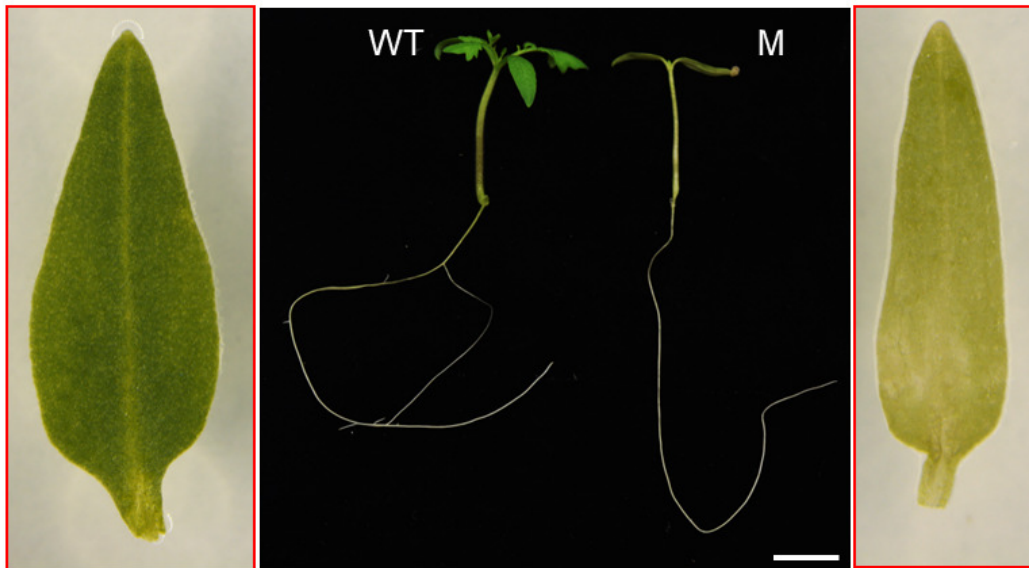


Figura 112. Fenotipo de plántula procedente de semilla de la línea 167 ET GA después de 10 días en medio de germinación con NaCl. Detalle de un cotiledón de cada genotipo (WT o M). La barra representa 1 cm.

Para ver si el fenotipo se debía a la presencia de sal en el medio se realizó el mismo experimento pero esta vez sin NaCl. Los resultados indicaron que se trata de un mutante del desarrollo, ya que el fenotipo se observó desde el quinto día de cultivo en medio MG (i.e. sin NaCl) (Figura 113).

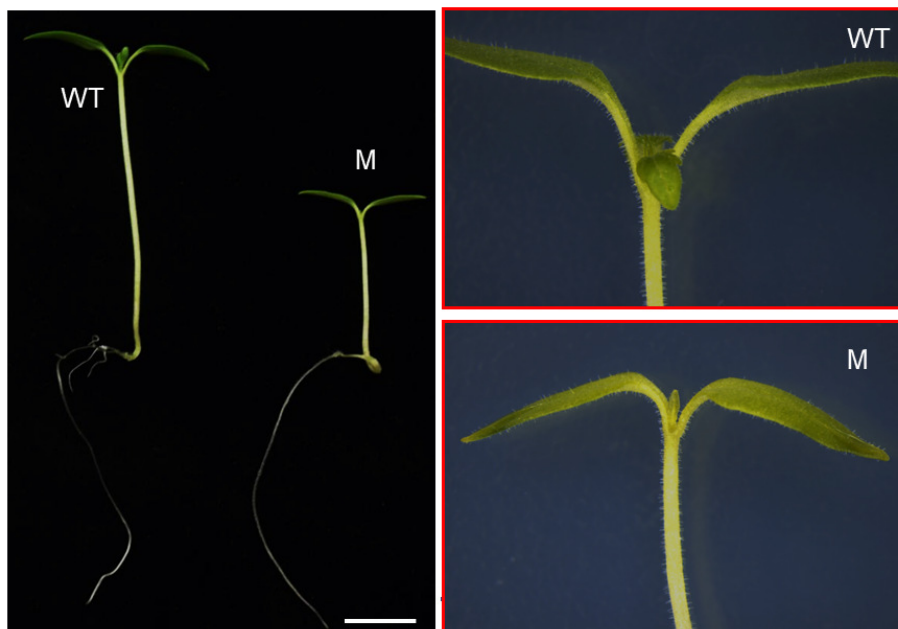


Figura 113. Fenotipo de plántulas procedente de semilla después de 5 días en medio de germinación de la línea 167 ET GA. Detalle del ápice meristemático. La barra representa 1 cm.

En estas condiciones, las plántulas presentaron clorosis en los cotiledones y un desarrollo más lento de la parte aérea y del sistema radicular. Conforme pasaban los

días de cultivo se observaba un incremento en la clorosis de los cotiledones y un porte más débil. Además, se vio que las raíces secundarias se desarrollaban con retraso respecto de las plantas WT (Figura 114).



Figura 114. Fenotipo de plántulas procedente de semilla de la línea 167 ET GA después de 7 días en medio de germinación. La barra representa 0.5 cm.

A partir de estas plántulas se realizó el cultivo de ápices meristemáticos en medio básico. Las plantas axénicas mutantes seguían mostrando un crecimiento más lento y un porte más débil que el WT, aunque la raíz crecía normalmente (Figura 115).



Figura 115. Fenotipo de planta axénica de la línea 167 ET GA después de 20 días de cultivo en medio básico. La barra representa 1 cm.

Aunque las plantas mutantes enraizaron de forma similar al WT, no llegaron a medrar en estas condiciones y todas murieron.

A continuación se realizaron experimentos de regeneración a partir de diferentes tipos de explantes para ver si la capacidad morfogenética estaba afectada por la mutación. Se cultivaron explantes de cotiledón e hipocótilo en medio organogénico IKZ y, a los 30 días, se observó que los explantes de plántulas mutantes daban brotes adventicios que elongaban como los WT tras el subcultivo a medio IK (Figura 116).

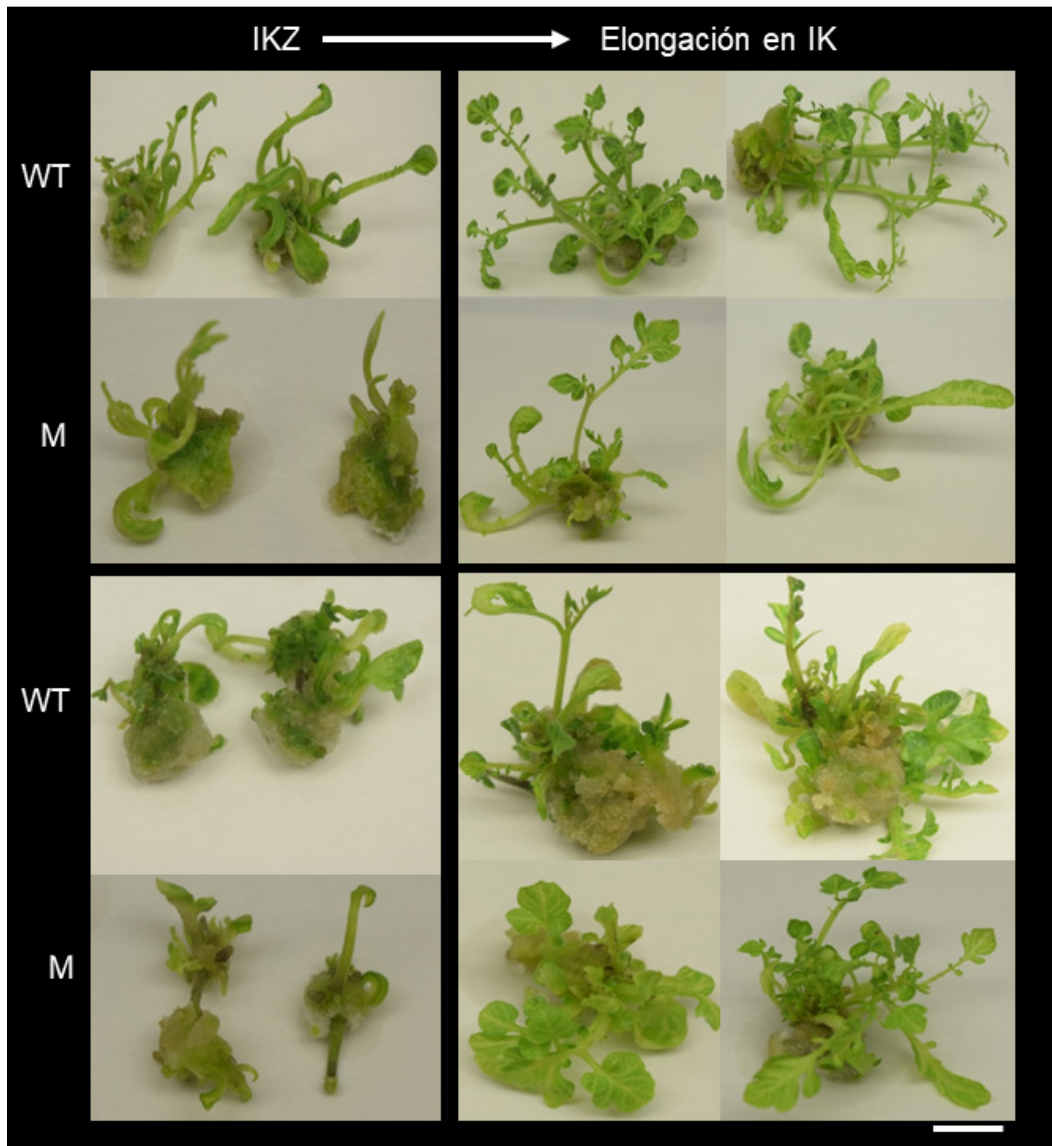


Figura 116. Cotiledones (parte superior) e hipocótilos (parte inferior) de la línea 167 ET GA después de 30 días en medio organogénico IKZ y 30 días más en medio IK. La barra representa 1 cm.

Los brotes adventicios se subcultivaron a medio de enraizamiento. Aunque al principio los brotes adventicios mutantes enraizaban, a los pocos días comenzaban a mostrar síntomas de clorosis y senescencia hasta que acababan muriendo (Figura 117).

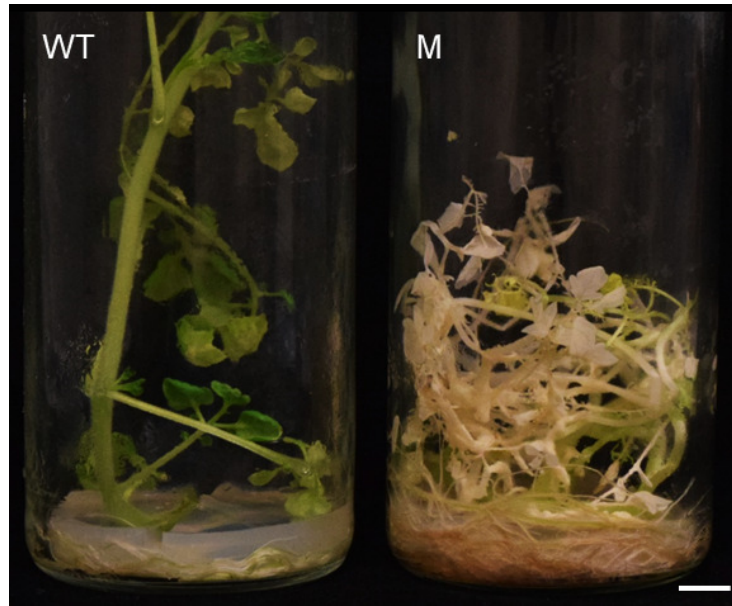


Figura 117. Plantas regeneradas a partir de explantes de cotiledón de la línea 167 ET GA tras 60 días de cultivo en medio de enraizamiento. La barra representa 1 cm.

Se sembraron semillas TG2 en el invernadero para ver si la alteración del desarrollo observado *in vitro* se reproducía *in vivo*. A los 15 días las plántulas mutantes ya presentaban unos claros síntomas de clorosis y comenzaron a colapsar (Figura 118).

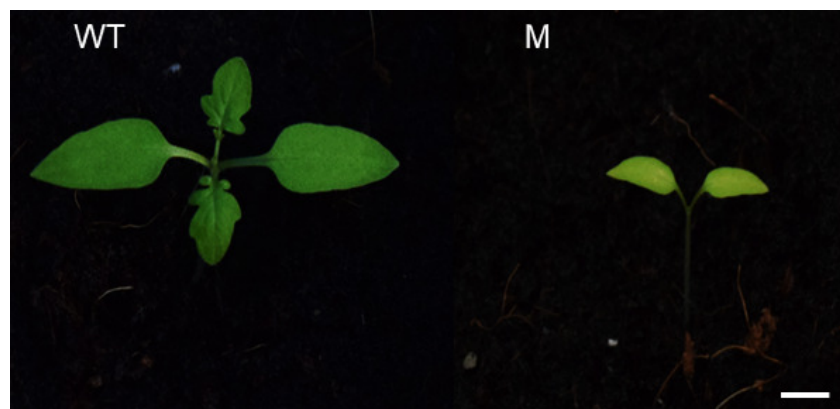


Figura 118. Fenotipo de plántulas procedente de semilla de la línea 167 ET GA después de 15 días en condiciones *in vivo*. La barra representa 1 cm.

Tras un mes de cultivo en el invernadero todas las plantas mutantes murieron. Por tanto, se ha identificado una mutación con claros efectos en el desarrollo temprano de las plantas, provocando en primera instancia clorosis y, más tarde, la muerte, aunque, sorprendentemente, la alteración de este gen no afecta a la capacidad de regeneración adventicia.

Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante

El fenotipo mutante se detectó en 21 de las 88 plantas analizadas en los tres experimentos realizados en cultivo *in vitro* o en el invernadero. El análisis de homogeneidad indicó que las muestras eran homogéneas y el análisis χ^2 de los datos acumulados indicó que en la línea 167 ET GA no había motivos para dudar de un modelo de herencia monogénica recesiva (Tabla 33).

Tabla 33. Análisis del modo de herencia del mutante 167 ET GA.

	Segregación	WT	M	Total	χ^2
Experimento 1	Observada Esperada (3:1)	28 27.0	8 9.0	36	0.15
Experimento 2	Observada Esperada (3:1)	20 22.5	10 7.5	30	1.11
Experimento 3	Observada Esperada (3:1)	19 16.5	3 5.5	22	1.52
Datos acumulados ^a	Observada Esperada (3:1)	67 66.0	21 22.0	88	0.06

^a Análisis χ^2 homogeneidad ($\chi^2_H = 2.71$) indica que la muestras son homogéneas ($P > 0.05$; $\chi^2_{2g.l.} = 5.99$)

Análisis genético del número de insertos T-DNA

Para evaluar la resistencia a la kanamicina se utilizaron explantes de cotiledón de las plantas WT y segmentos de hipocótilo de las plantas mutantes, ya que los cotiledones de estas últimas presentaban clorosis, lo que podría dificultar la interpretación de los resultados. (Figura 119).

La segregación se ajustó a 3 plantas Kan^R por cada planta Kan^S en los dos experimentos realizados. El análisis de homogeneidad confirmó que las muestras eran homogéneas y el análisis de los datos acumulados indicó que no había motivos para dudar de que la línea 167 ET GA porta un único inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional (Tabla 34).

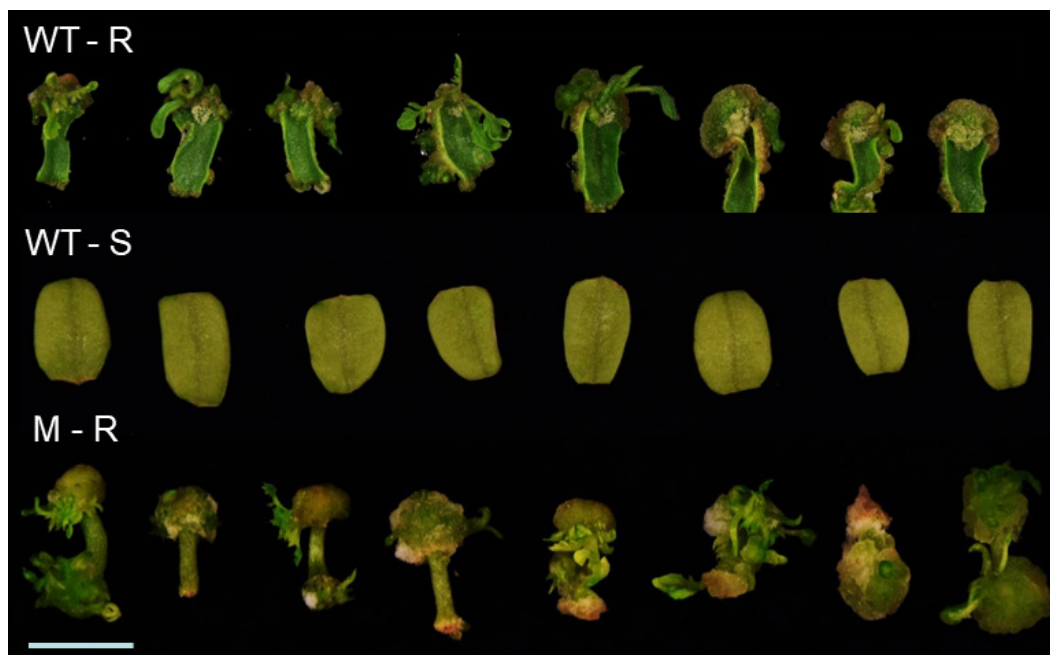


Figura 119. Fenotipo de explantes de cotiledón (plantas WT) e hipocótilo (plantas M) de la línea 167 ET GA tras 30 días de cultivo en medio organogénico con kanamicina. La barra representa 1 cm.

Tabla 34. Análisis del número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional de la línea 167 ET GA.

	Segregación	Kan ^R	Kan ^S	Total	χ^2
Experimento 1	Observada	23	13	36	2.37
	Esperada (3:1)	27.0	9.0		
Experimento 2	Observada	24	6	30	0.40
	Esperada (3:1)	22.5	7.5		
Datos acumulados^a	Observada	47	19	66	0.51
	Esperada (3:1)	49.5	16.5		

^a Análisis χ^2 homogeneidad ($\chi^2_H = 2.27$) indica que las muestras son homogéneas ($P > 0.05$; $\chi^2_{1 \text{ g.l.}} = 3.84$)

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

Para saber si el inserto T-DNA presente en esta línea es el responsable de la mutación se realizó el ensayo de cosegregación. Entre las 66 plantas TG2 se observaron 19 plantas sensibles a la kanamicina, todas de fenotipo WT (las supuestas acigotas). Otras 29 plantas presentaron fenotipo WT y eran resistentes a la kanamicina (las supuestas hemicigotas). Por otra parte, las 18 plantas mutantes fueron resistentes a la kanamicina (las supuestas homocigotas). Por tanto, no se observó ninguna planta mutante sensible al antibiótico. Tras realizar la prueba de la χ^2 y ver que los datos observados se ajustaban ($\chi^2_{DA (1:2:1)} = 2.59 < 5.99_{2 \text{ g.l. (5\%)}$) a una segregación 1 WT

Kan^S : 2 WT Kan^R : 1 M Kan^R se puede concluir, con una probabilidad de fallo menor del 2 %, que en la línea 167 ET GA existe cosegregación entre la mutación y el inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional (Tabla 35).

Tabla 35. Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 167 ET GA.

	Segregación	WT Kan ^S	WT Kan ^R	M Kan ^R	Total	χ^2
Experimento 1	Observada	13	15	8	36	2.39
	Esperada (1:2:1)	9.0	18.0	9.0		
Experimento 2	Observada	6	14	10	30	1.20
	Esperada (1:2:1)	7.5	15.0	7.5		
Datos acumulados ^a	Observada	19	29	18	66	1.0
	Esperada (1:2:1)	16.5	33.0	16.5		

^a Análisis χ^2 homogeneidad ($\chi^2_H = 2.59$) indica que la muestras son homogéneas ($P > 0.05$; $\chi^2_{2 g. l.} = 5.99$)

Si hay cosegregación entre el fenotipo mutante y el inserto T-DNA no debería aparecer ninguna planta mutante en las descendencias TG3 de plantas TG2 Kan^S (acigotas para el T-DNA). Por tanto, con el fin de corroborar la existencia de cosegregación, se realizó también la evaluación fenotípica de progenies TG3 procedentes de TG2 WT sensibles a la kanamicina (Tabla 36).

Tabla 36. Análisis del fenotipo de tres progenies TG3 procedentes de tres plantas TG2 WT Kan^S de la línea 167 ET GA.

	WT	M	Total
167-1 WT Kan S	33	0	33
167-2 WT Kan S	43	0	43
167-3 WT Kan S	39	0	39

No se observó en las tres progenies ninguna planta con fenotipo mutante, por lo que se confirmó la existencia de cosegregación entre el fenotipo mutante y el T-DNA con el gen *nptII* funcional. En la actualidad se está llevando a cabo la identificación del gen etiquetado mediante Anchor-PCR.

Mutante 199 ET MM

El mutante 199 ET MM se puede detectar en cultivo *in vitro* de plantas axénicas TG2. Se caracterizó por presentar síntomas de senescencia y marchitamiento. Además, presentaba manchas necróticas en el raquis, en las hojas y en el tallo (Figura 120).

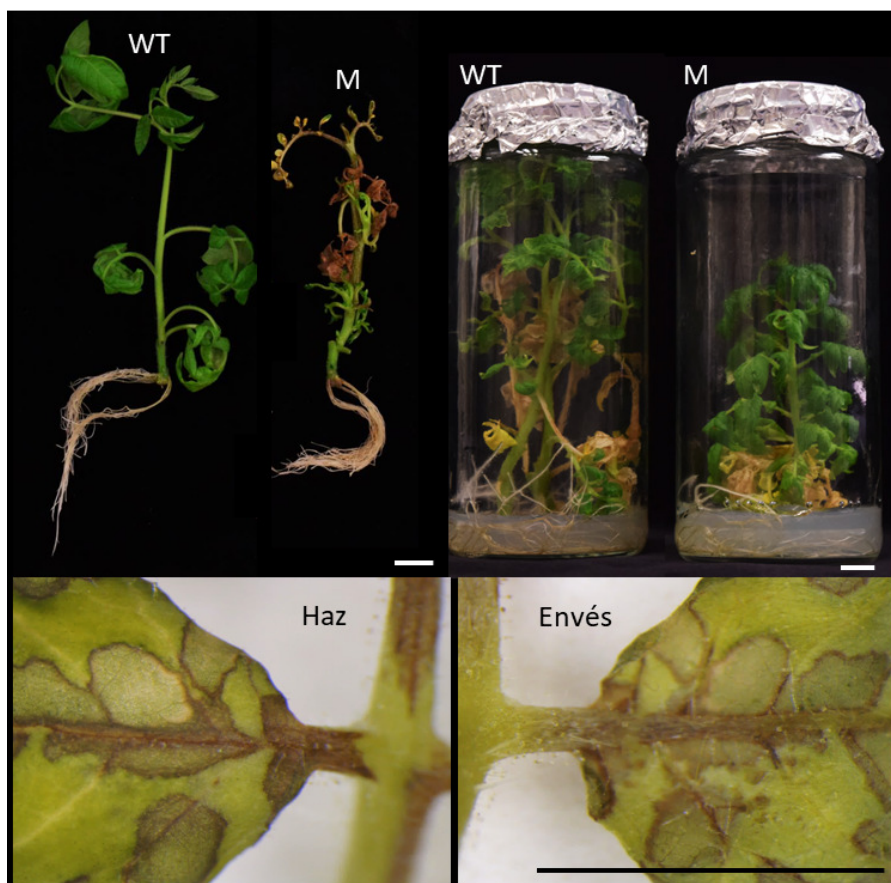


Figura 120. Fenotipo de plantas axénicas de la línea 199 ET MM en diferentes subcultivos (arriba) y detalle de hoja de planta mutante *in vitro* con inicios de necrosis (abajo). La barra representa 1 cm.

Se mantuvo la población de plantas (WT y M) en condiciones axénicas para corroborar los fenotipos observados. En esta línea resultaba difícil identificar si el fenotipo era WT o mutante en condiciones de cultivo *in vitro* porque en las plantas testigo también se observaban con frecuencia síntomas de marchitamiento en algunas de sus hojas. En estos casos la única posibilidad de realizar una adscripción correcta a la clase fenotípica es observar el desarrollo de estas plantas durante varios subcultivos. De esta forma, se pudo adscribir cada planta a una clase fenotípica. A continuación, se aclimataron plantas WT y mutantes en el invernadero con un doble objetivo: ver si el fenotipo mutante se detectaba en esas condiciones y corroborar la adscripción fenotípica realizada *in vitro*.

Se aclimataron varias plantas y se observó su desarrollo hasta el final del ciclo de cultivo, lo cual permitió detectar de forma inequívoca el fenotipo mutante. Los primeros síntomas de necrosis se observaron a los 45 días de cultivo con la presencia de manchas en el limbo de las hojas de las plantas mutantes (Figura 121).

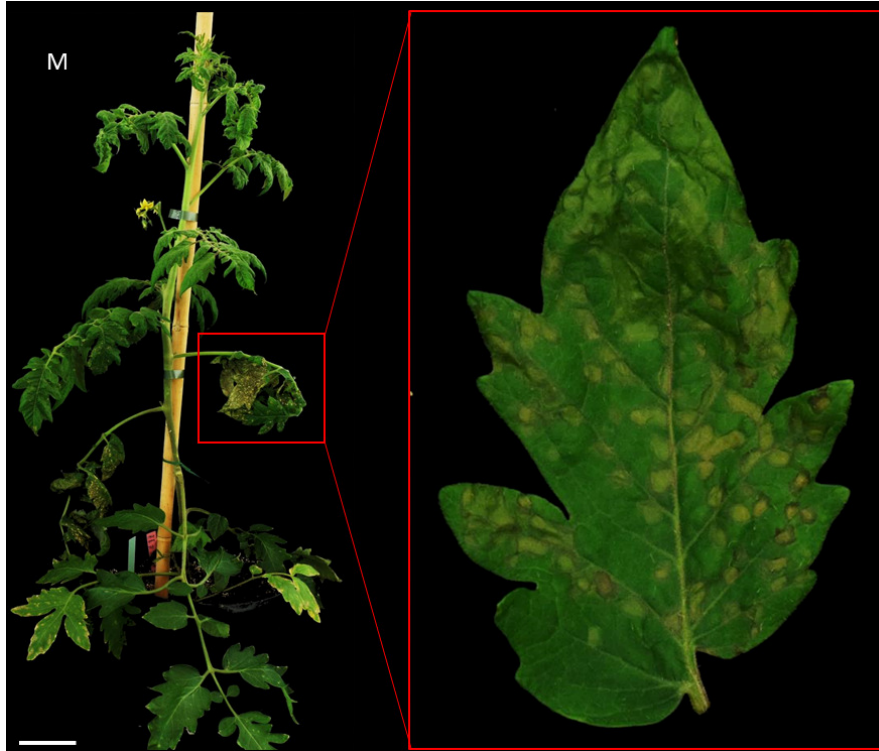


Figura 121. Fenotipo de plantas mutantes de la línea 199 ET MM tras 45 días de cultivo en el invernadero. La barra representa 10 cm.

Después de 70 días de cultivo en el invernadero, es decir en etapa de planta adulta, las manchas de necrosis fueron apareciendo también en el tallo y se extendieron al raquis de las hojas (Figura 122).



Figura 122. Fenotipo de plantas mutantes de la línea 199 ET MM tras 70 días de cultivo en el invernadero. La barra representa 10 cm.

Las plantas mutantes emitieron nuevos brotes, los cuales no presentaban síntomas de necrosis inicialmente. Sin embargo, conforme avanzaba su desarrollo, también acabaron necrosándose. Por último, cuando las plantas alcanzaron su fase final de desarrollo los síntomas aún fueron más evidentes, ya que las plantas mutantes se necrosaron por completo después de desarrollar frutos (Figura 123).

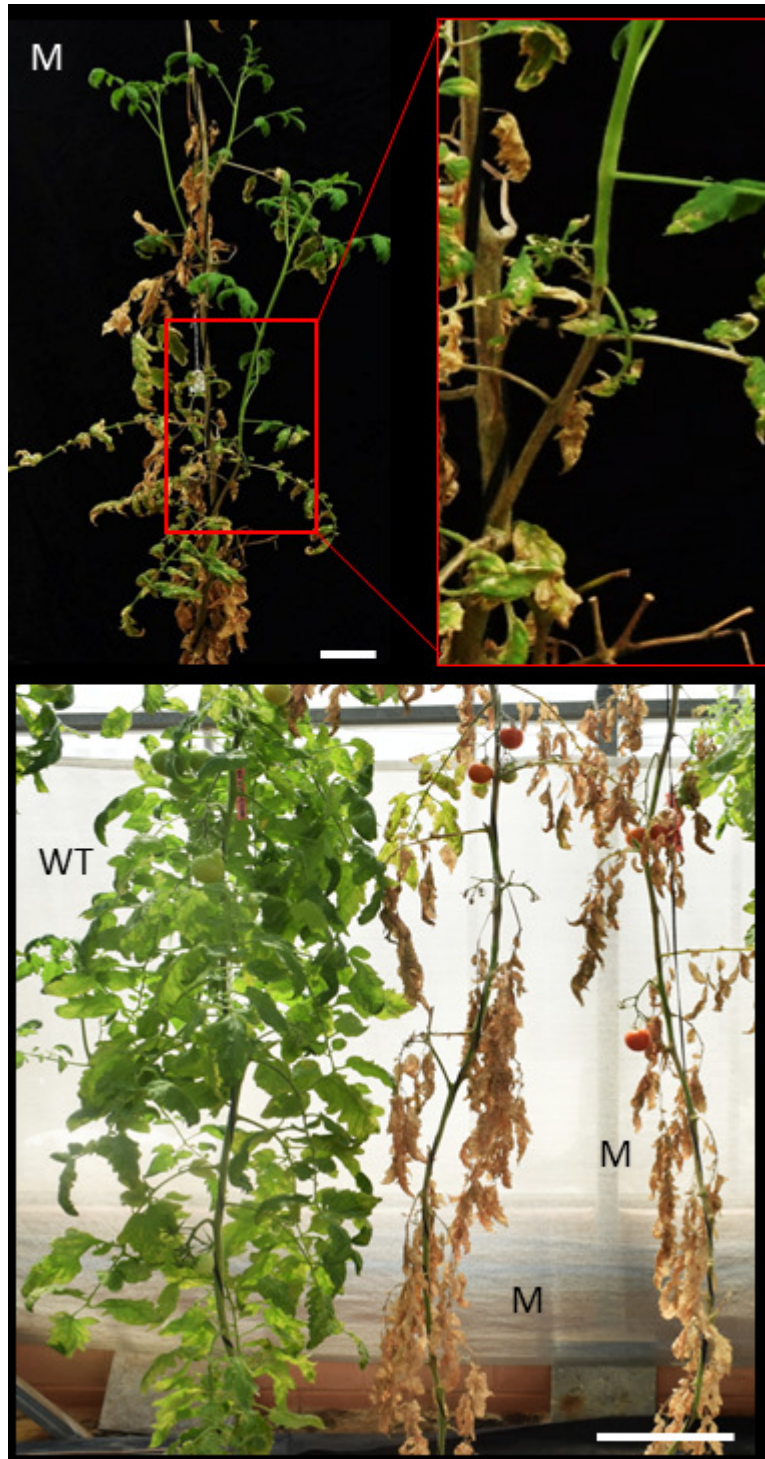


Figura 123. Fenotipo de plantas mutantes de la línea 199 ET MM al final del ciclo de cultivo. La barra representa 10 cm.

En las plantas mutantes las manchas necróticas invadieron todo el raquis y el limbo de las hojas. En las flores solo se observaron algunas manchas necróticas en pétalos y sépalos. Sorprendentemente, los frutos no se vieron prácticamente afectados en su desarrollo hasta la maduración. Como consecuencia, los frutos maduros que se

obtuvieron de las plantas mutantes presentaron una morfología y cantidad de semillas muy similares al WT (Figura 124).



Figura 124. Fenotipo de flores y frutos de la línea 199 ETMM. La barra representa 1 cm.

Se obtuvo progenie de plantas mutantes y se analizó en cultivo *in vitro*. En estado de plántula no se observó ningún fenotipo. Con relación a la respuesta morfogénica, los segmentos de cotiledón de plántulas mutantes regeneraron estructuras organogénicas en un medio IKZ, de forma similar a como lo hicieron los procedentes de plántulas WT. Sin embargo, conforme pasaron los días, fueron apareciendo síntomas de necrosis en los explantes mutantes (Figura 125).

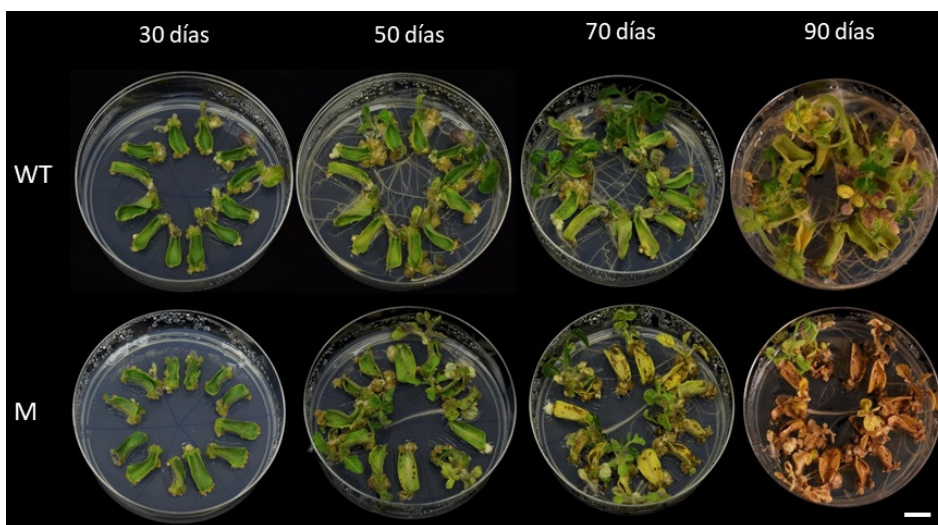


Figura 125. Fenotipo de cotiledones de la línea 199 ET MM en medio de regeneración IKZ. La barra representa 1 cm.

Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante

Debido a las características del mutante, se prefirió realizar la tarea de adscripción fenotípica de cada planta en el invernadero para no cometer ningún error. Como las semillas TG2 de que se disponía para hacer este cultivo eran muy antiguas y no germinaban bien se decidió realizar este análisis a partir de semillas TG3 procedentes de una planta TG2 WT-Kan^R, ya que sabíamos que esa progenie era análoga a una TG2. Por tanto, para analizar el modo de herencia en este mutante se cultivaron semillas TG3 de la línea 199-2 WT-Kan^R. Se observaron 10 plantas WT y 2 plantas mutantes. El análisis $\chi^2_{(3:1)} = 0.44 < 3.84_{1gl (5\%)}$ se ajustó modelo de herencia monogénica recesiva.

Análisis genético del número de insertos T-DNA

De las 51 plantas TG2 cultivadas *in vitro* se observaron 37 plantas resistentes a la kanamicina y 14 sensibles. Al realizar la prueba χ^2 se concluyó que la línea 199 ET MM porta un inserto con el gen *nptII* funcional (Tabla 37).

Tabla 37. Análisis del número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional de la línea 199 ET MM.

	Segregación	Kan ^R	Kan ^S	Total	χ^2
Experimento 1	Observada Esperada (3:1)	14 12.7	3 4.3	17	0.49
Experimento 2	Observada Esperada (3:1)	12 11.3	3 3.7	15	0.20
Experimento 3	Observada Esperada (3:1)	11 14.3	8 4.7	19	2.96
Datos acumulados^a	Observada Esperada (3:1)	37 38.3	14 12.7	51	0.16

^a Análisis χ^2 homogeneidad ($\chi^2_H=3.49$) indica que las muestras son homogéneas ($P>0.05$; $\chi^2_{2g.l.}=5.99$)

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

Este análisis se tuvo que hacer en las generaciones TG3 y TG4 porque las semillas TG2 disponibles en el momento de realizar el análisis de cosegregación eran muy pocas y, por su antigüedad, la tasa de germinación era muy baja. En concreto, el análisis se inició aclimatando en el invernadero dos clones de una planta resistente a la kanamicina catalogada como mutante *in vitro*. También se aclimataron una planta WT-Kan^R y otra WT-Kan^S. El fenotipo se confirmó en el invernadero tal y como se ha descrito en apartados anteriores, es decir, las plantas asignadas inicialmente como M presentaron un claro fenotipo mutante en invernadero y las plantas asignadas como WT no tuvieron síntomas de necrosis.

Se obtuvieron las progenies TG3 de estas plantas y se analizó su resistencia a la kanamicina. La progenie de la planta mutante fue homogéneamente resistente a la kanamicina; la progenie de la planta WT-Kan^S fue homogéneamente sensible a la kanamicina; y la progenie de la planta WT-Kan^R segregó 3 Kan^R : 1 Kan^S (Tabla 38). Estos resultados apuntaban hacia una posible cosegregación entre un inserto de T-DNA y el fenotipo mutante.

Tabla 38. Análisis del número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional de progenie TG3 de la línea 199-2 ET MM WT-Kan^R.

	Segregación	Kan ^R	Kan ^S	Total	χ^2
Experimento1	Observada	16	8	24	0.89
	Esperada (3:1)	18.0	6.0		

^a Análisis χ^2 ($P > 0.05$; $\chi^2_{1 \text{ g.l.}} = 3.84$)

Como en ese momento ya no disponíamos de semillas TG2 viables, se siguió trabajando con la nueva progenie TG3 procedente de la planta WT-Kan^R como si fuera una progenie TG2. Se cultivaron las 8 plantas TG3 Kan^S en el invernadero y se comprobó que eran plantas de fenotipo WT. Se obtuvo descendencia TG4 de tres de estas plantas WT-Kan^S y se analizaron en invernadero para ver si se observaba el fenotipo mutante. Se comprobó que todas las plantas TG4 analizadas eran WT (Tabla 39).

Tabla 39. Análisis de fenotipo de progenie TG4 de las líneas TG3 WT Kan S de 199-2 ET MM.

	Segregación	WT	M	Total	χ^2
199-2-1 ET MM WT-Kan^S	Observada	11	0	11	3.67
	Esperada (3:1)	8.3	2.7		
199-2-20 ET MM WT Kan^S	Observada	20	0	20	6.67
	Esperada (3:1)	15.0	5.0		
199-2-23 ET MM WT-Kan^S	Observada	23	0	23	7.67
	Esperada (3:1)	17.3	5.7		

Por tanto, teníamos una prueba estadísticamente significativa de la existencia de cosegregación.

Para confirmarlo, se obtuvo la descendencia TG4 de cinco plantas TG3 WT y dos plantas TG3 mutantes y se procedió a evaluar su resistencia a la kanamicina (Tabla 40).

Tabla 40. Análisis de fenotipo de progenie TG4 de la líneas TG3 WT y mutantes de 199-2 ET MM.

	Segregación	Kan^R	Kan^S	Total	χ^2
199-2-29 ET MM WT	Observada	28	8	36	0.15
	Esperada (3:1)	27.0	9.0		
199-2-30 ET MM WT	Observada	27	9	36	0.00
	Esperada (3:1)	27.0	9.0		
199-2-33 ET MM WT	Observada	0	36	36	108.00
	Esperada (3:1)	27.0	9.0		
199-2-35 ET MM WT	Observada	0	30	30	90.00
	Esperada (3:1)	22.5	7.5		
199-2-39 ET MM WT	Observada	0	36	36	108.00
	Esperada (3:1)	27.0	9.0		
199-2-31 ET MM M	Observada	24	0	24	8.00
	Esperada (3:1)	18.0	6.0		
199-2-38 ET MM M	Observada	12	0	12	4.00
	Esperada (3:1)	9.0	3.0		

Como era de esperar, las plantas WT son acigóticas o heterocigóticas para el T-DNA y, por tanto, sus descendientes son todas sensibles o segregan para la resistencia a la kanamicina respectivamente. En cambio, la descendencia de las plantas mutantes, homocigótica para el T-DNA, son totalmente resistentes a la kanamicina. Con estos datos del análisis en TG3 y TG4 no hay motivos para dudar de que exista cosegregación entre la mutación y el inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional.

Mutante 332 ET GA

Este mutante se observó en el escrutinio *in vitro* de plantas TG2 en condiciones salinas. Las plántulas mutantes tenían un menor desarrollo, no llegaron a formar hojas y presentaron un porte débil y un color verde pálido. La raíz no parecía afectada, aunque había un retraso en la aparición de raíces laterales (Figura 126).



Figura 126. Fenotipo de plántula de la línea 332 ET GA tras 10 días de cultivo en medio de germinación salino. La barra representa 1 cm.

Una vez detectado el fenotipo en condiciones salinas, se evaluó la línea en medio de germinación no salino. Se observó que también en estas condiciones el fenotipo mutante aparecía tras cinco días de cultivo en medio de germinación (Figura 127).

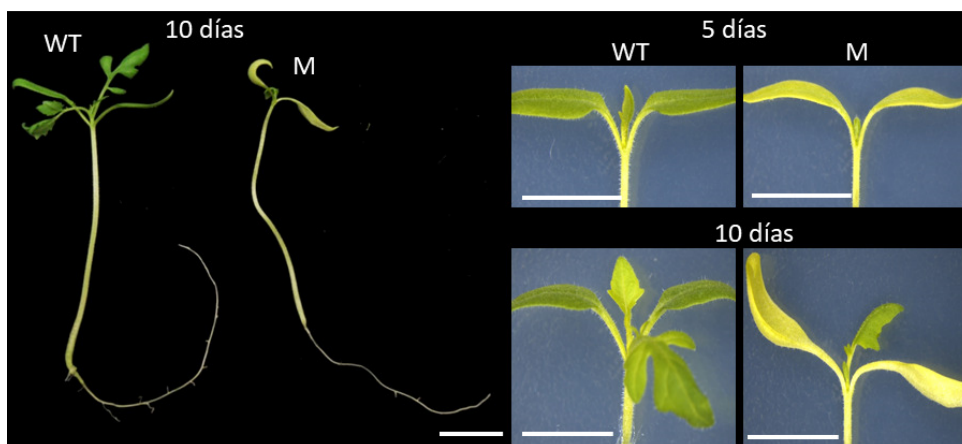


Figura 127. Fenotipo de plántula de la línea 332 ET GA tras 5 y 10 días de cultivo en medio de germinación. La barra representa 1 cm.

Al subcultivar los ápices meristemáticos y las yemas nodales en medio básico, se observó que las plantas mutantes fueron capaces de desarrollar alguna hoja, pero, al poco tiempo, experimentaron síntomas de marchitamiento y murieron (Figura 128).

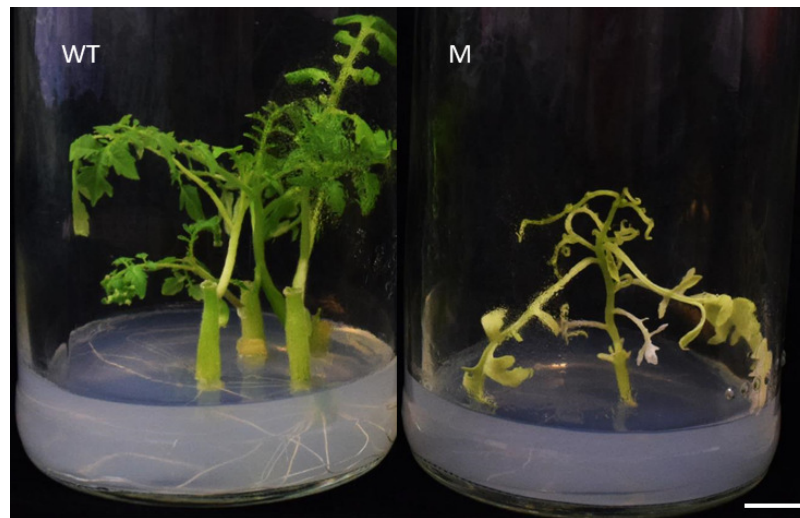


Figura 128. Fenotipo de planta axénica de la línea 332 ET GA procedente del cultivo del ápice meristemático en medio básico. La barra representa 1 cm.

Al evaluar esta línea en el invernadero se observó el fenotipo en los primeros diez días de cultivo. Al igual que ocurría en cultivo *in vitro*, las plántulas TG2 mutantes se marchitaron rápidamente y no sobrevivieron (Figura 129).

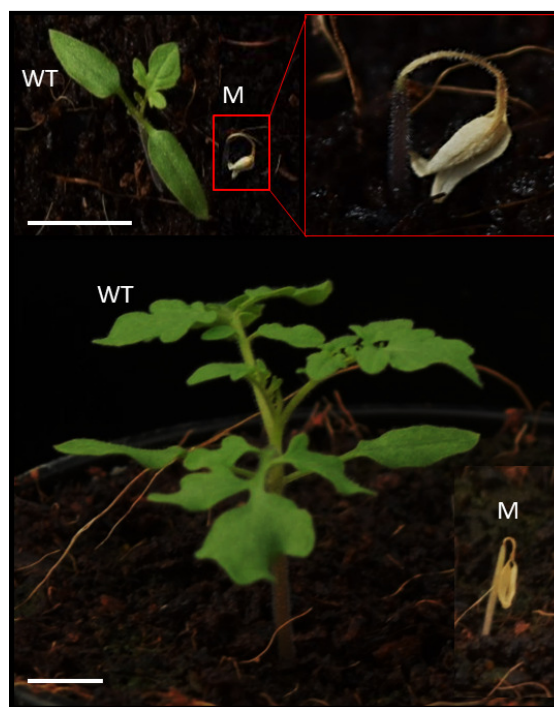


Figura 129. Fenotipo plántulas de la línea 332 ET GA después de 10 días (arriba) y 20 días (abajo) de cultivo en el invernadero. La barra representa 1 cm.

Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante

Se analizaron 62 individuos en dos experimentos *in vitro*. Tras comprobar que los datos de ambos experimentos se podían sumar, el análisis χ^2 de datos acumulados indicó que no había motivos para dudar de un modelo de herencia monogénica recesiva (Tabla 41).

Tabla 41. Análisis del modo de herencia del mutante 332 ET GA.

	Segregación	WT	M	Total	χ^2
Experimento 1	Observada	26	6	32	0.67
	Esperada (3:1)	24.0	8.0		
Experimento 2	Observada	26	4	30	2.18
	Esperada (3:1)	22.5	7.5		
Datos acumulados ^a	Observada	52	10	62	2.60
	Esperada (3:1)	46.5	15.5		

^a Análisis χ^2 homogeneidad ($\chi^2_{H=0.24}$) indica que las muestras son homogéneas ($P > 0.05$; $\chi^2_{1g.l.} = 3.84$)

Análisis genético del número de insertos T-DNA

En cuanto a la segregación de la resistencia a la kanamicina, sólo fue posible realizar este test a las plantas WT debido a la letalidad del fenotipo mutante. Con estas limitaciones, se intentó realizar el ajuste a los dos modelos posibles cuando se analizan las plantas WT de un mutante recesivo que porta un único inserto, es decir, 2 Kan^R : 1 Kan^S, para el caso de que exista cosegregación, y 3 Kan^R : 1 Kan^S, para el caso de que no exista cosegregación (Tabla 42).

Tabla 42. Análisis del número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional de los individuos WT de la línea 332 ET GA.

	Segregación	Kan ^R	Kan ^S	Total	χ^2
Experimento 1	Observada	20	6	26	1.23
	Esperada (2:1)	17.3	8.7		
	Esperada (3:1)	19.5	6.5		
Experimento 2	Observada	23	3	26	5.56
	Esperada (2:1)	17.3	8.7		
	Esperada (3:1)	19.5	6.5		
Datos acumulados ^a	Observada	43	9	52	6.01
	Esperada (2:1)	34.7	17.3		
	Esperada (3:1)	39	13		

^a Análisis χ^2 homogeneidad ($\chi^2_{H=0.92}$) indica que las muestras son homogéneas ($P > 0.05$; $\chi^2_{1g.l.} = 3.84$)

Tras comprobar que los datos de ambos experimentos se podían sumar, el análisis χ^2 de datos acumulados indicó que no había motivos para dudar de la integración de un único inserto. Además, los datos parecen indicar que no existía cosegregación, ya que

la segregación a la que mejor se ajustaron los datos observados fue a la de 3 Kan^R : 1 Kan^S. Para corroborar la ausencia de cosegregación se recurrió al estudio de descendencias de plantas TG2 WT-Kan^S.

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

Se aclimataron cinco plantas TG2 WT-Kan^S para analizar su progenie. Si existiera cosegregación, en ninguna de las progenies de estas plantas se podría observar el fenotipo mutante.

Los resultados obtenidos fueron que en 4 de las 5 progenies analizadas se observó el fenotipo mutante (Tabla 43)

Tabla 43. Análisis de segregación de fenotipo de TG3 WT Kanamicina sensible de la línea 332 ET GA.

	WT	M	Total
332-13 WT-Kan^S	16	12	28
332-24 WT-Kan^S	21	6	27
332-28 WT-Kan^S	29	0	29
332-29 WT-Kan^S	15	11	26
332-37 WT-Kan^S	21	9	30

Con estos datos se concluye que no existe cosegregación entre el fenotipo mutante y el inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional.

Mutante 526 ET 73

El fenotipo mutante de esta línea se puede observar en cultivo *in vitro* de plántulas TG2. Las plántulas mutantes tenían un menor tamaño que las WT, siendo esta diferencia más evidente en la parte aérea (Figura 130).

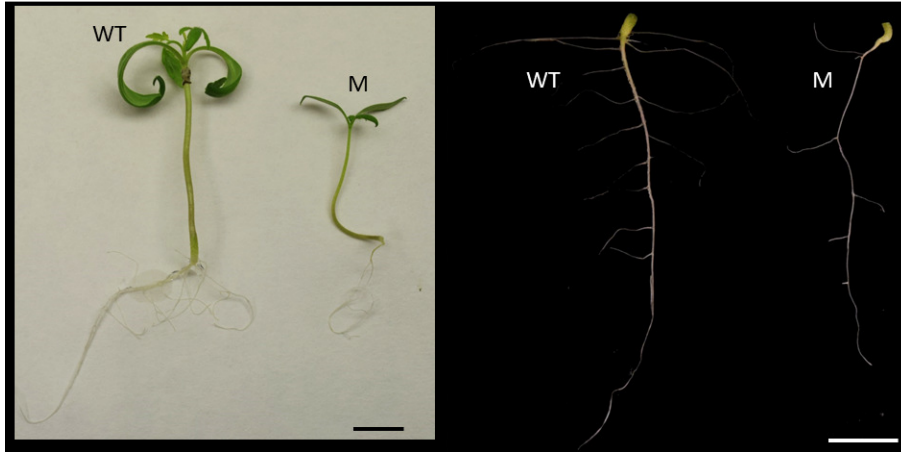


Figura 130. Fenotipo de plántula de la línea 526 ET 73 tras 7 días de cultivo en medio de germinación. La barra representa 1 cm.

Al cultivar los ápices meristemáticos en medio básico las plantas mutantes se desarrollaron menos que las plantas WT y mostraron síntomas de senescencia en las hojas basales (Figura 131).

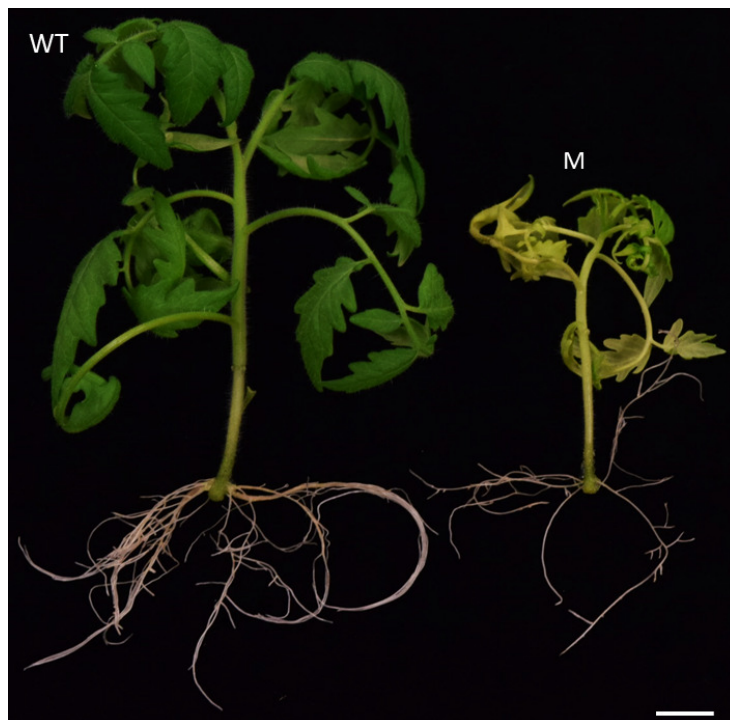


Figura 131. Fenotipo de planta axénica de la línea 526 ET 73 tras cultivar los ápices meristemáticos 30 días en medio básico. La barra representa 1 cm.

Las plantas mutantes se mantuvieron *in vitro* realizando varias clonaciones. Durante estos subcultivos se observó que, subcultivo tras subcultivo, las plantas mutantes revertían su fenotipo y se parecían cada vez más a las plantas WT (Figura 132).

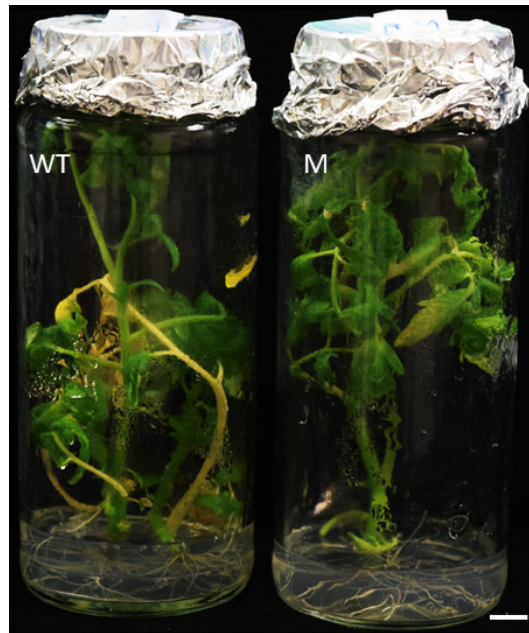


Figura 132. Fenotipo de plata axénica de la línea 526 ET 73 tras varios subcultivos en medio básico. La barra representa 1 cm.

Se estudió el fenotipo *in vivo* cultivando semillas en el invernadero. Al igual que ocurrió en cultivo *in vitro*, el fenotipo mutante se observó en las primeras etapas del crecimiento. Sin embargo, con el paso de tiempo, el desarrollo se fue normalizando (Figura 133). Las hojas de las plantas mutantes presentaron un color verde más pálido, aunque desarrollaron flores y frutos similares a los de las plantas WT.

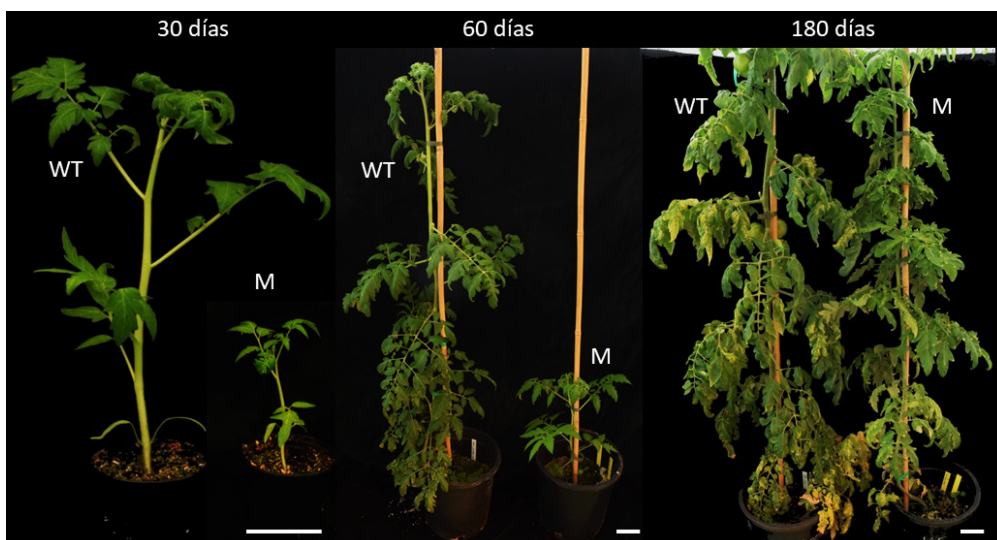


Figura 133. Fenotipo de plantas procedentes de semilla de la línea 526 ET 73 tras 30, 60 y 180 días de cultivo en invernadero. La barra representa 10 cm.

Se realizaron injertos utilizando como patrón el WT y el mutante en ambos sentidos ($\frac{WT}{M}$ y $\frac{M}{WT}$) y se comparó el fenotipo de estos injertos con las plantas WT y mutante sin injertar. Tras 110 días de cultivo, se observó que la parte aérea del WT injertada sobre la raíz del mutante alcanzaba un tamaño similar al de la planta M. Sin embargo, la coloración verde pálida característica de las hojas del mutante sólo apareció en las plantas del injerto $\frac{M}{WT}$ (Figura 134).



Figura 134. Fenotipo de injertos de la línea 526 ET 73 después de 110 días. La barra representa 10 cm.

Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante

Se realizaron dos experimentos *in vitro* y uno *in vivo*, observando plantas con el fenotipo mutante en todos los experimentos. Tras comprobar mediante el test de homogeneidad que los datos de los tres experimentos se podían acumular, se demostró que la segregación se ajusta a un modelo de herencia monogénico recesivo (Tabla 44).

Tabla 44. Análisis del modo de herencia del mutante 526 ET 73.

	Segregación	WT	M	Total	χ^2
Experimento 1	Observada	23	7	30	0.04
	Esperada (3:1)	22.5	7.5		
Experimento 2	Observada	37	7	44	1.94
	Esperada (3:1)	33.0	11.0		
Experimento 3	Observada	16	5	21	0.02
	Esperada (3:1)	15.7	5.3		
Datos acumulados ^a	Observada	76	19	95	1.27
	Esperada (3:1)	71.3	23.7		

^a Análisis χ^2 de homogeneidad ($\chi^2_H=0.73$) indica que las muestras son homogéneas ($P>0.05$; $\chi^2_{2g.l.}=5.99$)

Análisis genético del número de insertos T-DNA

En cuanto a la resistencia a kanamicina, a partir de los resultados de los experimentos en condiciones axénicas se concluyó que la línea 526 ET 73 portaba un inserto con el gen *nptII* funcional (Tabla 45).

Tabla 45. Análisis del número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional de la línea 526 ET 73.

	Segregación	Kan ^R	Kan ^S	Total	χ^2
Experimento1	Observada	26	4	30	2.18
	Esperada (3:1)	22.5	7.5		
Experimento 2	Observada	33	11	44	0.00
	Esperada (3:1)	33.0	11.0		
Datos acumulados ^a	Observada	59	15	74	0.88
	Esperada (3:1)	55.5	18.5		

^a Análisis χ^2 de homogeneidad ($\chi^2_H=1.29$) indica que las muestras son homogéneas ($P>0.05$; $\chi^2_{1g.l.}=3.84$)

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

Se realizaron dos ensayos de cosegregación entre el inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional y el fenotipo mutante. Se observó en ambos casos la presencia de una planta mutante kanamicina sensible (Tabla 46) por lo que se concluyó que no existe cosegregación *fenotipo-nptII*.

Tabla 46 Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 526 ET 73.

	WT		M		Total
	Kan ^R	Kan ^S	Kan ^R	Kan ^S	
Experimento1	20	3	6	1	30
Experimento 2	27	10	6	1	44
Datos acumulados	47	13	12	2	74

Al no existir cosegregación del fenotipo mutante con un inserto de T-DNA se realizaron cruces de una planta M-Kan^S con *Solanum pimpinellifolium*. Se obtuvo la población F2 correspondiente y se identificaron algunas plantas con el fenotipo mutante (Figura 135). Así pues, se dispone del material necesario para abordar el mapeo por secuenciación a fin de identificar el gen alterado en esta línea.



Figura 135. Fenotipo de plantas F2 del cruce del mutante 526 ET 73 con *S. pimpinellifolium* después de 30 días de cultivo en el invernadero. La barra representa 5 cm.

Mutante 1641 ET MM

Este mutante se identificó en el escrutinio de líneas en medio de germinación con NaCl. Se observaron varias plántulas que inicialmente presentaban clorosis y detenían su crecimiento hasta que días después colapsaban sin llegar a formar hojas. Pese a todas esas alteraciones de la parte aérea, el sistema radicular no parecía estar alterado (Figura 136).

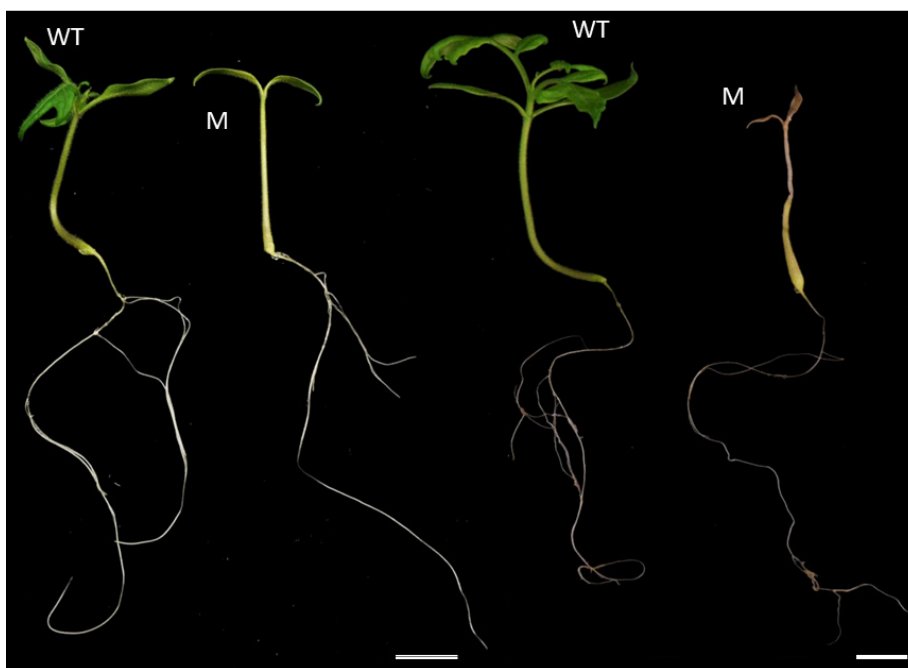


Figura 136. Fenotipo de plántulas de la línea 1641 ET MM después de 16 (izquierda) y 30 (derecha) días de cultivo en medio de germinación con NaCl. La barra representa 1 cm.

Al evaluar esta línea en medio no salino también se observó el fenotipo mutante a partir de los 7 días en medio de germinación. En estas condiciones se observaron plántulas con los cotiledones verde pálido que no desarrollaban las hojas normalmente (Figura 137).

En etapas posteriores se confirmó que el desarrollo de la parte aérea estaba totalmente ralentizado, los cotiledones perdían turgencia y, aunque el sistema radicular parecía no verse afectado, la plántula terminaba colapsando y muriendo (Figura 138).



Figura 137. Fenotipo de plántula de la línea 1641 ET MM después de 7 días de cultivo en medio de germinación. La barra representa 5 mm.



Figura 138. Fenotipo de plántulas de la línea 1641 ET MM después de 16 (izquierda) y 30 (derecha) días de cultivo en medio de germinación. La barra representa 1 cm.

Se cultivaron ápices meristemáticos en medio básico para conocer el fenotipo de la planta axénica. Los ápices meristemáticos de plantas mutantes enraizaron pero, al igual que ocurrió en las plántulas, se produjo el colapso sin llegar a desarrollar hojas (Figura 139).



Figura 139. Fenotipo de plantas axénicas de la línea 1641 ET MM tras cultivar ápices meristemáticos durante 30 días en medio básico. La barra representa 1 cm.

Se llevó a cabo la evaluación de la capacidad de regeneración adventicia en cotiledones cultivados en el medio IKZ (4.0 4.0 1.0) (Figura 140).

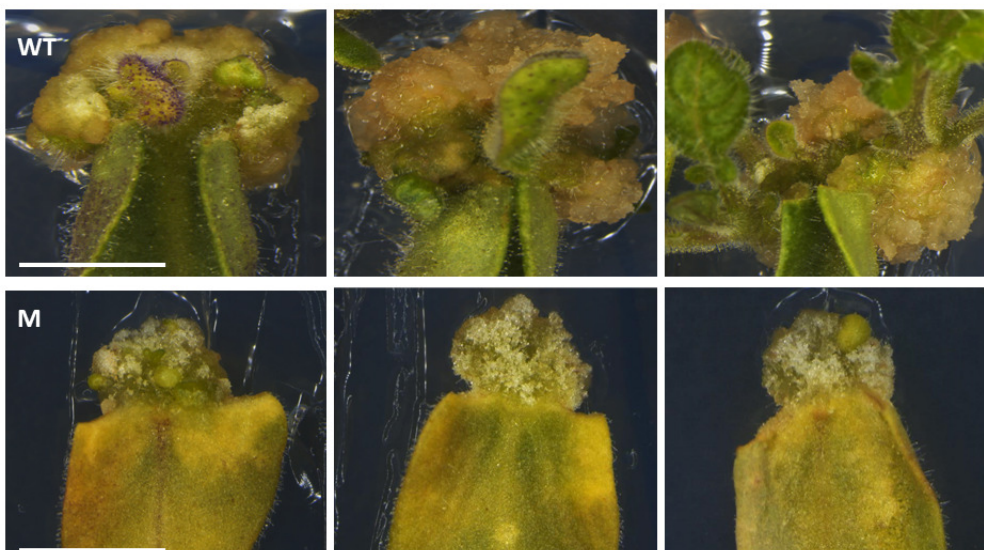


Figura 140. Respuesta de explantes de cotiledón de la línea 1641 ET MM después de 30 días de cultivo en medio de regeneración IKZ. La barra representa 5 mm.

Los resultados indicaron que, después de 30 días de cultivo en medio organogénico los explantes de cotiledón de plántulas mutantes no fueron capaces de regenerar yemas adventicias, aunque formaron callo desorganizado antes de que el explante de partida se volviera clorótico y, más tarde, se necrosara.

Por último, se estudió el fenotipo *in vivo* cultivando semillas TG2 en invernadero. El fenotipo mutante se observó claramente en el séptimo día de cultivo; poco después las plántulas colapsaron, igual que ocurría en condiciones axénicas (Figura 141).



Figura 141. Fenotipo de plántulas de la línea 1641 ET MM después de 7 y 8 días de cultivo en el invernadero. La barra representa 1 cm.

Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante

Se analizaron 136 individuos TG2 de la línea 1641 ET MM en tres experimentos *in vitro* y uno *in vivo* (Tabla 47).

Tabla 47. Análisis del modo de herencia del mutante 1641 ET MM.

	Segregación	WT	M	Total	χ^2
Experimento 1	Observada	26	5	31	1.30
	Esperada (3:1)	23.3	7.7		
Experimento 2	Observada	25	14	39	2.47
	Esperada (3:1)	29.3	9.7		
Experimento 3	Observada	13	6	19	0.44
	Esperada (3:1)	14.3	4.7		
Experimento 4	Observada	30	17	47	3.13
	Esperada (3:1)	35.3	11.7		
Datos acumulados^a	Observada	94	42	136	2.51
	Esperada (3:1)	102.0	34.0		

^a Análisis χ^2 homogeneidad ($\chi^2_H=4.83$) indica que las muestras son homogéneas ($P>0.05$; $\chi^2_{3\text{ g.l.}}=7.82$)

El análisis de los datos acumulados indicó un modo de herencia monogénico recesivo.

Análisis genético del número de insertos T-DNA

En los dos primeros experimentos no se pudo averiguar si las plantas mutantes eran resistentes o sensibles a la kanamicina porque morían antes de la evaluación. A partir de los resultados en las plantas WT se realizó el análisis estadístico para una segregación 2:1 (un inserto que cosegrega con el fenotipo mutante), 3:1 (un inserto que no cosegrega) y 15:1 (2 insertos que no cosegregan).

Los resultados indicaron que las muestras son homogéneas. La segregación no se ajustó a los modelos para un inserto T-DNA (2:1 o 3:1), y, en cambio, sí se ajustó a una segregación 15:1 (Tabla 48).

Tabla 48. Análisis del número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional de plantas WT de la línea 1641 ET MM.

	Segregación	Kan ^R	Kan ^S	Total	χ^2
Experimento 1	Observada	24	2	26	7.69
	Esperada (2:1)	17.3	8.6		
	Esperada (3:1)	19.5	6.5		
	Esperada (15:1)	24.4	1.6		
Experimento 2	Observada	23	2	25	7.22
	Esperada (2:1)	16.7	8.3		
	Esperada (3:1)	18.7	6.3		
	Esperada (15:1)	23.4	1.6		
Datos acumulados^a	Observada	47	4	51	14.91
	Esperada (2:1)	34.0	17.0		
	Esperada (3:1)	38.3	12.7		
	Esperada (15:1)	47.8	3.2		

^a Análisis χ^2 homogeneidad ($\chi^2_{H=0.0}$) indica que las muestras son homogéneas ($P > 0.05$; $\chi^2_{1g.l.} = 3.84$)

La hipótesis más probable era que la línea portara dos insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional. Esto se comprobó con los resultados del tercer experimento en el cuál se evaluó la resistencia a la kanamicina tanto en plantas WT como mutantes, gracias al cultivo de explantes de cotiledón en medio organogénico con antibiótico (Tabla 49).

Tabla 49. Análisis del número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional del experimento 3 de la línea 1641 ET MM.

	Segregación	Kan ^R	Kan ^S	Total	χ^2
Experimento 3	Observada	19	0	19	6.33
	Esperada (3:1)	14.3	4.7		
	Esperada (15:1)	17.8	1.2		

^a Análisis χ^2 ($P > 0.05$; $\chi^2_{1g.l.} = 3.84$)

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

Al no haber identificado plantas mutantes sensibles a la kanamicina se decidió determinar la existencia o ausencia de cosegregación mediante el análisis de progenies TG3 procedentes de plantas WT Kan^S. Si existiera cosegregación, no deberían aparecer plantas mutantes en dichas progenies TG3. Se evaluaron *in vitro* para ver el fenotipo y en una de las progenies analizadas se observó el fenotipo mutante (Tabla 50), lo que indica la ausencia de cosegregación.

Tabla 50. Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante en la progenie de la línea 1641-23 WT Kan^S ET MM.

	WT	M	Total
1641-23 WT Kan ^S	50	15	65

En este caso, debido a la muerte temprana de las plantas mutantes se realizaron los cruces de *Solanum pimpinellifolium* con la planta 1641-23 ET MM. Esta planta no porta ningún inserto de T-DNA (es sensible a la kanamicina) y es hemicigótica para la mutación (su descendencia segrega 50 WT : 15 M). Se obtuvieron varias plantas F1 y, de cada una de ellas, las correspondientes semillas F2. Se identificaron plantas con el fenotipo mutante en una de esas F2 (Figura 142).



Figura 142. Fenotipo de plantas F2 de la línea 1641 ET MM después de 7 días en medio de germinación. La barra representa 1 cm.

Mutante 1524 ET MM

Este mutante se detectó en una tesis doctoral previa de nuestro grupo (Sánchez-López, 2017). El mutante se caracteriza por una clorosis inicial que se convierte en una respuesta necrótica que afecta al tallo y al resto de los órganos vegetativos, haciendo imposible el desarrollo de los órganos reproductivos (Figura 143). El análisis de segregación indicó que el fenotipo estaba causado por una mutación monogénica recesiva y los análisis ulteriores indicaron que no existía cosegregación entre el único inserto T-DNA integrado y el fenotipo mutante.

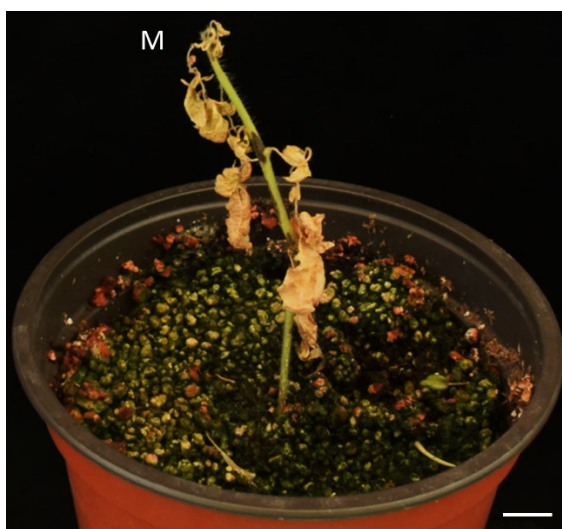


Figura 143. Fenotipo *in vivo* de planta mutante procedente de semilla de la línea 1524 ET MM después de 50 días de cultivo en invernadero. La barra representa 1 cm.

En esta tesis se ha tratado de profundizar en la caracterización del mutante. Se cultivaron semillas TG2 en invernadero, detectando plantas de menor tamaño, aún sin necrosis, a partir de los 15 días (Figura 144).

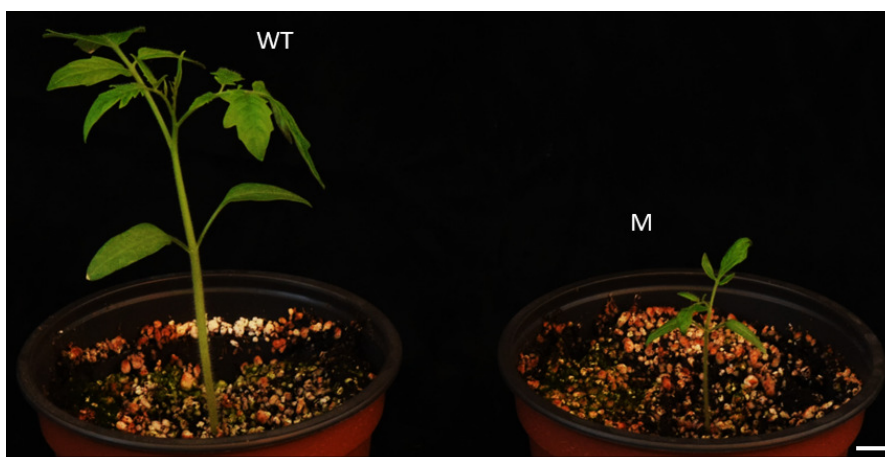


Figura 144. Fenotipo *in vivo* de plantas procedentes de semilla de la línea 1524 ET MM después de 15 días de cultivo en invernadero. La barra representa 1 cm.

Una vez identificadas las plantas mutantes y WT, se realizaron injertos en todas las combinaciones posibles a fin de conocer la influencia de la parte aérea y el sistema radicular. Después de 30 días de realizados los injertos se observó que en el injerto $\frac{WT}{M}$ la parte aérea estaba clorótica y había crecido menos que el injerto $\frac{WT}{WT}$. Por otra parte, como resultado más destacable, se vio que las plantas que tenían la parte aérea mutante con raíz WT tenían un aspecto similar al de las plantas WT. Por tanto, estos resultados nos permitieron concluir que en esta línea el fenotipo mutante depende fundamentalmente de la raíz de la planta (Figura 145).



Figura 145. Fenotipo de los injertos $\frac{M}{WT}$ y $\frac{WT}{M}$ y planta mutante de la línea 1524 ET MM tras de 30 días de cultivo en el invernadero. La barra representa 1 cm.

Después de 50 días de cultivo las observaciones anteriores se mantuvieron. Las plantas con raíz WT presentaban un buen desarrollo mientras que las que tenían raíz mutante prácticamente no crecieron en ese periodo (Figura 146).



Figura 146. Fenotipo de los injertos y plantas sin injertar de la línea 1524 ET MM tras 50 días de cultivo en invernadero. La barra representa 5 cm.

Las plantas se mantuvieron en el invernadero hasta la etapa adulta. Las plantas con raíz mutante crecieron menos y, tanto la planta mutante como el injerto $\frac{M}{M}$, murieron sin producir órganos reproductivos. Sin embargo, el injerto $\frac{WT}{M}$ se recuperó de la necrosis observada en los inicios del injerto y, aunque su crecimiento fue inferior comparado con el injerto $\frac{WT}{WT}$, pudo completar su desarrollo. Por último, las que tenían raíz WT crecieron inicialmente sin problemas. Cabe destacar que el injerto $\frac{M}{WT}$ se desarrolló inicialmente de forma muy parecida a las plantas testigo (Figura 147).



Figura 147. Fenotipo de parte aérea y raíz de plantas injertadas de la línea 1524 ET MM tras 4 meses de cultivo en invernadero. La barra representa 10 cm.

Al analizar la zona de unión injerto-patrón se observó que aparece perfectamente delimitada la zona que sufre necrosis (mutante) de la que permanece sana (WT). Esto se puede comprobar tanto en el injerto $\frac{WT}{M}$ como en el $\frac{M}{WT}$. De hecho, en este último,

parte del sistema radicular de la planta injertada se originaba a partir del tallo WT y, probablemente, ésta es la causa de la recuperación a largo plazo de la planta. Esta diferencia también se observó en el injerto inverso $\frac{M}{WT}$. En este caso, desde el punto de unión injerto-patrón hacia la raíz (WT) el tallo era verde y la raíz creció sin problemas. Sin embargo, desde esta misma zona hacia la parte aérea de la planta (M) se observaron claros síntomas de necrosis. En ese caso, los síntomas observados en el tallo parece que fueron los responsables de que, aunque se formara alguna inflorescencia, no llegara a desarrollarse ningún fruto (Figura 148).



Figura 148. Fenotipo de la zona de unión injerto-patrón, el tallo y los órganos reproductivos de plantas injertadas de las línea 1524 ET MM tras 4 meses de cultivo en el invernadero. La barra representa 1 cm.

En definitiva, en este mutante la respuesta necrótica se da tanto en la parte aérea como en la raíz y en ambos casos altera de forma significativa el normal desarrollo de la planta.

4.2.4. Mutantes afectados en el desarrollo radicular

El desarrollo de la raíz es uno de los caracteres que más relación tiene con la tolerancia a la sequía y la salinidad ya que este órgano es el que se encuentra directamente en contacto con el sustrato del que la planta extrae el agua y los nutrientes que necesita para sus funciones vitales. El estudio de su crecimiento, capacidad de formación de raíces secundarias y adventicias, presencia de malformaciones, etc. puede ayudar a descubrir nuevos genes que permitan abordar la mejora de las plantas cuando se ven sometidos a estos estreses.

En este cuarto y último apartado se presentan los resultados de la evaluación de cinco líneas que mostraron algún fenotipo mutante relacionado con el desarrollo radicular. Uno de estos mutantes se identificó en el escrutinio de líneas T-DNA en condiciones de estrés salino *in vitro* (196 ET GA). La línea 2647 ET MM M2 se identificó en un experimento de corroboración en TG2, ya que se había observado un fenotipo curioso en TG1 y queríamos saber si se transmitía a la descendencia. La línea 384 ET MM era un mutante identificado previamente al cultivar en el invernadero plantas TG2. La línea 2666 ET MM y el mutante *dor* se habían identificado en sendas tesis doctorales de nuestro grupo. Los fenotipos observados abarcan alteraciones en las raíces embrionarias, primarias o laterales, o en las raíces adventicias. En algunos mutantes se han detectado también cambios en otros caracteres. Además, dada la similitud fenotípica entre dos de estos mutantes, se realizó un test de alelismo que corroboró que ambas mutaciones afectan al mismo gen.

Mutante 196 ET GA

Este mutante se detectó en el experimento de evaluación *in vitro* en medio de germinación con estrés salino. Se observaron plántulas con un crecimiento más lento respecto al WT tanto de la parte aérea como del sistema radicular. Los cambios en el mutante se podían apreciar claramente desde los primeros 10 días de cultivo (Figura 149).

Una vez detectado el fenotipo mutante en presencia de estrés salino, se evaluó esta línea en un medio sin NaCl. En estas condiciones también se observaron plántulas mutantes. La parte aérea tenía un crecimiento más lento, pero los cambios más importantes se daban en la raíz. Las plántulas mutantes presentaron alteraciones en la raíz embrionaria, tanto por su menor longitud como por la práctica inexistencia de raíces secundarias (Figura 150).

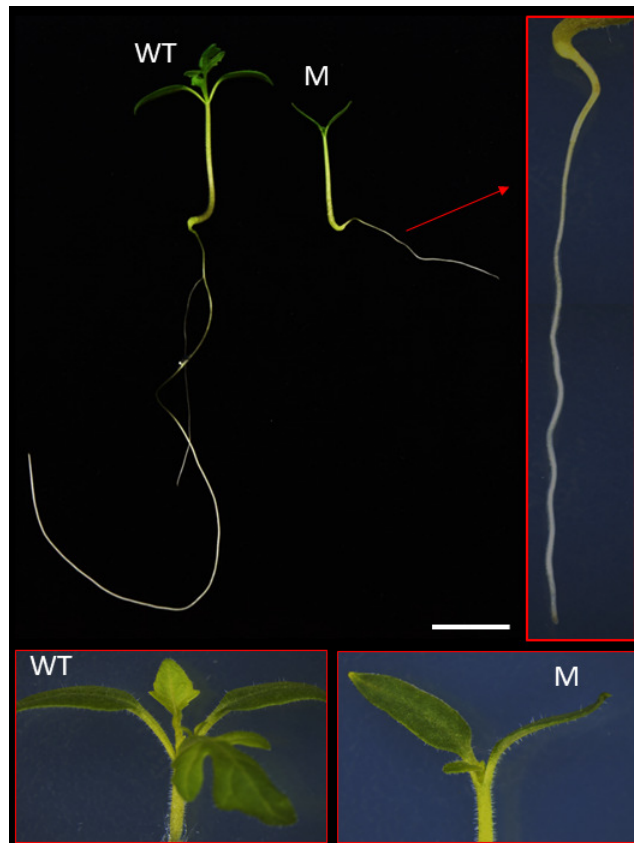


Figura 149. Fenotipo de plántulas procedentes de semilla de la línea 196 ET GA después de 10 días en medio de germinación con 75 mM de NaCl. La barra representa 1 cm.

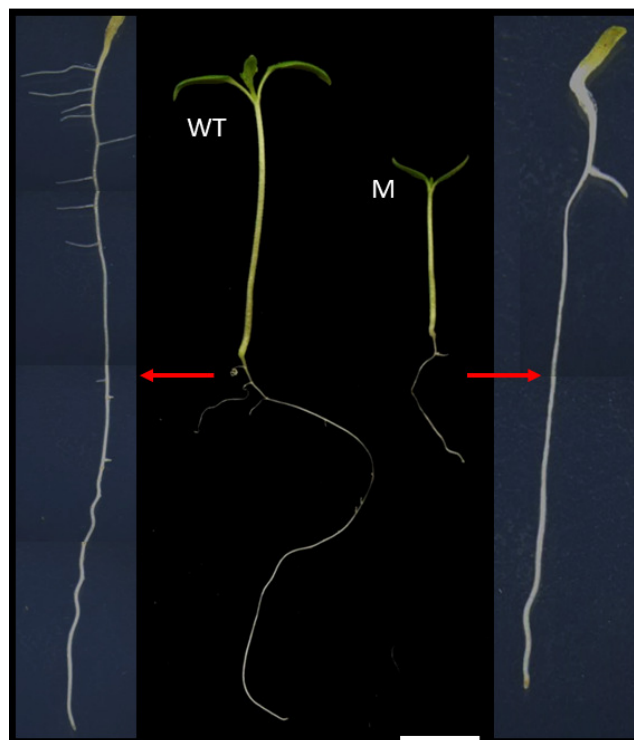


Figura 150. Fenotipo de plántulas de la línea 196 ET GA procedentes de semilla después de 7 días en medio de germinación. La barra representa 1 cm.

Incluso tras un mes de cultivo, la raíz primaria no había crecido mucho más y las raíces secundarias no se desarrollaban (Figura 151).



Figura 151. Fenotipo de plántulas procedentes de semilla de la línea 196 ET GA después de 30 días en medio de germinación. La barra representa 1 cm.



Figura 152. Fenotipo de planta axénica de la línea 196 ET GA después de 30 días de cultivo en medio básico. La barra representa 1 cm.

El fenotipo de la planta axénica obtenida tras cultivar apices meristemáticos en medio básico presentaba menor tamaño que el WT y, de nuevo, el sistema radicular adventicio estaba claramente alterado. Aunque el número de raíces primarias no difería significativamente del WT, su longitud era claramente inferior. Además, al igual que pasaba con la raíz embrionaria, la formación de raíces secundarias a partir de las raíces primarias adventicias era prácticamente inexistente en las plantas mutantes (Figura 152).

Por tanto, la mutación afecta tanto al desarrollo de las raíces primarias (embrionarias y adventicias) como a la formación de raíces secundarias.

Para comprobar si el fenotipo observado *in vitro* se reproducía en el invernadero se cultivaron semillas TG2 en macetas. Tras unos días de cultivo se identificaron las plantas mutantes. Al principio se observaba un menor desarrollo de la parte aérea que se iba acentuando con el paso del tiempo. Al evaluar el sistema radicular de estas plantas se vio que también estaba claramente afectado en su desarrollo (Figura 153).



Figura 153. Fenotipo *in vivo* a partir de semillas de la línea 196 ET GA después de 45 días y 75 días. La barra representa 5 cm.

Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante

Se realizaron dos experimentos en cultivo *in vitro* y uno en invernadero para conocer el modo de herencia del fenotipo mutante. El análisis de homogeneidad indicó que las muestras eran homogéneas. El análisis de los datos acumulados (χ^2 de datos acumulados) indicó que no había motivos para dudar de un modelo de herencia monogénica recesiva (Tabla 51).

Tabla 51. Análisis del modo de herencia del mutante 196 ET GA.

	Segregación	WT	M	Total	χ^2
Experimento 1	Observada	21	6	27	0.11
	Esperada (3:1)	20.3	6.7		
Experimento 2	Observada	18	10	28	1.71
	Esperada (3:1)	21.0	7.0		
Experimento 3	Observada	19	5	24	0.22
	Esperada (3:1)	18.0	6.0		
Datos acumulados ^a	Observada	58	21	79	0.11
	Esperada (3:1)	59.3	19.7		

^a Análisis χ^2 homogeneidad ($\chi^2_H = 1.94$) indica que la muestras son homogéneas ($P > 0.05$; $\chi^2_{2\text{ g.l.}} = 5.99$)

Análisis genético del número de insertos T-DNA

En cuanto a la segregación de la resistencia a kanamicina, se analizaron 55 individuos con una segregación de 40 resistentes y 15 sensibles. Al realizar la prueba de χ^2 se determinó que la línea 196 ET GA porta un inserto *nptII* funcional (Tabla 52).

Tabla 52. Análisis del número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional de la línea 196 ET GA.

	Segregación	Kan ^R	Kan ^S	Total	χ^2
Experimento 1	Observada	21	6	28	0.11
	Esperada (3:1)	20.3	6.735		
Experimento 2	Observada	19	9	27	0.76
	Esperada (3:1)	21.0	7.0		
Datos acumulados ^a	Observada	40	15	55	0.15
	Esperada (3:1)	41.3	13.7		

^a Análisis χ^2 homogeneidad ($\chi^2_H = 0.72$) indica que la muestras son homogéneas ($P > 0.05$; $\chi^2_{1\text{ g.l.}} = 3.84$)

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

Cuando se investigó la existencia, o no, de asociación entre el fenotipo mutante y el único inserto T-DNA de la línea 196 ET GA se comprobó que no existe cosegregación, ya que se observaron cuatro plantas mutantes sensibles a la kanamicina en los experimentos realizados (Tabla 53).

Tabla 53. Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 196 ET GA.

	WT		M		Total
	Kan ^R	Kan ^S	Kan ^R	Kan ^S	
Experimento1	16	5	5	1	27
Experimento 2	12	6	7	3	28
Datos acumulados	28	11	12	4	55

Una vez descartada la cosegregación entre el fenotipo mutante y un inserto de T-DNA con el gen *nptII* funcional, se va a analizar si la mutación se debe a algún inserto truncado de T-DNA o, alternativamente, a la integración del cuerpo del vector.

Mutante 2647 ET MM M2

Al cultivar en el invernadero la planta TG1 de la línea 2647 ET MM, se observó la formación de brotes adventicios en los nervios de algunas hojas, siendo el resto de caracteres similares a los de una planta WT. Además, al realizar la evaluación *in vitro* de las plantas TG2 se observaron dos fenotipos mutantes. El primero, denominado M1, se caracterizó por una alteración en el ápice y se describió en un apartado anterior. El segundo, denominado M2, se caracterizó por alteraciones en las hojas y el sistema radicular y es el que se describe en este apartado.

Las plántulas cultivadas *in vitro* en medio de germinación tenían un desarrollo más lento de la parte aérea y un sistema radicular con un menor crecimiento de la raíz embrionaria y sin formación de raíces secundarias (Figura 154).

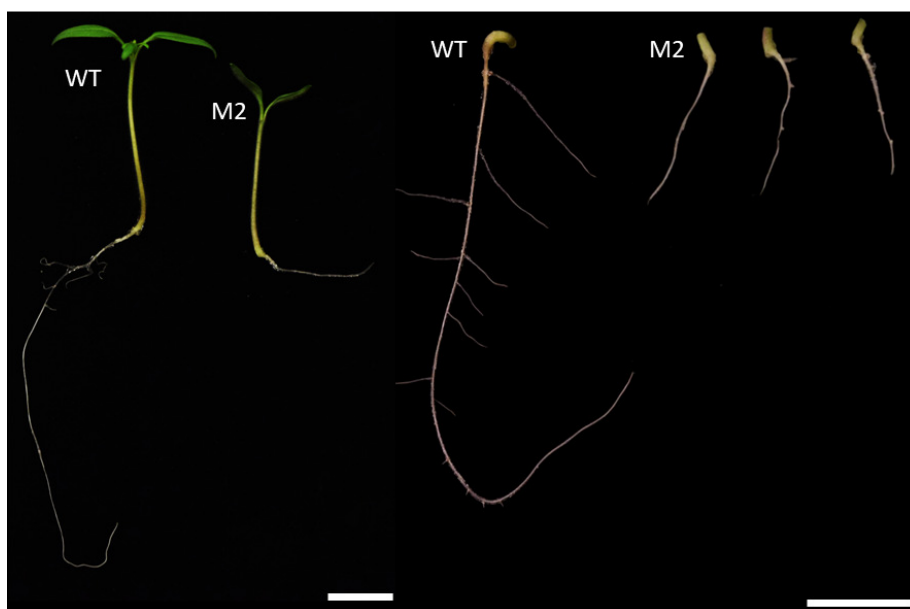


Figura 154. Fenotipo de plántulas de la línea 2647 ET MM M2 tras 7 días de cultivo en medio de germinación. La barra representa 1 cm.

Se cultivaron los ápices meristemáticos de estas plántulas para conocer el fenotipo de la planta axénica. El sistema radicular adventicio también estaba alterado. Se observó que las raíces primarias no eran capaces de elongar y que no había formación de raíces secundarias (Figura 155).



Figura 155. Fenotipo de planta axénica del mutante M2 de la línea 2647 ET MM en medio básico. En la fotografía el WT se cultivo durante 30 días y el mutante M2 durante 90 días. La barra representa 1 cm.

Respecto a la parte aérea, las plantas axénicas mutantes desarrollaron entrenudos más cortos y tenían hojas de morfología muy diferente al WT (Figura 156).



Figura 156. Fenotipo de las hojas de planta axénica de la línea 2647 ET MM M2. La barra representa 1 cm.

Se evaluó la capacidad de regeneración adventicia en medio IKZ 4.0 4.0 1.0 cultivando como explantes segmentos de raquis. Los explantes mutantes regeneraron brotes que, incluso en etapas tempranas de su desarrollo, mostraban una morfología foliar diferente (Figura 157).

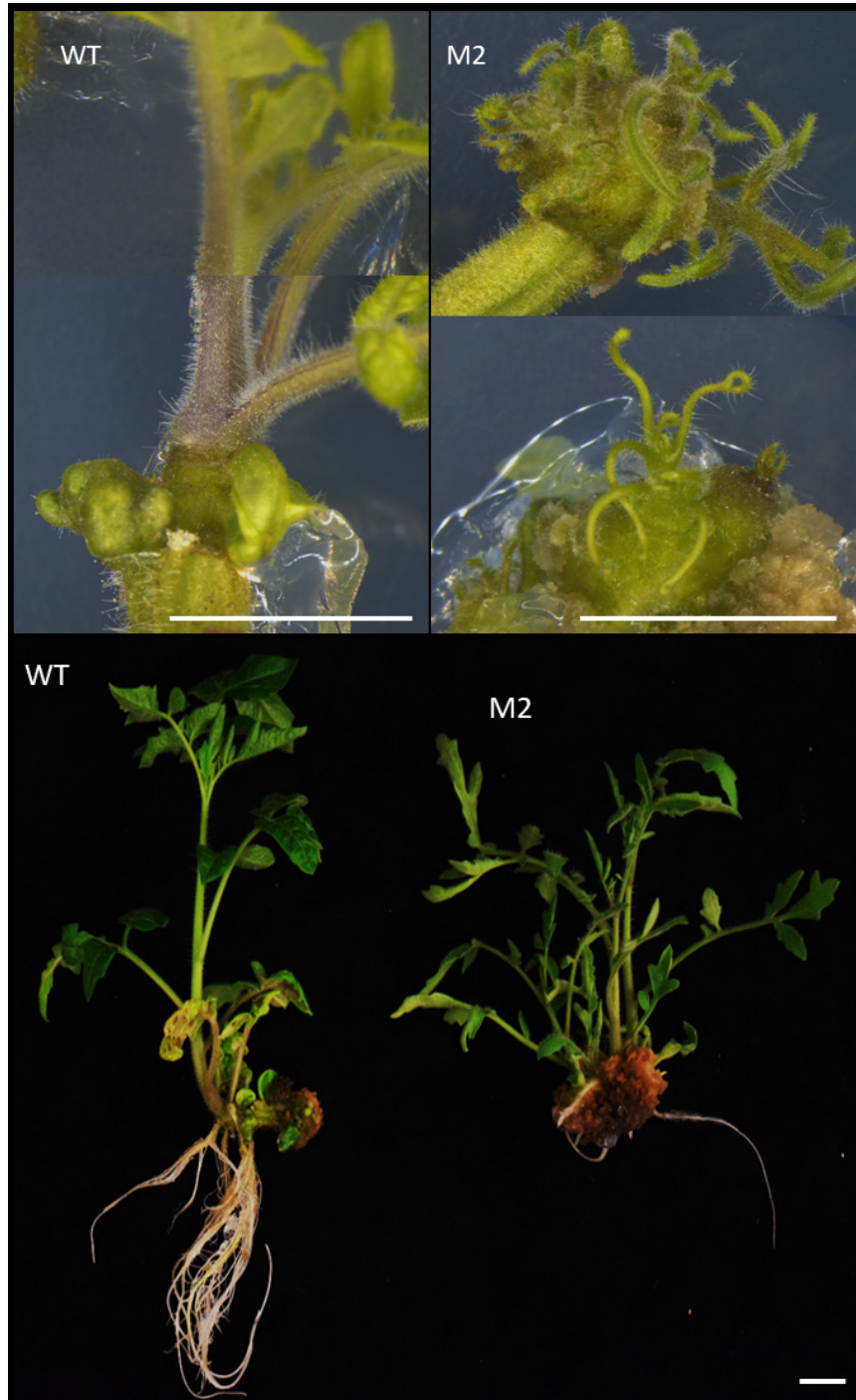


Figura 157. Regeneración adventicia de la línea 2647 ET MM M2 a partir de explantes de raquis cultivados 30 días en IKZ (arriba) y tras un subcultivo a medio de elongación (abajo). La barra representa 1 cm.

También se estudió la respuesta de los explantes en un medio de enraizamiento I 4.0 utilizando como explantes de partida hojas y cotiledones (Figura 158).



Figura 158. Ausencia de enraizamiento adventicio de la línea 2647 ET MM M2 a partir de explantes de hoja y cotiledón cultivados 30 días en I 4.0. La barra representa 1 cm.

Al igual que lo observado cuando se cultivaron ápices meristemáticos, los explantes de hoja y de cotiledón no fueron capaces de emitir raíces adventicias en condiciones donde sí enraizaban los explantes procedentes de plantas WT.

Para caracterizar el fenotipo mutante *in vivo* se cultivaron semillas TG2 en el invernadero. El fenotipo se detectó en las primeras etapas del desarrollo de las plántulas. En los primeros días se observaron alteraciones en la parte aérea, cotiledones arrugados y menos expandidos y, sobre todo, un menor desarrollo con relación a las plántulas WT (Figura 159).

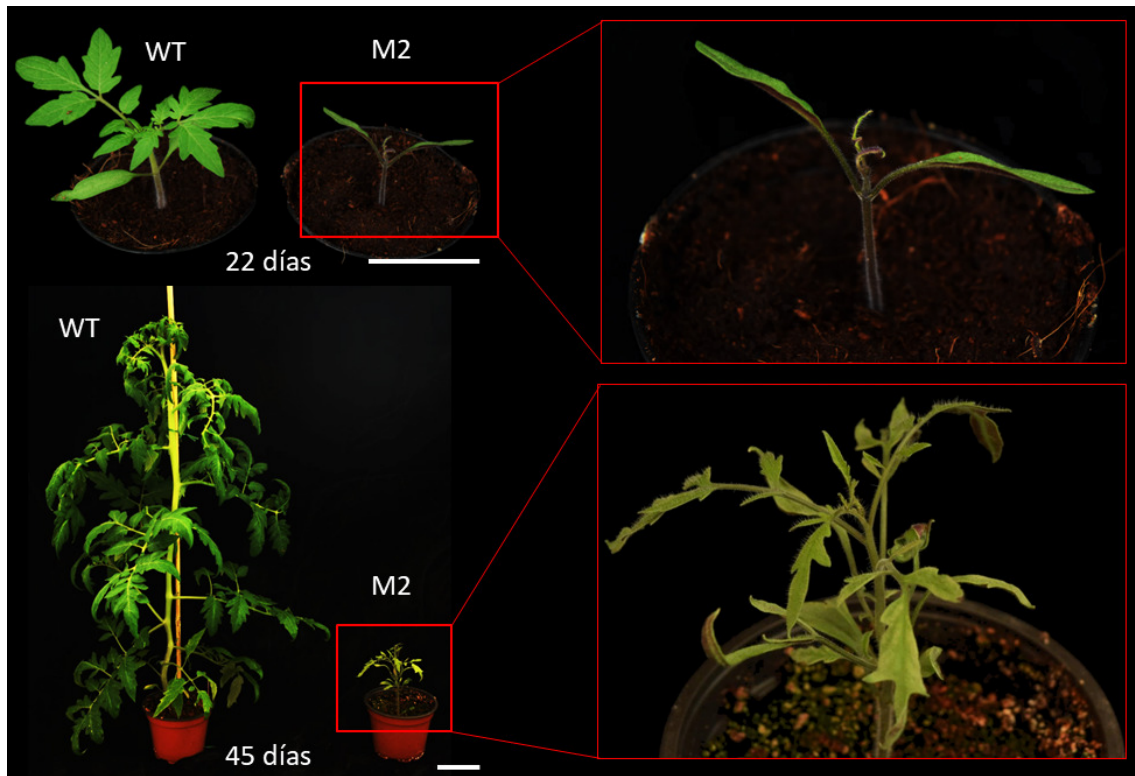


Figura 159. Fenotipo del mutante M2 de la línea 2647 ET MM a partir de semilla después de 22 y 45 días *in vivo*. La barra representa 5 cm.

A continuación, se analizó el fenotipo de las raíces de las plantas cultivadas en el invernadero. Al igual que ocurría *in vitro*, las plantas mutantes tenían una escasa masa radicular, con raíces primarias anómalas y de escasa o nula elongación, y sin raíces secundarias (Figura 160).

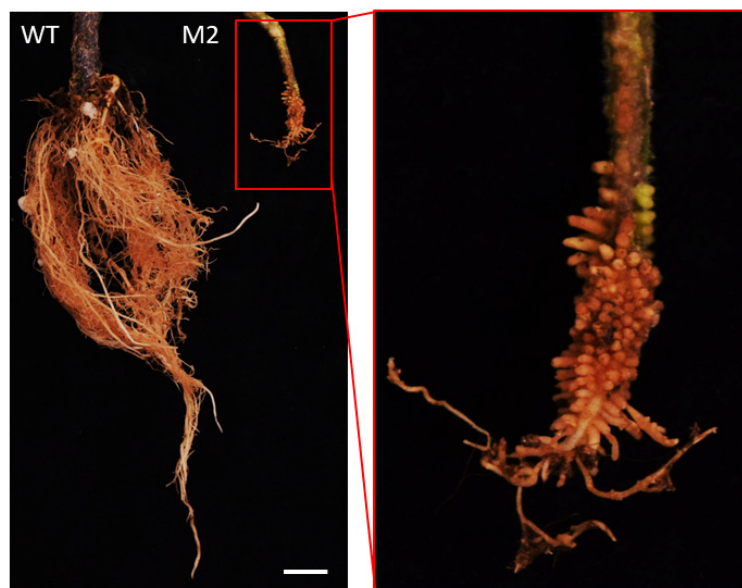


Figura 160. Fenotipo del sistema radicular del mutante M2 de la línea 2647 ET MM a partir de semilla después de 45 días *in vivo*. La barra representa 1 cm.

Las plantas mutantes siguieron creciendo y desarrollaron flores y frutos. Además, se observó la formación de estructuras organogénicas en el raquis de algunas hojas (Figura 161).

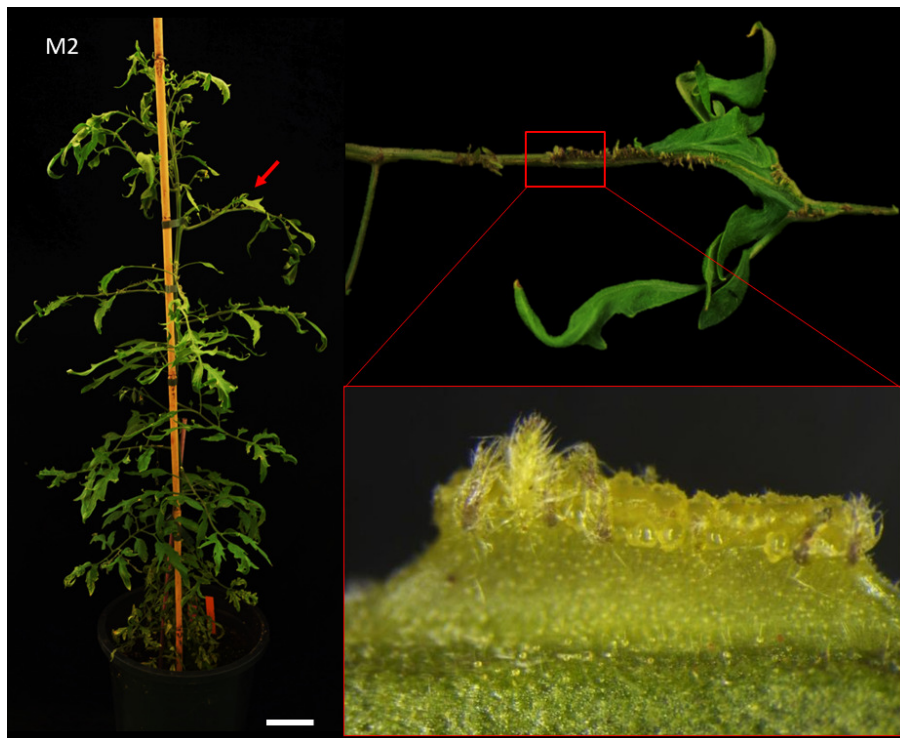


Figura 161. Fenotipo del mutante M2 de la línea 2647 ET MM tras 90 días de cultivo en el invernadero. Detalle de una hoja y de las estructuras que aparecieron en su raquis. La barra representa 10 cm.

Se realizaron cortes histológicos de raquis de hoja, observando el desarrollo de ápices meristemáticos vegetativos y ápices diferenciados en meristemos florales (Figura 162).

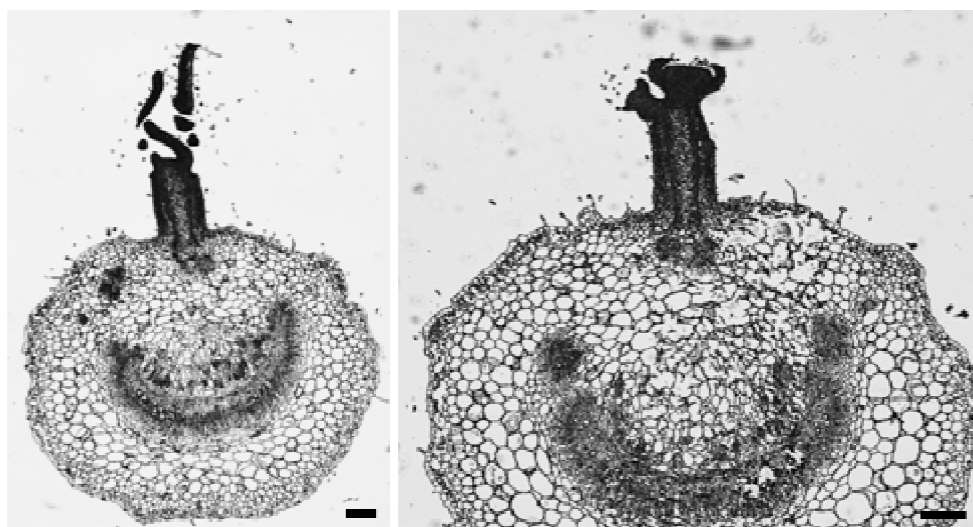


Figura 162. Cortes histológicos de raquis de hoja del mutante de la línea 2647 ET MM M2. La barra representa 200 μm .

Siguiendo con el fenotipado del mutante *in vivo*, se comprobó que las flores presentaban alteraciones en etapa de preantesis y antesis. En concreto, el mutante tenía todos los órganos florales curvados (Figura 163).

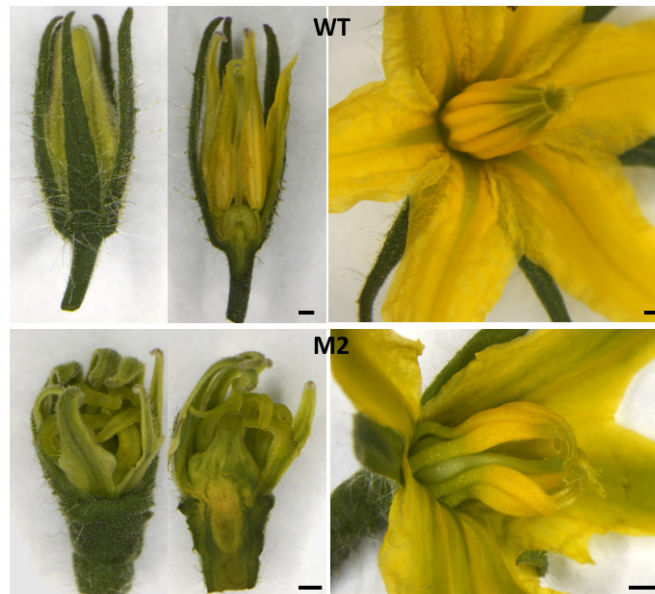


Figura 163. Fenotipo de flor en preantesis (izquierda) y antesis (derecha) de la línea 2647 ET MM M2. La barra representa 1 mm.

En estado adulto, la planta mutante desarrolló frutos de menor tamaño, cordiformes, asurcados, y sin semillas (Figura 164).

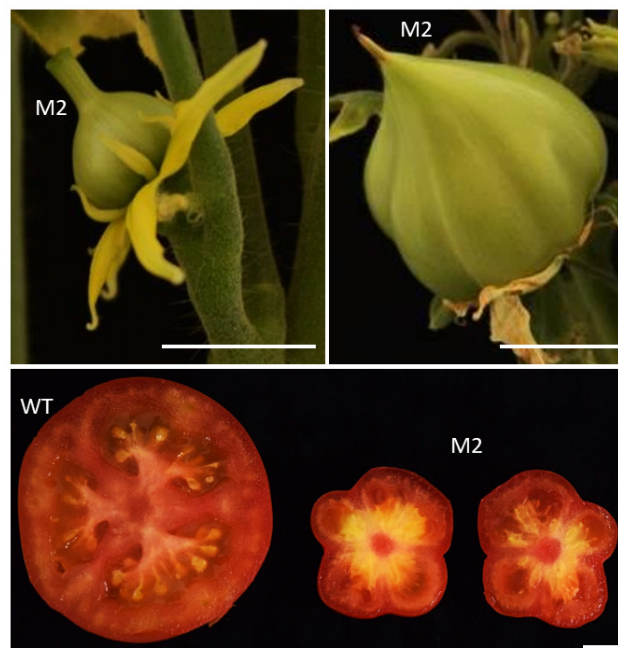


Figura 164. Fenotipo de frutos de la línea 2647 ET MM M2. La barra representa 1 cm.

Una vez comprobadas las alteraciones que presenta este mutante en su sistema radicular, se realizaron injertos en ambos sentidos (es decir, $\frac{M}{WT}$ y $\frac{WT}{M}$) y, además, se compararon estas plantas tanto con injertos $\frac{WT}{WT}$ y $\frac{M}{M}$ como con plantas sin injertar (WT y M) (Figura 165).



Figura 165. Fenotipo de plantas injertadas y sin injertar de la línea 2647 ET MM M2 tras 30 días (arriba) y 90 días (abajo) de cultivo en el invernadero. La barra representa 5 cm.

Los resultados de los injertos indicaron que la raíz es el principal órgano responsable del menor crecimiento de las plantas mutantes, ya que el injerto $\frac{M}{WT}$ creció casi a la par que el injerto $\frac{WT}{WT}$, al menos durante los primeros 30 días de cultivo.

Las raíces del WT no son capaces de normalizar el fenotipo de la parte aérea del mutante, ya que la morfología de las hojas de la parte aérea del injerto $\frac{M}{WT}$ es idéntica a la del mutante sin injertar.

Por otro lado, los resultados del injerto $\frac{WT}{M}$ indican que la raíz mutante es incapaz de soportar un crecimiento normal de la parte aérea WT, provocando además anomalías en su desarrollo que principalmente se traducen en un color rojizo en el tallo y el envés de las hojas (Figura 166).

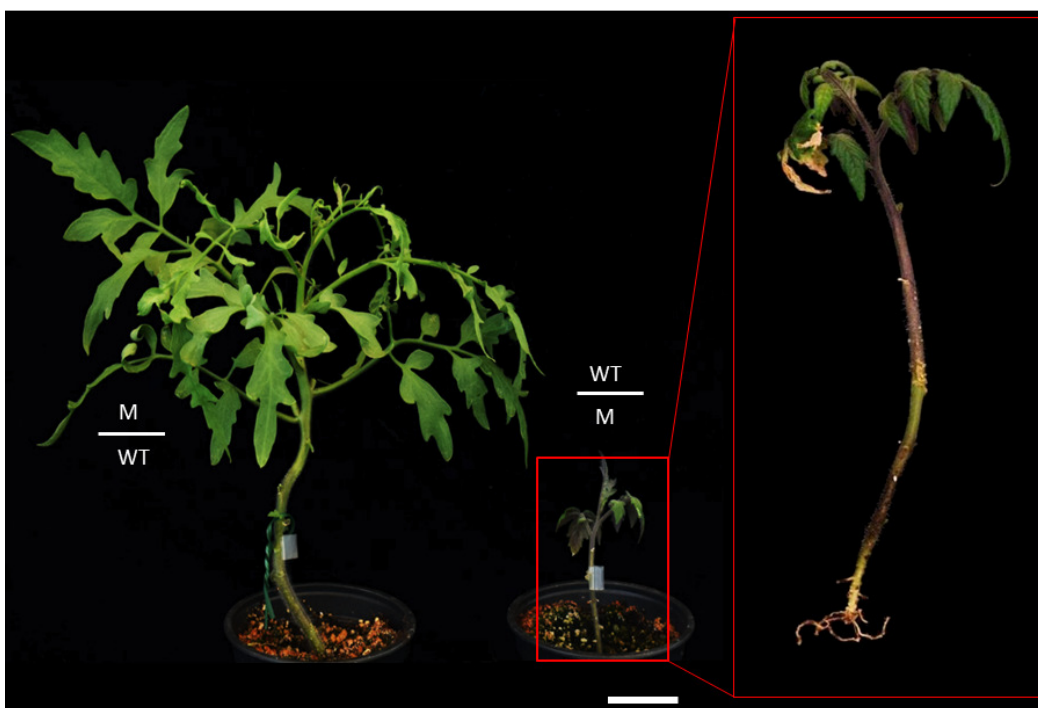


Figura 166. Fenotipo de injertos $\frac{M}{WT}$ y $\frac{WT}{M}$ de la línea 2647 ET MM M2 tras 30 días de cultivo en el invernadero. La barra representa 5 cm.

Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante

Se realizaron dos experimentos *in vitro* y un experimento *in vivo* a partir de semillas TG2. El fenotipo mutante se observó en todos los casos. Sin embargo, la segregación en el primer experimento se desvió de los valores esperados para un mutante monogénico recesivo (3 plantas WT por cada planta M). El análisis de homogeneidad indicó que las muestras eran homogéneas y el análisis de los datos acumulados reflejó el mismo resultado que el primer experimento (Tabla 54).

Tabla 54. Análisis del modo de herencia de la línea 2647 ET MM M2.

	Segregación	WT	M	Total	χ^2
Experimento 1	Observada	37	3	40	6.53
	Esperada (3:1)	30.0	10.0		
Experimento 2	Observada	46	8	54	2.99
	Esperada (3:1)	40.5	13.5		
Experimento 3	Observada	20	2	22	2.97
	Esperada (3:1)	16.5	5.5		
Datos acumulados ^a	Observada	103	13	116	11.77
	Esperada (3:1)	87.0	29.0		

^a Análisis χ^2 homogeneidad ($\chi^2_H=0.72$) indica que las muestras son homogéneas ($P>0.05$; $\chi^2_{2\text{ g. l.}}=5.99$)

Como puede verse, en todos los experimentos hay un menor número de plantas mutantes de lo esperado. Así pues, lo más probable es que la mutación sea monogénica recesiva y que la desviación entre los valores esperados y los observados para la clase mutante se deba a la existencia de un cierto grado de subletalidad asociada al fenotipo mutante. Alternativamente, es posible que las semillas tengan menor capacidad de germinación o que la alteración en el desarrollo radicular provoque una reducción en la capacidad de crecimiento de los embriones del mutante.

Análisis genético del número de insertos T-DNA

El análisis genético del número de insertos de T-DNA, basado en la evaluación de la resistencia a la kanamicina, no se ajustaba a una hipótesis de un único inserto con el gen *nptII* funcional. Por tanto, se realizaron los cálculos para dos insertos. Los resultados indicaron que no hay motivos para dudar de que esta línea porte dos insertos de T-DNA con el gen *nptII* funcional (Tabla 55).

Tabla 55. Análisis del número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional para la línea 2647 ET MM.

	Segregación	Kan ^R	Kan ^S	Total	χ^2
Experimento1	Observada	36	4	40	4.80
	Esperada (3:1)	30.0	10.0		
	Esperada (15:1)	37.5	2.5		
Experimento 2	Observada	50	4	54	8.91
	Esperada (3:1)	40.5	13.5		
	Esperada (15:1)	50.6	3.4		
Datos acumulados ^a	Observada	86	8	94	13.63
	Esperada (3:1)	70.5	23.5		
	Esperada (15:1)	88.1	5.9		

^a Análisis χ^2 homogeneidad ($\chi^2_H=0.26$) indica que las muestras son homogéneas ($P>0.05$; $\chi^2_{1\text{ g. l.}}=3.84$)

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

Para determinar la existencia o ausencia de cosegregación se aclimataron 6 plantas TG2 WT Kan^S y se analizó su descendencia. En las progenies TG3 de estas seis plantas no se observó el fenotipo mutante (Tabla 56).

Tabla 56. Análisis de progenie TG3 procedente de TG2 WT Kan^S de la línea 2647 ET MM M2.

TG2	WT	M	Total
2647-2 WT Kan ^S	20	0	20
2647-12 WT Kan ^S	20	0	20
2647-14 WT Kan ^S	21	0	21
2647-17 WT Kan ^S	24	0	24
2647-18 WT Kan ^S	21	0	21
2647-19 WT Kan ^S	24	0	24

Por tanto, no hay motivos para dudar de que exista cosegregación entre el fenotipo mutante y un inserto de T-DNA con el gen *nptII* funcional.

Debido a la existencia de cosegregación con uno de los dos insertos de T-DNA, se llevaron a cabo los experimentos necesarios para obtener un material que portara el inserto que ocasiona el fenotipo mutante. Para ello, buscamos una planta TG2 WT Kan^R cuya descendencia segregara para la mutación y para un inserto T-DNA. Se obtuvieron progenies TG3 a partir de TG2 con dichas características y se observó su segregación (Tabla 57).

Tabla 57. Análisis del modo de herencia de progenies TG3 procedentes de TG2 WT Kan^R de la línea 2647 ET MM M2 en condiciones *in vivo*.

TG2	Segregación	WT	M	Total	χ^2
2647-1 WT Kan ^R	Observada	20	3	23	1.75
	Esperada (3:1)	17.3	5.7		
2647-7 WT Kan ^R	Observada	17	8	25	0.65
	Esperada (3:1)	18.7	6.3		
2647-8 WT Kan ^R	Observada	12	4	16	0.00
	Esperada (3:1)	12.0	4.0		
2647-11 WT Kan ^R	Observada	15	5	20	0.00
	Esperada (3:1)	15.0	5.0		

Después se llevó a cabo la evaluación de resistencia a la kanamicina. Los resultados indicaron que la línea 2647-11 ET MM, además de segregar para la mutación portaba un único inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional ($\chi^2_{(3:1)}=0.45 < 3.84_{1g.l. (5\%)}$).

Para comprobar que este inserto era el causante de la mutación se hicieron dos experimentos en los que se evaluó tanto el fenotipo como la resistencia a la kanamicina (Tabla 58)

Tabla 58. Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 2647-11 ET MM M2.

	Segregación	WT Kan^R	WT Kan^S	M Kan^R	M Kan^S	Total	χ^2
Experimento 1	Observada	20	7	3	0	30	4.40
	Esperada (2:1:1)	15.0	7.5	7.5	0		
Experimento 2	Observada	21	14	9	0	44	1.23
	Esperada (2:1:1)	22.0	11.0	11.0	0		
Datos acumulados ^a	Observada	41	21	12	0	74	3.05
	Esperada (2:1:1)	37.0	18.5	18.5	0		

^a Análisis χ^2 homogeneidad ($\chi^2_{H}=2.57$) indica que las muestras son homogéneas ($P>0.05$; $\chi^2_{2\text{ g.l.}} = 5.99$)

Tras comprobar que en esta línea hay cosegregación fenotipo – *nptII*, se va a llevar a cabo la clonación del gen responsable del fenotipo mutante mediante Anchor-PCR.

Mutante 2666 ET MM

Este mutante se identificó en el contexto de una tesis previa (Sánchez-López, 2017), en la cual se llegó a las siguientes conclusiones: i) el fenotipo se debía a una mutación monogénica recesiva; ii) la línea tenía dos o tres insertos con el gen *nptII* funcional; y iii) que no había cosegregación, ya que se encontró una planta mutante sensible a la kanamicina. En esta tesis se ha tratado de profundizar en la caracterización fenotípica del mutante.

En la plántula cultivada *in vitro*, el fenotipo del mutante se observó desde los 7 días en medio de germinación. Tal y como se había descrito previamente, el sistema radicular embrionario estaba claramente alterado respecto al WT, ya que no se observó elongación de la raíz principal ni de las raíces laterales (Figura 167).

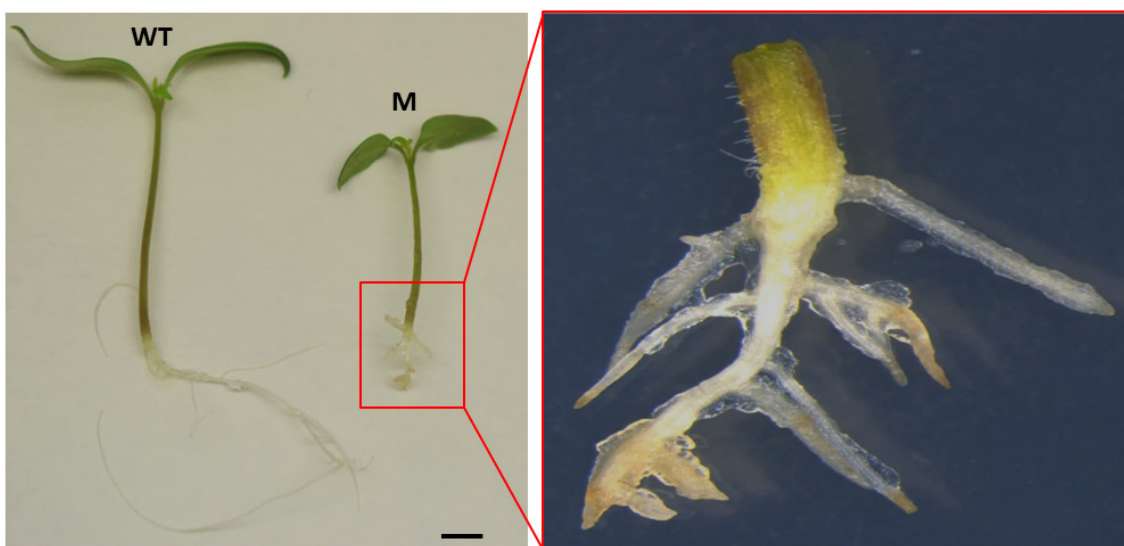


Figura 167. Fenotipo de la plántula procedente de semilla de la línea 2666 ET MM en medio de germinación después de 7 días. La barra representa 1 cm.

En cuanto al desarrollo de la planta axénica en medio básico, se observó un menor crecimiento de la parte aérea y un escaso desarrollo de las raíces adventicias (Figura 168).



Figura 168. Fenotipo en la planta axénica del mutante 2666 ET MM en medio básico después de 30 días. La barra representa 1 cm.

A continuación, se evaluó la respuesta organogénica de explantes procedentes de segmentos de cotiledón en medio IKZ (4.0 4.0 1.0). A los 30 días, se observó que los explantes de las plántulas mutantes sólo formaron un pequeño callo en la zona de corte, mientras que los explantes WT desarrollaron yemas adventicias y brotes. A los 60 días los explantes mutantes seguían sin dar una respuesta organogénica y el pequeño callo desorganizado empezó a experimentar síntomas de necrosis (Figura 169).

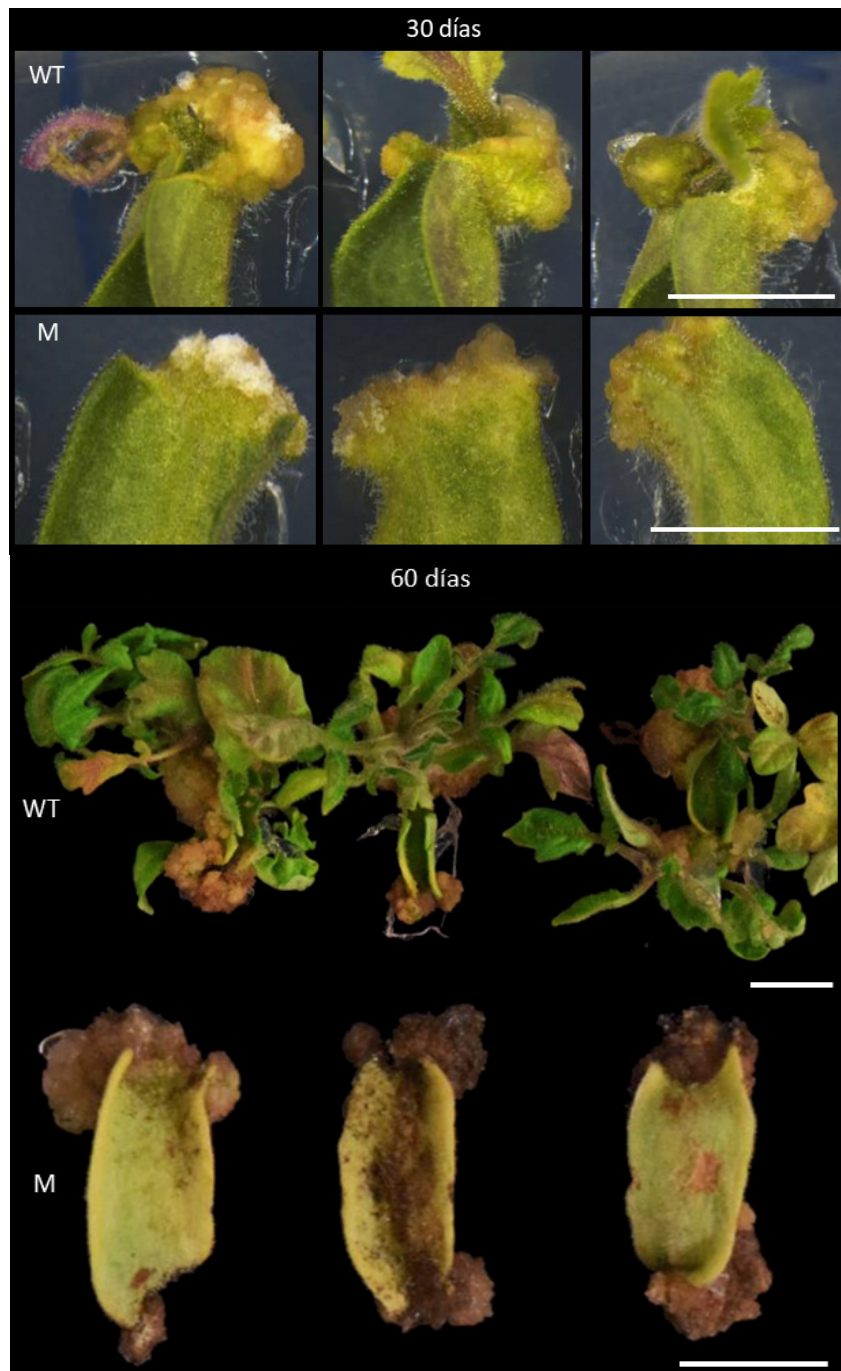


Figura 169. Cotiledones de la línea 2666 ET MM después de 30 y 60 días en medio de regeneración IKZ. La barra representa 1 cm.

También se evaluó la respuesta de cotiledones en medio de inducción de raíces I 4.0. A diferencia de lo que ocurría en los explantes WT, que desarrollaron raíces sin problema, los explantes mutantes no fueron capaces de emitir raíces después de 30 días de incubación. Como excepción, un explante mutante logro formar una raíz corta, que no fue capaz de elongar, a diferencia de lo sucedía en los explantes WT (Figura 170).

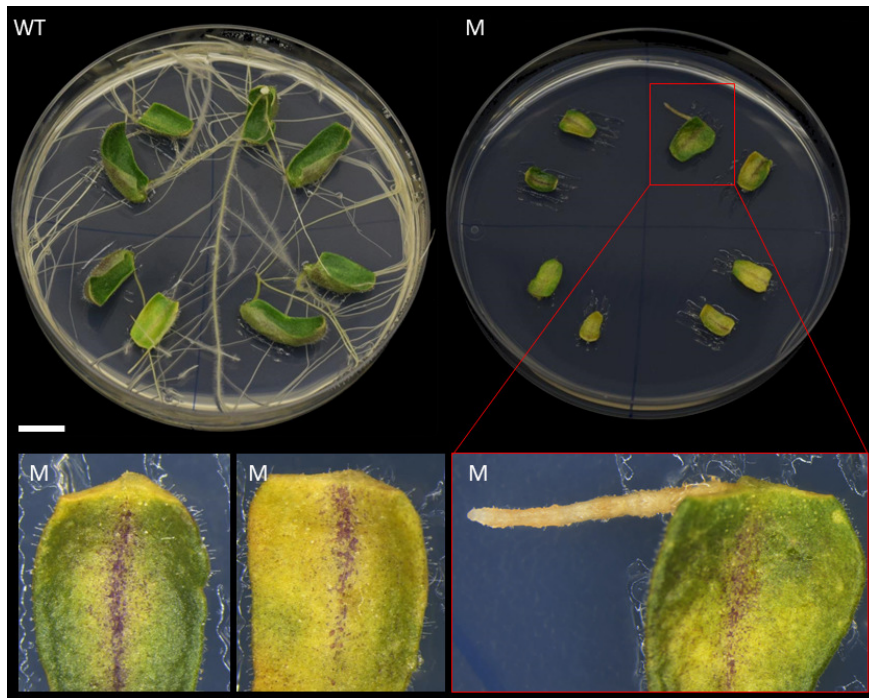


Figura 170. Cotiledones de la línea 2666 ET MM después de 30 días en medio I 4.0. La barra representa 1 cm.

A continuación, se evaluó el fenotipo *in vivo* cultivando semillas TG2. Se observó un menor crecimiento de la parte aérea del mutante, así como un escaso desarrollo del sistema radicular (Figura 171).



Figura 171. Fenotipo *in vivo* a partir de semilla de la línea 2666 ET MM después de 90 días. La barra representa 5 cm.

Se llevó a cabo el experimento de injertos, sobre todo con el fin de averiguar si el mutante era capaz de fenocopiar al WT si se injertaba sobre patrón WT.

El desarrollo radicular en el injerto $\frac{WT}{M}$ fue casi idéntico al observado en la planta M sin injertar, así como en la injertada sobre su propia raíz. Esto indica que la parte aérea del WT es incapaz de promover un desarrollo normal de la raíz M. En el injerto recíproco ($\frac{M}{WT}$), la parte aérea (M) experimentó un cierto desarrollo, pero no llegó a crecer igual que el WT. Es decir, la raíz del WT es incapaz de originar una fenocopia WT en la parte aérea M. Lo más notable es que, la raíz del WT no llegó a tener una masa radicular como la de una planta WT sin injertar (Figura 172). Esto indica que, si bien la mutación afecta principalmente a la parte radicular, también tiene un cierto efecto sobre la parte aérea.



Figura 172. Injertos de la línea 2666 ET MM $\frac{WT}{WT}$; $\frac{WT}{M}$; $\frac{M}{WT}$; M sin injertar y $\frac{M}{M}$ después de 90 días en invernadero. La barra representa 5 cm.

Mutante *dor*

Este mutante recesivo fue identificado previamente en nuestro grupo. Tras una evaluación fenotípica preliminar y un análisis subsiguiente llegamos a la conclusión de que no había cosegregación entre el fenotipo y el inserto T-DNA. Aún así, el trabajo realizado en el contexto de la presente Tesis indica que se trata el primer mutante de tomate que tiene alteraciones en dos procesos tan aparentemente distintos como el desarrollo radicular y la organogénesis adventicia. Por este motivo, lo hemos denominado *dor* (*defective in organogenesis and rooting*).

La evaluación de plántulas cultivadas *in vitro* en medio de germinación indicó alteraciones en la raíz embrionaria. Las plántulas mutantes solo emitían unas pocas raíces secundarias que presentaban una escasa elongación. Como consecuencia, el crecimiento de la parte aérea era menor que el de las plántulas WT (Figura 173).

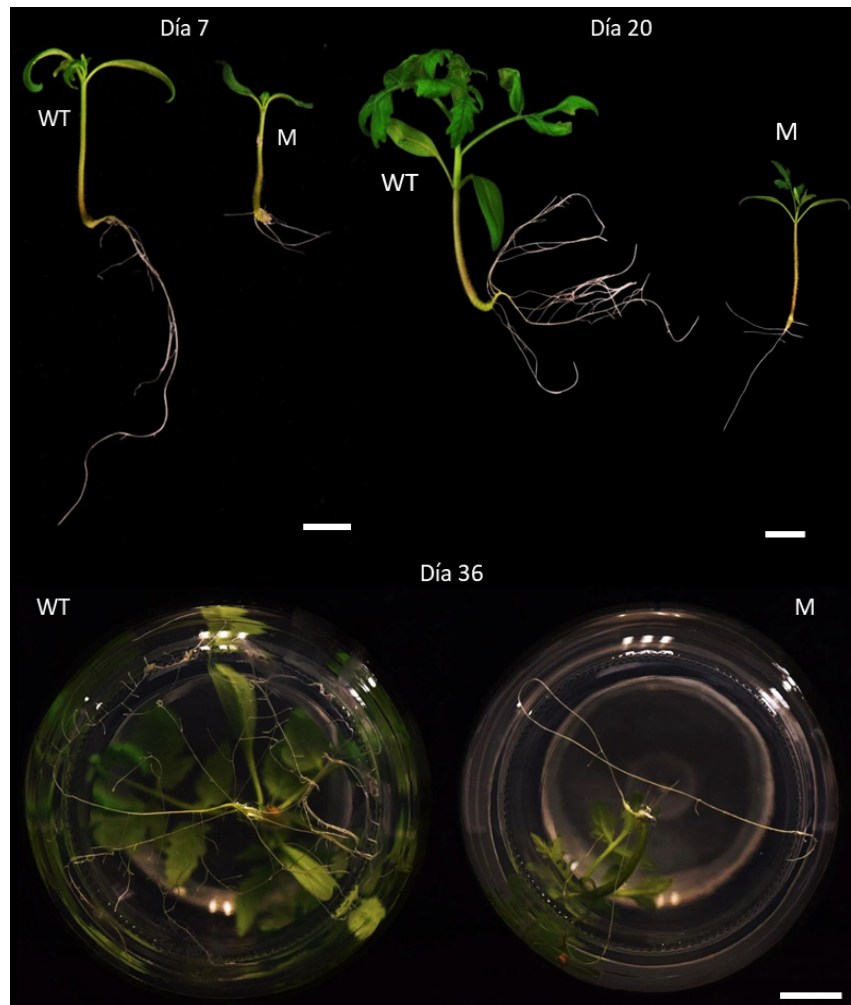


Figura 173. Fenotipo de plántulas procedentes de semillas del mutante *dor* después de 7, 20 y 36 días de cultivo en medio de germinación. La barra representa 1 cm.

Para estudiar el enraizamiento adventicio se cultivaron ápices meristemáticos en medio básico. Se observó que el sistema radicular de las plantas axénicas también estaba alterado, ya que no tenía raíces secundarias, sino solo protuberancias en los lugares donde deberían haber aparecido las raíces laterales. Aparentemente, el problema no era la formación de los nuevos meristemas radiculares a partir de las raíces primarias, sino la elongación de las raíces secundarias (Figura 174).

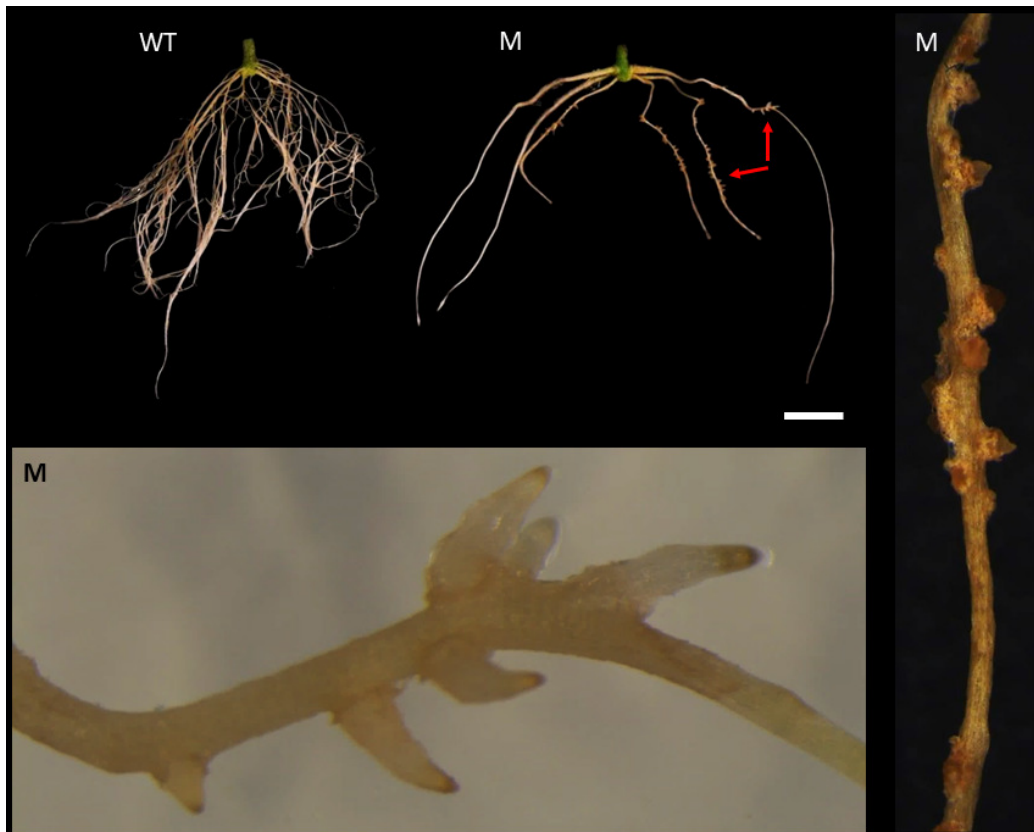


Figura 174. Fenotipo de las raíces adventicias de plantas axénicas del mutante *dor*. La barra representa 1 cm.

Para ver si el fenotipo mutante se debía a un déficit en auxinas endógenas, se realizó un experimento cultivando ápices meristemáticos en medios con diferentes tipos y concentraciones de IAA e IBA (0, 0.1, 1.0 y 10.0 mg.L⁻¹).

La adición de distintas concentraciones de IAA no ayudó a normalizar el desarrollo radicular y, en general, el crecimiento de las plantas mutantes fue menor que el de las plantas WT (Figura 175).

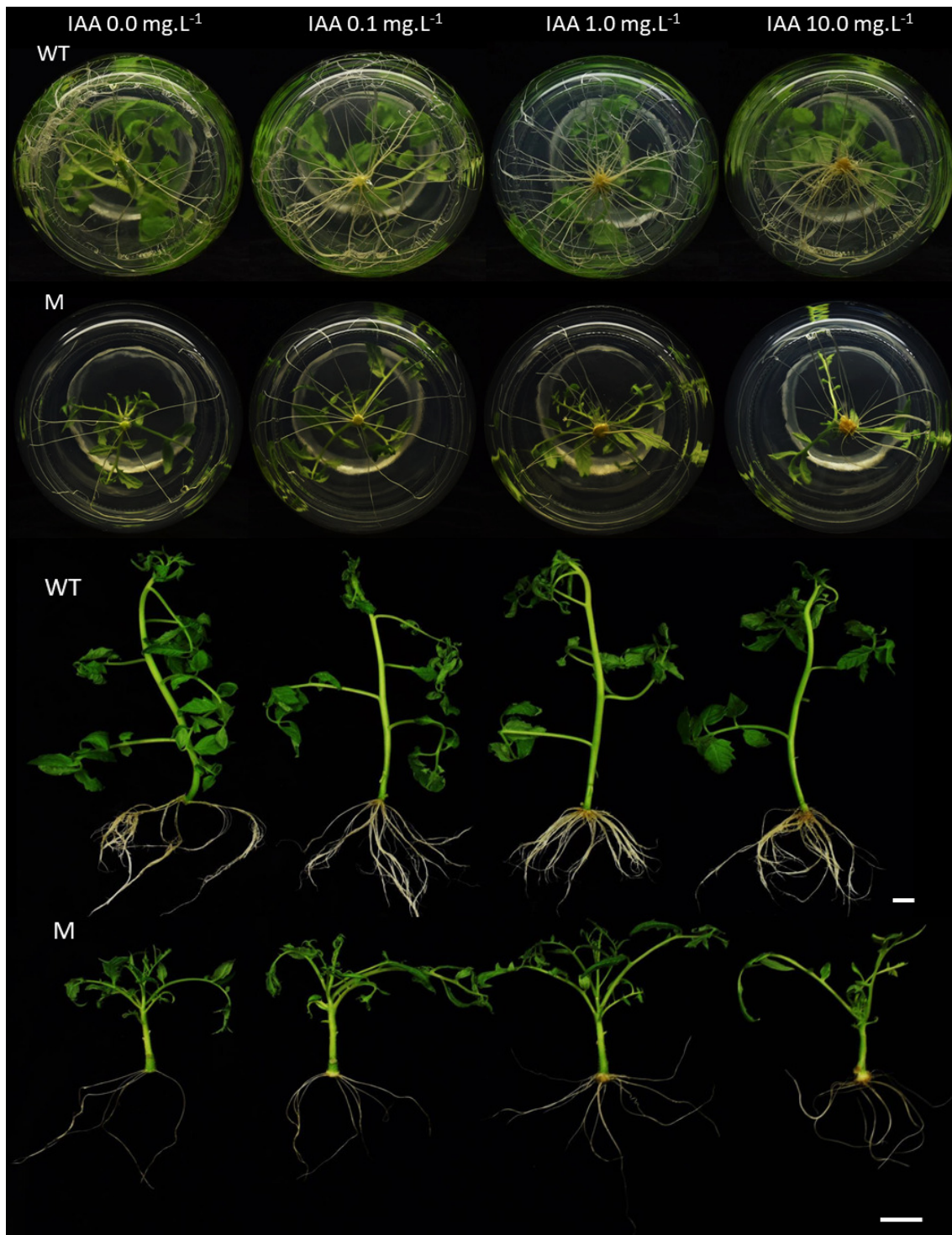


Figura 175. Fenotipo de plantas axénicas del mutante *dor* procedentes del cultivo de ápices meristemáticos después de 30 días con diferentes concentraciones de ácido indolacético. La barra representa 1 cm.

De forma similar, la adición de IBA tampoco condujo a una normalización del desarrollo radicular. Es más, la adición de 10.0 mg.L⁻¹ de IBA promovió la formación de callo en la base de las plantas mutantes, a diferencia de lo que sucedió en las plantas WT, que desarrollaron una gran masa radicular (Figura 176).

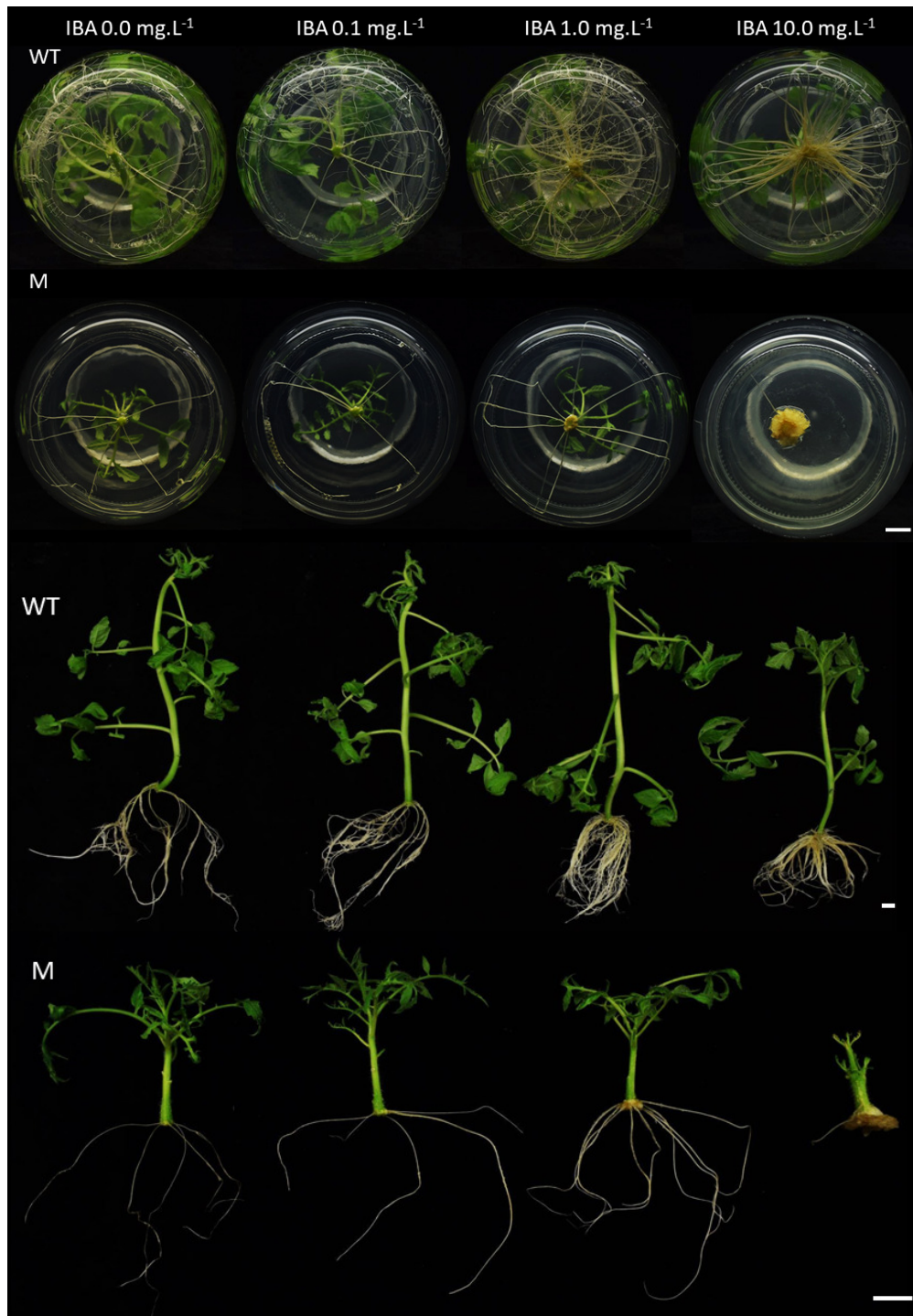


Figura 176. Fenotipo de plantas axénicas del mutante *dor* procedentes del cultivo de ápices meristemáticos después de 30 días con diferentes concentraciones de ácido indolbutírico. La barra representa 1 cm.

Se realizó también un experimento con diferentes tipos de auxinas. Las plantas mutantes cultivadas en medio básico suplementado con ANA (0.1 mg.L^{-1}) formaron un callo en la base y raíces de un grosor considerable, mientras que las plantas WT en estas condiciones desarrollaron raíces adventicias y crecieron de manera normal.

Las plantas WT y mutantes cultivadas en medios con 2,4-D y 4-CPA (0.1 mg.L^{-1}) sólo formaron un callo desorganizado.

Las plantas WT cultivadas en el medio con 2,4-5 T (0.1 mg.L^{-1}) desarrollaron un buen sistema radicular, mientras que las plantas mutantes únicamente desarrollaron un callo en la base y algunas raíces de gran grosor (Figura 177).

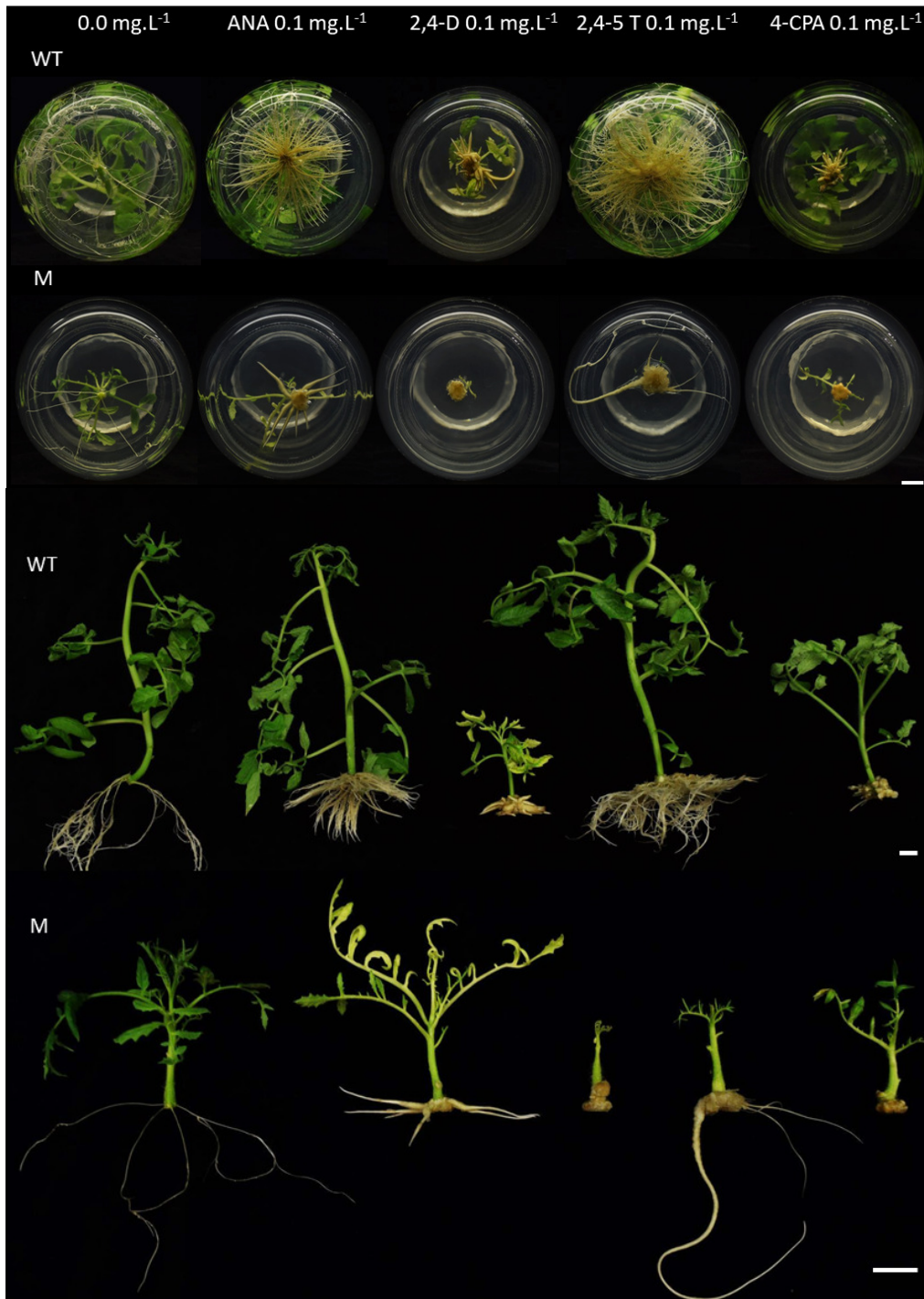


Figura 177. Fenotipo de plantas axénicas del mutante *dor* procedentes del cultivo de ápices meristemáticos después de 30 días con diferentes tipos de auxinas. La barra representa 1 cm.

Se evaluó también la formación de raíces adventicias a partir de explantes de cotiledón cultivados en medio de enraizamiento I4.0. Tal y como esperábamos, los explantes de las plantas WT formaron raíces adventicias, mientras que los de las plantas mutante no desarrollaron raíces (Figura 178).

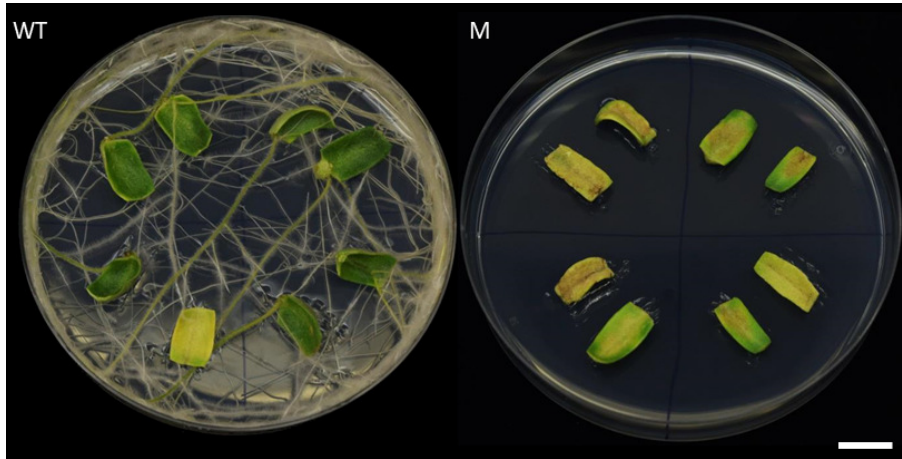


Figura 178. Fenotipo de cotiledones del mutante *dor* tras 30 días de cultivo en medio de enraizamiento I 4.0. La barra representa 1 cm.

Para conocer si la alteración en el sistema radicular estaba relacionada con la capacidad organogénica del mutante, se realizó un experimento cultivando explantes de cotiledón en medio de regeneración IKZ. Los resultados indicaron que la respuesta morfogénica del mutante también estaba afectada, ya que los explantes mutantes sólo produjeron callo desorganizado mientras que los del WT regeneraron yemas y brotes (Figura 179).

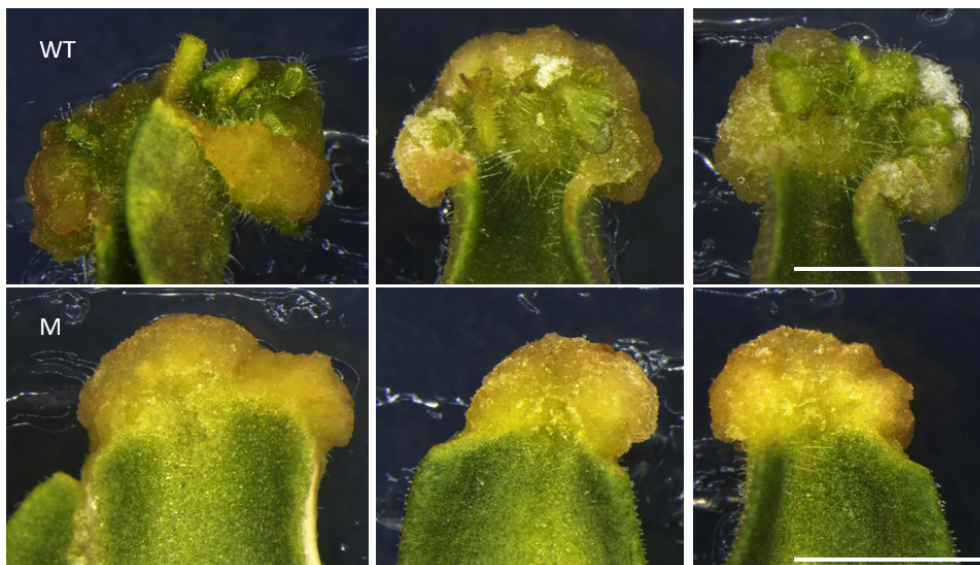


Figura 179. Fenotipo de cotiledones del mutante *dor* después de 30 días de cultivo en medio de regeneración IKZ. La barra representa 0.5 cm.

Para evaluar fenotipo *in vivo*, se cultivaron semillas WT y mutantes en invernadero. Desde los primeros días de cultivo se observaron diferencias entre ambos, ya que las plantas mutantes tenían menor crecimiento de la parte aérea y de la raíz (Figura 180).



Figura 180. Fenotipo a partir de semilla del mutante *dor* después de 15 (arriba) y 40 días (abajo) de cultivo en invernadero. La barra representa 5 cm.

Al comprobar que el fenotipo *in vitro* se correspondía con el observado en el invernadero, decidimos llevar a cabo un experimento que nos permitiera averiguar qué parte de la planta, la parte aérea o la raíz, se veía más afectada por la mutación. Para ello se realizaron injertos en las distintas combinaciones posibles: $\frac{WT}{WT}$, $\frac{WT}{M}$, $\frac{M}{WT}$ y $\frac{M}{M}$.

La conclusión fue que el fenotipo mutante se debe a la alteración que sufre el sistema radicular, ya que al injertar la parte aérea M sobre patrón WT, $\frac{M}{WT}$, el injerto fenocopiaba a la planta WT, desarrollándose sin problemas. En cambio, el injerto WT sobre patrón M, es decir $\frac{WT}{M}$, se comportaba como una planta mutante (Figura 181).



Figura 181. Fenotipo de injertos entre plantas WT y M del mutante *dor* después de 30 días de cultivo en invernadero. La barra representa 5 cm.

Además, este experimento nos permitió obtener semillas mutantes, ya que el injerto $\frac{M}{WT}$ mostraba un desarrollo vigoroso y desarrollaba flores y frutos como una planta WT (Figura 182).



Figura 182. Fenotipo de plantas injertadas del mutante *dor* en etapa adulta (arriba) y de frutos del injerto $\frac{M}{WT}$ (abajo). La barra representa 5 cm.

Tras comprobar que el sistema radicular era el responsable del fenotipo, se realizó un experimento adicional en invernadero para ver la influencia del sistema de riego en el desarrollo de las plantas mutantes. Habitualmente, en las primeras etapas de cultivo en el invernadero el riego se hace manualmente, ya que las macetas se colocan en bandejas a las que se añade la solución nutritiva. En el caso de este mutante, como la

planta prácticamente no se desarrollaba, se mantenía en las macetas originales y, como consecuencia, no se pasaba a riego por goteo. Por tanto, decidimos utilizar el riego por goteo desde el inicio del cultivo. Los resultados indicaron que con riego por goteo la planta mutante fue capaz de desarrollarse mejor que con riego manual, llegando incluso a desarrollar flores (Figura 183).



Figura 183. Experimento de riego por goteo y riego manual del mutante *dor*. La barra representa 5 cm.

Sin embargo, en ambos casos aparecieron síntomas de marchitamiento en la parte aérea, lo que corrobora que, aunque el mutante mejora su crecimiento con el riego por goteo, sigue presentando alteraciones que afectan al desarrollo general de la planta (Figura 184).

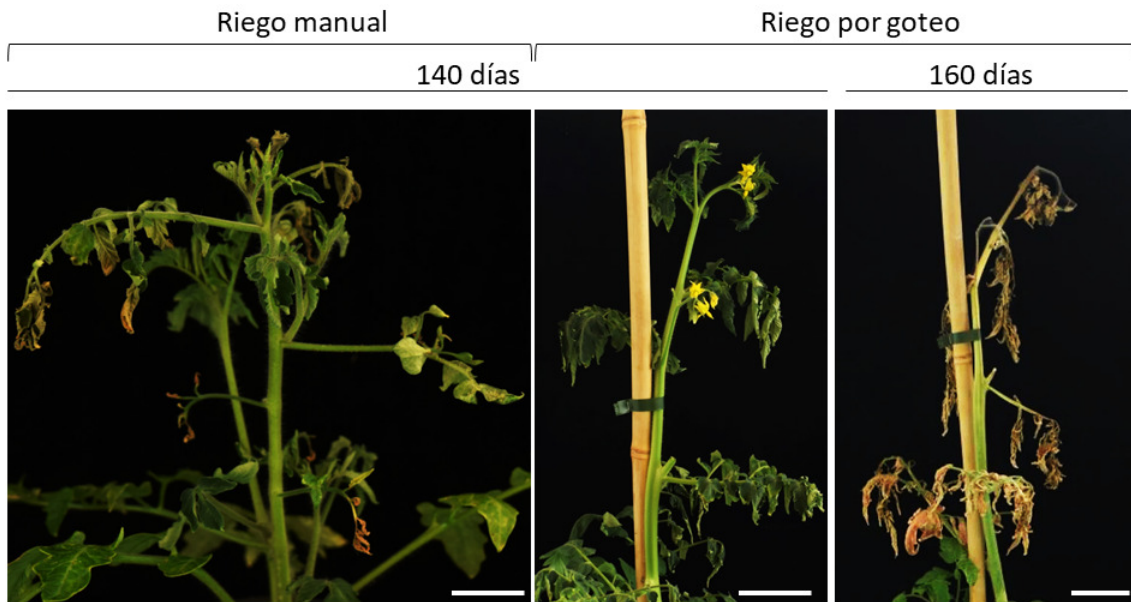


Figura 184. Fenotipo de la parte apical de plantas mutantes del mutante *dor* cultivadas en el invernadero con diferentes sistemas de riego. La barra representa 5 cm.

Mutante 384 ET MM

El mutante recesivo 384 ET MM fue identificado en el invernadero. Se observaron plantas que crecían menos que el WT y con un cierto grado de marchitamiento en las hojas. Se obtuvieron progenies TG3 a partir de plantas WT y mutantes, y, a partir de este material se abordó la caracterización del mutante con mayor detalle.

En cultivo *in vitro*, se observó que las plántulas mutantes presentaban alteraciones en la raíz embrionaria, produciendo una menor masa radicular y un menor desarrollo de las raíces secundarias respecto del WT (Figura 185).



Figura 185. Fenotipo de plántulas obtenidas a partir de semillas de la línea 384 ET MM después de 38 días en medio de germinación. La barra representa 1 cm.

Al cultivar explantes de ápice meristemático en medio básico se observaron también alteraciones en las raíces adventicias de las plantas axénicas, con un menor desarrollo del sistema radicular. Las raíces adventicias eran de menor tamaño y sin presencia de

raíces secundarias. Además, el crecimiento de la parte aérea era claramente inferior en las plantas mutantes (Figura 186).



Figura 186. Fenotipo de planta axénica de la línea 384 ET MM después de 30 días en medio básico. La barra representa 1 cm.

Dada la importancia que tienen las hormonas vegetales y, más concretamente, las auxinas en el proceso del enraizamiento, se evaluó la respuesta de los ápices meristemáticos del mutante en medios con diferentes concentraciones de IAA e IBA (0 mg.L^{-1} , 0.1 mg.L^{-1} , 1.0 mg.L^{-1} y 10.0 mg.L^{-1}).

En cuanto al IAA, el enraizamiento y el crecimiento de la parte aérea fue menor en las plantas mutantes en las cuatro concentraciones ensayadas. En ninguna de ellas se observó desarrollo de raíces secundarias (Figura 187).

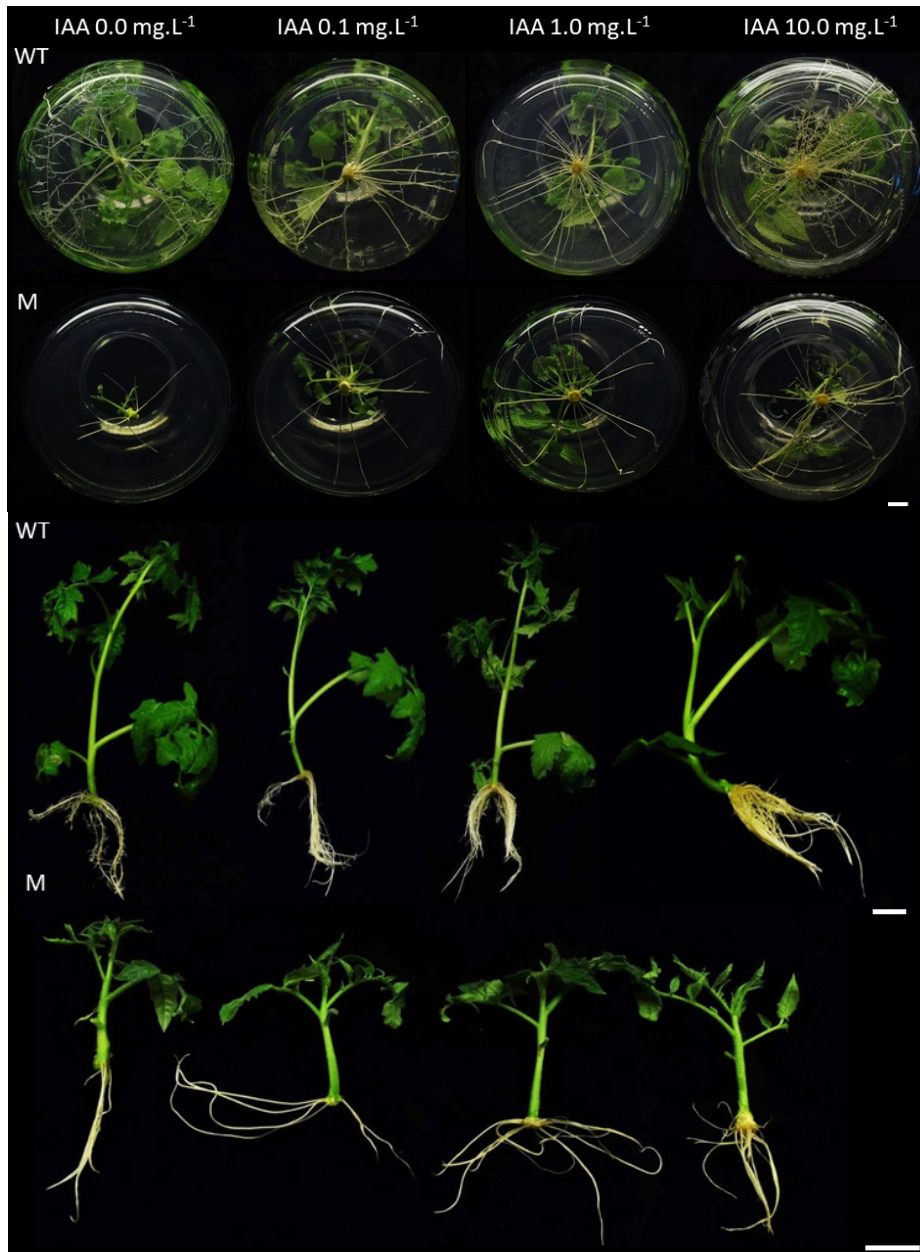


Figura 187. Fenotipo de plantas axénicas de la línea 384 ET MM procedentes del cultivo de ápices meristemáticos después de 30 días con diferentes concentraciones de ácido indolacético. La barra representa 1 cm.

La adición de IBA al medio de cultivo tampoco originó una fenocopia WT a partir del mutante. Al igual que ocurrió con el IAA, la adición de IBA tampoco mejoraba la formación de raíces secundarias (Figura 188).

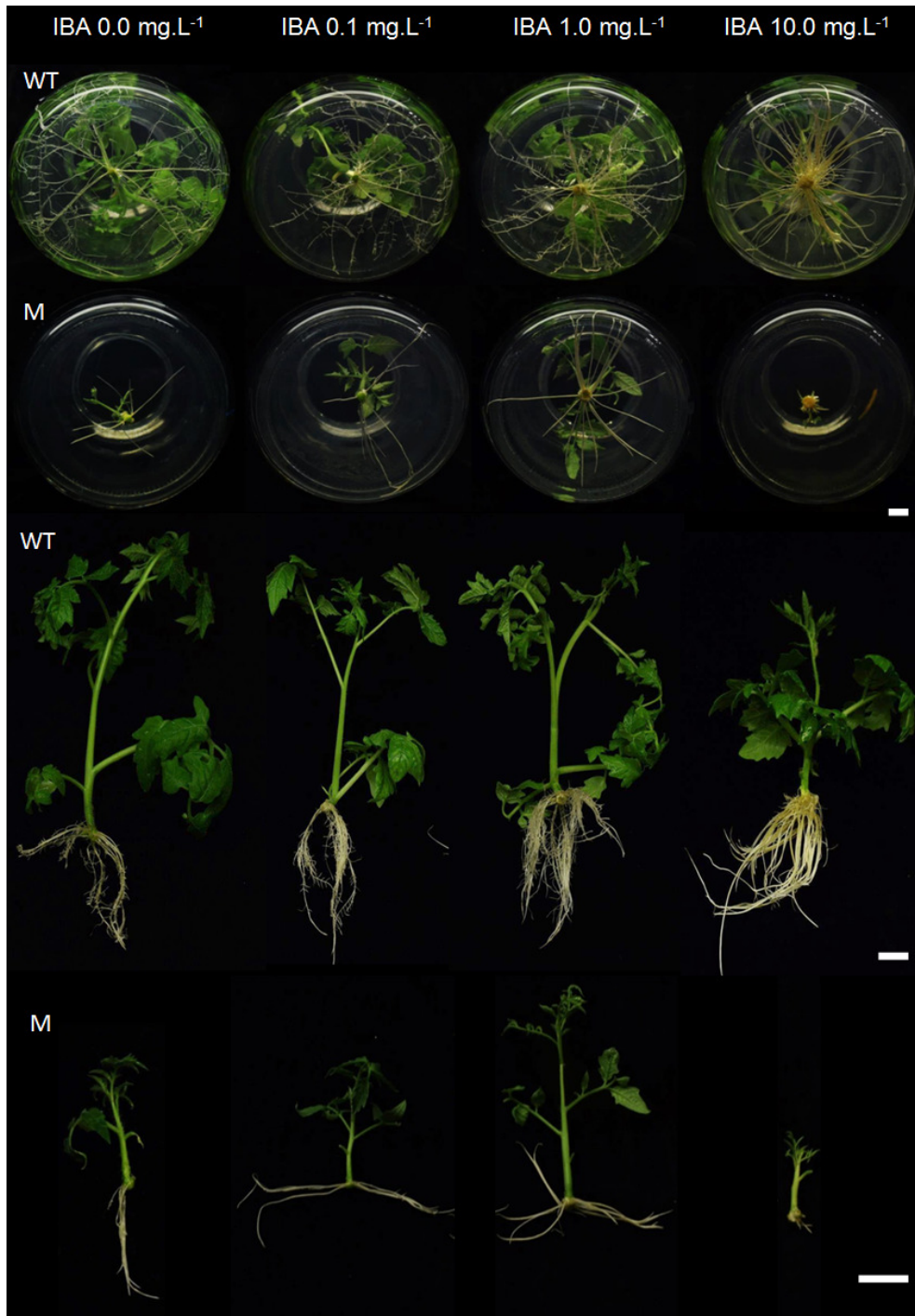


Figura 188. Fenotipo de plantas axénicas de la línea 384 ET MM procedentes del cultivo de ápices meristemáticos después de 30 días con diferentes concentraciones de ácido indolbutírico. La barra representa 1 cm.

También se realizó un experimento cultivando ápices meristemáticos de plantas WT y mutantes en medios suplementados con diferentes tipos de auxinas, como ANA; 2,4-D; 2,4,5-T y 4CPA, a una concentración de 0.1 mg.L^{-1} .

En los medios con ANA y 2,4,5-T se observó la formación de raíces en las plantas mutantes, pero de menor tamaño y en menor cantidad que las plantas WT. En medio

con 2,4-D y 4-CPA las plantas WT formaron pocas raíces y de mayor grosor que el habitual. Las plantas mutantes cultivadas en estos medios no desarrollaron raíces y únicamente formaron un pequeño callo desorganizado (Figura 189).

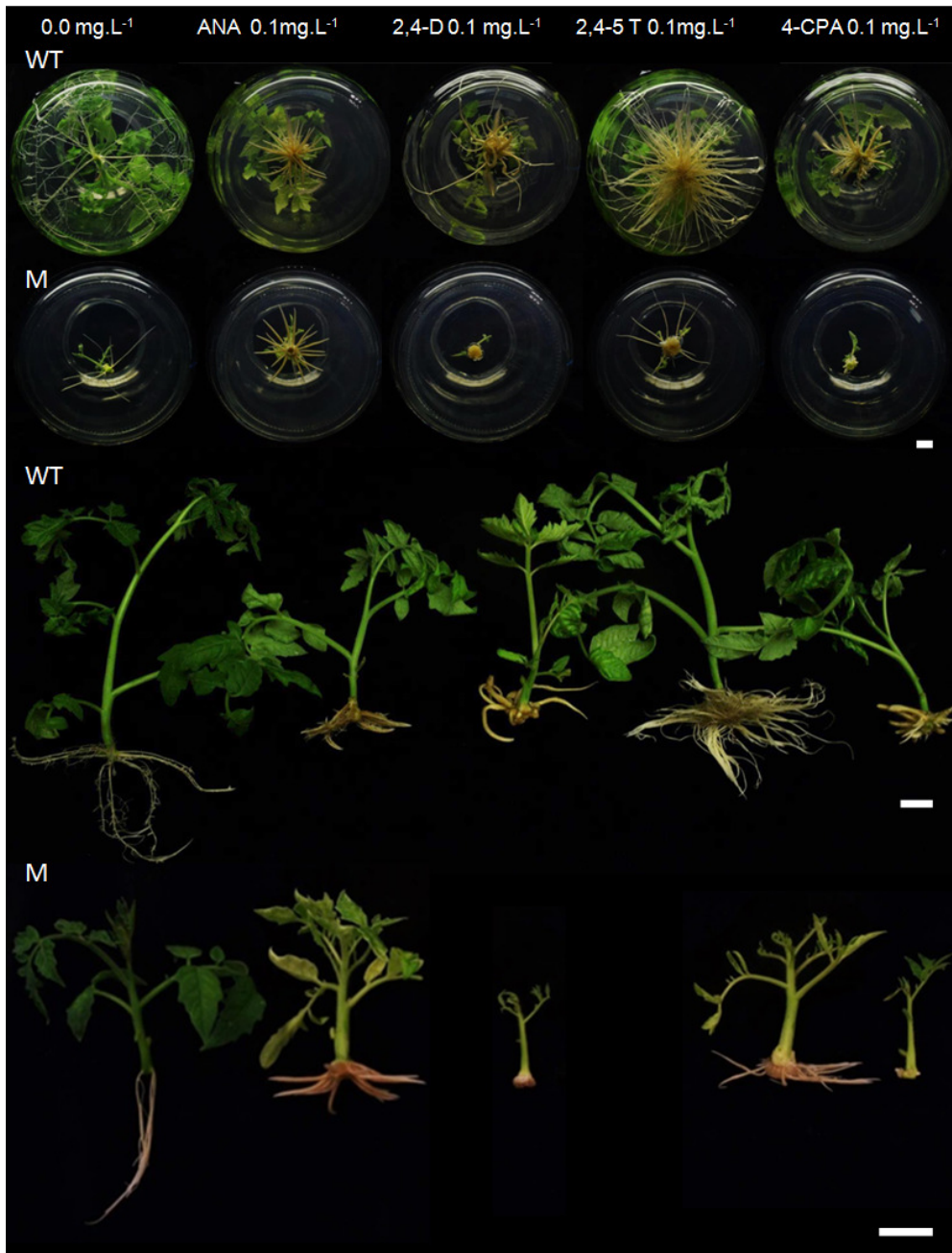


Figura 189. Fenotipo de plantas axénicas de la línea 384 ET MM procedentes del cultivo de ápices meristemáticos después de 30 días con diferentes tipos de auxinas. La barra representa 1 cm.

Además, se estudió el enraizamiento adventicio a partir de explantes de cotiledón en medio I 4.0. Se observó la misma respuesta que en los anteriores experimentos, es decir, una menor capacidad de enraizamiento y la ausencia total de raíces secundarias (Figura 190).

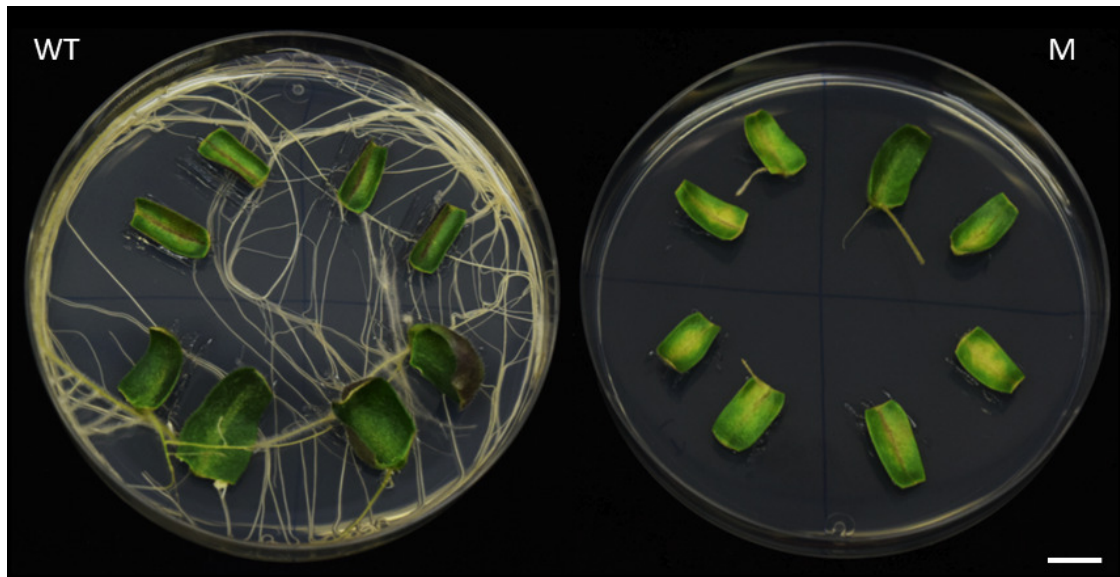


Figura 190. Fenotipo de cotiledones de la línea 384 ET MM tras 30 días de cultivo en medio de enraizamiento I 4.0. La barra representa 1 cm.

A continuación, se evaluó la respuesta organogénica del mutante mediante el cultivo de explantes de cotiledón en el medio de regeneración adventicia IKZ (4.0 4.0 1.0). A los 30 días de cultivo se observó que los cotiledones de las plántulas WT habían regenerado yemas y brotes adventicios. En cambio, los explantes mutantes no presentaban regeneración adventicia y sólo desarrollaron un pequeño callo desorganizado en las zonas de corte (Figura 191).

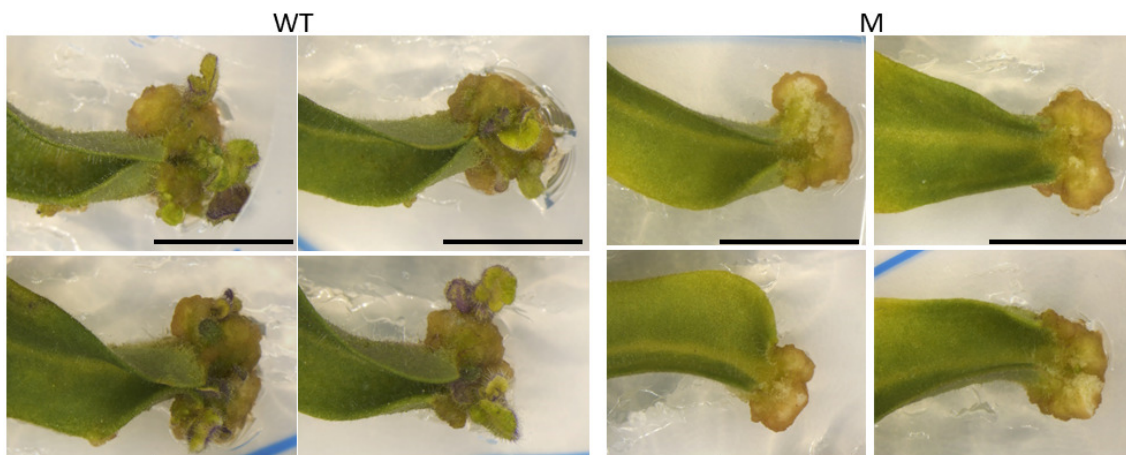


Figura 191. Fenotipo de cotiledones de la línea 384 ET MM después de 30 días de cultivo en medio de regeneración IKZ. La barra representa 0.5 cm.

Además de la caracterización fenotípica en cultivo *in vitro*, se llevó a cabo la evaluación de estas plantas en el invernadero (Figura 192).

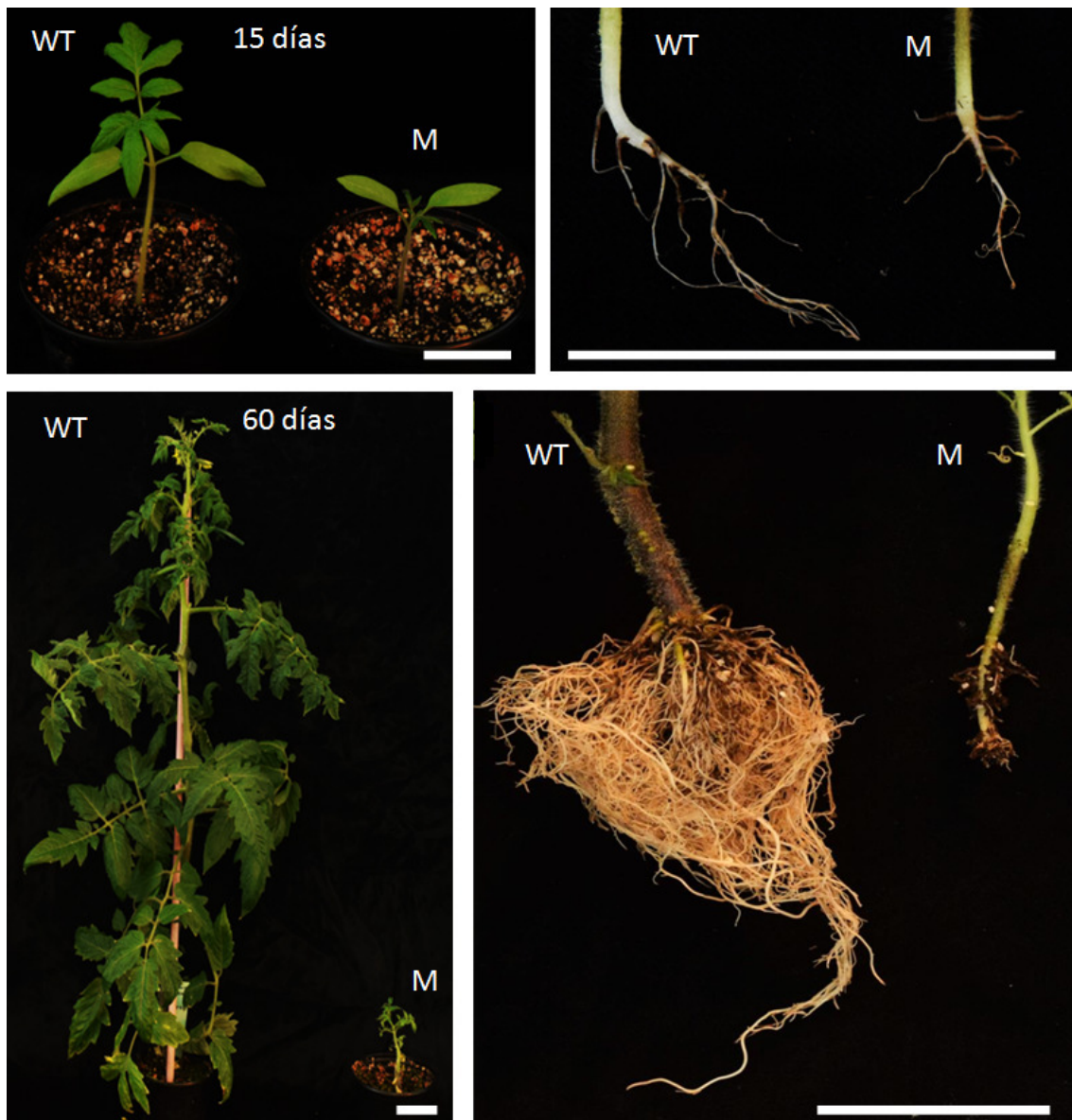


Figura 192. Fenotipo de plántulas procedentes de semilla de la línea 384 ET MM después de 15 y 60 días de cultivo en invernadero. La barra representa 5 cm.

Se observaron diferencias en las plantas procedentes de semillas WT y M desde los primeros días de cultivo. Las plantas mutantes presentaron un desarrollo mucho más lento y menor altura que las plantas WT. Esto hizo que la mayor parte no llegara a producir frutos. Cuando se analizó la parte radicular de estas plantas se vio que, al igual que ocurría *in vitro*, su desarrollo era menor que en el WT. Cuando se observó con detalle la parte aérea, se vio que, aunque se apreciaban algunas zonas marchitas, el SAM de la planta no parecía afectado (Figura 193).



Figura 193. Fenotipo de una plántula mutante de la línea 384 ETMM crecida en el invernadero y de su meristemo apical (flecha). La barra representa 1 cm (izquierda) y 1 mm (derecha).

Además del fenotipado *in vivo* de plantas procedentes de semilla, se realizó el mismo trabajo con plantas procedentes de la aclimatación de plantas axénicas cuyas raíces tenían un origen adventicio. Aunque muchas plantas mutantes no lograban superar la fase de aclimatación, las que lo hicieron mostraban una disminución tanto de la parte aérea como del sistema radicular. Además, en la parte aérea se observaron zonas necróticas que iban aumentando conforme pasaban los días de cultivo. Esta necrosis se producía fundamentalmente en la parte apical de las hojas y, en estados más avanzados del desarrollo, se extendía hacia la parte apical de la planta provocando el colapso de los ápices meristemáticos, lo que, a su vez, inducía la brotación axilar de yemas basales de la planta. Cuando estos nuevos brotes alcanzaban cierto tamaño, se volvía a reproducir la aparición de necrosis en los órganos antes comentados (Figura 194). Estos problemas dificultaron el cuajado y desarrollo de frutos, hasta el punto de que sólo conseguimos un único fruto a partir de todas las plantas mutantes cultivadas.

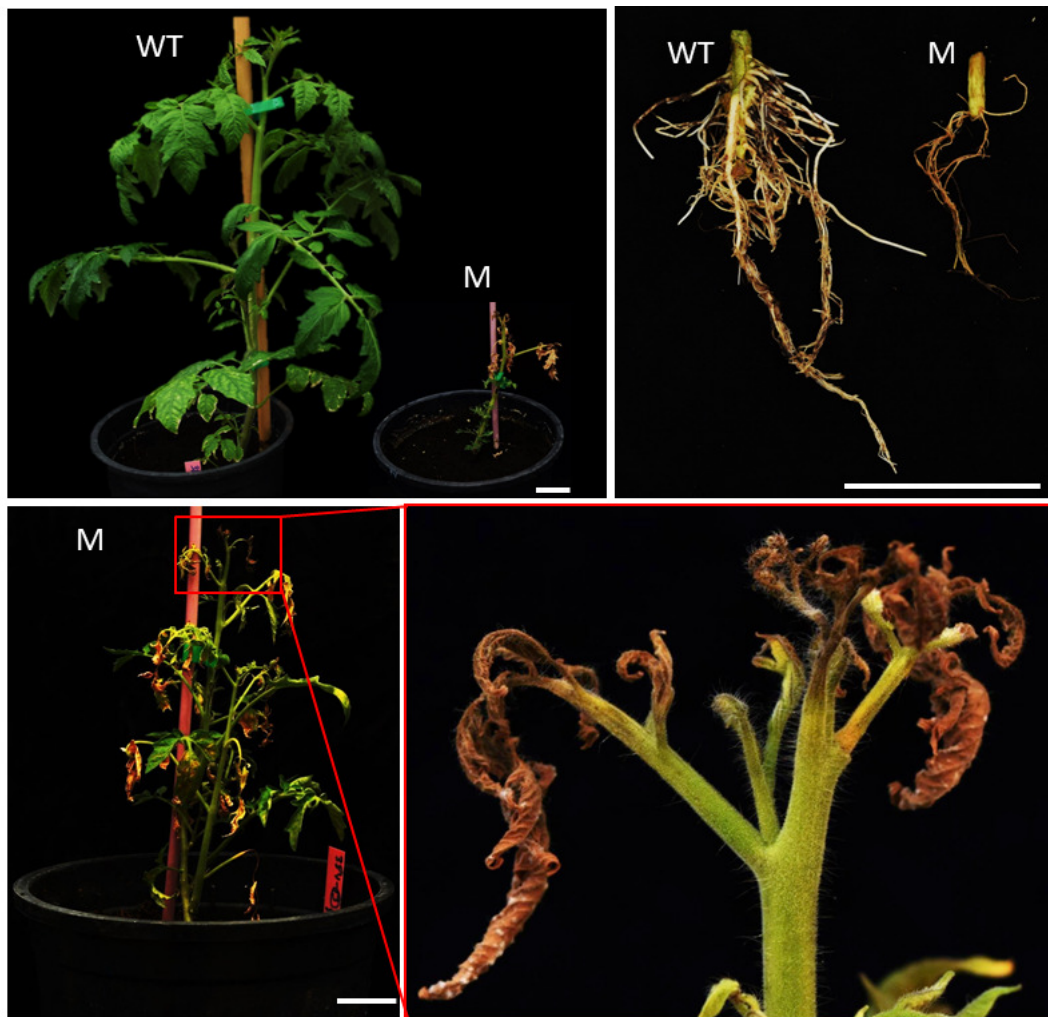


Figura 194. Fenotipo de plantas aclimatadas de la línea 384 ET MM después de 60 (parte superior) y 130 días (parte inferior) de cultivo en invernadero. La barra representa 5 cm.

Para intentar separar los efectos de la parte aérea y la raíz sobre el fenotipo mutante se cultivaron semillas WT y mutantes en el invernadero y se realizaron injertos en las diferentes combinaciones: $\frac{WT}{WT}$, $\frac{WT}{M}$, $\frac{M}{WT}$, $\frac{M}{M}$. Tras 30 días de cultivo en el invernadero se evaluó el desarrollo de las plantas injertadas (Figura 195).



Figura 195. Fenotipo de injertos entre plantas WT y M de la línea 384 ET MM después de 30 días de cultivo en invernadero. La barra representa 5 cm.

Los resultados indicaron que el fenotipo mutante se debe fundamentalmente al sistema radicular, ya que al injertar la parte aérea M sobre un patrón WT, $\frac{M}{WT}$, se obtenía una fenocopia del WT. Además, el injerto WT sobre patrón M, $\frac{WT}{M}$, tenía un fenotipo similar al de una planta mutante. Este experimento, además de ayudar a discernir la influencia de la raíz sobre el fenotipo de la parte aérea del mutante, nos permitió conseguir semilla TG3 mutante, ya que en el injerto $\frac{M}{WT}$ el desarrollo de flores y frutos era totalmente normal.

Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante

En un experimento realizado con semillas TG2 se observó una segregación de 11 plantas WT y 4 plantas mutantes. El resultado del análisis de χ^2 indicó que el fenotipo alterado de la línea 384 ET MM era causado por una mutación monogénica recesiva (Tabla 59).

Tabla 59. Análisis del modo de herencia del mutante 384 ET MM mediante el estudio de la TG2

	Segregación	WT	M	Total	χ^2
Experimento 1	Observada Esperada (3:1)	11 11.3	4 3.7	15	0.02

^a Análisis $\chi^2=0.02$ ($P>0.05$; $\chi^2_{1g.l.}=3.84$)

Se realizaron estudios adicionales del modo de herencia, así como la estimación del número de insertos y el análisis de cosegregación con semillas TG3, ya que las semillas TG2 disponibles eran muy antiguas y germinaban con dificultad. Como era de esperar, todas las plantas descendientes de una planta TG2 mutante (384-7 ET MM y 384-13 ET MM) fueron homogéneamente mutantes. Además, se detectaron tres líneas TG3 (384-5 ET MM, 384-6 ET MM y 384-9 ET MM) en las que todas las plantas fueron WT ya que las plantas TG2 de las que provenían eran acigóticas para la mutación. Por último, se corroboró la naturaleza monogénica recesiva de esta mutación mediante el análisis de las descendencias de las TG2 hemicigóticas (Tabla 60)

Tabla 60. Análisis del modo de herencia del mutante 384 ET MM mediante el estudio de las progenies TG3 segregantes

	Segregación	WT	M	Total	χ^2
384-1 ET MM	Observada Esperada (3:1)	17 17.3	6 5.7	23	0.01
384-2 ET MM	Observada Esperada (3:1)	13 13.5	5 4.5	18	0.07
384-4 ET MM	Observada Esperada (3:1)	13 13.5	5 4.5	18	0.07
384-10 ET MM	Observada Esperada (3:1)	8 9.0	4 3.0	12	0.44
384-11 ET MM	Observada Esperada (3:1)	13 13.5	5 4.5	18	0.07
384-12 ET MM	Observada Esperada (3:1)	8 7.5	2 2.5	10	0.13
384-14 ET MM	Observada Esperada (3:1)	20 18.0	4 6.0	24	0.89
384-15 ET MM	Observada Esperada (3:1)	17 15.7	4 5.3	21	0.40

Estos resultados confirmaron el modo de herencia del mutante.

Análisis genético del número de insertos T-DNA

Para determinar el número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional se obtuvieron los siguientes datos en el análisis de resistencia a kanamicina en TG3 (Tabla 61).

Tabla 61. Análisis del número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional de la línea 384 ET MM mediante el estudio de las progenies TG3

	Segregación	Kan ^R	Kan ^S	Total	χ^2
384-1 ET MM	Observada	22	1	23	5.23 0.14
	Esperada (3:1)	17.5	5.75		
	Esperada (15:1)	21.6	1.4		
384-2 ET MM	Observada	18	0	18	6.00 1.20
	Esperada (3:1)	13.5	4.5		
	Esperada (15:1)	16.9	1.1		
384-4 ET MM	Observada	17	1	18	3.63 0.01
	Esperada (3:1)	13.5	4.5		
	Esperada (15:1)	16.9	1.1		
384-5 ET MM	Observada	0	22	22	66.00 330.00
	Esperada (3:1)	16.5	5.5		
	Esperada (15:1)	20.6	1.4		
384-7 ET MM	Observada	13	3	16	0.33 4.27
	Esperada (3:1)	12.0	4.0		
	Esperada (15:1)	15.0	1.0		
384-9 ET MM	Observada	13	3	16	0.33 4.27
	Esperada (3:1)	12.0	4.0		
	Esperada (15:1)	15.0	1.0		
384-10 ET MM	Observada	12	0	12	4.00 0.80
	Esperada (3:1)	9.0	3.0		
	Esperada (15:1)	11.3	0.7		
384-11 ET MM	Observada	18	0	18	6.00 1.20
	Esperada (3:1)	13.5	4.5		
	Esperada (15:1)	16.9	1.1		
384-12 ET MM	Observada	10	0	10	3.33 0.67
	Esperada (3:1)	7.5	2.5		
	Esperada (15:1)	9.4	0.6		
384-13 ET MM	Observada	0	12	12	36.00 180.00
	Esperada (3:1)	9.0	3.0		
	Esperada (15:1)	11.3	0.7		
384-14 ET MM	Observada	13	11	24	5.56 64.18
	Esperada (3:1)	18.0	6.0		
	Esperada (15:1)	22.5	1.5		
384-15 ET MM	Observada	14	7	19	0.78 26.29
	Esperada (3:1)	15.8	5.2		
	Esperada (15:1)	19.7	1.3		

Los datos indicaron que hay dos TG3 que son acigóticas para cualquier inserto de T-DNA (384-5 ET MM y 384-13 ET MM). Además, aunque hay líneas que se ajustan mejor a una segregación 3:1 (384-7 ET MM, 384-9 ET MM y 384-15 ET MM), correspondiente a la integración de un único inserto, en varias de ellas la explicación más plausible sería la presencia de dos insertos de T-DNA ya que se ajustan perfectamente a una segregación 15:1 (384-1 ET MM, 384-2 ET MM, 384-4 ET MM,

384-10 ET MM, 384-11 ET MM y 384-12 ET MM). Por tanto, se acepta la hipótesis de que en esta línea se han integrado dos insertos de T-DNA con el gen *nptII* funcional.

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

Para llevar a cabo el análisis de cosegregación, se analizó la resistencia a la kanamicina de las dos progenies TG3 procedentes de plantas mutantes. A la vista de los resultados se pudo concluir que no existe cosegregación en la línea 384 ET MM con ninguno de los dos insertos de T-DNA ya que en estas líneas se observaron un total de 15 plantas mutantes sensibles a la kanamicina (Tabla 62).

Tabla 62. Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 384 ET MM.

	WT		M		Total
	Kan ^R	Kan ^S	Kan ^R	Kan ^S	
384-7 M	0	0	13	3	16
384-13 M	0	0	0	12	12

Experimentos adicionales para abordar la identificación del gen alterado en el mutante 384 ET MM mediante mapeo por secuenciación (NGS)

Dado el interés de este mutante se ha analizado molecularmente para ver si la mutación pudiera estar causada por un inserto parcial del T-DNA o por la inserción de un fragmento del cuerpo del vector. Para ello se ensayó una batería de PCR's con amplicones que abarcaron siete secuencias del T-DNA y 14 del cuerpo del vector (Figura 21). Se realizaron estas pruebas en una planta con fenotipo mutante y sensible a la kanamicina. Todas las pruebas PCR fueron negativas por lo que lo más probable es que esta mutación no esté causada por ningún fragmento de T-DNA ni del cuerpo del vector. Por tanto, pensamos que la mutación observada en esta línea era de naturaleza somaclonal.

Al no existir cosegregación, se realizaron cruces de plantas mutantes sensibles a la kanamicina con *S. pimpinellifolium* y se obtuvieron semillas F1. A partir de ellas se obtuvieron las correspondientes plantas F1 que, mediante autofecundación, produjeron la semilla F2, necesaria para llevar a cabo la identificación del gen mutado mediante mapeo por secuenciación. Para lograr este objetivo un aspecto clave es la identificación de forma inequívoca de las plantas con fenotipo WT y mutante presentes en la población F2. En este caso se sembraron semillas F2 en condiciones axénicas y

se distinguió claramente las plantas que presentaban un fenotipo mutante similar al observado en las progenies TG2 y TG3 de la línea T-DNA (Figura 196).

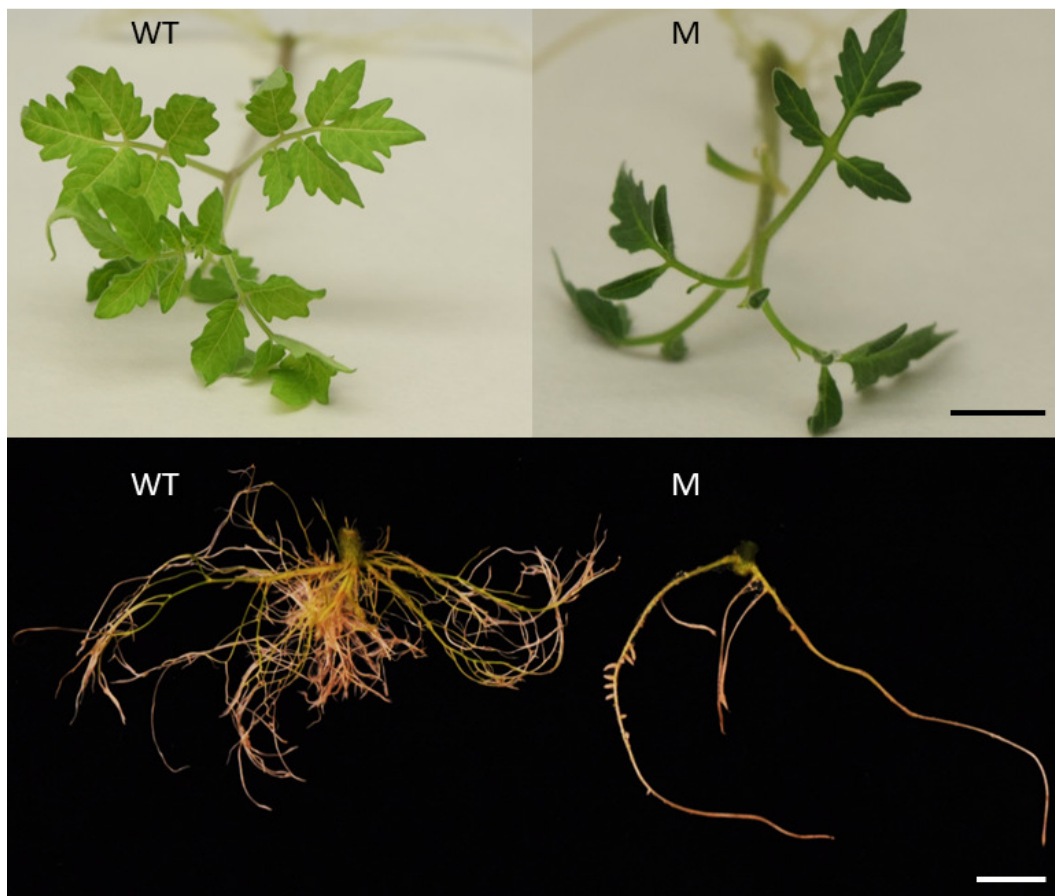


Figura 196. Fenotipo de plantas F2 de la línea 384 ET MM después de 30 días de cultivo en medio básico. La barra representa 1 cm.

Actualmente disponemos de suficientes muestras congeladas de plantas WT y plantas M de la progenie F2 para llevar a cabo la identificación del gen alterado.

Test de alelismo entre las líneas 384 ET MM y *dor*

Tras realizar la caracterización fenotípica de los mutantes 384 ET MM y *dor* se observó que presentaban características muy similares tanto en la parte aérea como en el sistema radicular. Por ello, se realizó la prueba de alelismo realizando cruces entre ambos mutantes. Al evaluar la progenie de este cruce (*dor* x 384 ET MM) se observó que todas las plantas eran mutantes (Figura 197). Esto indica que son alélicos, es decir, que están alterados en el mismo gen.



Figura 197. Fenotipo de planta axénica de *dor* X 384 ET MM después de 30 días en medio básico. La barra representa 1 cm.

Experimentos preliminares sobre el análisis funcional del gen alterado en el mutante *dor*

Tras realizar el cruce del mutante *dor* con *Solanum pimpinellifolium*, obtener la F1, autofecundar las plantas F1 y evaluar las plantas F2, el grupo del Dr. Lozano (Universidad de Almería) consiguió identificar un gen candidato, al que de forma preliminar denominamos *DOR*. Con el fin de averiguar si se trata realmente del gen alterado en el mutante *dor*, el grupo del Dr. Lozano realizó las construcciones RNAi (silenciamiento) y OX (sobrexpresión) y, a partir de aquí, nosotros llevamos a cabo los experimentos de transformación genética con estos vectores, así como los primeros trabajos relacionados con el análisis funcional del gen *DOR*.

En primer lugar, obtuvimos las plantas RNAi::DOR con fondo genético de tomate MoneyMaker y de una especie silvestre relacionada, *Solanum pennellii*. Tras obtener las plantas transgénicas con la construcción RNAi::DOR, se evaluó la respuesta en el

medio de enraizamiento I 4.0 y en medio de regeneración IKZ utilizando como explante de partida hojas de las plantas RNAi obtenidas.

Como esperábamos, los explantes de hoja de plantas RNAi::DOR de Moneymaker no fueron capaces de enraizar en el medio I 4.0 (Figura 198).

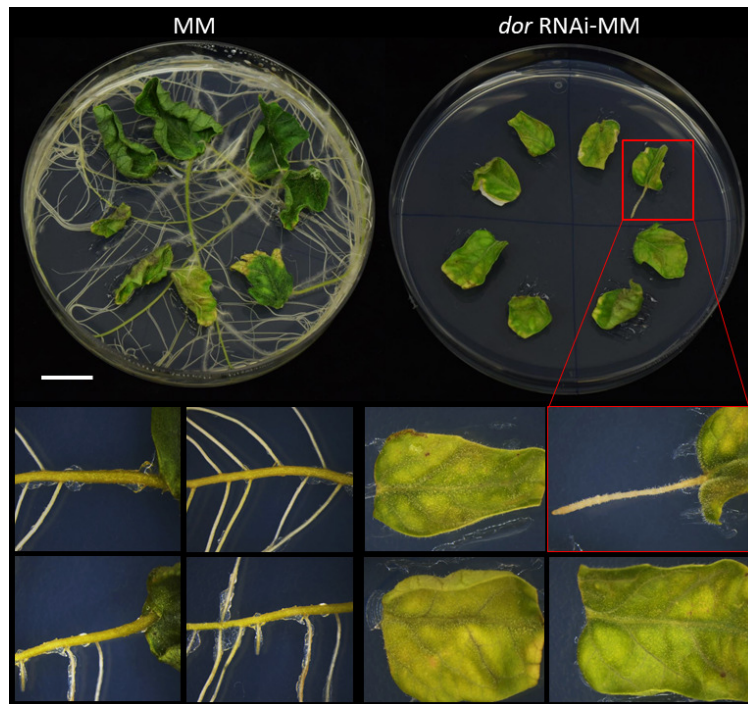


Figura 198. Fenotipo de hojas de plantas RNAi en Moneymaker del mutante *dor* después de 30 días de cultivo en medio de enraizamiento I 4.0. La barra representa 1 cm.

Los explantes de hoja de plantas WT de *S. pennellii* tienen mayor capacidad de enraizamiento en medio I 4.0 que los del cultivar Moneymaker (Figura 198). En estas mismas condiciones, los explantes de las plantas RNAi::DOR de *S. pennellii* no fueron capaces de emitir raíces a los 15 y 30 días de cultivo (que es el periodo normal de incubación) y sólo son desarrollaron unas pocas raíces a los 90 días de cultivo (Figura 199).

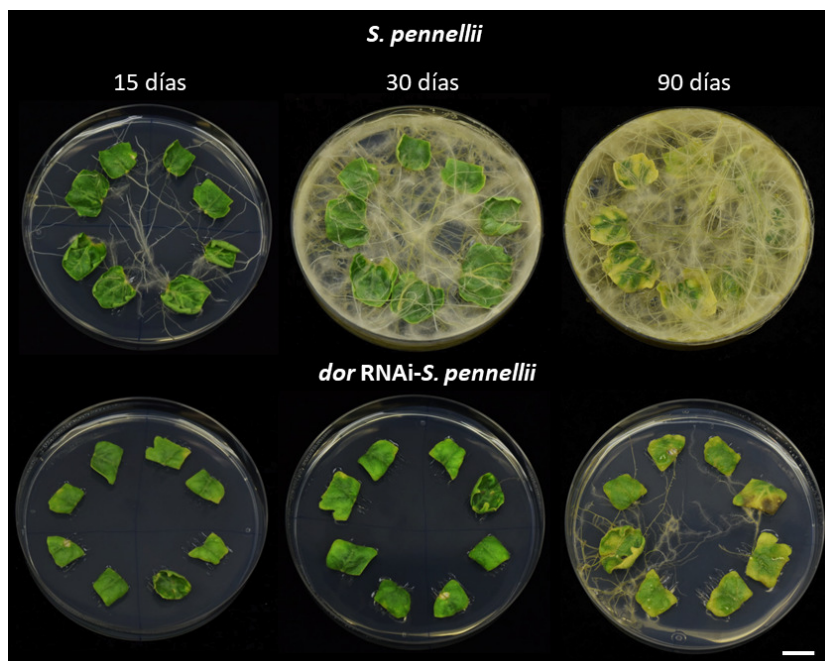


Figura 199. Fenotipo de hojas de plantas RNAi en *S. pennellii* del mutante *dor* después de 15, 30 y 90 días de cultivo en medio de enraizamiento I 4.0. La barra representa 1 cm.

En el medio IKZ los explantes de Moneymaker regeneran yemas y brotes adventicios, mientras que los de las plantas RNAi::DOR solo dan lugar a la formación de callo (Figura 200).



Figura 200. Fenotipo de hojas de plantas RNAi en Moneymaker del mutante *dor* después de 30 días de cultivo en medio de regeneración IKZ. La barra representa 1 cm.

En medio de regeneración IKZ los explantes de *S. pennellii* originan una enorme cantidad de brotes adventicios que, además, son capaces de elongar en el mismo medio. Los explantes de las plantas RNAi::DOR de *S. pennellii* fueron capaces de desarrollar yemas y brotes, aunque el proceso de regeneración fue mucho más lento que en los explantes WT (Figura 201).



Figura 201. Fenotipo de hojas de plantas RNAi de *S. pennellii* para el gen identificado en el mutante *dor* después de 30 días de cultivo en medio de regeneración IKZ. La barra representa 1 cm.

Así pues, los resultados indican que el gen candidato que se clonó mediante métodos de secuenciación (NGS) es realmente el gen alterado en el mutante *dor*. Los resultados sugieren también que aunque el gen en cuestión cumple funciones similares en tomate y *S. pennellii*, el silenciamiento del mismo tiene un papel más drástico en la especie cultivada que en la especie silvestre.

En definitiva, se ha logrado identificar un gen de tomate que tiene funciones clave tanto en el proceso de enraizamiento como en la formación de meristemas adventicios caulinares.

DISCUSIÓN

5.1. Identificación de mutantes afectados en su nivel de tolerancia al estrés hídrico

La sequía es una de las principales limitaciones para el rendimiento de los cultivos en la agricultura. Los modelos de crecimiento predicen que su efecto será más severo en el futuro. La sequía perjudica a casi todos los procesos en las plantas. Las plantas tienen una variedad de respuestas fisiológicas y bioquímicas a nivel celular y de organismo completo, por lo que se trata de un fenómeno muy complejo (Farooq *et al.*, 2012). De hecho, a pesar de décadas de investigación, sigue siendo muy complicado vincular procesos moleculares específicos a signos visibles de estrés en una planta.

Los avances en biotecnología pueden hacer factible la identificación de genes que participan en la respuesta de las plantas a la sequía para, mediante un enfoque de transformación genética, conseguir plantas con mejor adaptación a la sequía (Ashraf, 2010; Hadiarto y Tran, 2011).

En nuestro laboratorio se ha abordado un programa de mutagénesis insercional como herramienta para la generación de una colección de líneas T-DNA de tomate (*Solanum lycopersicum*) de los cultivares Moneymaker y P73, así como líneas T-DNA de las especies silvestres relacionadas *S. pennellii*, *S. galapagense* y *S. pimpinellifolium*. En esta tesis se ha utilizado una colección de líneas mutagenizadas de tomate a partir del cultivar Moneymaker para identificar mutantes alterados en su nivel de tolerancia a la sequía.

El escrutinio de mutantes con cambios en la tolerancia al estrés hídrico se realiza comúnmente en cultivo *in vitro*, basándose en la adición de compuestos al medio de cultivo como el manitol, sorbitol o polietilenglicol que reducen el potencial hídrico del medio (Verslues *et al.*, 2006). Las principales ventajas del cribado *in vitro* son que se trabaja en un ambiente controlado, se puede manejar una gran población en un espacio reducido, se necesita poco tiempo para ver los resultados, y el material vegetal se mantiene libre de enfermedades (Patade y Suprasanna, 2008). Sin embargo, las propias condiciones del cultivo *in vitro* con alta humedad ambiental hacen que se produzcan efectos diferentes a los que se encuentra una planta cultivada en condiciones de sequía.

Uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral ha sido el escrutinio de progenies de tomate para la detección de mutantes afectados en el grado de tolerancia al estrés hídrico. Para ello se ha puesto a punto un método para identificar posibles mutantes afectados en este carácter. Se ha optado por llevar a cabo la evaluación en

condiciones de invernadero aplicando un riego cada diez días, con una duración del experimento de 30 días, es decir, regando los días 10, 20 y 30 del experimento. Durante el periodo de suspensión de riego se evaluó si las plantas presentaban una mayor sensibilidad o tolerancia a la falta de riego con respecto al WT. La metodología usada en esta tesis ofrece ventajas en comparación con otros métodos de fenotipado de respuesta al estrés por sequía ya que permite corroborar en cada ciclo el comportamiento de las plantas, al tiempo que facilita su recuperación para la obtención de descendencias. De hecho, mediante este escrutinio se han identificado tanto mutantes sensibles al estrés hídrico como más tolerantes.

Harb y colaboradores (2010) emplearon diversos tratamientos de estrés hídrico para evaluar la tolerancia a la sequía de las plantas. Uno de los métodos que usaron fue la sequía progresiva, en la cual el agua se retiene por un cierto período de tiempo hasta que se observan síntomas de marchitez. Este método de evaluación se ha utilizado para determinar la tasa de supervivencia o para controlar cambios en la expresión génica de plantas silvestres o genotipos que sobreexpresan genes candidatos para la tolerancia a la sequía (Sakuma *et al.*, 2006; Catalá *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2008; Ning *et al.*, 2010). Estos estudios han arrojado algo de luz sobre las respuestas de las plantas a la sequía a nivel fisiológico y molecular.

En este trabajo se ha evaluado la tolerancia al estrés hídrico de 83 líneas T-DNA de tomate, para lo cual ha sido necesario cultivar dos mil plantas en el invernadero. Se han identificado dos líneas mutantes afectadas en su respuesta al estrés por sequía y un mutante con alteraciones en el desarrollo. Aunque la muestra de líneas T-DNA evaluadas no ha sido muy elevada, en comparación con otros trabajos realizados en nuestro grupo, se ha obtenido un porcentaje de mutantes similar.

5.2. Identificación de mutantes afectados en el grado de tolerancia a la salinidad

Además de la sequía, otro factor ambiental importante que limita la productividad de los cultivos es la alta salinidad. El problema de los suelos salinos se ha agravado en los últimos años (Rengasamy, 2010). El desarrollo de cultivos que puedan tolerar los niveles de salinidad del suelo es una alternativa para solucionar o disminuir este problema (Yamaguchi y Blumwald, 2005). En las últimas décadas, se han empleado técnicas de selección basadas en el cultivo de tejidos vegetales mediante diversos

sistemas, como callos, cultivos en suspensión, embriones somáticos o cultivo de brotes (Woodward y Bennett, 2005).

Uno de los objetivos de esta tesis fue identificar mutantes afectados en el grado de tolerancia a la salinidad. En nuestro grupo se había puesto a punto un método para identificar mutantes hipersensibles que consistía en cultivar semillas TG2 pregerminadas en medio de cultivo suplementado con NaCl. Tras el escrutinio de 1888 líneas T-DNA, este método permitió detectar 47 mutantes, de los cuales 44 estaban afectados en caracteres del desarrollo y 3 mostraron un fenotipo específico de hipersensibilidad al estrés salino (Sánchez-Sauceda, 2016).

En la presente tesis doctoral se han evaluado en condiciones de estrés salino *in vitro* 175 líneas T-DNA de tomate y 202 de *Solanum galapagense*. Se han detectado 9 mutantes de *Solanum galapagense* y 8 de tomate con alteraciones en caracteres del desarrollo, ya que los fenotipos observados inicialmente en condiciones salinas también se observaron en ausencia de estrés. Esta proporción está en consonancia con lo observado por Sánchez-Sauceda (2016). Por otra parte, el que la alteración no sea específica para estrés salino no quiere decir que carezca de valor para estudiar este carácter. Como ya se ha explicado anteriormente, además del estudio de mutantes específicos para estrés salino e hídrico, se evaluaron diversos mutantes afectados en caracteres del desarrollo que, de una forma u otra, puedan tener alguna relación con los mecanismos que se ven alterados cuando una planta está sometida a algún estrés de tipo abiótico.

5.3. Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante

En este trabajo de tesis doctoral se ha trabajado con 23 líneas mutantes. En 22 se ha identificado un único fenotipo mutante, mientras que en una de las líneas (2647 ET MM) se ha comprobado la presencia de dos fenotipos mutantes independientes. En un trabajo previo del grupo (Sánchez-López, 2017) ocurrió algo similar, ya que, tras identificar 22 líneas mutantes con cambios en el desarrollo temprano, en una de ellas se detectaron dos fenotipos mutantes producidos por otros tantos genes. En ambos casos se ha logrado segregar esas mutaciones mediante el análisis de los descendientes de las líneas originales.

Se han observado mutantes con dos modos de herencia: 21 tienen naturaleza recesiva y 2 naturaleza dominante. En resultados previos del grupo se observaron datos muy parecidos, con un 91% de mutaciones recesivas y 9% de naturaleza

semidominante (Sánchez-López, 2017). En un trabajo con líneas T-DNA de *Arabidopsis thaliana* Berná y colaboradores (1999) observaron que, de los 122 mutantes identificados, el 94% eran monogénicos y de naturaleza recesiva, el 5% de tipo semidominante y 1% de naturaleza dominante.

Dentro de las mutaciones de naturaleza recesiva que hemos detectado, en 2 de ellas (2149 ET MM y 2647 ET MM) las proporciones fenotípicas se desvían de lo esperado para una distribución mendeliana 3 WT: 1 M. En ambos casos el número de plantas observadas de fenotipo mutante fue inferior a lo esperado. Una posible explicación es que podría haber un cierto grado de subletalidad cuando el alelo mutante se presenta en configuración homocigótica. Este mismo fenómeno se observó en cinco de las líneas identificadas por Sánchez-López (2017) en mutantes afectados en caracteres del desarrollo temprano de tomate. También se vio este mismo fenómeno en el escrutinio de mutantes de *Arabidopsis* (Berná *et al.*, 1999) con segregaciones que no se ajustaban a la proporción 3:1, que se atribuyeron a un problema de subletalidad.

5.4. Análisis genético del número de insertos T-DNA

La determinación del número de insertos T-DNA de las líneas mutantes detectadas en esta tesis se realizó comprobando la resistencia a kanamicina que confiere el gen *nptII*. Como se ha descrito en la metodología, para evaluar dicha resistencia se pueden utilizar varias técnicas dependiendo del material vegetal disponible y del fenotipo mutante. Por ejemplo, si las plantas mutantes no tienen afectada su capacidad de enraizamiento la evaluación se puede hacer cultivando yemas o ápices meristemáticos en un medio de enraizamiento suplementado con kanamicina. Si en este medio de cultivo las plantas son capaces de enraizar se concluye que son resistentes a la kanamicina y portadoras de, al menos, un inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional. Si, por lo contrario, las plantas no enraízan se concluye que son sensibles a la kanamicina y no poseen ningún inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional. Si las plantas tienen afectado el sistema radicular no se utilizan yemas axilares o ápices para realizar la evaluación; en este caso, para evaluar la respuesta a la kanamicina, se recurre a otros explantes, como cotiledones, hipocótilos u hojas, cultivados en medio de regeneración suplementado con kanamicina.

Realizando este tipo de análisis se ha comprobado que en 16 de las líneas mutantes con las que se ha trabajado portaban un único inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional (69,6%) mientras que en 6 (26,1%) se identificaron dos insertos y hay una en la que

puede haber 2 o 3 insertos (4,3%). Por tanto, el promedio ha sido de 1.33 insertos por línea. En un trabajo similar de nuestro grupo se obtuvo un resultado de 1.57 insertos por línea, similar al obtenido en esta tesis doctoral y al promedio total de este programa de mutagénesis, que es de 1.7 insertos por línea.

A finales de la década de los 90 y principios de 2000 se crearon grandes colecciones de líneas T-DNA de *Arabidopsis thaliana* para lograr saturar su genoma con mutaciones insercionales. En esas colecciones (Alonso *et al.*, 2003, Feldmann, 1991) se determinó que contenían un promedio de 1.5 inserciones por línea. Los datos obtenidos en arroz (Wu *et al.*, 2003) indicaron que las líneas T-DNA de esta especie presentaron un promedio de dos insertos por línea. Sin embargo, cuando se utilizan métodos de transformación genética basados en el bombardeo de partículas, se pueden insertar un mayor número de copias de T-DNA, alcanzando valores superiores a 100 insertos por línea (Shou *et al.*, 2004). Con métodos de transformación directa se pueden alcanzar promedios de 3 copias de T-DNA, con la presencia de un alto número de líneas con entre 4 y 6 insertos (Kohli *et al.*, 1998).

Por lo tanto, el método de transformación genética utilizado en nuestro laboratorio para obtener las líneas transgénicas es el más adecuado, ya que produce un número limitado (o bajo) de inserciones de T-DNA por planta transgénica. El disponer de una colección de líneas T-DNA con bajo número de inserciones es una ventaja, porque una vez identificado un mutante es más sencillo saber si el fenotipo se debe a una inserción de T-DNA. Por el contrario, cuando se tiene una línea con varias inserciones hay que segregar las copias hasta disponer, idealmente, de una línea TG3 o TG4 con un único inserto y que muestre el fenotipo mutante.

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

Tras la identificación de un mutante, se debe llevar a cabo un análisis de cosegregación entre el fenotipo mutante y un inserto de DNA de secuencia conocida, habitualmente un T-DNA con el gen *nptII* funcional, ya que en estas líneas la mutación también puede deberse a cambios de tipo somaclonal. Discernir entre si el gen está o no etiquetado por un T-DNA es clave para saber si se debe acometer la clonación del gen alterado mediante Anchor-PCR o mediante mapeo por secuenciación.

Para saber si la mutación está causada por la inserción de un T-DNA, se estudia la asociación del fenotipo mutante con la expresión del gen marcador *nptII* o,

alternativamente, se emplea una batería de cebadores para detectar, mediante PCR, la presencia de algún fragmento del T-DNA o del cuerpo del vector.

En esta tesis se ha comprobado, con una probabilidad de fallo menor al 5%, que existe cosegregación entre el fenotipo mutante y un inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional en tres mutantes (167 ET GA, 199 ET MM y 2647 ET MM M2) de los 22 con los que se ha trabajado (13.6%). En un trabajo similar de nuestro grupo Sanchez-López (2017) encontró una frecuencia de cosegregación del 21% para caracteres del desarrollo temprano. En el conjunto del programa de mutagénesis insercional de nuestro grupo la frecuencia de cosegregación observada entre un inserto T-DNA y el fenotipo mutante es algo superior al 13%. Por tanto, en este sentido, los mutantes con los que se ha trabajado en esta tesis son una muestra representativa de toda la colección.

Hay muy pocos trabajos con los que se pueda comparar este resultado. En un trabajo realizado con una pequeña población de mutantes de *Arabidopsis* se observó una frecuencia de cosegregación cercana al 35% (Azpiroz-Leehan y Feldmann, 1997), pero en un estudio con otra colección de líneas T-DNA de la misma especie (Van Lijsebettens *et al.*, 1991) obtuvieron una frecuencia de cosegregación del 10%. En otro estudio, realizado mediante técnicas de PCR con líneas T-DNA de arroz, Li y colaboradores (2006) obtuvieron un porcentaje de cosegregación del 1.4%.

Como ya se ha comentado, el determinar la existencia de cosegregación entre un inserto de T-DNA y el fenotipo mutante es esencial para la clonación del gen alterado. En nuestro caso, gracias a la colaboración con el grupo del Dr. Rafael Lozano de la Universidad de Almería, se han clonado genes que regulan caracteres relevantes mediante la técnica de Anchor-PCR amplificando los fragmentos de ADN genómico a partir del RB (*right border*) y LB (*left border*) del T-DNA. En el caso de las líneas en las que la mutación no está causada por un inserto con el gen *nptII* funcional, no se debe descartar que el gen haya quedado etiquetado por un T-DNA truncado (e.g. sin el gen *nptII*) o una parte o todo el cuerpo del vector. Este fenómeno ya ha sido reportado por otros autores en *Arabidopsis* (Castle *et al.*, 1993). En un trabajo con tabaco (Kononov *et al.*, 1997) se demostró que en más del 75% de las líneas T-DNA analizadas se había integrado parte del cuerpo del vector. Por lo tanto, tras descartar la cosegregación con un inserto de T-DNA con el gen *nptII* funcional, se pueden abordar los experimentos necesarios para identificar un fragmento de DNA de secuencia conocida con el que se haya etiquetado del gen alterado.

Cuando se llega a la conclusión de que en una línea no existe cosegregación con un fragmento de DNA de secuencia conocida es necesario recurrir a técnicas de mapeo y

secuenciación NGS para llegar a clonar el gen mutado. Para ello se deben realizar diversas tareas que son muy laboriosas y que requieren de varias generaciones de cultivo en el invernadero. En concreto, es necesario cruzar una planta mutante o, en su defecto, WT hemicigótica para la mutación con *Solanum pimpinellifolium* obteniendo de esta manera la generación F1. A continuación, es necesario obtener la descendencia (F2) y, en ella, detectar plantas WT y mutantes para el carácter alterado. Conviene mencionar que si el fenotipo mutante es difícil de detectar en una población F2 segregante, esta metodología no puede llevarse a cabo. Tras la secuenciación del genoma de un grupo de plantas WT y otro grupo de plantas mutantes (idealmente unas cuarenta de cada tipo) se lleva a cabo un trabajo bioinformático para ir detectando en estas poblaciones polimorfismos que estén sobrerrepresentados en la población de plantas mutantes respecto de las WT. En la región genómica donde se agrupan los polimorfismos es donde supuestamente se encuentra el gen alterado. Un posterior análisis de los genes que se encuentran en esa región permite establecer cuáles son los genes candidatos y comprobar si en ellos hay algún polimorfismo que comparten todas las plantas mutantes y que pueda explicar el fenotipo mutante. Desafortunadamente este proceso supone un elevado coste económico por lo que sólo se lleva a cabo en el caso de mutantes con un fenotipo de elevado interés.

5.6. Caracterización de mutantes afectados en la tolerancia al estrés por sequía

La falta de agua es uno de los problemas más importantes a los que se enfrenta la agricultura actual. Una de las soluciones para intentar paliarlo es desarrollar variedades que tengan mayor resistencia a este estrés. El empleo de mutantes para conocer cuáles son los genes clave que determinan este carácter es una de las aproximaciones posibles. En esta tesis se han identificado dos líneas mutantes (1389 ET MM y 2149 ET MM) que están afectadas en su respuesta al estrés por sequía. En el caso de la línea 1389 ET MM las plantas cultivadas en ausencia de estrés no presentaban alteraciones y se comportaban como el WT. En cambio, cuando se sometían a un tratamiento de estrés hídrico las plantas con fenotipo mutante eran más sensibles comparadas con el testigo y mostraban claros síntomas de pérdida de turgencia. Al analizar su RWC se vio que era ligeramente menor en todas las etapas estudiadas. Por tanto, el mutante tiene una menor capacidad de retención de agua o, dicho de otra forma, transpira más que las plantas WT. Además, en este mutante no

se observaron diferencias con el WT al aplicar estrés salino, lo cual indica que el mecanismo afectado está relacionado de forma específica con el estrés hídrico.

A diferencia del anterior, el mutante 2149 ET MM presentó una mayor tolerancia al estrés hídrico que el WT. Este mutante tenía la morfología de las hojas alterada, una menor densidad de tricomas globulares y su desarrollo era algo más lento que el del WT. En los experimentos realizados se ha observado una menor pérdida de turgencia que el WT. También se ha visto que la RWC del mutante era muy superior a la de las plantas WT, es decir, el mutante tiene mayor capacidad de retener el agua. Además, se realizó una evaluación del contenido de agua de las hojas durante un ciclo de deshidratación y, mientras el WT sufría una bajada conforme avanzaban los días sin riego, el mutante permaneció sin cambios significativos en este parámetro. Por último, este mutante mostró cierta tolerancia en presencia de estrés salino.

En la literatura científica se pueden encontrar ejemplos de mutantes hipersensibles al estrés hídrico en varias especies. En un cribado de una población de 50000 líneas EMS de *Arabidopsis*, Posé y colaboradores (2009) identificaron un mutante recesivo hipersensible denominado *dry2*. La sensibilidad del mutante se ha relacionado con alteraciones en la regulación del cierre estomático, la acumulación de prolina, la degradación de clorofila, anomalías en el sistema radicular y la inducción de genes relacionados con el estrés. En cebada (*Hordeum spontaneum* Koch) se identificó un mutante espontáneo (*eibi1*) hipersensible a la sequía. Este mutante mostró la tasa de pérdida de agua más alta entre los mutantes hipersensibles conocidos, probablemente debido a una cutícula defectuosa (Chen *et al.*, 2004). En maíz, Mou y colaboradores (2014) detectaron un mutante sensible a la sequía en un ensayo en campo. El mutante mostraba hojas enrolladas en condiciones de sequía moderada y, con estrés más intenso, las hojas se volvían amarillas y con respuesta senescente.

El caso de mutantes con mayor tolerancia, como el 2149 ET MM, es menos frecuente que el anterior, pero hay algún precedente. En un estudio de mutantes de inserción de T-DNA de *Arabidopsis* se aisló un mutante con mayor tolerancia a la sequía (*adt*). En condiciones de estrés por sequía el mutante acumulaba niveles más altos de ABA comparado con el WT. El análisis genético reveló una expresión activa de un gen *WRKY* que codifica la proteína WRKR57. Los resultados de este estudio indicaron que la expresión de *WRKY* mejoró la tolerancia a la sequía de *Arabidopsis* por la elevación de los niveles de ABA (Jiang *et al.*, 2012).

En tomate se han identificado varios genes relacionados con la tolerancia al estrés hídrico. Dos de ellos son de la familia ERF (Ethylene Response Factor), *JERF1* y

SIERF5. El gen *JERF1* aislado a partir de tomate se ha probado tanto en tabaco como en arroz (Zhang *et al.*, 2010) y en ambos casos ha producido un incremento en la tolerancia a la sequía en la que parece estar implicada la activación en la síntesis del ácido abscísico. Tras la identificación del gen *SIERF5* se ha sobreexpresado en tomate produciendo plantas con mayor contenido relativo de agua y una mayor tolerancia a la sequía y la salinidad (Pan *et al.*, 2011). El gen *SINAGS1* se aisló en tomate por su homología con las familias NAGS1 y NAGS2 (N-acetyl-L-glutamate synthase) de *Arabidopsis*. Este gen se expresa en los órganos aéreos pero no en las raíces de tomate. Tras obtener plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresaban *SINAGS1* se comprobó que mostraban mayor tolerancia al estrés hídrico y salino (Kalamaki *et al.*, 2009). Por último, el gen *SITIP2;2* (Tonoplast Intrinsic Protein) fue aislado de tomate por su relación con las acuoporinas. Al sobreexpresar este gen en tomate se ha conseguido aumentar la biomasa y la cosecha en tres años consecutivos de cultivo en invernaderos comerciales tanto en condiciones normales como con estrés hídrico (Sade *et al.*, 2009).

En otras especies también se han identificado genes relacionados con la tolerancia a la sequía (Alter *et al.*, 2014). Algunos de los más importantes son los genes *DREB* (*dehydration responsive element binding*), que son reguladores de la expresión génica en situaciones de estrés por sequía en *Arabidopsis thaliana*, arroz y trigo (Chen *et al.*, 2006). Los genes *PIP1* y *PIP2* son responsables de la formación de acuaporinas, una proteína relacionada con la disponibilidad de agua en las plantas (Porcel *et al.*, 2006). Kuromori y colaboradores (2011) identificaron *AtABCG22*, un gen de la familia ABCG (ATP-binding cassette sub-family G) relacionado con la regulación de la apertura estomática en *Arabidopsis*.

Una vez se han identificado los genes candidatos relacionados con la tolerancia al estrés hídrico se han realizado diferentes trabajos para la obtención de plantas transgénicas con dichos genes, normalmente en especies modelo y en condiciones de laboratorio o de invernadero (Dubouzet *et al.*, 2003; Garg *et al.*, 2002; Holmstrom *et al.*, 1996; Park *et al.*, 2005; Shen *et al.*, 1997; Xiong y Yang, 2003; Xu *et al.*, 1996). Sin embargo, lo que importa es evaluar el efecto de estos genes en las especies y variedades de interés agronómico y en condiciones ambientales más similares a las que se enfrenta una planta cultivada. Gracias a este esfuerzo ya hay en el mercado algunas variedades transgénicas y otras están en fases avanzadas de evaluación para ser comercializadas (Waltz, 2014).

5.7. Caracterización de mutantes afectados en la tolerancia al estrés salino

En esta tesis se ha ampliado la caracterización fenotípica de dos mutantes muy importantes para el grupo, el 698 ET MM y 1560 ET MM, hipersensibles al estrés salino (Sánchez-Sauceda, 2016). Estos mutantes, al ser sometidos a condiciones salinas, muestran un fenotipo débil y clorótico; sin embargo, en ausencia de estrés salino no se observa el fenotipo.

Para complementar la caracterización del mutante 1560 ET MM se realizó el experimento de injertos, intercambiando la raíz y parte aérea del WT y el mutante, sometiendo las plantas injertadas a condiciones de estrés salino con 100 mM de NaCl. Antes de aplicar el tratamiento salino el desarrollo de los injertos era similar. Tras completar el tratamiento, los injertos con la parte radicular mutante, es decir $\frac{WT}{M}$ y $\frac{M}{M}$, mostraron clorosis en las hojas. Por el contrario, los injertos con el sistema radicular WT, $\frac{WT}{WT}$ y $\frac{M}{WT}$, no mostraron estos síntomas de clorosis comportándose como el testigo. Los resultados de este experimento permitieron confirmar que el fenotipo de sensibilidad al estrés salino está ocasionado por un defecto en el sistema radicular de las plantas mutantes.

Al analizar el contenido en agua de las plantas injertadas y cultivadas en condiciones salinas se observó que todas las plantas con raíz mutante habían acumulado una mayor cantidad de agua en la parte aérea. También se realizó un experimento de RWC con el mutante 698 ET MM, que es alélico al 1560 ET MM, en plantas injertadas y cultivadas en condiciones salinas. El resultado mostró que la pérdida por transpiración era similar entre los cuatro tipos de plantas. Sin embargo, el contenido en materia seca era muy superior en las plantas cuya raíz era WT respecto de aquellas con raíz mutante. Al tener en cuenta todos estos resultados, nuestra hipótesis es que la función principal del gen alterado estaría relacionada con la capacidad de absorción de agua de las raíces y su transporte a la parte aérea. Si el medio de cultivo tiene NaCl, al absorber mayor cantidad de agua y sal, su transporte a la parte aérea provocaría síntomas de clorosis y pérdida de vigor. Si esa hipótesis fuera correcta, estas plantas podrían ser más tolerantes al estrés hídrico. De hecho, al realizar los experimentos de tolerancia al estrés hídrico, tanto con plantas procedentes de semilla como con plantas aclimatadas, se observó cómo las plantas mutantes presentaban un retraso en la aparición de síntomas de pérdida de turgencia durante el tratamiento estresante al compararlas con las plantas WT.

El Na^+ se absorbe del suelo por las células de la raíz y se transporta por los vasos del xilema hasta la parte aérea de la planta. Se han encontrado evidencias fisiológicas que indican que las raíces de tomate podrían determinar la concentración de Na^+ que llega a la parte aérea de la planta dependiendo de la intensidad del estrés (Estañ *et al.*, 2005). Aunque existen ciertos mecanismos que pueden regular este transporte del Na^+ , tanto en las membranas celulares como mediante la actuación de proteínas de transporte, el Na^+ transportado acaba acumulándose inevitablemente en la parte aérea y provoca daños de diversa naturaleza (Hasegawa, 2013). Se conocen algunos de los genes que controlan la homeostasis de los iones celulares como el Na^+ al restringir su acumulación. Los genes *SOS (Salt Overly Sensitive)* y *HKT (High-Affinity Potassium Transporter)* están relacionados con esta función (Deinlein *et al.*, 2014). Los mutantes 1560 ET MM y 698 ET MM nos pueden ayudar a entender cómo se produce esa absorción y transporte desde la solución nutritiva para poder regular esa respuesta y encontrar nuevas alternativas para la mejora de las plantas frente a los estreses abióticos.

En cuanto al mutante 916 ET MM, en esta tesis doctoral se ha profundizado en su caracterización en dos aspectos, mediante experimentos de injertos, que han permitido evaluar el efecto de la mutación sobre la parte aérea y la raíz, y mediante la evaluación de la respuesta al estrés hídrico. En el primer caso se vio que el genotipo de la raíz no influye en el fenotipo de la parte aérea. En el segundo, se comprobó que las plantas mutantes mostraron también mayores síntomas de pérdida de turgencia respecto de las plantas WT cuando se ven sometidas a un tratamiento de estrés hídrico. Además, se comprobó que las plantas mutantes tienen una ligera mayor pérdida de agua por transpiración.

Por tanto, se ha demostrado que el mutante es sensible, no solo a estrés salino, sino también a estrés hídrico. En el caso de enfrentarse a condiciones de sequía, la mayor rapidez en su pérdida de turgencia podría estar causada por una mayor transpiración. Además, con los resultados obtenidos en los experimentos de estrés salino se vio la importancia que tiene en la parte aérea de la planta la protección de las estructuras meristemáticas frente al estrés abiótico. Por tanto, el estudio de mutantes que presenten alteraciones en el desarrollo de los meristemos de la parte aérea de la planta nos puede ayudar a comprender los mecanismos biológicos que permiten su crecimiento en condiciones desfavorables para, en un futuro, buscar alguna estrategia que disminuya estos efectos negativos en plantas sometidas a estrés.

5.8. Caracterización de mutantes con alteraciones en la parte aérea

En esta tesis se han identificado tres líneas mutantes, 111 ET GA, 1458 ET MM y 2647 ET MM, que presentaron alteraciones en el desarrollo de la parte aérea de la planta. El mutante 111 ET GA presentó alteraciones en la localización y desarrollo del ápice meristemático. La línea 1458 ET MM tenía cambios pleiotrópicos en la parte aérea que afectaron al desarrollo vegetativo y reproductivo. La línea 2647 ET MM presentó una alteración que hizo que la zona cercana al meristemo terminal de la planta se necrosara y detuviera su crecimiento.

El SAM es una pequeña población de células madre responsables de la generación de todos los órganos de la parte aérea de la planta, como tallos, hojas y flores. Para cumplir con esta función, el SAM debe permanecer activo durante todo el ciclo de vida de la planta con la capacidad de generar órganos en todas las etapas de desarrollo (Bustamante *et al.*, 2016). Estudios genéticos y moleculares de varios genes asociados con el desarrollo del SAM han ayudado a comprender la formación y el mantenimiento del SAM. El gen *SHOOTMERISTEMLESS (STM)* de *Arabidopsis* es necesario para la formación embrionaria del SAM (Barton y Poethig, 1993). Las plántulas homocigotas para alelos de pérdida de función germinan, desarrollan raíces, hipocótilo y cotiledones, pero no se forma el SAM. El gen *STM* codifica un tipo de proteína de homeodominio Knotted1 (Kn1) (Long *et al.*, 1996). Similar al gen *STM*, el gen *CUPSHAPED COTYLEDON 2 (CUC2)* de *Arabidopsis* y el *NO APICAL MERISTEM (NAM)* de *Petunia* son requeridos para la formación del SAM y separación de los cotiledones (Souer *et al.*, 1996).

Otro gen clave en la formación del SAM es *WUSCHEL (WUS)*. La expresión de *WUS* se limita a un grupo de células del interior de la zona central del meristemo (centro organizador). En los mutantes *wus* el meristemo se forma pero no se renueva la población de células indiferenciadas y el tamaño del meristemo va disminuyendo de forma progresiva hasta desaparecer (Mayer *et al.*, 1998). La expresión de *WUS* está controlada por la retroalimentación negativa de la vía de señalización de los genes *CLAVATA (CLV1, CLV2 y CLV3)* (Carles y Fletcher, 2001). Los genes *CLV* codifican los componentes de una vía de señalización del receptor quinasa que limita el tamaño del meristemo (Clark *et al.*, 1993). El tamaño de la población de las células madre se mantiene en el SAM mediante un ciclo regulatorio entre las células madre y el centro organizador del meristemo mediado por los genes *WUS* y *CLV* (Schoof *et al.*, 2000).

Además de estos genes clave para el funcionamiento del SAM, se han reportado otros que afectan el mantenimiento del SAM, como los genes *SHO* que tienen un papel importante en el mantenimiento de la organización adecuada del meristemo, esencial para el patrón de iniciación normal de los primordios foliares (Itoh *et al.*, 2000). El gen *ZWILLE (ZLL)* se requiere para establecer la organización central del ápice del embrión y es esencial para la autopropagación del SAM. Los mutantes *zll* inician correctamente la expresión del gen *STM* en estadios tempranos del embrión, pero no regulan la expresión en estadios posteriores e inician estructuras diferenciadas en lugar de células madre. El gen *ZLL* transmite información posicional para mantener las células madre del meristemo en desarrollo en un estado indiferenciado durante la transición del desarrollo embrionario a la formación de órganos postembrionarios (Moussian *et al.*, 1998). Otro gen que interviene en el desarrollo del SAM es *PINHEAD (PNH)*. Las mutaciones recesivas en el locus *PINHEAD* de *Arabidopsis* interfieren en la capacidad para la correcta organización del meristemo apical del brote primario así como de los meristemos de brotes laterales (McConnell y Barton, 1995).

En nuestro grupo se ha identificado un mutante muy interesante, el 916 ET MM, severamente afectado en el ápice meristemático en condiciones de estrés salino, mientras que en condiciones control no se puede distinguir entre plantas WT y mutantes (Sánchez-Sauceda, 2017). Según Hirayama y Shinozaki (2010) la respuesta de las plantas frente al estrés tiene efectos inmediatos sobre múltiples procesos del desarrollo, promoviendo numerosos cambios morfológicos en órganos y tejidos. Por consiguiente deben existir mecanismos comunes que regulan ambos procesos.

Las plantas han adquirido respuestas adaptativas a un entorno de cambio constante. Estas respuestas son el resultado de una red de señalización que va desde la homeostasis iónica hasta el control del ciclo celular. El estrés inhibe la división celular, lo que afecta negativamente el crecimiento y desarrollo de la planta. El reciente descubrimiento de la proteína RSS1 en el arroz da una idea de cómo la percepción del estrés puede influir en el control del ciclo celular en zonas meristemáticas (Ebel y Hanin, 2015). Los mutantes *rss1* presentan graves defectos en la división celular meristemática cuando se someten a estrés salino. En estos mutantes las células se detienen en la fase G1/S cuando son tratados con sal. Ogawa y colaboradores (2011) proponen que la proteína RSS1 promueve el ciclo celular meristemático en la transición G1/S sobre el estrés abiótico para asegurar la viabilidad de los meristemos. La comprensión de las relaciones entre los mecanismos del desarrollo y las situaciones estresantes puede ayudar a encontrar nuevas estrategias que permitan la solución a estos problemas.

5.9. Caracterización de mutantes cloróticos y variegados

Cuando una planta se ve sometida a estrés hídrico o salino es habitual que su contenido total de clorofila disminuya y muestre un fenotipo de clorosis. En este apartado se han incluido tres mutantes, uno clorótico y dos variegados. El mutante 2232 ET MM se desarrolla con normalidad durante los primeros 10 días, pero después exhibe un ritmo de crecimiento más lento probablemente como consecuencia de su clorosis. Pese a ello, no se observaron alteraciones significativas en las inflorescencias ni en el desarrollo de los frutos.

Los estudios sobre el proceso biosintético de la clorofila se han centrado en *Arabidopsis thaliana* y en arroz. En cebada, también se ha descrito una gran cantidad de mutantes con deficiencia total o parcial de clorofila (Wang *et al.*, 2017), pero no se conoce la mayor parte de los genes implicados. En arroz se han descrito más de 170 mutaciones del color de las hojas y se han identificado más de 160 genes en los 12 cromosomas, de los cuales, aproximadamente cuarenta están directamente implicados en la biosíntesis o catabolismo de la clorofila (Zhu *et al.*, 2016). En maíz y trigo también se han descrito algunos mutantes cloróticos (Asakura *et al.*, 2008; Hui *et al.*, 2012). Algunos ejemplos de estos mutantes son: *elm1*, *elm2*, *vyl-Chr.1* y *vyl-Chr.9* en maíz (Sawers *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2013; Xing *et al.*, 2014); *ygl1*, *ygl2*, *ygl3*, *ygl7*, *ygl98* y *YGL138(t)* en arroz (Wu *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2013; Tian *et al.*, 2013; Deng *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2013); y *chaos*, *egy1*, *apg1* y *var3* en *Arabidopsis* (Klimyuk *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2005; Motohashi *et al.*, 2003; Naested *et al.*, 2004).

En esta tesis se detectaron dos mutantes variegados el 245 ET GA y el 2494 ET MM. Los dos eran de naturaleza dominante ya que la mutación se detectó en TG1. El mutante 245 ET GA mostraba hojas con zonas de color blanco y también se observó un color diferente en las flores respecto al WT. Las plantas no fueron capaces de desarrollar frutos. El mutante 2494 ET MM presentaba zonas variegadas en las hojas y también en el tallo. A partir de de la TG1 de esta línea se obtuvo la descendencia que también exhibía la variegación. Las plantas variegadas proporcionan una herramienta valiosa para estudiar la biogénesis de los cloroplastos al permitir la comparación directa entre los sectores verde y blanco/amarillo dentro de la misma hoja (Hung *et al.*, 2010).

Los mutantes variegados, tales como *immutans (im)* (Aluru *et al.*, 2001), *yellow variegated 1 (var1)* (Sakamoto *et al.*, 2002) y *yellow variegated 2 (var2)* (Chen *et al.*, 2000; Takechi *et al.*, 2000) de *Arabidopsis*; *variegated and distorted leaf (vdl)* (Wang *et al.*, 2000) de tabaco; *ghost (gh)* (Josse *et al.*, 2000) de tomate; *albostrians* de cebada

(Yaronskaya *et al.*, 2003) y *yellow stripe 1 (ys1)* de maíz (Curie *et al.*, 2001), han demostrado ser materiales de gran valor para estudiar los mecanismos de desarrollo y mantenimiento de plastidios y cloroplastos (Hung *et al.*, 2010).

5.10. Caracterización de mutantes de senescencia y letalidad

Las plantas utilizan la senescencia de las hojas adultas para poder superar situaciones de estrés ambiental como la sequía. La senescencia y abscisión de estas hojas reducen la pérdida de agua por transpiración e incrementan la transferencia de nutrientes de dichas hojas hacia los meristemos y otros órganos de reserva. El ácido abscísico juega un papel central en la respuesta de las plantas a estas situaciones estresantes ya que, además de intervenir en procesos de senescencia, actúa en procesos como el cierre estomático, inhibición del crecimiento, acumulación de ceras en la cutícula o abscisión de hojas (Zhao *et al.*, 2017). De hecho, en un trabajo reciente se consiguió mejorar la tolerancia al estrés hídrico en plantas de *Arabidopsis* y arroz mediante la transformación con el gen *PYL9 (Pyrabactin Resistance 1-Like)* de la familia de los receptores de ácido abscísico. En este caso se comprobó que las plantas toleraban más la sequía gracias a que la senescencia de las hojas adultas ponía a disposición de los órganos en desarrollo mayor cantidad de agua (Zhao *et al.*, 2015). De nuevo, se pone de manifiesto la importancia que algunos procesos del desarrollo pueden tener para la mejora de la tolerancia a determinados tipos de estrés. Otro ejemplo del empleo de genes relacionados con la senescencia para la mejora de la tolerancia a estreses abióticos es el del gen *Hanb-4*. La sobreexpresión de este gen inhibe la senescencia inducida por etileno, y en ensayos de campo realizados con soja transgénica en USA y Argentina se han encontrado mejoras del rendimientos de entre el 7 y el 15% cuando el cultivo se realiza en condiciones de falta de agua (Waltz, 2014).

En esta tesis se han caracterizado seis mutantes con fenotipo de senescencia y letalidad: dos con fondo genético de *Solanum galapagense* (167 ET GA y 332 ET GA), uno con fondo genético de tomate P73 (526 ET 73) y tres con fondo genético de Moneymaker. Entre estos últimos, dos de ellos (199 ET MM, 1641 ET MM) se identificaron en la presente tesis, mientras que otro, el mutante 1524 ET MM, se identificó en un escrutinio previo del grupo (Sánchez-López, 2017).

Dentro de estas líneas se observaron mutantes de letalidad que se morían en los primeros días del desarrollo. Por ejemplo, el mutante 1641 ET MM presentaba

síntomas de senescencia desde la etapa de plántula, con zonas amarillentas en los cotiledones, hasta que la planta moría a las dos semanas. Los mutantes 167 ET GA y 332 ET GA también mostraron su fenotipo desde etapas tempranas del desarrollo hasta que, tras pocos días, terminaban por colapsar y morir. Estos mutantes de letalidad pueden estar causados por alteraciones en genes específicamente requeridos durante el desarrollo temprano de las plántulas, cuya ausencia se vuelve crítica en esta etapa. En un cribado para identificar genes de mutantes “*seedling-lethal*” de *Arabidopsis*, se evaluaron 38,000 líneas y se evaluaron fenotípicamente y molecularmente 22 mutantes con fenotipo de letalidad. La mayoría de los mutantes tenían afectado algún carácter relacionado con la función de los cloroplastos. (Budziszewski *et al.*, 2001).

El mutante 526 ET 73 presentaba un fenotipo de senescencia, a pesar del cual las plantas mutantes pudieron mantenerse tanto *in vitro* como *in vivo*, llegando a la etapa adulta en el invernadero. Las características principales de este mutante fueron un porte débil, un ritmo de crecimiento más lento que el WT y un color verde pálido en las hojas, debido probablemente a la degradación de la clorofila en los cloroplastos. Con un fenotipo similar, el mutante *staygreen (sgr)* de arroz (*Oryza sativa*) permitió identificar el gen *SGR*, asociado a la senescencia, que codifica una nueva proteína del cloroplasto. El arroz transgénico que sobreexpresa *SGR* produce hojas de color marrón o amarillento (Park *et al.*, 2007). En investigaciones recientes Sun y colaboradores (2017) identificaron otro mutante de arroz denominado *sp/32* que mostró senescencia foliar prematura, con una disminución drástica del contenido de clorofila. La clonación posicional reveló que *SPL32* codifica una glutamato sintetasa dependiente de ferredoxina (Fd-GOGAT). La actividad enzimática de GOGAT disminuyó significativamente en el mutante y el contenido de glutamato estaba alterado.

El mutante 1524 ET MM fue identificado por el grupo en una tesis anterior (Sánchez-López, 2017). Las características fenotípicas observadas fueron plantas de menor tamaño que el WT y que no llegaban a etapa adulta por necrosarse gran parte de los tejidos hasta acabar muriendo a los dos meses de cultivo. Para profundizar en la caracterización de este mutante, en esta tesis se realizó el experimento de injertos. Las plantas mutantes con raíz WT lograron desarrollarse hasta un tamaño similar al WT. La aparición de necrosis se ralentizó, aunque no se pudo evitar del todo, por lo que no se consiguió la producción de semillas a partir de estas plantas. El mutante 199 ET MM se iba necrosando desde las hojas hasta llegar al raquis y tallo, e incluso presentaba zonas necróticas en las flores, hasta que la planta se acababa secando

casi por completo. A pesar de eso, algunas plantas mutantes pudieron desarrollar frutos con semillas. Estos fenotipos de necrosis localizada en determinados tejidos podrían tener alterados algunos genes relacionados con la muerte celular programada.

La muerte celular programada es un proceso que se da en diferentes fases del desarrollo de una planta, como la formación de las anteras y de determinados tejidos vasculares (Gunawardena, 2008), así como en procesos de senescencia (Uzelac *et al.*, 2008) y en la germinación de semillas (Domínguez *et al.*, 2001). Además, las plantas emplean la muerte celular programada como respuesta controlada a diferentes estreses bióticos y abióticos (Zuppin *et al.*, 2010). Durante su ciclo de vida, las plantas están expuestas a microorganismos invasores, que incluyen bacterias, hongos y virus, que son potencialmente patógenos (Ma y Berkowitz, 2007). Cuando estos patógenos invaden una planta, una respuesta de defensa compleja llamada respuesta hipersensible causa la formación de lesiones necróticas mediante la activación de una vía de muerte celular programada con el fin de restringir el crecimiento del patógeno.

Se han aislado mutantes que muestran muerte celular espontánea en maíz (Hoisington *et al.*, 1982), arroz (Takahashi *et al.*, 1999, Wang *et al.*, 2005), cebada (Wolter *et al.*, 1993) y *Arabidopsis* (Greenberg y Ausubel, 1993; Dietrich *et al.*, 1994, Greenberg *et al.*, 1994, Lorrain *et al.*, 2004, Bouchez *et al.*, 2007). Estos mutantes muestran diferentes fenotipos de lesión y se clasifican en dos categorías: mutantes de iniciación y mutantes de propagación (Lorrain *et al.*, 2003). Esta clasificación se basa en la suposición de que hay dos mecanismos diferentes involucrados en el control de la muerte celular: una vía para iniciar la muerte celular programada y otra vía para suprimirla. Los mutantes de iniciación forman puntos necróticos localizados de tamaño determinado, mientras que los mutantes de propagación son incapaces de controlar la tasa y el alcance de las lesiones. El estudio de estos mutantes brinda la oportunidad para estudiar las bases moleculares de la muerte celular programada y la resistencia a patógenos. Esto ha revelado una amplia variedad de factores importantes: genes relacionados con la defensa, ácido salicílico, ácido abscísico, transporte de iones Ca^{2+} , formación y detección de ROS, metabolismo de esfingolípidos, y biosíntesis y catabolismo de clorofila (Lorrain *et al.*, 2003; Moeder y Yoshioka, 2008; Mosher *et al.*, 2010). En *Arabidopsis* se han identificado mutantes relacionados con este tipo de respuesta: mutantes de muerte acelerada (*acd*), mutantes que simulan la respuesta de resistencia a enfermedades (*lsd1*), mutantes de necrosis espontánea (*svn1*), mutantes con lesiones similares a enfermedades (*dll1*) y mutantes que desarrollan lesiones cloróticas o específicas de tejidos (*acd11*) (Lorrain *et al.*, 2003). La identificación y

caracterización de los mutantes de esta tesis nos puede ayudar a entender mejor estos mecanismos y su relación con la tolerancia a diferentes tipos de estrés.

5.11. Caracterización de mutantes afectados en el desarrollo radicular

El sistema radicular es muy importante para las plantas en una amplia variedad de procesos, incluida la absorción de nutrientes y agua, el anclaje, el almacenamiento de ciertas sustancias; además, las raíces son la interfaz entre la parte aérea de la planta y diversos factores bióticos y abióticos en el suelo, como por ejemplo la presencia de un exceso de sales o la falta de disponibilidad de agua. La comprensión del desarrollo y la arquitectura de las raíces puede abrir el camino para explotar y manipular sus características y aumentar el rendimiento de las plantas (Den Herder *et al.*, 2010). El sistema radicular embrionario consiste en una raíz primaria derivada del tejido meristemático del SAM y las raíces laterales que surgen a partir de un conjunto específico de células del periciclo de la raíz primaria. Las raíces adventicias se forman a partir de tejidos diferenciados del tallo, u otros que no sean otras raíces (Sorin *et al.*, 2005).

Se han identificado varios mutantes con alteraciones en el sistema radicular embrionario así como en el adventicio (196 ET GA; 384 ET MM; 2647 ET MM; 2666 ET MM) y se ha trabajado con un mutante previamente identificado en nuestro grupo que además presenta alteraciones en su capacidad de regeneración adventicia, el mutante *dor*. En todos los casos los mutantes presentaban dificultad para crecer y formar frutos. En algunos mutantes, además de las anomalías en el sistema radicular, se observaron alteraciones en otros órganos de las plantas como las hojas (e.g. 2647 ET MM-M2). Los mutantes 384 ET MM y *dor* presentaban menor formación de raíces laterales y adventicias. Cabe mencionar que en estos mutantes se probaron diferentes explantes (e.g. cotiledones y hojas) como material a partir del cual obtener raíces adventicias y en todos ellos se observó una respuesta similar.

Se han identificado diversos genes que regulan el crecimiento del sistema radicular en *Arabidopsis* relacionados con el meristemo apical de la raíz (RAM). El gen *SCHIZORHIZA* (*SCZ*) está asociado con el desarrollo del sistema radicular ya que se requiere para el establecimiento de células madre de la raíz embrionaria. El mutante *schizoriza* (*scz*) tiene alterada la formación de la endodermis y corteza debido a que las proteínas *SCHIZORHIZA* (*SCZ*) intervienen en la formación de las células

precursoras de estos tejidos en el embrión (Pernas *et al.*, 2010). Se han asociado dos factores de transcripción con el mantenimiento del meristemo apical de la raíz: SCARECROW (SCR) y SHORT ROOT (SHR). El crecimiento de la raíz se retrasa en los mutantes *scr* y *shr*. El comportamiento de crecimiento de la raíz del mutante *shr* se debe a que el meristemo apical primario de la raíz no inicia la división celular después de la germinación. Los genes *SHR* y *SCR* codifican factores de transcripción que pertenecen a la familia de genes *GRAS* (Di Laurenzio *et al.*, 1996; Helariutta *et al.*, 2000). Se ha demostrado que *SHR* regula directamente la expresión de genes que incluyen *SCR* (Levesque *et al.*, 2006) y una serie de componentes del ciclo celular, incluida la ciclina de tipo D, *CYCD6; 1* (Sozzani *et al.*, 2010). La función de *SHR* no está restringida a la raíz primaria, sino que también se requiere para la iniciación y el diseño de primordios de raíz lateral. Además, *SHR* es necesario para mantener el crecimiento indeterminado de las raíces laterales y de anclaje. Los autores que han trabajado sobre este tema concluyen que *SHR* regula una amplia gama de procesos de desarrollo relacionados con la raíz de *Arabidopsis* (Lucas *et al.*, 2011). Además, la incapacidad de *shr* para reactivar la actividad mitótica en el meristemo apical de la raíz se asocia con la reducción progresiva en la abundancia de portadores de salida de auxina: PIN-FORMED1 (PIN1), PIN2, PIN3, PIN4 y PIN7. Los genes *PIN* controlan colectivamente la distribución de auxinas para regular la división celular y la expansión celular en la raíz primaria. La acción conjunta de estos genes tiene un papel importante al restringir el dominio de expresión de los genes *PLETHORA 1 y 2* (*PLT1* Y *PLT2*), principales determinantes para la especificación de células madre de la raíz. A su vez, se requieren genes *PLT* para la transcripción de los genes *PIN* a fin de estabilizar el máximo de auxina en el meristemo apical de la raíz. Según Blilou y colaboradores (2005) los datos revelan una red de interacción de transporte de auxinas y el crecimiento del primordio de la raíz.

Como se ha descrito antes, las auxinas tienen una importante implicación en el control de la elongación celular en la raíz y en la formación de las raíces laterales. Se han aislado mutantes de la vía de respuesta a auxinas, como el mutante de la raíz solitaria (*slr*) que tiene una ausencia completa de raíces laterales debido a una mutación de ganancia de función que aumenta la actividad represiva de IAA14 (Fukaki *et al.*, 2002). Además del mutante *slr*; otros mutantes de ganancia de función *aux/iaa* exhiben fenotipos que afectan a las raíces laterales: el mutante *hypocotyl2-2* (*shy2-2*)/*iaa3* (Tian *et al.*, 2003) y el mutante *iaa28* (Rogg *et al.*, 2001) de *Arabidopsis* presentan raíces laterales reducidas. Además de las auxinas, los brasinosteroides y las citoquininas tienen funciones muy importantes en el sistema radicular. Las citoquininas

son promotores de la diferenciación celular y los brasinosteroides son reguladores de la expansión celular (Clouse y Sasse, 1998). Mouchel y colaboradores (2004) aislaron el gen *BREVIS RADIX (BRX)*. Los mutantes de este gen presentaron niveles reducidos de brasinosteroides y tenían un menor tamaño celular en las raíces con respecto al WT.

Debido a que la regulación hormonal juega un papel muy importante en el sistema radicular se estudió el comportamiento de algunos mutantes en medios suplementados con distintas auxinas, tanto naturales como de síntesis (IAA, IBA, ANA, 2,4-D, 2,4-5T y 4-CPA), a diferentes concentraciones. Se cultivaron ápices meristemáticos mutantes y WT en estos medios. En ninguna de las líneas evaluadas se observó una reversión total del fenotipo mutante al adicionar estas hormonas al medio de cultivo. Se han obtenido resultados similares en el mutante *alf-4 (aberrant lateral root formation-4)* de *Arabidopsis* en el cual no se observó respuesta a la aplicación exógena de auxinas (Celenza *et al.*, 1995). En un estudio con el mutante de arroz *Lrt1* que no logra formar raíces laterales se investigaron los efectos de las auxinas sobre la iniciación de la raíz lateral mediante la aplicación exógena de IBA, IAA, ANA y 2,4-D. Con IBA el mutante restauró la iniciación de raíz lateral y el gravitropismo. Sin embargo, la aplicación de IAA restauró sólo la respuesta gravitropica de la raíz, pero no la iniciación de raíces laterales. Con la aplicación de ANA se restauró el inicio de la raíz lateral pero no estableció completamente el gravitropismo (Chun *et al.*, 2003). Los autores concluyeron que IBA es la auxina más eficaz para restaurar la formación de raíz lateral en el mutante *Lrt1*.

A pesar de la importancia del sistema radicular, es complicado cuantificar el control que ejerce en el desarrollo de la planta. Un sistema radicular es difícil de observar y de interpretar. Una alternativa para conocer los efectos que tiene una mutación de este tipo en la parte aérea de la planta es el uso de injertos, intercambiando los genotipos de parte aérea y de la raíz. El experimento de injertos se ha utilizado en los mutantes de raíz identificados en esta tesis.

En el mutante *dor* y 384 ET MM los injertos con la parte aérea mutante en patrón WT se desarrollaron sin problema llegando a etapa adulta y permitiendo la obtención de semillas mutantes. Esto, además de la información que proporcionó sobre el fenotipo mutante, representó un beneficio práctico para el diseño de los siguientes experimentos, ya que la obtención de semillas mutantes no fue posible de otra manera. Además se comprobó que el fenotipo mutante de estas líneas estaba determinado exclusivamente por las anomalías en el sistema radicular, ya que el

injerto con la parte aérea WT sobre patrón mutante presentó el mismo aspecto que el de las plantas mutantes.

El mutante 2647 ET MM M2 presentaba anomalías en la morfología de las hojas y en el sistema radicular. Al realizar los injertos con la parte aérea mutante sobre patrón WT se produjo un desarrollo vigoroso, similar al de una planta WT, aunque la morfología de las hojas seguía siendo anómala. El injerto en el sentido opuesto dio plantas que no fueron capaces de crecer como una planta WT. En este caso se concluyó que el fenotipo está influido tanto por el sistema radicular como por la parte aérea de la planta.

En la línea 2666 ET MM ocurrió algo similar: el fenotipo mutante estaba provocado tanto por el sistema radicular como por la parte aérea. En definitiva, el uso de la metodología de injertos fue muy positivo tanto para la caracterización de los fenotipos mutantes como para la obtención de descendencia.

Por último, conviene incidir en la importancia que estos mutantes afectados en el desarrollo de la raíz pueden tener en la búsqueda de nuevas estrategias para conseguir mejorar la tolerancia al estrés hídrico y salino. De hecho, se ha estudiado el comportamiento de diversos mutantes afectados en estos caracteres al verse sometidos a diferentes situaciones estresantes. Así, el mutante *edt1* (*ENHANCED DROUGHT TOLERANCE1*) de *Arabidopsis* tiene un sistema radicular con raíces de mayor longitud y mayor número de raíces laterales, lo cual le confiere una mayor tolerancia al estrés hídrico (Yu *et al.*, 2008). Por otro lado, plantas de *Arabidopsis* en las que no se expresa el gen *AN3* (*ANGUSTIFOLIA3*) muestran una mayor tolerancia al estrés hídrico gracias a una menor densidad de tricomas y a una modificación en la arquitectura de la raíz que presenta mayor longitud y mayor biomasa (Meng y Yao, 2015).

CONCLUSIONES

1. Se ha puesto a punto un método para identificar mutantes afectados en la tolerancia al estrés hídrico. Tras el escrutinio de líneas T-DNA de tomate, se ha identificado y caracterizado un mutante con menor tolerancia al déficit hídrico y otro que, en las mismas condiciones, es más tolerante que el WT.
2. Se ha profundizado en la caracterización de tres mutantes hipersensibles al estrés salino previamente identificados en nuestro grupo. En los mutantes 1560 ET MM y 698 ET MM la sensibilidad al estrés salino se debe a una excesiva absorción de agua por parte de la raíz, lo que provoca la acumulación de iones tóxicos en la parte aérea. En el caso del mutante 916 ET MM la raíz no interviene en el fenotipo de colapso de la parte aérea en condiciones de estrés salino. Se ha comprobado que el mutante 916 ET MM también está alterado en su tolerancia al estrés hídrico.
3. Tras el escrutinio de líneas T-DNA de tomate y de *Solanum galapagense* se han identificado mutantes alterados en caracteres del desarrollo potencialmente relacionados con la tolerancia a estrés abiótico. En concreto, se han identificado y caracterizado cinco mutantes afectados en el desarrollo de la parte aérea, tres con clorosis o variegación en las hojas, seis que presentan senescencia o respuesta hipersensible y, por último, cinco mutantes con alteraciones en el desarrollo del sistema radicular.
4. Se ha confirmado la naturaleza insercional de tres mutantes (167 ET GA, 199 ET MM y 2647 ET MM M2), lo que permitirá abordar la clonación del gen alterado en cada uno de ellos mediante Anchor-PCR. En el caso de los mutantes de tipo somaclonal hemos obtenido poblaciones segregantes a partir del cruce de cada uno de ellos con *Solanum pimpinellifolium* para abordar la identificación de los genes alterados mediante técnicas de mapeo por secuenciación NGS.
5. Se ha iniciado el análisis funcional del gen identificado en el mutante *dor*. Los resultados han revelado que el gen *DOR* tiene una función importante en el desarrollo radicular y la organogénesis adventicia. Además, se ha comprobado que los mutantes *dor* y 384 ET MM son alélicos.

BIBLIOGRAFÍA

- Achard P., Cheng H., De Grauwe L., Decat J., Schoutteten H., Moritz T., Van Der Straeten D., Peng J., Harberd N.P. 2006.** Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science* 311:91-94.
- Alonso J.M., Stepanova A.N., Leisse T.J., Kim C.J., Chen H., Shinn P., Stevenson D.K., Zimmerman J., Barajas P., Cheuk R., Gadrinab C., Heller C., Jeske A., Koesema E., Meyers C.C., Parker H., Prednis L., Ansari Y., Choy N., Deen H., Geralt M., Hazari N., Hom E., Karnes M., Mulholland C., Ndubaku R., Schmidt I., Guzman P., Aguilar-Henonin L., Schmid M., Weigel D., Carter D.E., Marchand T., Risseeuw E., Brogden D., Zeko A., Crosby W.L., Berry C.C., Ecker J.R. 2003.** Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301(5633):653-657.
- Alter V., Bader K.C., Spannagl M., Wang Y., Bauer E., Schön C.C., Mayer K.F.X. 2014.** DroughtDB: An expert-curated compilation of plant drought stress genes and their homologs in nine species. *Database* doi.org/10.1093/database/bav046
- Aluru M.R., Bae H., Wu D., Rodermel S.R. 2001.** The *Arabidopsis immutans* mutation affects plastid differentiation and the morphogenesis of white and green sectors in variegated plants. *Plant Physiology* 127:67-77.
- André D., Colau D., Schell J., Van Montagu M., Hernalsteens J.P. 1986.** Gene tagging in plants T-DNA insertion mutagen that generates *APH* (3') II-plant gene fusions. *Molecular and General Genetics* 204 (3):512-518.
- Apel K. y Hirt H. 2004.** Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55:373–399.
- 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* 1256-1258.
- 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 (4):413-418.
- Asakura Y., Kikuchi S., Nakai M. 2008.** Non-identical contributions of two membrane-bound cpSRP components, cpFtsY and Alb3, to thylakoid biogenesis. *The Plant Journal* 56:1007-1017.

- Ashley M.K., Grant M., Grabov A. 2006.** Plant responses to potassium deficiencies: a role for potassium transport proteins. *Journal of Experimental Botany* 57 (2): 425-436.
- Ashraf M. 2010.** Inducing drought tolerance in plants: recent advances. *Biotechnology Advances* 28:169-183.
- Atarés A., Moyano E., Morales B., Schleicher P., Garcia-Abellan J.O., Anton T., Garcia-Sogo B., Perez-Martin F., Lozano R., Flores F.B., Moreno V., Del Carmen Bolarin 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(10): 1865-79.
- Azpiroz-Leehan R. y Feldmann K.A. 1997.** T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: going back and forth. *Trends in Genetics* 13(4):152-156.
- Bade J., Van Grinsven E., Custers J., Hoekstra S., Ponstein A. 2003.** T-DNA tagging in *Brassica napus* as an efficient tool for the isolation of new promoters for selectable marker genes. *Plant Molecular Biology* 52:53–68.
- Barba-Espín G., Clemente-Moreno M.J., Álvarez S., García-Legaz M.F., Hernández J.A., Díaz-Vivancos P. 2011.** Salicylic acid negatively affects the response to salt stress in pea plants. *Plant Biology* 13:909–917.
- Barrs H.D. y Weatherley P.E. 1962.** A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficit in leaves. *Australian Journal of Biological Sciences* 15:413-428.
- Barton M.K. y Poethig 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* 119:823-31.
- Basu S., Ramegowda V., Kumar A., Pereira A. 2016.** Plant adaptation to drought stress. *F1000 Research* 5:1554.
- Belver A., Olías R., Huertas R., Rodríguez-Rosales M.P. 2012.** Involvement of SISOS2 in tomato salt tolerance. *Bioengineered*. 3(5):298-302.
- Berná G., Robles P., Micol J.L. 1999.** A mutational analysis of leaf morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 152:729-742.

- Bishop G.J., Harrison K., Jones J.D.G. 1996.** The tomato *Dwarf* gene isolated by heterologous transposon tagging encodes the first member of a new cytochrome P450 family. *The Plant Cell* 8:959-969.
- Blanvillain R. y Gallois P. 2008.** Promoter Trapping System to Study Embryogenesis. In: Suárez M.F., Bozhkov P.V. (eds) *Plant Embryogenesis. Methods In Molecular Biology™*, vol 427. Humana Press
- Blilou I., Xu J., Wildwater M., Willemsen V., Paponov I., Friml J., Heidstra R., Aida M., Palme K., Scheres B. 2005.** The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* 433:39-44.
- Bohnert H.J., Nelson D.E., Jensen R.G. 1995.** Adaptations to environmental stresses. *The Plant Cell* 7:1099-1111.
- Borevitz J.O., Xia Y., Blount J., Dixon R.A., Lamb C. 2000.** Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *The Plant Cell* 12:2383-2394.
- Bouchez O., Huard C., Lorrain S., Roby D., Balagué C. 2007.** Ethylene is one of the key elements for cell death and defense response control in the *Arabidopsis* lesion mimic mutant *vad1*. *Plant Physiology* 145:465-477.
- Brunaud V., Balzergue S., Dubreucq B., Aubourg S., Samson F., Chauvin S., Bechtold N., Cruaud C., DeRose R., Pelletier G., Lepiniec L., Caboche M., Lecharny A . 2002.** T-DNA integration into the *Arabidopsis* genome depends on sequences of pre-insertion sites. *EMBO Reports* 12:1152–1157.
- 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.
- Busov V., Yordanov Y., Gou J., Meilan R., Ma C., Regan S., Strauss S. 2011.** Activation tagging is an effective gene tagging system in *Populus*. *Tree Genetics and Genomes* 7:91-101.
- Bustamante M., Matus J.T., Riechmann J.L. 2016.** Genome-wide analyses for dissecting gene regulatory networks in the shoot apical meristem. *Journal of Experimental Botany* 67(6):1639-1648.

- Butler N.M., Baltes N.J., Voytas D.F., Douches D.S. 2016.** Geminivirus-Mediated Genome Editing in Potato (*Solanum tuberosum* L.) Using Sequence Specific Nucleases. *Frontiers in Plant Science*. 7:1045.
- Campisi L., Yang Y., Yi Y., Heilig E., Herman B., Cassista A.J., Allen D.W., Xiang H., Jack T. 1999.** Generation of enhancer trap lines in *Arabidopsis* and characterization of expression patterns in the inflorescence. *The Plant Journal* 17:669-707.
- Cao Y.R., Chen S.Y., Zhang J.S. 2008.** Ethylene signaling regulates salt stress response: An overview. *Plant Signal Behaviour* 3:761–763.
- Carles C.C. y Fletcher J.C. 2001.** Shoot apical meristem maintenance: the art of a dynamic balance. *Trends in Plant Science* 8:394-401.
- Carrillo P., Annunziata M.G., Pontecorvo G., Fuggi A., Woodrow P. 2011.** Salinity Stress and Salt Tolerance, Abiotic Stress in Plants - Mechanisms and Adaptations, Prof. Arun Shanker (Ed.), ISBN: 978-953-307-394-1, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/abioticstress-in-plants-mechanisms-and-adaptations/salinity-stress-and-salt-tolerance>
- Carroll B.J., Klimyuk V.I., Thomas C.M., Bishop G.J., Harrison K., Scofield S.R., Jones J.D. 1995.** Germinal transpositions of the maize element Dissociation from T-DNA loci in tomato. *Genetics* 139:407.
- Carter J.D., Pereira A., Dickerman A.W., Veilleux R.E. 2013.** An active Ac/Ds transposon system for activation tagging in tomato cultivar M82 using clonal propagation. *Plant Physiology* 162:145-156.
- Castle L.A., Errampalli D., Atherton T., Franzmann L., Yoon E., Meinke D.W. 1993.** Genetic and molecular characterization of embryonic mutants identified following seed transformation in *Arabidopsis*. *Molecular Genetics and Genomics* 241:504-514.
- Catala R., Ouyang J., Abreu I.A., Hu Y., Seo H., Zhang X., Chua N.H. 2007.** The *Arabidopsis* E3 SUMO ligase SIZ1 regulates plant growth and drought responses. *The Plant Cell* 19:2952-2966.
- Celenza J.L., Grisafi P.L., Fink G.R. 1995.** A pathway for lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genes & Development* 9:2131-2142.

- Chalfun-Junior A., Mes J.J., Mlynárová L., Aarts M.G.M., Angenent G.C. 2003.** Low frequency of T-DNA based activation tagging in *Arabidopsis* is correlated with methylation of CaMV 35S enhancer sequences. *FEBS Letters* 555:459-463.
- Chen G., Bi Y.R., Li N. 2005.** EGY1 encodes a membrane-associated and ATP-independent metalloprotease that is required for chloroplast development. *The Plant Journal* 41(3):364-375.
- Chen G., Sagi M., Weining S. Krugman T., Fahima T., Korol A.B., Nevo E. 2004.** Wild barley *eibi1* mutation identifies a gene essential for leaf water conservation. *Planta* 219(4):684-693.
- Chen H., Cheng Z.J., Ma X.D., Wu H., Liu Y.L., Zhou K.N., Chen Y.L., Ma W.W., Bi J.C., Zhang X., Guo X.P., Wang J.L., Lei C.L., Wu F.Q., Lin Q.B., Liu Y.Q., Jiang L. 2013.** A knockdown mutation of *YELLOW-GREEN LEAF2* blocks chlorophyll biosynthesis in rice. *Plant Cell Reports* 32:1855-1867.
- Chen M., Choi Y.D., Voytas D.F., Rodermel S. 2000.** Mutations in the *Arabidopsis* VAR2 locus cause leaf variegation due to the loss of a chloroplast FtsH protease. *The Plant Journal* 22:303-313.
- Chen Y., Chen P., De los Reyes B. G. 2006.** Differential Responses of the Cultivated and Wild Species of Soybean to Dehydration Stress. *Crop Science* 46:2041-2046.
- Chhun T., Taketa S., Tsurumi S. Ichii M. 2003.** The effects of auxin on lateral root initiation and root gravitropism in a lateral rootless mutant *Lrt1* of rice (*Oryza sativa* L.) *Plant Growth Regulation* 39(2):161-170.
- Ciarmiello F.L., Woodrow P., Fuggi A., Pontecorvo G., Carrillo P. 2011.** Plant Genes for Abiotic Stress, Abiotic Stress in Plants - Mechanisms and Adaptations, Prof. Arun Shanker (Ed.), *InTech* doi: 10.5772/22465.
- Claeys H. e Inzé D. 2013.** The Agony of Choice: How Plants Balance Growth and Survival under Water-Limiting Conditions. *Plant Physiology* 162(49):1768-1779.
- Clark S.E., Running M.P., Meyerowitz E.M. 1993.** CALAVATA1, a regulator of meristem and flower development in *Arabidopsis*. *Development* 119:397-418.
- Clouse S.D. y Sasse J.M. 1998.** Brassinosteroids: Essential regulators of plant growth and development. *Plant Physiology* 49:427-451.

- Comas L.H., Becker S.R., Cruz V.M.V., Byrne P.F., Dierig D.A. 2013.** Root traits contributing to plant productivity under drought. *Frontiers in Plant Science* 4:442.
- Cong B., Barrero L.S., Tanksley S.D. 2008.** Regulatory change in YABBY-like transcription factor led to evolution of extreme fruit size during tomato domestication. *Nature Genetics* 40: 800–804.
- Cuartero J., Bolarín M.C., Asins M.J, Moreno V. 2006.** Increasing salt tolerance in the tomato. *Journal of Experimental Botany* 57:1045-1058.
- Curie C., Panaviene Z., Loulergue C., Dellaporta S.L., Briat J.F., Walker E.L. 2001.** Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. *Nature* 409:346-349.
- David-Schwartz R., Badani H., Smadar W., Levy A.A., Galili G., Kapulnik Y. 2001.** Identification of a novel genetically controlled step in mycorrhizal colonization: plant resistance to infection by fungal spores but not extra-radical hyphae *Plant Journal* 27:561-569
- Deinlein U., Stephan A.B., Horie T., Luo W., Xu G., Schroeder J.I. Plant salt-tolerance mechanisms. 2014.** *Trends in plant science* 19(6):371-379.
- Den Herder G., Van Isterdael G., Beeckman T., De Smet I. 2010.** The roots of a new green revolution. *Trends Plant Science* 15:600-607.
- Deng X.J., Zhang H.Q, Wang Y., He F., Liu J.L, Xiao X., Shu Z., Li W., Wang G.H., Wang G.L. 2014.** Mapped clone and functional analysis of leaf-color gene *Ygl7* in a rice hybrid (*Oryza sativa L. ssp. indica*). *PLoS One* 9(6):e99564.
- Di Lorenzo L., Wysocka-Diller J., Malamy J.E., Pysh L., Helariutta Y., Freshour G., Hahn M.G., Feldmann K.A., Benfey P.N. 1996.** The *SCARECROW* gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root. *Cell* 86:423-433.
- Dietrich R.A., Delaney T.P., Uknes S.J., Ward E.R., Ryals J.A., Dangi J.L. 1994.** *Arabidopsis* mutants simulating disease resistance response. *Cell* 77(4):565-577.
- Divi U.K. y Krishna P. 2009.** Brassinosteroid: a biotechnological target for enhancing crop yield and stress tolerance. *New Biotech* 26:131–136.

- Domínguez F., Moreno J., Cejudo F.J. 2001.** The nucellus degenerates by a process of programmed cell death during the early stages of wheat grain development. *Planta* 213:352-360.
- Dooner H.K. y Belachew A. 1989.** Transposition pattern of the maize element Ac from the bz-m2 (Ac) allele. *Genetics* 122:447-457.
- Dooner H.K., Keller J., Harper E., Ralston E. 1991.** Variable patterns of transposition of the maize element activator in tobacco. *The Plant Cell* 3:473-482.
- Droc G., Périn C., Fromentin S., Larmande P. 2008.** OryGenesDB 2008 update: database interoperability for functional genomics of rice. *Nucleic Acids Research* 2009: 37 (Database issue): D992-995. 66.
- Dubouzet J.G., Sakuma Y., Ito Y., Kasuga M., Dubouzet E.G., Miura S., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. 2003.** *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *The Plant Journal* 33:751-763.
- Ebel C. y Hanin M. 2015.** Maintenance of meristem activity under stress: is there an interplay of RSS1-like proteins with the RBR pathway? *Plant Biology* 18:167-170.
- Egea I., Pineda B., Ortíz-Atienza A., Plasencia F.A., Drevensek S., García-Sogo B., Yuste-Lisbona F.J., Barrero J., Atarés A., Flores F.B., Barneche F., Angosto T., Capel C., Salinas J., Vriezen W., Esch E., Bowler C., Bolarin M.C., Moreno V., Lozano R.. 2017.** The SICBL10 calcineurin B-like protein ensures plant growth under salt stress by regulating Na⁺ and Ca²⁺ homeostasis. *Plant Physiology* DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.17.01605>.
- Enoki H., Izawa T., Kawahara M., Komatsu M., Koh S., Kyozuka J., Shimamoto K. 1999.** Ac as a tool for the functional genomics of rice. *The Plant Journal* 19 (5):605-613.
- Estañ M.T., Martínez-Rodríguez M.M., Pérez-Alfocea F., Flowers T.J., Bolarin M.C. 2005.** Grafting raises the salt tolerance of tomato through limiting the transport of sodium and chloride to the shoot. *Journal of Experimental Botany* 56:703-712.

- Fanourakis D., Carvalho S., Almeida D., Heuvelink E. 2011.** Avoiding high relative air humidity during critical stages of leaf ontogeny is decisive for stomatal functioning. *Physiologia Plantarum* 142:274–286.
- Fariduddin Q., Mir B.A., Yusuf M., Ahmad A. 2013.** Comparative roles of brassinosteroids and polyamines in salt stress tolerance. *Acta Physiol Plant* 35:2037–2053.
- Farooq M., Hussain M., Wahid A., Siddique H.M. 2012.** Drought stress in plants: an overview. In: Aroca R, ed. *Plant responses to drought stress*. Berlin, Heidelberg, Germany: Springer 1–33.
- Fedoroff N., Wessler S., Shure M. 1983.** Isolation of the transposable maize controlling elements Ac and Ds. *Cell* 35:235-242.
- Feldmann K.A. 1991.** T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: mutational spectrum. *The Plant Journal* 1(1):71-82.
- Flachowsky H., Szankowski I., Sascha Waidmann S., Peil A., Tränkner C., Hanke M. 2012.** The *MdTFL1* gene of apple (*Malus × domestica* Borkh.) reduces vegetative growth and generation time. *Tree Physiology* 32:1288–1301.
- Foolad M.R. 2007.** Genome Mapping and Molecular Breeding of tomato. *International Journal of plant Genomics* 2007:64358.
- Franzmann L.H., Yoon E.S., Meinke D.W. 1995.** Saturating the map of *Arabidopsis thaliana* with embryonic mutations. *The Plant Journal*. 7(2):341-350.
- Frary A., Göl D., Keleş D., Ökmen B., Pinar H., Ö Şığva H., Yemenicioğlu A., Doğanlar S. 2010.** Salt tolerance in *Solanum pennellii*: antioxidant response and related QTL. *BMC Plant Biology* 10:58.
- Frary A., Nesbitt C., Grandillo S., Knaap E., Cong B., Liu J., Meller J., Elber R., Alpert K.B., Tanksley S.D. 2000.** *fw2.2*: A quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science* 289: 85–88
- 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.

- Gady A.L., Hermans F.W., Van de Wal M.H., van Loo E.N., Visser R.G., Bachem C.W. 2009.** Implementation of two high through-put techniques in a novel application: detecting point mutations in large EMS mutated plant populations *Plant Methods* 5:13.
- Garg A.K., Kim J.K., Owens T.G., Ranwala A.P., Choi Y.D., Kochian L.V., Wu R.J. 2002.** Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 99:15898-15903.
- Geisler M., Jablonska B., Springer P.S. 2002.** Enhancer trap expression patterns provide a novel teaching resource. *Plant Physiology* 130:1747–1753.
- Gelvin S.B. 2000.** Agrobacterium and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Plant Molecular Biology* 51:223-256.
- Gelvin S.B. 2003.** Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67:16-37.
- Gerszberg A., Hnatuszko-Konka K., Kowalczyk T. 2015.** Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the service of biotechnology. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 120:881–902.
- Gidoni D., Fuss E., Burbidge A., Speckmann G., James S., Nijkamp D., Mett A., Feiler J., Smoker M., de Vroomen M. 2003.** Multi-functional T-DNA/Ds tomato lines designed for gene cloning and molecular and physical dissection of the tomato genome. *Plant Molecular Biology* 51:83-98.
- Giovannoni J.J. 2004.** Genetic Regulation of Fruit Development and Ripening. *Plant Cell* 16: S170–S180.
- Gisbert C., Arrillaga I., Roig L.A., Moreno V. 1999.** Acquisition of a collection of *Lycopersicon pennellii* (Corr. D’Arcy) transgenic plants with uidA and nptII marker genes. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 74(1):105–109.
- Goodrich J., Puansomlee P., Martin M., Long D., Coupland G. 1997.** A polycomb-group gene regulates homeotic gene expression in *Arabidopsis*. *Nature* 386:44-51.

- Greenberg J.T. y Ausubel F.M. 1993.** *Arabidopsis* mutants compromised for the control of cellular damage during pathogenesis and aging. *The Plant Journal* 4(2):327-341.
- Greenberg J.T., Guo A., Klessig D.F., Ausubel F.M. 1994.** Programmed cell death in plants: a pathogen-triggered response activated co-ordinately with multiple defense functions. *Cell* 77(4):551-563.
- Greenblatt I.M. 1984.** A chromosome replication pattern deduced from pericarp phenotypes resulting from movements of the transposable element, Modulator, in maize. *Genetics* 108:471-485.
- Greenway H. y Munns R. 1980.** Mechanisms of Salt Tolerance in Nonhalophytes. *Annual Review of Plant Physiology* 31:149-190.
- Groß F., Durner J., Gaupels F. 2013.** Nitric oxide, antioxidants and prooxidants in plant defence responses. *Frontiers in Plant Science* 4:419.
- Gunawardena A.H. 2008.** Programmed cell death and tissue remodelling in plants. *Journal of Experimental Botany* 59(3):445-451.
- Gupta B. y Huang B. 2014.** Mechanism of Salinity Tolerance in Plants: Physiological, Biochemical, and Molecular Characterization. *International Journal of Genomics* 2014: ID701596.
- Hadiarto T. y Tran L.S.P. 2011.** Progress studies of drought-responsive genes in rice. *Plant Cell Reports* 30:297-310.
- Hao J.J., Yin Y.H., Fei S.Z. 2013.** Brassinosteroid signaling network: implications on yield and stress tolerance. *Plant Cell Reports* 32:1017–1030.
- Harb A., Krishnan A., Ambavaram M.R., Pereira A. 2010.** Molecular and Physiological Analysis of Drought Stress in *Arabidopsis* reveals early responses leading to acclimation in plant growth. *Plant Physiology* 154:1254-1271.
- Harrison E.J., Bush M., Plett J.M., McPhee D.P., Vitez R., O'Malley B., Sharma V., Bosnich W., Seguin A., MacKay J. 2007.** Diverse developmental mutants revealed in an activation-tagged population of poplar. *Botany* 85:1071-1081.
- Hasegawa P.M. 2013.** Sodium (Na⁺) homeostasis and salt tolerance of plants. *Environmental and Experimental Botany* 92:19-31.

- Hayashi H., Czaja I., Lubenow H., Schell J., Walden R. 1992.** Activation of a plant gene by T-DNA tagging: auxin-independent growth *in vitro*. *Science* 258 (5086):1350–1353.
- He Y., Tang W., Swain J.D., Green A.L., Jack T.P., Gan S. 2001.** Networking Senescence-Regulating Pathways by Using *Arabidopsis* Enhancer Trap Lines. *Plant Physiology* 126(2):707–716.
- Hehl R. y Baker B. 1990.** Properties of the maize transposable element activator in transgenic tobacco plants: a versatile inter-species genetic tool. *The Plant Cell* 2:709–721.
- Helariutta Y., Fukaki H., Wysocka-Diller J., Nakajima K., Jung J., Sena G., Hauser M.T., Benfey P.N. 2000.** The *SHORT-ROOT* gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling. *Cell* 101:555-567.
- Herman L., Jacobs A., Montagu M. V. Depicker A. 1990.** Plant chromosome/marker gene fusion assay for study of normal and truncated T-DNA integrations event. *Molecular and General Genetics* 224 (2):248-256.
- Hirayama T. y Shinozaki K. 2010.** Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. *The Plant Journal* 61(6):1041-1052.
- Hoisington D.A., Neuffer M.G., Walbot V. 1982.** Disease lesion mimics in maize: I. Effect of genetic background, temperature, developmental age, and wounding on necrotic spot formation with *Les1*. *Developmental Biology* 93(2):381-388.
- Holmström K.O., Mäntylä E., Welin B., Mandal A., Palva E.T., Tunnela O.E., Londesborough J. 1996.** Drought tolerance in tobacco. *Nature* 6567:683-684.
- Hooker J.D. 1851.** An enumeration of the plants of the Galapagos Archipelago with descriptions of those which are new. *Transactions of the Linnean Society of London* 20(2):163–233.
- Hsing Y.I., Chem C.G., Fan M.J., Lu P.C., Chen K.T., Lo S.F., Sun P.K. 2007.** A rice gene activation/knockout mutant resource for high throughput functional genomics. *Plant Mol. Biol.* 63:351–364.
- Huang S., Cerny R.E., Bhat D.S., Brown S.M. 2001.** Cloning of an *Arabidopsis* patatin-like gene, *STURDY*, by activation T-DNA tagging. *Plant Physiology* 125:573-584.

- Huertas R., Olías 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.
- Hui Z., Tian F.X., Wang G.K., Wang G.P., Wang W. 2012.** The antioxidative defense system is involved in the delayed senescence in a wheat mutant *tasg1*. *Plant Cell Reports* 31:1073-1084.
- Hung C.Y., Sun Y.H., Chen J., Darlington D.E., Williams A.L., Burker K.O., Xie J. 2010.** Identification of a Mg-protoporphyrin IX monomethyl ester cyclase homologue, EaZIP, differentially expressed in variegated *Epipremnum aureum* 'Golden Pothos' is achieved through a unique method of comparative study using tissue regenerated plants. *Journal of Experimental Botany* 61(5):1483-1493.
- Ito T. y Meyerowitz E.M. 2000.** Overexpression of a gene encoding a cytochrome P450, CYP78A9, induces large and seedless fruit in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 12:1541-1550.
- Itoh J.I., Kitano H., Matsuoka M., Nagato Y. 2000.** *SHOOT ORGANIZATION* Genes regulate shoot apical meristem organization and the pattern of leaf primordium initiation in rice. *The Plant Cell* 12:2161-2174.
- Iyer-Pascuzzi A.S., Jackson T., Cui H.C., Petricka J.J., Busch W., Tsukagoshi H., Benfey P.N. 2011.** Cell Identity Regulators Link Development and Stress Responses in the *Arabidopsis* Root. *Developmental Cell* 21(4):770-782.
- Jeon J.S., Lee S., Jung K.H., Jun S.H., Jeong D.H., Lee J., Kim C. 2000.** T-DNA insertional mutagenesis for functional genomics in rice. *The Plant Journal* 22:561–570.
- Jeong D.H., An S., Kang H.G., Moon S., Han J.J., Park S., Lee H.S. 2002.** T-DNA insertional mutagenesis for activation tagging in rice. *Plant Physiology* 130:1636-1644.
- Jiang Y., Liang G., Yu D. 2012.** Activated Expression of WRKY57 Confers Drought Tolerance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* 5(6):1375-1388.

- Johnson A.A.T., Hibberd J.M., Gay C., Essah P.A., Haseloff J., Tester M., Guiderdoni E. 2005.** Spatial control of transgene expression in rice (*Oryza sativa* L.) using the GAL4 enhancer trapping system. *The Plant Journal* 41:779–789.
- Jones D.A., Thomas C.M., Hammond-Kosack K.E., Balint-Kurti P.J., Jones J. 1994.** Isolation of the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science* 266:789-793.
- Jones J., Carland F., Lim E., Ralston E., Dooner H.K. 1990.** Preferential transposition of the maize element Activator to linked chromosomal locations in tobacco. *The Plant Cell* 2:701-707.
- Josse E.M., Simkin A.J., Gaffe J., Laboure A.M., Kuntz M., Carol P. 2000.** A plastid terminal oxidase associated with carotenoid desaturation during chromoplast differentiation. *Plant Physiology* 123:1427-1436.
- Jung J.K.H. y McCouch S. 2013.** Getting to the roots of it: Genetic and hormonal control of root architecture. *Frontiers in Plant Science* 4:186.
- Kakimoto T. 1996.** CK11, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. *Science* 274:982-985.
- Kakutani K., Matsuda Y., Nonomura T., Toyoda H., Takikawa Y. 2016** *Agrobacterium*-mediated T-DNA insertion for mutagenesis assessed by the production of hairy roots emitting melon fruit odours. *Acta Horticulturae* 1145:17-22.
- Kalamaki M.S., Alexandrou D., Lazari D., Merkouropoulos G., Fotopoulos V., Pateraki I., Aggelis, A., Carrillo-López A., Rubio-Cabetas M.J., Kanellis A.K. 2009.** Over-expression of a tomato N-acetyl-L-glutamate synthase gene (*SINAGS1*) in *Arabidopsis thaliana* results in high ornithine levels and increased tolerance in salt and drought stresses. *Journal of Experimental Botany* 60(6):1859–1871.
- Kalidhasan N., Joshi D., Bhatt T.K., Gupta A.K. 2015.** Identification of key genes involved in root development of tomato using expressed sequence tag analysis. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 21(4):491–503.

- Kang D., Seo Y., Lee J.D., Ishii R., Kim K.U., Shin D.H., Park S.K., Lee I. 2005.** Jasmonic Acid differentially affects growth, ion uptake and abscisic acid concentration in salt-tolerant and salt-sensitive rice cultivars. *J Agron Crop Sci* 191:273–282.
- Kardailaky I., Shukla V.K., Ahn J. H., Dagenais N., Christensen S.K., Nguyen J.T., Chory J., Harrison M.J., Weigel D. 1999.** Activation tagging of the floral inducer *FT*. *Science* 286:1962-1965.
- Kazan K. y Manners J.M. 2012.** JAZ repressors and the orchestration of phytohormone crosstalk. *Trends Plant Sci* 17:22-31.
- Kazazian H.H.Jr. 2004.** Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science* 303: 1626–1632.
- Keddie J.S., Carroll B., Jones J.D.G., Grissem W. 1996.** The *DCL* gene of tomato is required for chloroplast development and palisade cell morphogenesis in leaves. *The EMBO Journal* 15:4208-4217.
- Keddie J.S., Carroll B.J., Thomas C.M., Reyes M.E., Klimyuk V., Holtan H., Grissem W., Jones J.D. 1998.** Transposon tagging of the *Defective embryo and meristems* gene of tomato. *The Plant Cell* 10:877-887.
- Keller J., Lim E., Dooner H. 1993.** Preferential transposition of *Ac* to linked sites in *Arabidopsis*. *Theoretical and Applied Genetics* 86:585-588.
- Kimura S., Koenig D., Kang J., Yoong F.Y., Sinha N. 2008.** Natural variation in leaf morphology results from mutation of a novel *KNOX* gene. *Current Biology* 18(9):672-677.
- Kirik V., Simon M., Huelskamp M., Schiefelbein J. 2004.** The *ENHANCER OF TRY AND CPC1* gene acts redundantly with *TRYPTYCHON* and *CAPRICE* in trichome and root hair cell patterning in *Arabidopsis*. *Developmental Biology* 268:506–513.
- Klimyuk VI, Persello-Cartieaux F, Havaux M, Contard-David P, Schuenemann D, Meierhoff K. Gouet P., Jones J.D.G., Hoffman N.E., Nussaume L. 1999.** A chromodomain protein encoded by the *Arabidopsis* *CAO* gene is a plant-specific component of the chloroplast signal recognition particle pathway that is involved in LHCP targeting. *The Plant Cell* 11:87-99.

- Knapp S., Coupland G., Uhrig H., Starlinger P., Salamini F. 1988.** Transposition of the maize transposable element *Ac* in *Solanum tuberosum*. *Molecular and General Genetics* 213:285-290.
- Kohli A., Leech M., Vain P., Laurie D.A., Christou P. 1998.** Transgene organization in rice engineered through direct DNA transfer supports a two-phase integration mechanism mediated by the establishment of integration hot spots. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(12):7203-7208.
- Kolesnik T., Szeverenyi I., Bachmann D., Kumar C.S., Jiang S., Ramamoorthy R., Cai Minnie., Ma Z.G., Sundaresan V., Ramachandran S. 2004.** Establishing an efficient *Ac/Dc* tagging system in rice: large-scale analysis of *Ds* flanking sequence. *The Plant Journal* 37(2):301-314.
- Koncz C., Martini N., Mayerhofer R., Koncz-Kalman Z., Körber H., Redei G.P., Schell J. 1989.** High-frequency T-DNA-mediated gene tagging in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86:8467–8471.
- Kononov M.E., Bassuner B., Gelvin S.B. 1997.** Integration of T-DNA binary vector “backbone” sequences into the tobacco genome: evidence for multiple complex patterns of integration. *The Plant Journal* 11:945-957.
- Krysan P.J., Young J.C., Sussman M.R. 1999.** T-DNA as an Insertional Mutagen in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 11:2283–2290.
- Kuromori T., Sugimoto E., Shinozaki K. 2011.** *Arabidopsis* mutants of *ATABCG22*, an ABC transporter gene, increase water transpiration and drought susceptibility. *The Plant Journal* 67(5):885-894.
- Lanfermeijer F., Dijkhuis J., Sturre M.G., de Haan P., Hille J. 2003.** Cloning and characterization of the durable tomato mosaic virus resistance gene Tm-22 from *Lycopersicon esculentum*. *Plant Molecular Biology* 52:1039-1051.
- 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. *Plant Medicine* 74 (7):780–786.
- Lee M.K., Kim H.S., Kim J.S., Kim S.H., Park Y.D. 2004.** *Agrobacterium*-mediated transformation system for large-scale production of transgenic chinese cabbage (*Brassica rapa L. ssp. pekinensis*) plants for insertional mutagenesis. *Journal of Plant Biology* 47:300-306.

- Levesque M.P., Vernoux T., Busch W., Cui H., Wang J.Y., Blilou I., Hassan H., Nakajima K., Matsumoto N., Lohmann J.U., Scheres B., Benfey P.N. 2006.** Whole-genome analysis of the SHORT-ROOT developmental pathway in *Arabidopsis*. *PLoS Biology* 4(5):739-752.
- Li A.H., Zhang Y.F., Wu C.Y., Tang W., Wu R., Dai Z.Y., Liu G.Q., Zhang H.X., Pan X.B. 2006.** Screening for and genetic analysis on T-DNA-inserted mutant pool in rice. *Acta Genetica Sinica* 33(4):319-329.
- Li J., Brader G., Palva E.T. 2004.** The WRKY70 transcription factor: A node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate mediated signals in plant defense. *The Plant Cell* 16:319–331.
- Li Y., Rosso M.G., Strizhov N., Viehoveer P., Weisshaar B. 2003.** GABI-Kat SimpleSearch: a flanking sequence tag (FST) database for the identification of T-DNA insertion mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Bioinformatics* 19:1441-1442.
- Lindsey K., Wei W., Clarke M., McArdle H., Rooke L., Topping J. 1993.** Tagging genomic sequences that direct transgene expression by activation of a promoter trap in plants. *Transgenic Research* 2:33-47.
- 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 USA* 99(20), 13302–13306.
- Liu W., Yuan X., Zhang Y. 2014.** Effects of salt stress and exogenous Ca²⁺ on Na⁺ compartmentalization, ion pump activities of tonoplast and plasma membrane in *Nitraria tangutorum* Bobr. leaves. *Acta Physioly Plant* 36:2183-2193.
- Long J.A., Moan E.I., Medford J.I., Barton M.K. 1996.** A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene of *Arabidopsis*. *Nature* 379:66-69.
- Lorrain S., Lin B., Auriac M.C., Kroj T., Saindrenan P., Nicole M., Balagué C., Roby D. 2004.** Vascular associated death1, a novel GRAM domain containing protein, is a regulator of cell death and defense responses in vascular tissues. *The Plant Cell* 16:2217-2232.
- Lorrain S., Vaillau F., Balague C., Roby D. 2003.** Lesion mimic mutants: keys for deciphering cell death and defense pathways in plants? *Trends in Plant Science* 8(6): 263-271.

- Lozano R., Giménez E., Cara B., Capel J., Angosto T. 2009.** Genetic analysis of reproductive development in tomato. *The International Journal of Developmental Biology* 53: 1635-1648.
- Lucas M., Swarup R., Paponov I.A., Swarup K., Casimiro I., Lake D., Peret B., Zappala S., Mairhofer S., Whitworth M., Wang J., Ljung K., Marchant A., Sandberg G., Holdsworth J., Palme K., Pridmore T., Mooney S., Bennett M.J. 2011.** SHORT-ROOT Regulates Primary, Lateral, and Adventitious Root Development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 155(1):384-398.
- Ma W. y Berkowitz G.A. 2007.** The grateful dead: calcium and cell death in plant innate immunity. *Cellular Microbiology* 9(11):2571-2885.
- Mahajan S. y Tuteja N. 2005.** Cold, salinity and drought stresses: An overview. *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. *Biochemistry and Biophysics* 471(2): 146-158.
- Marsch-Martinez N., Greco R., Becker J.D., Dixit S., Bergervoet J.H., Karaba A., de Folter S., Pereira A. 2006.** BOLITA, an *Arabidopsis* AP2/ERFlike transcription factor that affects cell expansion and proliferation/differentiation pathways. *Plant Molecular Biology* 62:825–843.
- Mathews H., Clendennen S.K., Caldwell C.G., Lui X. L., Connors K., Matheis N., Schuster D.K., 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* 15:1689-1703
- Mayer K.F.X., Schoot H., Haecker A., Lenhard M., Jürgens G., Laux T. 1998.** Role of *WUSCHEL* in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell* 95:805-815.
- McConnell J. R. y 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.
- Meissner R., Chagua V., Zhu Q., Emmanuel E., Elkind Y., Levy A. A. 2000.** A high-throughput system for transposon tagging and promoter trapping in tomato. *The Plant Journal* 22:265-274.

- Meissner R., Jacobson Y., Melmed S., Levyatuv S., Shalev G., Ashri A., Elkind Y., Levy A. 1997.** A new model system for tomato genetics. *The Plant Journal* 12:1465-1472.
- Meng L.S. y Yao S.Q. 2015.** Transcription co-activator Arabidopsis ANGUSTIFOLIA3 (AN3) regulates water-use efficiency and drought tolerance by modulating stomatal density and improving root architecture by the transrepression of YODA (YDA). *Plant Biotechnology Journal* 13:893–902.
- Miller J.C. y Tanksley S.D. 1990.** RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. *Theoretical and Applied Genetics* 80:437-448.
- Minoia S., Petrozza A., D'Onofrio O., Piron F., Mosca G., Sozio G., Cellini F., Bendahmane A., Carriero F. 2010.** A new mutant genetic resource for tomato crop improvement by TILLING technology. *BMC Research Notes* 3:69.
- Miyao A., Tanaka K., Murata K., Sawaki H., Takeda S., Abe K., Shinozuka Y., Onosato K., Hirochika H. 2003.** Target site specificity of the *Tos17* retrotransposon shows a preference for insertion within genes against insertion in retrotransposon-rich regions of the genome. *The Plant Cell* 15:1771-1780.
- Moeder W. y Yoshioka K. 2008.** Lesion mimic mutants: a classical, yet still fundamental approach to study programmed cell death. *Plant Signal & Behavior* 3:764-767.
- Moftah A.E. y Michel B.E. 1987.** The effect of sodium chloride on solute potential and proline accumulation in soybean leaves. *Plant Physiology* 83(2):238-240.
- Mohammadzadeh R., Zamani M., Motallebi M., Norouzi P., Jourabchi E., Benedetti M., De Lorenzo G. 2012.** Agrobacterium tumefaciens-mediated introduction of polygalacturonase inhibiting protein 2 gene (*PvPGIP2*) from *Phaseolus vulgaris* into sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Australian Journal of Crop Science* 6(8):1290-1297.
- Molinero-Rosales N., Jamilena M., Zurita S., Gómez P., Capel J., Lozano R. 1999.** FALSIFLORA, the tomato orthologue of FLORICAULA and LEAFY, controls flowering time and floral meristem identity. *The Plant Journal* 20:685-693.

- Molinero-Rosales N., Latorre A., Jamilena M., Lozano R. 2004.** SINGLE FLOWER TRUSS regulates the transition and maintenance of flowering in tomato. *Planta* 218:427-434.
- Moons A., Prinsen E., Bauw G., Van Montagu M. 1997.** Antagonistic effects of abscisic acid and jasmonates on salt stress-inducible transcripts in rice roots. *The Plant Cell* 9:2243–2259.
- Mosher S., Moeder W., Nishimura N., Jikumaru Y., Joo S.H., Urquhart W., Klessig D.F., Kim S.K., Nambara E., Yoshioka K. 2010.** The lesion mimic mutant *cpr22* shows alteration in abscisic acid signaling and abscisic acid insensitivity in a salicylic acid dependent manner. *Plant Physiology* 152:1901-1913.
- Motohashi R., Ito T., Kobayashi M., Taji T., Nagata N., Asami T., Yoshida S., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. 2003.** Functional analysis of the 37kDa inner envelope membrane polypeptide in chloroplast biogenesis using a *Ds*-tagged *Arabidopsis* pale-green mutant. *The Plant Journal* 34(5):719-731.
- Mou Y., Liu Y., Wang G., Zheng J. 2014.** Genetic Analysis and Gene Mapping of a Maize Drought Sensitive Mutant. *Journal of Plant Genetic Resources* 15(3):615-619.
- 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(6):700-714.
- Moussian B., Schoof H., Haecker A., Jürgens G., Laux T. 1998.** Role of the *ZWILLE* gene in the regulation of central shoot meristem cell fate during *Arabidopsis* embryogenesis. *The EMBO Journal* 17(6):1799-1809.
- Moyle L.C. 2008.** Ecological and evolutionary genomics in the wild tomatoes (*Solanum sect. Lycopersicon*). *The Society for the Study of Evolution* 62(12):2995–3013.
- Murashige T. y Skoog F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Naested H., Holm A., Jenkins T., Nielsen H.B., Harris C.A., Beale M.H., Andersen M., Mant A., Scheller H., Camara B., Mattsson O. Mundy J. 2004.** *Arabidopsis* *VARIEGATED 3* encodes a chloroplast targeted, zinc-finger Protein required for chloroplast and palisade cell development. *Journal of Cell Science* 117(20):4807-4818.

- Nagel A.K., Schnabel G., Petri C., Scorza R. 2008.** Generation and Characterization of Transgenic Plum Lines Expressing the *Gastrodia* Antifungal Protein. *Hortscience* 43(5):1514–1521.
- Nakazato T. y Housworth E.A. 2011.** Spatial genetics of wild tomato species reveals roles of the Andean geography on demographic history. *American Journal of Botany* 98(1): 88–98.
- Ning J., Li X., Hicks L.M., Xiong L. 2010.** A Raf-like MAPKKK gene DSM1 mediates drought resistance through reactive oxygen species scavenging in rice. *The Plant Physiology* 152:876-890.
- Nishiyama R., Watanabe Y., Fujita Y., Le D.T., Kojima M., Werner T., Vankova R., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., Kakimoto T. 2011.** Analysis of cytokinin mutants and regulation of cytokinin metabolic genes reveals important regulatory roles of cytokinins in drought, salt and abscisic acid responses, and abscisic acid biosynthesis. *The Plant Cell* 23:2169–2183.
- O’Kane C.J. y Gehring W.J. 1987.** Detection in situ of genomic regulatory elements in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84(24):9123–9127.
- Ogawa D., Abe K., Miyao A., Kojima M., Sakakibara H., Mizutani M., Morita H., Toda Y., Hobo T., Sato Y., Hattori T., Hirochika H., Takeda S. 2011.** RSS1 regulates the cell cycle and maintains meristematic activity under stress conditions in rice. *Nature Communications* 2:278.
- Olias 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 & Environment* 32:904-916.
- Osakabe Y., Osakabe K., Shinozaki K. 2014.** Response of plants to water stress. *Frontiers in Plant Science* 5:86.
- Osborne B.I., Corr C.A., Prince J.P., Hehl R., Tanksley S.D., McCormick S., Baker B. 1991.** Ac transposition from a T-DNA can generate linked and unlinked clusters of insertions in the tomato genome. *Genetics* 129:833-844.

- Pan Y., Seymour G.B., Lu Ch., Hu Z., Chen X., Chen G. 2011.** An ethylene response factor (ERF5) promoting adaptation to drought and salt tolerance in tomato. *Plant Cell Reports* 31:349–360.
- Paran I. y Van der Knaap E. 2007.** Genetic and molecular regulation of fruit and plant domestication traits in tomato and pepper. *Journal of Experimental Botany* 58(14):3841-3852.
- Pardo J.M. 2010.** Biotechnology of water and salinity stress tolerance. *Current Opinion Biotechnology* 21(2):185-196.
- Park S., Li J., Pittman J.K., Berkowitz G.A., Yang H., Undurraga S., Morris J., Hirschi K.D., Gaxiola R.A. 2005.** Up-regulation of a H⁺-pyrophosphatase (H⁺-PPase) as a strategy to engineer drought-resistant crop plants. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 102:18830-18835.
- Park S.Y., Yu J.W., Park J.S., Li J., Yoo S.C., Lee N.Y., Lee S.K., Jeong S.W., Seo H.S., Koh H.J., Jeon J.S., Park Y., Paek N.C. 2007.** The Senescence-Induced Staygreen Protein Regulates Chlorophyll Degradation. *The Plant Cell* 19(5):1649-1664.
- Patade V.Y. y Suprasanna P. 2008.** Radiation induced *in vitro* mutagenesis for sugarcane improvement. *Sugar Tech* 10(1):14-19.
- Peleg Z. y Blumwald E. 2011.** Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Current Opinion in Plant Biology* 14:290-295.
- Peng H., Huang H.M., Yang Y.Z., Zhai Y., Wu J.X., Huang D.F. y Lu, T.G. 2005.** Functional analysis of GUS expression patterns and T-DNA integration characteristics in rice enhancer trap lines. *Plant Science* 168:1571–1579.
- Peralta I.E. y Spooner D.M. 2007.** History, origin and early cultivation of tomato (Solanaceae). In: Rozdan MK, Matto AK (eds) Genetic improvement of Solanaceous crops: tomato, Vol 2. *Science Publishers*, Enfield, NH 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). In: Systematic Botany Monographs, Vol 84. *The American Society of Plant Taxonomists*.

- Pérez-Martín F., Yuste-Lisbona F.J., Pineda B., Angarita-Díaz M.P., García-Sogo B., Antón T., Sánchez S., Giménez E., Atarés A., Fernández-Lozano A., Ortíz-Atienza A., García-Alcázar M., Castañeda L., Fonseca R., Capel C., Goergen G., Sánchez J., Quispe J.L., Capel J., Angosto T., Moreno V., Lozano R. 2017.** A collection of enhancer trap insertional mutants for functional genomics in tomato. *Plant Biotechnol J.* 15(11):1439-1452.
- Pernas M., Ryan E., Dolan L. 2010.** SCHIZORIZA Controls Tissue System Complexity in Plants. *Current Biology* 20:818-823.
- Pnueli L., Carmel-Goren L., Hareven D., Gutfinger T., Alvarez J., Ganai M., Zamir D., Lifschitz E. 1998.** The SELF-PRUNING gene of tomato regulates vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the ortholog of CEN and TFL1. *Development* 125:1979-1989.
- Porcel R., Aroca R., Azcón R., Ruiz J.M. 2006.** PIP Aquaporin Gene Expression in Arbuscular Mycorrhizal *Glycine max* and *Lactuca sativa* Plants in Relation to Drought Stress Tolerance. *Plant Molecular Biology* 60(3):384-404.
- Posé D., Castanedo I., Borsani O., Nieto B., Rosado A., Taconnat L., Ferrer A., Dolan L., Valpuesta V., Botella M.A. 2009.** Identification of the *Arabidopsis dry2/sqe1-5* mutant reveals a central role for sterols in drought tolerance and regulation of reactive oxygen species. *The Plant Journal* 59:63-76.
- Radhamony R.S., Prasad A.M., Srinivasan R. 2005.** T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis*. A tool for functional genomics. *Electronic Journal of Biotechnology* 8(1):83-106.
- Rao K.P., Richa T., Kumar K., Raghuram B., Sinha A.K. 2010.** *In silico* analysis reveals 75 members of mitogen-activated protein kinase kinase gene family in rice. *DNA Res* 17:139–153
- Rao S.S.R., Vardhini B.V., Sujatha E., Anuradha S. 2002.** Brassinosteroids - A new class of phytohormones. *Curr Sci India* 82:1239–1245
- Rengasamy P. 2010.** Soil processes affecting crop production in salt-affected soils. *Functional Plant Biology* 37 255–263.
- Rogg L.E., Lasswell J., Bartel B. 2001.** A gain-of-function mutation in *IAA28* suppresses lateral root development. *The Plant Cell* 13:465-480.

- Rommens C.M., Rudenko G.N., Dijkwel P.P., van Haaren M.J., Ouwerkerk P.B., Blok K.M., Nijkamp H.J.J., Hille J. 1992.** Characterization of the Ac/Ds behaviour in transgenic tomato plants using plasmid rescue. *Plant Molecular Biology* 20:61-70.
- Ron M., Dorrity M.W., De Lucas M., Toal T., Hernandez R.I., Little S.A., Maloof J.N., Kliebenstein D.J., Brady S.M. 2013.** Identification of Novel Loci Regulating Interspecific Variation in Root Morphology and Cellular Development in Tomato. *Plant Physiology* 162:755–768.
- Ruiz-Rojas J.J., Sargent D.J., Shulaev V., Dickerman A.W., Pattison J., Holt S.H., Ciordia A., Richard E.V. 2010.** SNP discovery and genetic mapping of T-DNA insertional mutants in *Fragaria vesca* L. *Theoretical and Applied Genetics* 121:449-463.
- Ryu H. y Cho Y.G. 2015.** Plant Hormones in Salt Stress Tolerance. *Journal of Plant Biology* 58: 147.
- Sade N., Vinocur B.J., Diber A., Shatil A., Ronen G., Nissan H., Wallach R., Karchi H., Moshelion M. 2009.** Improving plant stress tolerance and yield production: is the tonoplast aquaporin SITIP2;2 a key to isohydric to anisohydric conversion? *New Phytologist* 181:651–661.
- Saito T., Ariizumi T., Okabe Y., Asamizu E., Hiwasa-Tanase K., Fukuda N., Mizoguchi T., Yamazaki Y., Aoki K., Ezura H.. 2011.** TOMATOMA: A Novel Tomato Mutant Database Distributing Micro-Tom Mutant Collections. *Plant and Cell Physiology* 52(2):283–296.
- Sakamoto W., Tamura T., Hanba-Tomita Y., Murata M. 2002.** The VAR1 locus of *Arabidopsis* encodes a chloroplastic FtsH and is responsible for leaf variegation in the mutant alleles. *Genes to Cells* 7:769-780.
- Sakuma Y., Maruyama K., Osakabe Y., Qin F., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. 2006.** Functional analysis of an *Arabidopsis* transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. *The Plant Cell* 18(5):1292-1309.

- Sallaud C., Gay C., Larmande P., Bès M., Piffanelli P., Piéqu B., Droc G., Regad F., Bourgeois E., Meynard D., Périn C., Sabau X., Ghesquière A., Glaszmann J.C., Delseny M., Guiderdoni E. 2004.** High throughput T-DNA insertion mutagenesis in rice: a first step towards in silico reverse genetics. *The Plant Journal* 39:450–464.
- Sallaud C., Meynard D., Van Boxtel J., Gay C., Bes M., Brizard J., Larmande P., Ortega D., Raynal M., Portefaix M. 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-López J. 2017.** Generación de líneas T-DNA de tomate (*Solanum lycopersicum*) para la identificación de mutantes de inserción alterados en la morfogénesis y el desarrollo vegetal. Tesis doctoral: Departamento de Biotecnología, Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas. Universitat Politècnica de València, Valencia.
- Sánchez-Sauceda S. 2016.** Generación de mutantes de inserción de tomate cultivado y Silvestre e identificación de genes implicados en porcesos de desarrollo y tolerancia a estrés abiótico. Tesis doctoral: Departamento de Biotecnología, Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas. Universitat Politècnica de València, Valencia.
- Santisree P., Nongmaithem S., Vasuki H., Sreelakshmi Y., Ivanchenko M.G., Sharma R. 2011.** Tomato root penetration in soil requires a coaction between ethylene and auxin signaling. *Plant Physiology* 156(3):1424-38.
- Santner A. y Estelle M. 2009.** Recent advances and emerging trends in plant hormone signaling. *Nature* 459(7250):1071-1078.
- Sawers R.J.H., Linley P.J., Gutierrez-Marcos J.F., Delli-Bovi T., Farmer P.R., Kohchi T., Terry M.J., Brutnell T.P. 2004.** The *Elm1(ZmHy2)* gene of maize encodes a phytochromobilin synthase. *Plant Physiology* 136(1):2771-2781.
- Schleicher P. 2017.** Mutagénesis insercional en tomate y *Solanum pennellii*: Identificación de mutantes de inserción alterados en el desarrollo y la tolerancia a la salinidad. Tesis doctoral: Departamento de Biotecnología, Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas. Universitat Politècnica de València, Valencia.

- Scholte M., d'Erfurth, Ripa 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.
- Schoof H., Lenhard M., Haecker A., Mayer K.F.X., Jurgens G., Laux T. 2000.** The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* Genes. *Cell* 100:635-644.
- Schupp J. M., Price L.B., Klevytska A., Keim P. 1999.** Internal and flanking sequence from AFLP fragments using ligation-mediated suppression PCR. *Biotechniques* 26:905-908.
- Sessions A., Burke E., Presting G., Aux G., McElver J., Patton D., Dietrich B., Ho P., Bacwaden J., Ko C., Clarke J.D., Cotton D., Bullis D., Snell J., Miguel T., Hutchison D., Kimmerly B., Mitzel T., Katagiri F., Glazebrook J., Law M., Goffsessions S.A. 2002.** A high-throughput *Arabidopsis* reverse genetics system. *The Plant Cell* 14:2985-2994.
- Shahzad M. A., Jan S. U., Afzal F., Khalid M., Gul A., Sharma I., Sofo A. Ahmad P. 2016.** Drought stress and morphophysiological responses in plants. In: *Water Stress and Crop Plants: A Sustainable Approach* (ed P. Ahmad), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
- Shao H.B., Chu L.Y., Jaleel C.A., y Zhao C.X. 2008.** Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *Comptes Rendus Biologies* 331(3):215–225.
- Shen B., Jensen R.G., Bohnert H.J. 1997.** Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts. *Plant Physiology* 113:1177-1183.
- Shi D., Zheng X., Li L., Lin W., Xie W., Yang J., Chen S., Jin W. 2013.** Chlorophyll deficiency in the maize *elongated mesocotyl 2* mutant is caused by a defective heme oxygenase and delaying grana stacking. *PLoS One* 8(11):e80107.
- Shi H., Xiong L., Stevenson B., Lu Tiegang., Zhu J.K. 2002.** The *Arabidopsis salt overly sensitive 4* Mutants Uncover a Critical Role for Vitamin B6 in Plant Salt Tolerance. *The Plant Cell* 14:575-588.

- Shou H., Frame B.R., Whitham S.A., Wang K. 2004.** Assessment of transgenic maize events produced by particle bombardment or *Agrobacterium*-mediated transformation. *Molecular Breeding* 13(2):201–208.
- Singer T. y Burke E. 2003.** High-Throughput TAIL-PCR as a Tool to Identify DNA Flanking Insertions. In: Grotewold E. (eds) Plant Functional Genomics. *Methods in Molecular Biology™* vol 236. Humana Press
- Slavik B. 1974.** Methods of Studying Plant Water Relations. *Chapman and Hall*, London, p 449.
- Sorin C., Bussell J. D., Camus I., Ljung K., Kowalczyk M., Geiss G., McKhann H., Garcion C., Vaucheret H., Sandberg G., Bellini C. 2005.** Auxin and light control of adventitious rooting in *Arabidopsis* require ARGONAUTE1. *The Plant Cell* 17:1343-1359.
- Souer E., Houwelingen A., Kloos D., Mol J., Koes R. 1996.** The *No Apical Meristem* gene of petunia is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordia boundaries. *Cell* 85:159-70.
- Sozzani R., Cui H., Moreno-Risueno M.A., Busch W., Van Norman J.M., Vernoux T., Brady S.M., Dewitte W., Murray J.A.H., Benfey P.N. 2010.** Spatiotemporal regulation of cell-cycle genes by SHORTROOT links patterning and growth. *Nature* 466(7302):128-132
- Spooner D.M., Peralta I.E., Knapp S. 2005.** Comparison of AFLPs with other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes [*Solanum L.* section *Lycopersicon* (Mill.) Wettst]. *Taxon* 54:43-61.
- Springer P.S. 2000.** Gene traps: tools for plant development and genomics. *The Plant Cell* 12:1007–1020.
- Storey R., Ahmad N., Wyn Jones R.G. 1977.** Taxonomic and Ecological Aspects of the Distribution of Glycinebetaine and Related Compounds in Plants. *Oecologia* 27:319-332.
- Sun L., Wang Y., Liu L.L., Wang C., Gan T., Zhang Z., Wang Y., Wang D., Niu M., Long W., Li X., Zheng M., Jiang L., Wan J. 2017.** Isolation and characterization of a *spotted leaf 32* mutant with early leaf senescence and enhanced defense response in rice. *Nature Scientific Reports* 7:41846.

- Sundaresan V., Springer P., Volpe T., Haward S., Jones J.D.G., Dean C., Ma H., Martienssen R. 1995.** Patterns of gene action in plant development revealed by enhancer trap and gene trap transposable elements. *Genes and Development* 9(14):1797-1810.
- Suzuki Y., Uemura S., Saito Y., Murofushi N., Schmitz G., Theres K., Yamaguchi I. 2001.** A novel transposon tagging element for obtaining gain of function mutants based on a self-stabilizing *Ac* derivative. *Plant Molecular Biology* 45 (2):123–131.
- Szabados L., Kovacs I., Oberschall A., Abrahám E., Kerekes I., Zsigmond L., Nagy R., Alvarado M., Krasovskaja I., Gál M., Berenete A., Rédei G.P., Haim A.B., Koncz C. 2002.** Distribution of 1000 sequenced T-DNA tags in the *Arabidopsis* genome. *The Plant Journal* 32:232–242.
- Takahashi A., Kawasaki T., Henmi K., Shil K., Kodama O., Satoh H., Shimamoto K. 1999.** Lesion mimic mutants of rice with alterations in early signaling events of defense. *The Plant Journal* 17(5):535-545.
- Takechi K, Sodmergen, Murata M, Motoyoshi F, Sakamoto W. 2000.** The YELLOW VARIEGATED (VAR2) locus encodes a homologue of FtsH, an ATP-dependent protease in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* 41:1334-1346.
- Takken F.L., Schipper D., Nijkamp H.J.J., Hille J. 1998.** Identification and Ds-tagged isolation of a new gene at the Cf-4 locus of tomato involved in disease resistance to *Cladosporium fulvum* race 5. *The Plant Journal* 14:401-411.
- Tian Q., Nagpal P., Reed J.W. 2003.** Regulation of *Arabidopsis* SHY2/IAA3 protein turnover. *The Plant Journal* 36:643-651.
- Tian X.Q., Ling Y.H., Fang L.K., Du P., Sang X.C., Zhao F.M., Li Y.F., Xie R., He G.H. 2013.** Gene cloning and functional analysis of *yellow green leaf3 (ygl3)* gene during the whole-plant growth stage in rice. *Genes Genom* 35:87-93.
- Topping JF, Agyeman F, Henricot B, Lindsey K. 1994.** Identification of molecular markers of embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* by promoter trapping. *The Plant Journal* 5:895–903.

- Trieu A.T., Burleigh S.H., Kardailsky I.V., Maldonado-Mendoza I.E., Versaw W.K., Blaylock L.A., Shin H., Chiou T.J., Katagi H., Dewbre G.R., Weigel D., Harrison M.J. 2000.** Transformation of *Medicago truncatula* via infiltration of seedlings of flowering plants with *Agrobacterium*. *The Plant Journal* 22(6):531-541.
- Türkan I. y Demiral T. 2009.** Recent developments in understanding salinity tolerance. *Environmental and Experimental Botany* 67:2-9.
- Uzelac B., Janosević D., Budimir S. 2008.** In situ detection of programmed cell death in *Nicotiana tabacum* leaves during senescence. *Journal of Microscopy* 230:1-3.
- 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 inertional mutagenesis. *Plant Biotechnology Journal* 6(3):236-245.
- Van den Ende W. 2014.** Sugars take a central position in plant growth, development and, stress responses. A focus on apical dominance. *Frontiers in Plant Science* doi: 103389/pls2014.00313.
- Van der Biezen E.A., Brandwagt B.F., van Leeuwen W., Nijkamp H.J.J., Hille J. 1996.** Identification and isolation of the FEEBLY gene from tomato by transposon tagging. *Molecular and General Genetics* 251:267-280.
- Van der Fits L., Hilliou F., Memelink J. 2001.** T-DNA activation tagging as a tool to isolate regulators of a metabolic pathway from a genetically non-tractable plant species. *Transgenic Research* 10:513-521.
- Van der Graaff E., Hooykaas P.J., Keller B. 2002.** Activation tagging of the two closely linked genes *LEP* and *VAS* independently affects vascular cell number. *The Plant Journal* 32(5):819–830.
- Van Lijsebettens M., Vanderhaegen R., Van Montagu M. 1991.** Insertional mutagenesis in *Arabidopsis thaliana*: isolation of a T-DNA-linked mutation that alters leaf morphology. *Theoretical and Applied Genetics* 81:277-284.
- Van Sluys M.A., Tempe J., Fedoroff N. 1987.** Studies on the introduction and mobility of the maize Activator element in *Arabidopsis thaliana* and *Daucus carota*. *The EMBO journal* 6:3881.

- Verslues P.E., Agarwal M., Katiyar-Agarwal S., Zhu J., Zhu J.K. 2006.** Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *The Plant Journal* 45:523-539.
- Verstraeten I., Schotte S., Geelen D. 2014.** Hypocotyl adventitious root organogenesis differs from lateral root development. *Frontiers in Plant Science* 5:495.
- Waltz E. 2014.** Beating the heat. *Nature Biotechnology* 32(7):610-613.
- Wan S., Wu J., Zhang Z., Sun X., Lv Y., Gao C., Ning Y. 2009.** Activation tagging, an efficient tool for functional analysis of the rice genome. *Plant Molecular Biology* 69:69.
- Wang H., Wang H., Shao H., Tang X. 2016.** Recent Advances in Utilizing Transcription Factors to Improve Plant Abiotic Stress Tolerance by Transgenic Technology. *Frontiers in Plant Science* 9,7:67.
- Wang L., Pei Z., Tian Y., He C. 2005.** OsLSD1, a Rice zinc finger protein, regulates programmed cell death and callus differentiation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18:375-384.
- Wang R., Yang F., Zhang X.Q., Wu D., Tan C., Westcott S., Broughton S., Li C. Zhang W., Xu Y. 2017.** Characterization of a Thermo-Inducible Chlorophyll-Deficient Mutant in Barley. *Frontiers in Plant Science* 8:1936.
- Wang Y., Duby G., Purnelle B., Boutry M. 2000.** Tobacco VDL gene encodes a plastid DEAD box RNA helicase and is involved in chloroplast differentiation and plant morphogenesis. *The Plant Cell* 12:2129-2142.
- Wang Y., Li K., Li X. 2009.** Auxin redistribution modulates plastic development of root system architecture under salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Physiol* 166:1637–1645.
- Wani S.H., Kumar V., Shiriram V., Kumar S.S. 2016.** Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. *The Crop Journal* 4:162–176.
- 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 japonica*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13(6):606–616.

- Weigel D., Ahn J.H., Blázquez M.A., Borevitz J.O., Christensen S.K., Fankhauser C., Ferrándiz C., Kardailsky I., Malancharuvil E.J., Neff M.M. 2000.** Activation tagging in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 122:1003-1014.
- Wen J., Lease K.A., Walker H.C. 2004.** *DVL*, a novel class of small polypeptides: overexpression alters *Arabidopsis* development. *The Plant Journal* 37(5):668–677.
- Wolter M., Hollricher K., Salamini F., Schulze-Lefert P. 1993.** The *mlo* resistance alleles to powdery mildew infection in barley trigger a developmentally controlled defence mimic phenotype. *Molecular and General Genetics* 239:122-128.
- Woodward A.J. y Bennett I.J. 2005.** The effect of salt stress and abscisic acid on proline production, chlorophyll content and growth of *in vitro* propagated shoots of *Eucalyptus camaldulensis*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 82(2):189-200
- Wu C., Li X., Yuan W., Chen G., Kilian A., Li J., Xu C., Li X., Zhou D.X., Wang S., Zhang Q. 2003.** Development of enhancer trap lines for functional analysis of the rice genome. *The Plant Journal* 35:418-427.
- Wu C.Y., Trieu A., Radhakrishnan P., Kwok S.F., Harris S., Zhang K., Wang J.L., Wan J.M., Zhai H.Q., Takatsuto S. 2008.** Brassinosteroids regulate grain filling in rice. *The Plant Cell* 20:2130–2145.
- Wu Z., Zhang X., He B., Diao L., Sheng S., Wang J., Guo X., Su N., Wang L., Jiang L., Wang C., Zhai H., Wan J. 2007.** A chlorophyll-deficient rice mutant with impaired chlorophyllide esterification in chlorophyll biosynthesis. *Plant Physiology* 145:29-40.
- Xiao H., Jiang N., Schaffner E., Stockinger E.J., van der Knaap E. 2008.** A retrotransposon-mediated gene duplication underlies morphological variation of tomato fruit. *Science* 319: 1527–1530.
- Xing A., Williams M.E., Bourett T.M., Hu W., Hou Z., Meeley R.B., Jaqueth J., Dam T., Li B., 2014.** A pair of homoeolog *ClpP5* genes underlies a *virescent yellow-like* mutant and its modifier in maize. *Plant Journal* 79:192-205.

- Xiong L., Wang R.G., Mao G., Koczan J.M. 2006.** Identification of drought tolerance determinants by genetic analysis of root response to drought stress and abscisic acid. *Plant Physiology* 142:1065–1074.
- Xiong L. y Yang Y. 2003.** Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible mitogen-activated protein kinase. *The Plant Cell* 15:745-759.
- Xu D., Duan X., Wang B., Hong B., Ho T.H.D., Wu R. 1996.** Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, *HVA1*, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiology* 110:249-257.
- Xu P., Cai X.T., Wang Y., Xing L., Chen Q., Xiang C.B. 2014.** HDG11 upregulates cell-wall-loosening protein genes to promote root elongation in *Arabidopsis*. *Journal Experimental Botany* 65:4285–4295.
- Xu C., Liberatore K.L., MacAlister C.A., Huang Z., Chu Y.H., Jiang K., Brooks C., Ogawa-Ohnishi M., Xiong G., Pauly M., Van Eck J., Matsubayashi Y., van der Knaap E., Lippman Z.B. 2015.** A cascade of arabinosyltransferases controls shoot meristem size in tomato. *Nature Genetics* 47(7):784-92.
- Yamaguchi T. y Blumwald E., 2005.** Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities. *Trends in Plant Science* 10(12):615-620.
- Yaronskaya E., Ziemann V., Walter G., Averina N., Borner T., Grimm B. 2003.** Metabolic control of the tetrapyrrole biosynthetic pathway for porphyrin distribution in the barley mutant *albostrians*. *The Plant Journal* 35:512-522.
- Yoder J.I. 1990.** Rapid proliferation of the maize transposable element Activator in transgenic tomato. *The Plant Cell* 2:723-730.
- Yoder J.I., Palys J., Alpert K., Lassner M. 1988.** Ac transposition in transgenic tomato plants. *Molecular and General Genetics* 213:291-296.
- Yoo S.D., Cho Y.H., Tena G., Xiong Y., Sheen J. 2008.** Dual control of nuclear EIN3 by bifurcate MAPK cascades in C2H4 signalling. *Nature* 451:789–781.
- Yu H., Chen X., Hong Y.-Y., Wang Y., Xu P., Ke S.-D., Liu H.-Y., Zhu J.-K., Oliver D.J., Xiang C.-B. 2008.** Activated expression of an *Arabidopsis* HD-START protein confers drought tolerance with improved root system and reduced stomatal density. *The Plant Cell* 20:1134–1151.

- Yu L., Chen X., Wang Z., Wang S., Wang Y., Zhu Q., Li S., Xiang C. 2013.** *Arabidopsis Enhanced Drought Tolerance1/HOMEODOMAIN GLABROUS11* Confers Drought Tolerance in Transgenic Rice without Yield Penalty. *Plant Physiology* 162(3):1378–1391.
- Zhang Z., Li F., Li D. Zhang H., Huang R. 2010.** Expression of ethylene response factor *JERF1* in rice improves tolerance to drought. *Planta* 232:765–774.
- Zhang F.T., Luo X.D., Hu B.L., Wan Y., Xie J.K. 2013.** *YGL138(t)*, encoding a putative signal recognition particle 54 kDa protein, is involved in chloroplast development of rice. *The Rice Journal* 6:7.
- Zhang J., Jia W., Yang J., Ismail A.M., 2006.** Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. *Field Crops Research*. 97:111–119.
- 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, Chan Z., Gao J., Xing L., Cao M., Yu Ch., Hu Y., You J. Shi H., Zhu Y., Gong Y. Mu Z., Wang H., Deng X., Wang P., Bressan R.A., Zhu J.K. 2015.** ABA receptor PYL9 promotes drought resistance and leaf senescence. *PNAS* 113(7):1949-1954.
- Zhao Y., Christensen S.K., Fankhauser C., Cashman J.R., Cohen J.D., Weigel D., Chory J. 2001.** A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. *Science* 291:306-309.
- Zhao Y., Gao J., Kim J.I., Chen K., Bressan R.A., Zhu J.K. 2017.** Control of Plant Water Use by ABA Induction of Senescence and Dormancy: An Overlooked Lesson from Evolution. *Plant and Cell Physiology* 58(8):1319-1327.
- Zhao Y., Liu Q., Davis R.E. 2004.** Transgene expression in strawberries driven by a heterologous phloem-specific promoter. *Plant Cell Rep* 23:224–230.
- Zhu J.K. 2002.** Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology* 53:247-273.
- Zhu J.K., Liu J., Xion L. 1998.** Genetic Analysis of Salt Tolerance in *Arabidopsis*: Evidence for a Critical Role of Potassium Nutrition. *The Plant Cell* 10(7):1181-1191.

- Zhu X., Guo S., Wang Z., Du Q., Xing Y., Zhang T., Shen W., Sang X., Ling Y., He G. 2016.** Map-based cloning and functional analysis of *YGL8*, which controls leaf colour in rice (*Oryza sativa*). *BMC Plant Biology* 16:134.
- Zlatev Z. y Lidon F.C. 2012.** An overview on drought induced changes in plant growth, water relations and photosynthesis. *Emir. J. Food Agric* 24(1):57-72.
- Zubko E., Adams C.J., Machaekova I., Malbeck J., Scollan C., Meyer P. 2002.** Activation identifies a gene from *Petunia hybrida* responsible for the production of active cytokinins in plants. *The Plant Journal* 29:797-808.
- Zupan J, Muth T.R., Draper O., Zambryski P. 2000.** The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *The Plant Journal* 23:11-28.
- Zuppin A., Gerotto C., Baldan B. 2010.** Programmed cell death and adaptation: two different types of abiotic stress response in a unicellular chlorophyte. *Plant Cell Physiology* 51:884-895.

