



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Universitat Politècnica de València

Escuela Técnica Superior de Ingeniería

Agronómica y del Medio Natural

(ETSIAMN)

Identificación y caracterización de mutantes de tomate con alteraciones en el desarrollo vegetativo

Trabajo Final de Grado – Grado en Biotecnología

Carles Quesada Traver



Tutores:

Alejandro Atarés Huerta
Vicente Moreno Ferrero

Directora experimental:
Marybel Jáquez Gutiérrez

Curso 2017-2018

València, Julio de 2018



Título: Identificación y caracterización de mutantes de tomate con alteraciones en el desarrollo vegetativo

Resumen: Estudiar la función de los genes que participan en procesos clave del desarrollo vegetal y su interacción con el medio aporta información muy importante, tanto básica como aplicada. Una aproximación para ello es la generación de mutantes para estos caracteres y su posterior caracterización. Si para ello se utiliza T-DNA como agente mutágeno, además de producir un mutante, el gen afectado queda etiquetado por el inserto de secuencia conocida, por lo que su clonación es más sencilla y rápida.

En este trabajo se han analizado un total de 40 líneas T-DNA de *Solanum lycopersicum* variedad *Money Maker*, transformadas con una trampa de intensificadores. Para ello se han empleado tanto técnicas de cultivo *in vitro* como técnicas de cultivo convencional en el invernadero. El objetivo final era detectar nuevos mutantes con alteraciones en el desarrollo vegetativo.

Aplicando este abordaje se han detectado tres nuevos mutantes. Uno de ellos con el desarrollo radicular afectado y los otros dos con un fenotipo compacto en la parte aérea. En todos ellos se ha realizado la caracterización fenotípica *in vitro* e *in vivo* y la caracterización genética. Se ha determinado el tipo de mutación, el número de insertos integrados y, combinando ambos análisis, la presencia de cosegregación entre algún inserto T-DNA con el fenotipo mutante. A partir de esta información se podrá iniciar las tareas para poder identificar el gen responsable de cada mutación.

Palabras clave: Desarrollo vegetativo – Tomate – Mutagénesis insercional

Autor: Carles Quesada Traver

Localidad y Fecha: Valencia, julio de 2018

Tutores: Alejandro Atarés Huerta y Vicente Moreno Ferrero

Directora experimental: Marybel Jáquez Gutiérrez

Tipo de licencia de autorización de acceso y difusión del TFG/M: Creative Commons: Reconocimiento – NoComercial (by-nc)

Title: Identification and characterization of tomato mutants with vegetative development alterations.

Abstract: Studying the function of genes that play a key role in vegetative development and its interaction with the environment provides important basic as well as applied information. A good approach for this purpose is the generation of mutants and its subsequent characterization. If T-DNA is used as a mutagenic agent, besides generating a mutant, the affected gene remains tagged by the insert which sequence is known, which makes the cloning process simpler and faster.

In this work, a total of 40 T-DNA lines of *Solanum lycopersicum* variety *Money Maker* transformed with an enhancer trap have been studied. For this purpose, plant tissue culture and greenhouse techniques have been used. The main aim of this project was to find mutants affected in the vegetative development.

Applying this procedure three new mutants have been identified. One affected in the root development, and two showing an aerial compact phenotype. For all of them, *in vitro* and *in vivo* phenotypic characterization as well as genetic characterization was carried out. The type of mutation and the number of inserts has been determined for each line. And by combining this two analysis, the determination of cosegregation between a T-DNA insert with the mutant phenotype has also been studied. This information constitutes the foundation for further investigation on the gene involved in each mutation.

Keywords: Vegetative development –Tomato – Insertional mutagenesis

Índice:

1. INTRODUCCIÓN	- 1 -
1.1 EL TOMATE, SU HISTORIA Y SU IMPORTANCIA SOCIOECONÓMICA Y CIENTÍFICA	- 1 -
1.2. MEJORA GENÉTICA EN EL TOMATE	- 2 -
1.3 APLICACIONES DEL CULTIVO <i>IN VITRO</i>	- 3 -
1.3.1 <i>Respuesta morfogénica</i>	- 4 -
1.4 MUTAGÉNESIS INSERCIONAL	- 5 -
1.5 EVALUACIÓN DEL DESARROLLO TEMPRANO MEDIANTE EL CULTIVO <i>IN VITRO</i>	- 8 -
2. OBJETIVOS	- 9 -
3. MATERIALES Y MÉTODOS:	- 10 -
3.1 MATERIAL VEGETAL.....	- 10 -
3.2 MEDIOS DE CULTIVO	- 11 -
3.3 CULTIVO <i>IN VITRO</i> DEL MATERIAL VEGETAL	- 12 -
3.3.1 <i>Esterilización de semillas</i>	- 12 -
3.3.2 <i>Germinación de las semillas</i>	- 12 -
3.3.3 <i>Cultivo de explantes y ápices meristemáticos</i>	- 12 -
3.3.4 <i>Mantenimiento de las plantas in vitro</i>	- 13 -
3.3.5 <i>Aclimatación</i>	- 13 -
3.4 ANÁLISIS FENOTÍPICO	- 14 -
3.5 ANÁLISIS GENÉTICO	- 15 -
3.5.1 <i>Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante</i>	- 15 -
3.5.2 <i>Análisis genético del número de insertos T-DNA</i>	- 16 -
3.5.3 <i>Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante.</i>	- 16 -
3.5.4 <i>Tratamiento estadístico de los datos. Test χ^2</i>	- 17 -
4. RESULTADOS	- 18 -
4.1. 2646 ET MM. MUTANTE DE ENRAIZAMIENTO	- 18 -
4.1.1 <i>Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante</i>	- 20 -
4.1.2 <i>Análisis genético del número de insertos T-DNA</i>	- 21 -
4.1.3 <i>Análisis de cosegregación fenotipo – inserto T-DNA</i>	- 21 -
4.2 2751 ET MM. MUTANTE COMPACTO	- 21 -
4.2.1 <i>Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante</i>	- 24 -
4.2.2 <i>Análisis genético del número de insertos T-DNA</i>	- 24 -
4.2.3 <i>Análisis de cosegregación fenotipo – inserto de T-DNA</i>	- 24 -
4.3. 2118 ET MM. MUTANTE COMPACTO	- 25 -
4.3.1 <i>Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante</i>	- 27 -
4.3.2 <i>Análisis genético del número de insertos T-DNA</i>	- 27 -
4.3.3 <i>Análisis de cosegregación fenotipo – inserto de T-DNA</i>	- 28 -
5. DISCUSIÓN	- 30 -
5.1 IDENTIFICACIÓN DE LÍNEAS T-DNA MUTANTES PARA CARACTERES DEL DESARROLLO TEMPRANO	- 30 -
5.2 MODO DE HERENCIA DEL FENOTIPO MUTANTE	- 31 -
5.3 NÚMERO DE INSERTOS T-DNA	- 32 -
5.4 COSEGREGACIÓN ENTRE UN INSERTO DE T-DNA Y EL FENOTIPO MUTANTE	- 33 -
5.4 MUTANTES DE ENRAIZAMIENTO	- 34 -
5.5 MUTANTES COMPACTOS	- 35 -
6. CONCLUSIONES	- 36 -
7. BIBLIOGRAFÍA	- 37 -

Índice de figuras:

FIGURA 1 ANATOMÍA DE SOLANUM LYCOPERSICUM	- 1 -
FIGURA 2 COMPARACIÓN ENTRE LA ESPECIE SILVESTRE S. PIMPINELLIFOLIUM Y UNA VARIEDAD DE LA ESPECIE CULTIVADA S. LYCOPERSICUM CV. GIANT HIERLOOM	- 3 -
FIGURA 3 ESQUEMA REPRESENTATIVO DE LAS TRES TRAMPAS GÉNICAS Y SU EFECTO EN EL DNA GENÓMICO.....	- 7 -
FIGURA 4 ESTRUCTURA DEL PLÁSMIDO PD911 UTILIZADO PARA OBTENER LOS MUTANTES ET MM ...	- 10 -
FIGURA 5 CORTES A REALIZAR EN UNA PLÁNTULA PARA EL CULTIVO DE EXPLANTES Y ÁPICES MERISTEMÁTICOS.	- 12 -
FIGURA 6 HERENCIA DEL FENOTIPO MUTANTE MONOGÉNICO (DOMINANTE Y RECESIVO) DEBIDO A LA INSERCIÓN DE T-DNA.	- 15 -
FIGURA 7 COMPARACIÓN FENOTÍPICA EN ESTADO DE PLÁNTULA TRAS 7 DÍAS DE CULTIVO EN MG DE LA LÍNEA 2646 ET MM.....	- 18 -
FIGURA 8 FENOTIPO EN PLANTA AXÉNICA DE LA LÍNEA 2646 ET MM.....	- 19 -
FIGURA 9 FENOTIPO EN CONDICIONES DE CULTIVO IN VIVO DE LA LÍNEA 2646 ET MM DESPUÉS DE 35 DÍAS DE CULTIVO.	- 20 -
FIGURA 10 FENOTIPO EN ESTADO DE PLÁNTULA TRAS 7 DÍAS DE CULTIVO EN MEDIO MG DE LA LÍNEA 2751 ET MM	- 22 -
FIGURA 11 FENOTIPO EN PLANTA AXÉNICA TRAS 20 DÍAS EN MEDIO BÁSICO MB3 DE LA LÍNEA 2751 ET MM	- 23 -
FIGURA 12 FENOTIPO TRAS 60 DÍAS DE CULTIVO EN EL INVERNADERO DE PLANTAS ACLIMATADAS DE LA LÍNEA 2751 ET MM.....	- 23 -
FIGURA 13 FENOTIPO EN ESTADO DE PLÁNTULA TRAS 7 DÍAS DE CULTIVO EN MEDIO MG DE LA LÍNEA 2118 ET MM	- 25 -
FIGURA 14 FENOTIPO EN PLANTA AXÉNICA TRAS 20 DÍAS EN MEDIO BÁSICO MB3 DE LA LÍNEA 2751 ET MM	- 26 -
FIGURA 15 FENOTIPO IN VIVO DE LA LÍNEA 2118.....	- 26 -

Índice de tablas:

TABLA 1 COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO	- 11 -
TABLA 2 COMPOSICIÓN DE LA SOLUCIÓN NUTRITIVA SUPLEMENTADA EN EL INVERNADERO	- 14 -
TABLA 3 ANÁLISIS DEL MODO DE HERENCIA DEL FENOTIPO MUTANTE DE LA LÍNEA 2646 ET MM.	- 21 -
TABLA 4 ANÁLISIS DEL MODO DE HERENCIA DEL FENOTIPO MUTANTE DE LA LÍNEA 2751 ET MM	- 24 -
TABLA 5 ANÁLISIS GENÉTICO DEL NÚMERO DE INSERTOS DE T-DNA DE LA LÍNEA 2751 ET MM.....	- 24 -
TABLA 6 ANÁLISIS DEL MODO DE HERENCIA DEL FENOTIPO MUTANTE DE LA LÍNEA 2118 ET MM	- 27 -
TABLA 7 ANÁLISIS GENÉTICO DEL NÚMERO DE INSERTOS DE T-DNA DE LA LÍNEA 2118-2 ET MM	- 28 -
TABLA 8 ANÁLISIS DE LA COSEGREGACIÓN FENOTIPO - INSERTO T-DNA DE LA LÍNEA 2118-2 ET MM..	- 28 -

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El tomate, su historia y su importancia socioeconómica y científica

El género *Solanum* está constituido por aproximadamente 1.500 especies siendo uno de los géneros más grandes dentro de las angiospermas y el más grande de la familia *Solanaceae*. Entre las especies más representativas de este género podemos encontrar el pimiento, la patata o la berenjena de una gran importancia alimentaria, el tabaco de importancia económica o la petunia, relevante desde un punto de vista ornamental. El tomate cultivado (*S. lycopersicum*), después de muchos estudios tanto morfológicos como moleculares, pertenece inequívocamente a este género tal y como lo había designado Linneo en 1753 (Peralta et al. 2008) aunque esto no siempre ha sido así ya que en 1754 Phillip Miller le otorgó un género propio, *Lycopersicon*. La denominación del tomate cultivado y sus relativos silvestres como *Lycopersicon* estuvo vigente durante casi dos siglos, por lo que en la literatura es posible encontrar las dos denominaciones (Foolad, 2007).

En términos botánicos esta especie es herbácea, perenne, pilosa y suele alcanzar un metro de altura. Las hojas están compuestas por folíolos de tamaño variable y se disponen de forma alternada a lo largo del tallo principal. Es de reproducción autógama debido a su morfología floral. Las flores se disponen en racimos y cada una está constituida por cinco sépalos y cinco pétalos de color amarillo. Con función reproductiva se encuentra la estructura formada por cinco estambres y el pistilo. El engrosamiento del ovario da lugar a frutos carnosos y loculados de color rojo (Figura 1) (Peralta et al., 2008).



Figura 1 Anatomía de *Solanum lycopersicum*. A. Rama. B. Hoja. C. Vista abaxial de la flor. D. Vista adaxial de la flor. E. Vista lateral de la flor. F. Infrutescencia (Peralta et al., 2008)

El tomate cultivado es el resultado de un proceso de domesticación a partir de especies silvestres. Este proceso no se produjo en Europa ni fue en un solo paso. Estudios filogenéticos sugieren que el tomate cultivado es el resultado de una domesticación en dos pasos (Nakazato y Housworth, 2011). El primer paso fue desde *S. pimpinellifolium* hasta *S. lycopersicum* var. cerasiforme y tuvo lugar en regiones de la costa oeste sudamericana concretamente en los países: Chile, Perú y Ecuador. Más

tarde en la región de Centroamérica se produjo el segundo paso, llegando finalmente a la especie *S. lycopersicum* var. *lycopersicum*, que seguidamente sería transportada a Europa mediante semillas y se establecería de forma mundial (Blanca *et al.*, 2015). Esta variedad no se ha mantenido invariable a lo largo de los últimos años, sino que mediante programas de mejora genética tradicional se le han introgresado pequeñas regiones de especies silvestres relacionadas para conferirle resistencias a enfermedades y mejores cualidades para su comercialización (Sim *et al.*, 2009, 2011).

Actualmente el tomate tiene una gran importancia económica, ya que se trata de un alimento muy apreciado tanto por su sabor como por su contenido nutricional, destacando su alto contenido en potasio, vitamina B, vitamina C y licopeno entre otros (Bergougnoux, 2014). Por ello, según datos de la FAO, su producción a nivel mundial se ha visto incrementada. En el año 2016 fue de 177.042.364 toneladas, un 29,08% más que diez años atrás. Las mayores producciones corresponden a China, India y EE.UU cuya contribución respecto al total fue del 31,80%, 10,40% y 7,36% respectivamente. España se situó en el octavo lugar con una producción de 4.671.807 toneladas. España destacó por su productividad, 8,62 kg/m², encontrándose por encima de la media mundial, 3,70 kg/m², aunque sin llegar a los niveles alcanzados por Holanda, 50,70 kg/m².

La importancia del tomate no es exclusivamente económica, poco a poco se está convirtiendo en una planta modelo para la comunidad científica. Esto es debido a su ciclo de vida relativamente corto, su facilidad para ser propagado asexualmente, su insensibilidad frente al fotoperiodo, el control que se puede ejercer sobre su polinización y por las características de su genoma. Éste es pequeño (950 Mb) y está secuenciado. Además de conocer las características del genoma (genes, repeticiones, sitios de recombinación...) también se dispone de una gran variedad de mapas con muchos marcadores moleculares (i.e. SNPs) asociados a regiones de interés (Gerszberg *et al.*, 2015). Por último, presenta una característica diferencial frente a otras especies modelo, y es que forma frutos carnosos que acumulan metabolitos secundarios (Bauchet y Causse, 2012).

1.2. Mejora genética en el tomate

Los cultivos destinados al consumo humano siempre han sido objeto de mejora. Al principio esta mejora la hacían los propios agricultores, pero hoy en día son las empresas productoras de semillas las que realizan fundamentalmente esta tarea. En sus inicios, durante el proceso de domesticación, la constante presión selectiva a favor de caracteres relacionados con el tamaño del fruto hizo que éstos aumentasen sus dimensiones y adoptasen formas diferentes (Figura 2).

Desde que el cultivo fue establecido mundialmente se ha intentado mejorar con el principal objetivo de aumentar su rendimiento (producción por unidad de superficie). Además, se han conseguido avances en términos de calidad externa y postcosecha del fruto, reducción del tiempo de cosecha y resistencia a estreses bióticos. Sin embargo, la mejora frente a caracteres como la resistencia a estreses abióticos no ha tenido tanto éxito (Ashraf y Akram, 2009). Para conseguir estos objetivos sería importante disponer de fuentes de



Figura 2 Comparación entre la especie silvestre *S. pimpinellifolium* (izquierda) y una variedad de la especie cultivada (derecha) *S. lycopersicum* cv. Giant hierloom (Tanksley, 2004).

variación que sean compatibles sexualmente con la especie cultivada. Esto es muy complicado ya que, mediante métodos de mejora tradicional, teniendo en cuenta todos los cruces que hay que hacer, el proceso puede prolongarse hasta veinte años cuando queremos introgresar caracteres que se encuentran en genomas silvestres (Rubio *et al.*, 2016). Se utilizan estas especies porque sobre ellas no ha actuado la presión de selección y mantienen genes que ya no están presentes en la especie cultivada, hecho muy útil para los mejoradores. Además, estos tiempos de mejora característicos de la mejora clásica se están viendo reducidos por la aplicación de marcadores moleculares y técnicas de cultivo *in vitro* que pueden acelerar estos procesos, así como ampliar las fuentes de variación disponibles (Foolad y Panthee, 2012).

Un aspecto clave para poder utilizar algunas de las técnicas de mejora biotecnológica (e.g. transformación genética o edición génica) es conocer los genes responsables de los caracteres que se pretenden mejorar. El empleo de mutantes es una herramienta muy útil para conocer cuáles son esos genes. En tomate se han generado diferentes colecciones de mutantes que constituyen un recurso muy valioso para lograr ese objetivo. Gracias a esta aproximación se han descubierto genes muy importantes desde el punto de vista científico básico y aplicado, como el mutante *self pruning (sp)* que cambia el hábito de crecimiento de la planta de indeterminado a determinado, característica muy importante para una recolección mecánica de los frutos (Pnueli *et al.*, 1998).

1.3 Aplicaciones del cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* de plantas es una herramienta muy potente para la investigación biotecnológica ya que abarca un gran espectro de técnicas que proporcionan una serie de ventajas frente a otras técnicas de cultivo. Entre estas técnicas podemos encontrar la micropropagación, utilizada para

multiplicar plantas y mantener genotipos de interés (Namitha y Negi, 2013). También es posible sanear cultivos de enfermedades víricas mediante microinjertos (Roldán *et al.*, 2005). Además, existe una gama de posibilidades para abordar la mejora genética por métodos biotecnológicos. La variabilidad intraespecífica se puede incrementar mediante el aprovechamiento de la variación somaclonal, propia del cultivo *in vitro* (Evans y Sharp, 1983). En cuanto a la variación extra-específica es posible aumentarla gracias al rescate de embriones o la hibridación somática mediante fusión de protoplastos (Lanzhuang y Adachi, 1996; Wijbrandi *et al.*, 1990). Si el objetivo es obtener líneas puras, el método haplo-diploide, por ejemplo, mediante cultivo de anteras, puede ser una alternativa muy potente que evite los largos procesos de autofecundaciones sucesivas necesarias para alcanzar este propósito (Germanà, 2011).

Además de las técnicas nombradas anteriormente, la que probablemente ha tenido un mayor impacto es la transformación genética ya que permite la transferencia de uno o pocos genes de una especie a otra sin modificar el resto de sus características. Gracias a esta técnica es posible la integración de uno o pocos genes en el genoma vegetal con la ayuda de vectores bacterianos como *Agrobacterium tumefaciens*. Esta técnica permite introducir genes de especies filogenéticamente muy alejadas en muy poco tiempo (Sun *et al.*, 2015) lo cual ha supuesto un gran avance tanto desde el punto de vista básico como aplicado. Además, con relación a este trabajo, cabe mencionar que es posible la utilización de esta técnica para producir mutaciones en la especie transformada, procedimiento conocido como mutagénesis insercional. La mutagénesis ocurre por la inserción de forma aleatoria de un fragmento de secuencia conocida (T-DNA, transposón, ...) en el genoma, pudiendo truncar la secuencia de un gen endógeno o posicionarse cerca de éste y alterar su expresión, dando como resultado un fenotipo mutante asociado al evento de inserción.

De forma más reciente se están aplicando técnicas de edición génica, entre ellas una de la más utilizada es la que emplea el sistema CRISPR/Cas9. Con esta técnica es posible modificar de forma dirigida alguna parte del genoma de la especie editada. Por tanto, permite crear colecciones de mutantes mediante mutagénesis dirigida, como hicieron Jacobs y colaboradores con tomate (2017).

1.3.1 Respuesta morfogénica

Todas las aplicaciones del cultivo *in vitro* derivan de la capacidad de regeneración que tienen las células vegetales gracias a mantener su totipotencia a lo largo del desarrollo. Esto permite que al ser cultivadas en las condiciones adecuadas, pueden dar lugar a organismos u órganos completos a partir de una sola célula (Skoog y Miller, 1957). Por ejemplo, en el caso de querer obtener plantas

transgénicas es necesario poder regenerar una planta a partir de una célula previamente transformada.

Existen dos posibles respuestas morfogénicas, la embriogénesis somática y la organogénesis adventicia. Respecto a la organogénesis, se trata de un proceso mediante el cual a partir de un explante que carece de meristemas se forman brotes o raíces. De forma empírica se han determinado todos los parámetros necesarios para una regeneración satisfactoria en diferentes cultivares de tomate. Estos parámetros son fundamentalmente el tipo de explante (órgano, edad y tamaño), las condiciones de cultivo, y la composición del medio de cultivo (Gerszberg *et al.*, 2015). Esta última es muy determinante ya que además de tener que contar con la concentración adecuada de macronutrientes, micronutrientes, azúcar y vitaminas, la presencia de reguladores del crecimiento en un correcto balance es crucial para obtener la respuesta deseada (Namitha y Negi, 2013).

El desarrollo de estas metodologías se ha producido gracias a planteamientos empíricos ya que no se conocen los procesos biológicos que conducen a estas respuestas y los genes que los controlan. De hecho, aunque se han puesto a punto protocolos de regeneración en gran cantidad de materiales, existen aún genotipos de diversas especies para los cuales no existen protocolos eficaces. A este tipo de cultivos se les denomina recalcitrantes. En este caso es evidente que existe un componente genético en todos estos comportamientos y que el descubrimiento de cuáles son los genes involucrados facilitaría la mejora de los protocolos. Así, por ejemplo, en un estudio sobre regeneración en tres cultivares de tomate diferentes, se encontró una gran diversidad entre ellos con relación a su respuesta morfogénica (Ajenifujah-Solebo *et al.*, 2013). Por tanto, para poder avanzar en el desarrollo de cualquier metodología relacionada con el cultivo *in vitro* sería muy importante identificar los genes involucrados en esta respuesta y elucidar su mecanismo de acción, con la finalidad de poder regenerar de forma eficaz todo tipo de plantas y genotipos diferentes.

1.4 Mutagénesis insercional

Para poder aprovechar el gran potencial que tienen las técnicas de transformación y edición génica es imprescindible conocer cuáles son los genes clave que regulan el proceso biológico que se pretende estudiar o modificar. Por tanto, un aspecto importante es descubrir cuáles son estos genes clave. Aunque existen numerosas metodologías para abordar este problema, una de las que mejores resultados ha dado es la identificación de mutantes y posterior identificación del gen alterado. La identificación puede realizarse en mutantes espontáneos, pero dada la baja tasa de mutación espontánea, lo más común es crear una colección mutagenizada. Para ello se pueden utilizar agentes

mutágenos tanto físicos (radiaciones) como químicos (Etil Metano Sulfonato (EMS)). Un ejemplo es la colección de mutantes inducidos con EMS y Radiación producida por Menda y colaboradores (2004), donde identificaron 3.417 mutantes de un total de 13.000 familias generadas. Aunque esta metodología reporte un buen número de mutantes, la clonación del gen alterado es complicada, debiéndose de recurrir al uso de marcadores moleculares o técnicas de mapeo por secuenciación costosas en tiempo y recursos. Sin embargo, existe una metodología que podría ayudar a identificar más rápidamente el gen que se ha visto alterado en un mutante: la mutagénesis insercional.

Esta técnica se basa en el hecho de que al obtener una planta transgénica el fragmento de ADN que se inserta en el genoma de la especie receptora puede alterar la expresión de un gen endógeno, quedando éste etiquetado por la presencia de un fragmento de ADN de secuencia conocida, ya sea un transposón o un T-DNA. La principal ventaja de generar poblaciones con este método en comparación con los métodos tradicionales es que se conoce la secuencia que se inserta y que está causando la mutación. En este caso la identificación del gen alterado se puede realizar mediante análisis moleculares sencillos del tipo TAIL-PCR o Anchor-PCR. Este tipo de aproximaciones han sido muy utilizadas y reportan muy buenos resultados tal y como reflejaron los estudios de este tipo en *Arabidopsis* (Van Lijsebettens *et al.*, 1991) y arroz (Jeon *et al.*, 2000).

En nuestro caso hemos utilizado la transformación con T-DNA que se integra de forma aleatoria en el genoma huésped gracias a la mediación de *Agrobacterium tumefaciens* (Tinland, 1996). Para ello, se recurre a técnicas de cultivo *in vitro* que permiten transformar unas pocas células de un explante a partir de las cuales se regeneran las plantas transgénicas. En estas aproximaciones se debe disponer de un método de transformación de elevada eficacia, ya que como en cualquier programa de mutagénesis el objetivo es obtener el mayor número de eventos fundadores de organismos mutantes posible. Esta técnica destaca respecto al uso de transposones por su estabilidad a lo largo de las generaciones y por su bajo número de copias integradas por evento de transformación (Radhamony *et al.*, 2005). Como se ha demostrado su viabilidad en trabajos previos, en *Arabidopsis* (Li *et al.*, 2003) o Petunia (Zubko *et al.*, 2002) y por las ventajas que presenta respecto a los transposones, en nuestro laboratorio se optó por utilizar esta aproximación para un programa de mutagénesis insercional tanto en tomate (Pérez-Martín *et al.*, 2017) como en especies silvestres relacionadas (Atarés *et al.*, 2011).

Normalmente el T-DNA porta un gen que confiere resistencia a antibióticos para diferenciar las células transformadas de las no transformadas. El más utilizado es el gen *nptII* que confiere resistencia a la kanamicina por fosforilación de ésta (De Vries *et al.*, 1998). Además, una de las grandes ventajas de

utilizar esta técnica es que además de la información proporcionada por la interrupción o alteración de la expresión del gen mutado se puede diseñar el T-DNA para que proporcione alguna información adicional. En concreto, se puede añadir algún gen delator, el más utilizado es el *uidA*, que da lugar a la proteína GUS fácilmente observable mediante una tinción simple (Springer, 2000), con diferentes secuencias reguladoras. Estas construcciones genéticas se denominan trampas génicas y, dependiendo de su estructura, encontramos tres tipos: de intensificadores, de promotores y de genes (Figura 3).

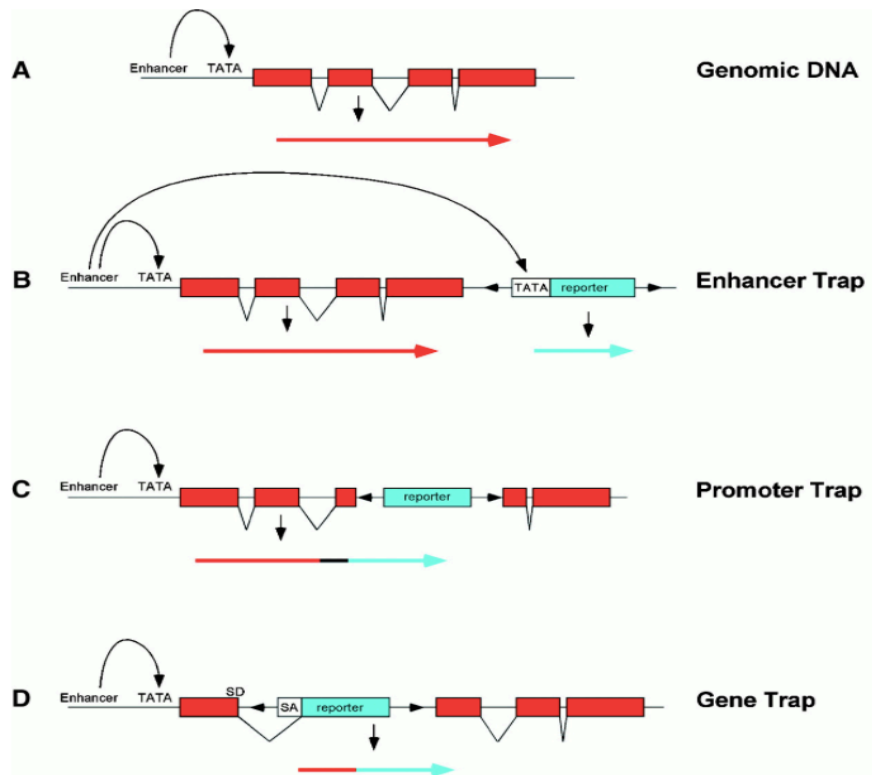


Figura 3 Esquema representativo de las tres trampas génicas. (A) DNA genómico. (B) Trampa de intensificadores. (C) Trampa de promotores. (D) Trampa de genes. Exones: Rectángulos rojos. Intrones: líneas negras. TATA: Promotor mínimo. SA: Sitio aceptor de *splicing*. Springer, 2000.

El T-DNA utilizado como trampa de intensificadores contiene un promotor mínimo fusionado a la región estructural del gen *uidA*. Ese promotor por sí mismo no da lugar a niveles significativos de proteína GUS. Por tanto, es necesario que el inserto se encuentre en el área de acción de un intensificador así como en la dirección correcta para que se produzca la proteína. En el caso de la trampa de promotores, para que haya una producción detectable de proteína GUS es necesario que el inserto se encuentre en uno de los exones del gen, ya que no cuenta con ningún tipo de promotor. Por último, la trampa de genes cuenta con un sitio aceptor de *splicing* justo antes del gen delator, por lo que sólo se observa expresión del gen delator cuando se inserta en un intrón del gen. La construcción utilizada en este trabajo fue la trampa de intensificadores, ya que el rango de eventos

de inserción que proporcionan visualización es mayor que en las otras construcciones. Sin embargo, debido a esto, también encontramos el inconveniente de que el intensificador puede actuar sobre el gen delator aunque éste se encuentre alejado en términos de secuencia.

1.5 Evaluación del desarrollo temprano mediante el cultivo *in vitro*

Todas las aplicaciones mencionadas anteriormente, enmarcadas dentro de lo que se conoce como técnicas de cultivo *in vitro*, son muy importantes. Sin embargo, también cabe destacar el potencial del cultivo *in vitro* como herramienta para el análisis del desarrollo temprano de las plantas en el contexto de un programa de mutagénesis. El desarrollo temprano de una planta se entiende como el periodo de tiempo que abarca desde la emergencia de la radícula hasta la formación de las primeras hojas verdaderas. Se trata de un periodo crucial, ya que en éste es posible identificar gran número de alteraciones en el desarrollo vegetativo tanto de la parte aérea como de la raíz que más tarde serían de difícil o imposible identificación.

Gracias al cultivo *in vitro* se pueden analizar las plantas en condiciones ambientales controladas, en un periodo corto de tiempo y en una pequeña superficie de cultivo. Además, es posible analizar el desarrollo radicular y su evolución a lo largo del tiempo ya que la naturaleza translúcida del medio gelificado con agar permite esta visualización sin problemas. En este caso es posible estudiar la raíz embrionaria si el material de partida son semillas o las raíces adventicias si el material de partida son explantes de tallo, hipocótilo u hoja. Por último, además de estudiar el desarrollo de la raíz, lo cual es difícil de llevar a cabo con un cultivo *in vivo*, el empleo del cultivo *in vitro* en la evaluación de mutantes también permite el estudio de caracteres como la capacidad de regeneración organogénica. Los mutantes afectados en este carácter pueden ayudar a descubrir qué genes hay involucrados en este proceso y, por tanto, poder mejorar las técnicas de cultivo *in vitro* antes mencionadas.

2. OBJETIVOS

En nuestro grupo de investigación, en colaboración con el grupo de la Universidad de Almería dirigido por el Dr. Rafael Lozano y el del CEBAS dirigido por la Dra. Mari Carmen Bolarín, se han generado más de 7.000 líneas T-DNA de *S. lycopersicum* y especies silvestres relacionadas (*S. pimpinellifolium*, *S. pennellii* y *S. galapagense*) para llevar a cabo un programa de mutagénesis insercional. El propósito principal de este proyecto es identificar genes que controlen caracteres de relevancia tanto agronómica como científica. Actualmente esta colección de líneas ya ha reportado numerosos resultados de interés, como la identificación de más de 400 mutantes alterados en diferentes caracteres (desarrollo vegetativo de parte aérea y raíz, desarrollo reproductivo, resistencia a estreses abióticos como sequía y salinidad, etc). Además, ya se han clonado más de 35 genes que se están analizando funcionalmente.

El presente trabajo tiene como objetivos principales el cribado de una parte de la colección de líneas T-DNA generadas para detectar nuevos mutantes y evaluar líneas previamente identificadas para profundizar en su caracterización fenotípica y genética. Para ello se han analizado un total de 33 líneas T-DNA de tomate para identificar nuevos mutantes y 7 líneas preseleccionadas por haber visto previamente algún indicio de fenotipo mutante. Para la caracterización fenotípica y genética la herramienta principal ha sido el cultivo *in vitro*, ya que permite desarrollar de forma rápida y eficiente esta tarea.

Los objetivos concretos planteados en este caso han sido:

1. Identificación de nuevos mutantes de tomate alterados en caracteres del desarrollo temprano
2. Caracterización fenotípica *in vitro* e *in vivo* de los mutantes identificados y de las líneas preseleccionadas
3. Análisis del modo de herencia de la mutación de las líneas seleccionadas
4. Determinación del número de insertos T-DNA de las líneas seleccionadas
5. Análisis de la cosegregación entre el fenotipo mutante y un inserto T-DNA de las líneas seleccionadas

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Las plantas utilizadas en este trabajo provenían de líneas T-DNA pertenecientes a una colección generada en trabajos previos de nuestro grupo de investigación en colaboración con la Universidad de Almería y el CEBAS de Murcia. Se han utilizado líneas de la especie *Solanum lycopersicum* cv. *Money Maker* que han sufrido un proceso de transformación genética con el plásmido pD911, proporcionado amablemente por el Dr. Thomas Jack de la Universidad de Dartmouth. Este plásmido portaba una trampa de intensificadores o “Enhancer trapping” (ET), en la que el gen *nptII* que confiere resistencia a la kanamicina se había puesto bajo el control de un promotor constitutivo para permitir la selección de las células transformadas. Por otra parte, el gen *uidA* estaba controlado por un promotor mínimo. Este promotor truncado proveniente del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) contenía una caja TATA lo cual le hacía incapaz de expresarse si no estaba influido por un intensificador de algún gen endógeno (Figura 4). La transformación con este vector introducido en una cepa de *Agrobacterium* dio lugar a la generación de las líneas T-DNA denominadas ET MM (ET: Enhancer Trapping / MM: Money Maker).

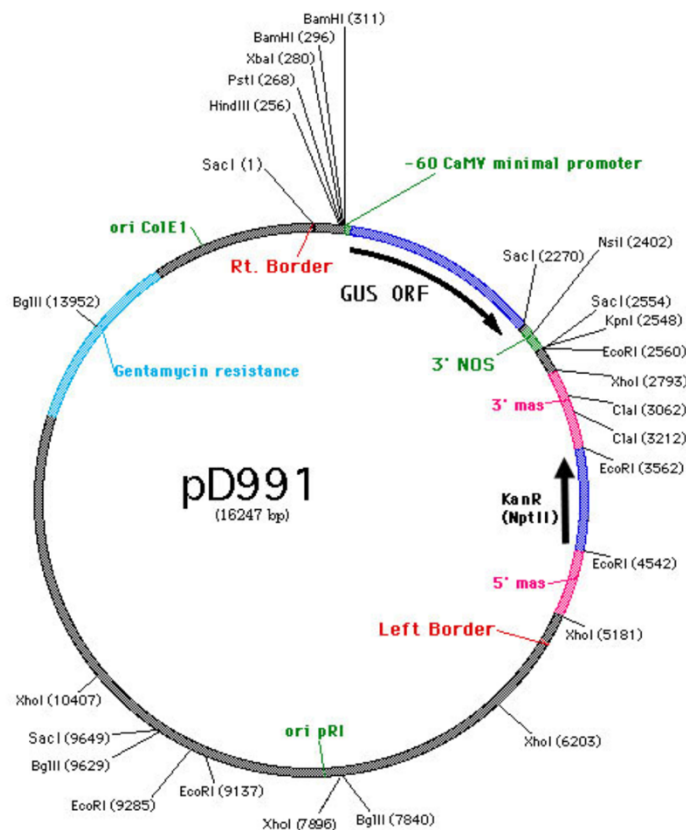


Figura 4 Estructura del plásmido pD911 utilizado para obtener las líneas T-DNA.

Las plantas generadas a partir de la transformación genética y posterior regeneración se denominaban TG1. Éstas eran hemicigóticas para cada inserción de T-DNA (su alelo homólogo era un alelo nulo). Tras su obtención se mantuvieron y multiplicaron mediante técnicas de clonación. Como cada planta provenía de un evento único de transformación era necesaria su evaluación, tanto *in vitro* como en el invernadero, donde se obtenía su descendencia por autofecundación a la que se le denominaba TG2. Esta población resultaba ser segregante para cada uno de los insertos ya que se podían encontrar individuos hemicigotos, acigotos o homocigotos para cada T-DNA (se podía insertar más de un T-DNA en cada evento de transformación). A partir de estos individuos, también por autofecundación, se obtenían las poblaciones TG3 y así sucesivamente. En este trabajo se han utilizado fundamentalmente familias TG2 y TG3 a partir de semillas de diferentes líneas previamente obtenidas por el grupo.

3.2 Medios de cultivo

Para realizar los experimentos de cultivo *in vitro* fue necesario preparar los medios necesarios. Además de sales minerales, sacarosa y vitaminas, dependiendo de la finalidad del experimento, la composición del medio fue variando en diferentes componentes. A continuación, se muestran todos los medios utilizados y sus composiciones detalladas. Para su preparación, en primer lugar, se disolvieron todos los componentes (Tabla 1) en agua desionizada y se procedió a ajustar el pH hasta 5,7 con ácido clorhídrico (HCl) o hidróxido de potasio (KOH).

Tabla 1 Composición de los medios de cultivo

	MG	MB3	α	β	IKZ	ε
Sales minerales ^a	MS/2	MS	MS	MS	MS	MS
Sacarosa [g/L]	10,0	30,0	20,0	20,0	30,0	30,0
Inositol [g/L]		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Tiamina-HCl [mg/L]		1	1	1		
Vitaminas ^b					SH	SH
Acido indolacético [mg/L]			0,1	0,1	4,0	4,0
Kinetina [mg/L]					4,0	4,0
Zeatina [mg/L]					1,0	1,0
Kanamicina [mg/L]				100		100

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

Una vez ajustado el pH de la disolución se le añadió el agar bacteriológico de Pronadisa® (9 g/L), se fundió y se distribuyó en botes para su posterior esterilización en la autoclave (121°C – 30 minutos).

3.3 Cultivo *in vitro* del material vegetal

3.3.1 Esterilización de semillas

El punto de partida de todos los experimentos fue la esterilización de semillas obtenidas en años anteriores con la finalidad de trabajar con el material vegetal de forma estéril. Para este propósito se prepararon primero dos series de agua. Cada serie estaba compuesta por cuatro botes esterilizados previamente. A uno de ellos, que estaba vacío, se le añadía lejía comercial al 50% y unas gotas de Tween 20 mientras que los otros tres contenían agua desionizada. Por otra parte se colocaron las semillas en una gasa que se cerró en forma de bolsa con una etiqueta indicando el genotipo de éstas para que no se separaran durante la esterilización. Las semillas se sumergieron en el bote con lejía durante 30 minutos. Luego se fueron pasando a los botes con agua y se sumergieron durante 5, 10 y 15 minutos en cada uno. Se realizó el mismo procedimiento al día siguiente, ya que se ha visto que de esta forma se mejora la tasa de germinación

3.3.2 Germinación de las semillas

Una vez las semillas fueron esterilizadas, se colocaron en placas Petri con dos hojas de papel de filtro y nueve mL de agua desionizada estéril. Seguidamente se incubaron en oscuridad a una temperatura de 28°C para promover su germinación. Tras dos días en estas condiciones se podía visualizar la emisión de la radícula y en ese momento se cultivaron en medio de germinación MG, distribuyéndolas uniformemente y con un máximo de 10 semillas por bote. Por último, para promover el crecimiento de las plántulas, los botes se colocaron en la cámara de cultivo *in vitro* en condiciones de fotoperiodo de 16 horas y 8 de oscuridad, una intensidad lumínica de $45 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y una temperatura de 25°C.

3.3.3 Cultivo de explantes y ápices meristemáticos

Tras sembrar las semillas en los botes con medio de germinación pasaron 7 días en la cámara de cultivo. En ese momento el material vegetal se encontraba en el estado óptimo para la realización del cultivo de explantes y ápices meristemáticos. Para ello se realizaron una serie de cortes con la finalidad de separar los cotiledones y el ápice meristemático (Figura 5).

Los ápices meristemáticos obtenidos se cultivaron en botes de vidrio de 10,5 cm de altura y 9,8 cm de diámetro, con medio básico MB3, con la finalidad de evaluar el fenotipo de la parte aérea y del

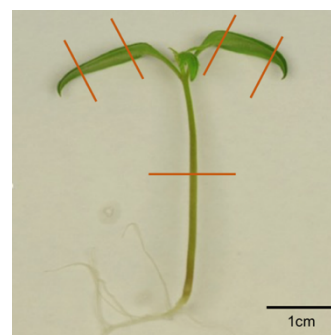


Figura 5 Esquema de los cortes (en rojo) a realizar en una plántula de tomate para la obtención de explantes de cotiledón y ápices meristemáticos.

enraizamiento adventicio a partir de los ápices meristemáticos. En cada bote se cultivaron cuatro ápices y se numeraron de forma correlativa para los posteriores análisis.

Por otra parte, los cotiledones se separaron del ápice y se cortaron en su parte distal de tal modo que se obtuvieron explantes con dos zonas de corte. Estos explantes se cultivaron en placas Petri con IKZ para evaluar la capacidad regenerativa de los explantes, ya que este medio promueve, tras una etapa de callo desorganizado, la formación de yemas adventicias, ápices y brotes en tomate. En cada placa se cultivaron los cotiledones provenientes de seis plántulas, es decir, un total de doce explantes que se numeraban al igual que los ápices meristemáticos de forma correlativa en función de la plántula de procedencia para poder realizar asociaciones entre ambos tipos de explantes posteriormente.

3.3.4 Mantenimiento de las plantas *in vitro*

Cuando se detectaba una línea mutante era imprescindible realizar su propagación para disponer de más réplicas y así conservar con más seguridad el material, corroborar el fenotipo, realizar diferentes experimentos... Para esto se subcultivaron ápices meristemáticos y yemas axilares en medio básico MB3 o en medio de enraizamiento α . En este caso se utilizaron botes de vidrio de 15,5cm de alto y 6 cm de diámetro, ideales para el desarrollo de forma individualizada de plantas axénicas de tomate.

3.3.5 Aclimatación

Una planta cultivada *in vitro* se encuentra en condiciones de elevada humedad, baja intensidad lumínica, heterotrofia y ausencia de otros organismos en el ambiente. Estas características son contrarias a las de las plantas cultivadas *in vivo* que se encuentran con baja humedad ambiental, alta intensidad lumínica, condiciones autótrofas y presencia de plagas y enfermedades. Es debido a esto, que las plantas axénicas necesitan de un proceso de transición para pasar de unas condiciones a otras sin que se vea afectada su viabilidad. A esta transición se le denomina periodo de aclimatación.

Este procedimiento se realizó en individuos en los que era necesario corroborar el fenotipo en condiciones de invernadero. El primer requisito para poder aclimatar un individuo fue mantener una copia de esa planta en condiciones *in vitro*. El segundo, que la planta que se quería aclimatar contase con un desarrollo radicular y de la parte aérea suficiente. Para proceder a la aclimatación, se extraía la planta del bote cuidadosamente y se retiraba el agar restante de las raíces sumergiéndolas en agua. Seguidamente se trasplantaron a macetas de 9 cm de diámetro con un sustrato que era una mezcla de turba y perlita (1:1) o, alternativamente, en fibra de coco. El sustrato se humedecía antes de

utilizarse. Finalmente se colocó un vaso de plástico transparente invertido sobre la planta cultivada en la maceta para crear las condiciones de humedad idóneas para una planta proveniente de cultivo *in vitro*. Este vaso que permitía mantener una humedad relativa elevada en las primeras etapas de la aclimatación se fue levantando a lo largo de los días posteriores con la finalidad de reducir dicha humedad. Una vez aclimatadas las plantas se trasplantaron a macetas de mayor diámetro para permitir su crecimiento *ex vitro* hasta alcanzar el desarrollo de una planta adulta con la formación correspondiente de flores y frutos. En el invernadero donde se cultivaron que disponía de control de temperatura e iluminación de apoyo las plantas se regaban mediante sistema de goteo con una solución de fertirrigación que les aportaba los nutrientes necesarios (Tabla 2).

Tabla 2 Composición de la solución de fertirrigación del invernadero

Solución nutritiva de riego			
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	2,360 g·L ⁻¹	ZnSO ₄ ·5H ₂ O	14,00 mg·L ⁻¹
KNO ₃	1,012 g·L ⁻¹	MnO ₄ ·5H ₂ O	33,20 mg·L ⁻¹
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,980 g·L ⁻¹	CuSO ₄ ·5H ₂ O	2,60 mg·L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0,272 g·L ⁻¹	H ₃ BO ₃	38,00 mg·L ⁻¹
g Fe (quelato)	0,056 g·L ⁻¹	(NH ₄) ₆ Mo ₇ ·4H ₂ O	1,76 mg·L ⁻¹

3.4 Análisis fenotípico

Con la finalidad de detectar y analizar líneas con mutaciones que afectaran el desarrollo de la planta en los primeros estadios de crecimiento, se realizó una evaluación fenotípica continua desde la germinación de las semillas hasta el estado de planta axénica derivada del cultivo de ápices meristemáticos. Además, gracias al cultivo de los explantes de cotiledón se pudo analizar si esas plantas tenían afectada su capacidad de regeneración adventicia.

Al detectar una línea mutante, se procedía a su evaluación también en el invernadero mediante la aclimatación de plantas axénicas crecidas inicialmente en condiciones de cultivo *in vitro* o bien por la siembra directa de semilleros. Para la preparación de estos semilleros el material de partida seguía los mismos pasos que se han explicado previamente de esterilización y pre-germinación en condiciones axénicas. Una vez comprobada la emisión de la radícula las semillas se plantaban directamente en macetas de 9 cm de diámetro con el mismo sustrato utilizado para la aclimatación.

Dada la naturaleza de los caracteres aquí estudiados la principal forma de registrar los resultados obtenidos en la caracterización fenotípica ha sido el registro fotográfico. Para ello se ha utilizado una cámara fotográfica digital (Nikon DC3300).

3.5 Análisis genético

3.5.1 Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante

El análisis del fenotipo de las plantas transformadas (TG1) y las segregaciones observados en sus descendencias (plantas TG2 obtenidas mediante autofecundación de las TG1) se utilizó para saber qué tipo de mutación se ha producido. El material vegetal empleado en este trabajo fueron plantas TG2, por tanto, si el modo de herencia de la mutación era 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 hemicigotos) y $\frac{1}{4}$ WT (acigotos). 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 hemicigotos) y $\frac{1}{4}$ mutantes (homocigotos) (Figura 6).

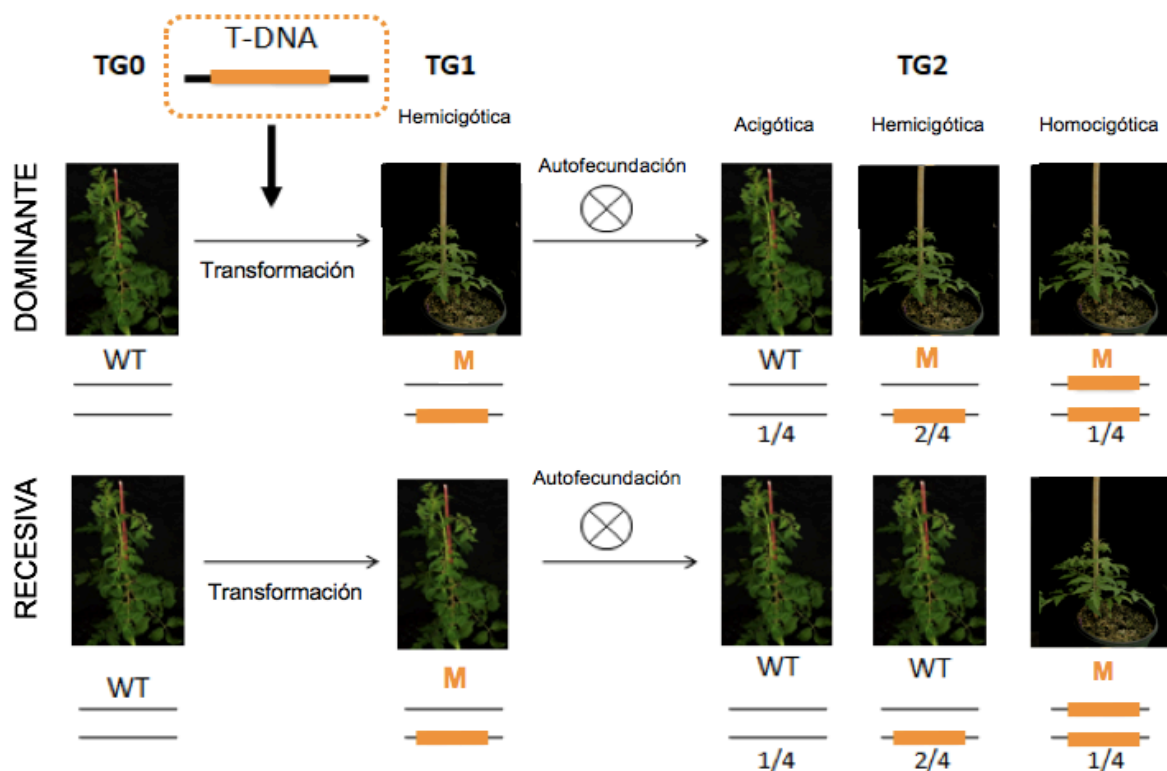


Figura 6 Herencia del fenotipo mutante monogénico (dominante y recesivo) debido a la inserción de T-DNA.

Con este análisis además del modo de herencia, se podría comprobar la influencia de la mutación en la viabilidad de las plantas mutantes ya que si hubiera un fenómeno de subletalidad asociada a la mutación aparecerían menos plantas mutantes de las esperadas.

3.5.2 Análisis genético del número de insertos T-DNA

Las líneas T-DNA analizadas contaban en su construcción con el gen *nptII* bajo el control de un promotor constitutivo. Este gen, ya sea en homocigosis o hemicigosis, confiere resistencia a la kanamicina por fosforilación de ésta siempre que el T-DNA se haya insertado totalmente y no de forma parcial o truncada. En este trabajo se ha utilizado la resistencia a la kanamicina como medio indirecto para averiguar el número de insertos de T-DNA con el gen *nptII* funcional que portaba cada línea T-DNA. Para estudiar la respuesta a la kanamicina se han utilizado dos técnicas diferentes en función de la situación del material vegetal. Una aproximación consistió en cultivar en una placa Petri con medio ϵ explantes de cotiledón, hipocótilos y/o folíolos de hoja. Otra fue cultivar ápices meristemáticos o yemas axilares en medio β . En ambos casos a los 15-20 días se analizó la sensibilidad/resistencia de los explantes por su respuesta morfogénica o por su capacidad de enraizamiento en los medios ϵ y β respectivamente. Ambas respuestas estaban inhibidas por la presencia de la kanamicina en las plantas sensibles por no ser portadoras de ningún T-DNA con el gen *nptII* funcional.

Para cada línea, tras realizar estos experimentos, se hizo un escrutinio de las plantas resistentes y las sensibles a la kanamicina (Kan^R / Kan^S). Con estos datos fue posible inferir el número de insertos en función de la segregación del fenotipo observada y la esperada. Así, por ejemplo, la segregación esperada en TG2 para el caso de una línea que portara un inserto de T-DNA con el gen *nptII* funcional era de 3 Kan^R : 1 Kan^S . En cambio, si se habían integrado dos copias la segregación esperada sería 15 Kan^R : 1 Kan^S .

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

Este análisis se utilizó para determinar si el fenotipo mutante detectado era debido a algún inserto de T-DNA con el gen *nptII* funcional. Este paso era necesario ya que durante la regeneración de las plantas TG1 se pueden dar eventos de variación somaclonal. En este contexto, antes de abordar la clonación del gen responsable de una mutación, se debería saber si ésta ha sido causada por el inserto de un fragmento de ADN de secuencia conocida (por ejemplo, un T-DNA) o por cualquier otro motivo (por ejemplo, como consecuencia de un evento de variación somaclonal). En el primer caso la clonación del gen sería relativamente sencilla y se abordaría mediante técnicas como el Anchor PCR que puede llevar unas pocas semanas de trabajo. En el segundo caso la clonación del gen responsable sería mucho más complicada ya que es necesario seguir una estrategia de mapeo por secuenciación para la que sería necesario obtener cruces del mutante con *Solanum pimpinellifolium*, obtener la correspondiente población F2, identificar en esa población plantas WT y M y secuenciarlas de forma independiente para poder identificar la región genómica donde se encuentra el gen alterado.

Para esta finalidad se combinaron para cada planta los resultados obtenidos en el análisis fenotípico (WT y M) y en el análisis del número de insertos (Kan^R y Kan^S). De esta forma, si se detectaba un individuo mutante que era susceptible a la kanamicina se podía afirmar que no existía cosegregación entre dicho fenotipo mutante y ningún inserto de T-DNA con el gen *nptII* funcional. Por el contrario, si todos los individuos mutantes compartían resistencia a la kanamicina no había motivos para dudar de que existiera cosegregación entre dicho fenotipo mutante y algún inserto de T-DNA con el gen *nptII* funcional con cierta probabilidad de fallo.

3.5.4 Tratamiento estadístico de los datos. Test χ^2

El análisis de los datos observados frente a los esperados en el análisis genético se evaluó con el test χ^2 . Este test permitió saber si un conjunto de datos obtenido se ajustaba a la distribución de datos esperados para cada una de las segregaciones planteadas en cada experimento. En este test se asume que el modelo es adecuado cuando la probabilidad de fallo es menor del 5%. Además, con la finalidad de poder acumular datos obtenidos en diferentes experimentos de la misma línea se realizó el test de homogeneidad de χ^2 el cual permitió elucidar si existían diferencias significativas entre los experimentos realizados y, como consecuencia, poder o no analizarlos como un conjunto de datos único.

4. RESULTADOS

Como consecuencia del análisis fenotípico de 33 líneas T-DNA de *S. lycopersicum* cv. *Money Maker* sin información previa se encontró en la línea 2646 ET MM un mutante afectado en el desarrollo radicular. Además, como resultado del análisis de siete líneas candidatas previamente identificados en nuestro grupo por haber detectado alguna alteración en el desarrollo vegetativo de la parte aérea, se presentan los resultados obtenidos en otras dos líneas T-DNA, la 2751 ET MM y la 2118 ET MM, que presentaron un desarrollo más compacto en su parte aérea. A continuación se detallan de forma específica los resultados más relevantes de estas tres líneas T-DNA obtenidos durante la caracterización fenotípica y genética realizada en el presente trabajo final de grado.

4.1. 2646 ET MM. Mutante de enraizamiento

El material vegetal de partida fueron semillas TG2. El fenotipo de este mutante fue fácilmente observable en los primeros estadios del desarrollo y se mantuvo a lo largo de su cultivo *in vitro* además de reproducirse en condiciones de cultivo *in vivo*. Su detección se produjo gracias a la observación de plántulas tras 7 días de cultivo en medio de germinación MG. A simple vista, se observaron plántulas mutantes (M) de menor tamaño que las Wild Type (WT) y con una velocidad de desarrollo menor. En ese momento ya se observaba el desarrollo de las primeras hojas en el WT pero no así en el mutante. Además, la raíz embrionaria también tenía alteraciones importantes, aunque la longitud no parecía afectada, se observó la menor formación de raíces secundarias en comparación con las plántulas WT (Figura 7).

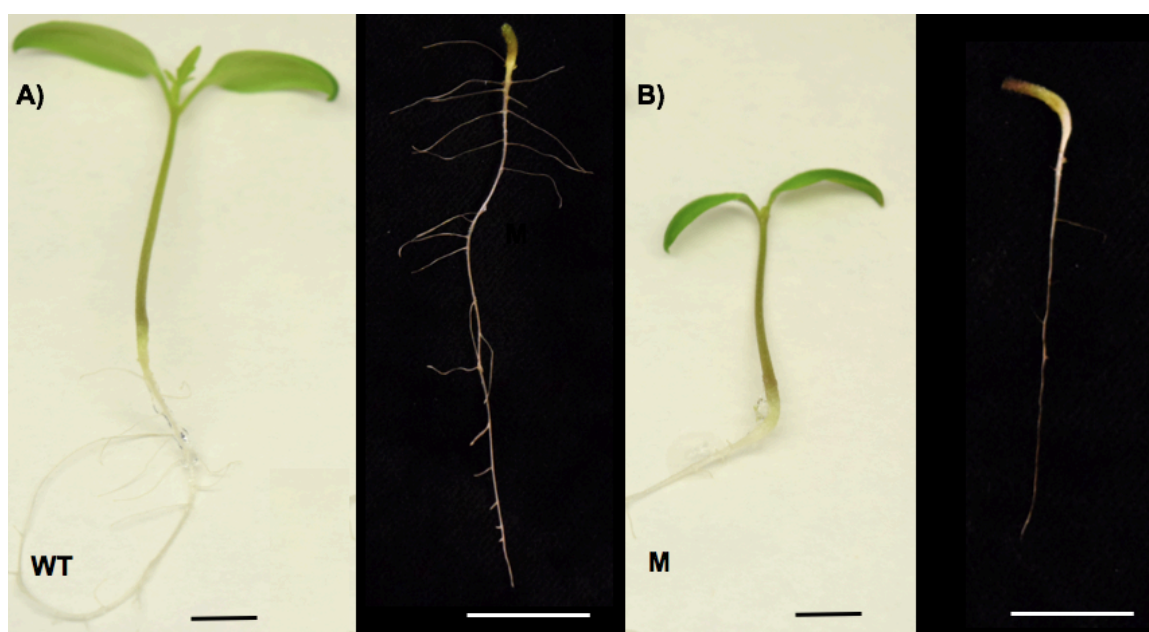


Figura 7 Comparación fenotípica en estado de plántula tras 7 días de cultivo en MG de la línea 2646 ET MM. A) Plántula y detalle de raíz WT. B) Plántula y detalle de raíz M. Las barras representan 1 cm.

Tras la realización del subcultivo de los ápices meristemáticos a medio básico MB3, se corroboró el fenotipo observado anteriormente en los individuos mutantes. Se observó que el crecimiento de la parte aérea además del enraizamiento adventicio estaban igualmente alterados en todo el periodo de cultivo. El mutante producía un menor número de raíces adventicias y éstas formaban un menor número de raíces secundarias. Además, la parte aérea del mutante se desarrolló mucho menos que la de las plantas WT, produciendo un menor número de hojas y una menor longitud total (Figura 8A). Al comparar con más detalle los sistemas radiculares se comprobó como el mutante sólo iniciaba la formación de raíces secundarias cuando las raíces primarias habían alcanzado cierto tamaño. Por el contrario, las raíces WT comenzaban a formar raíces secundarias desde una etapa anterior (Figura 8B).

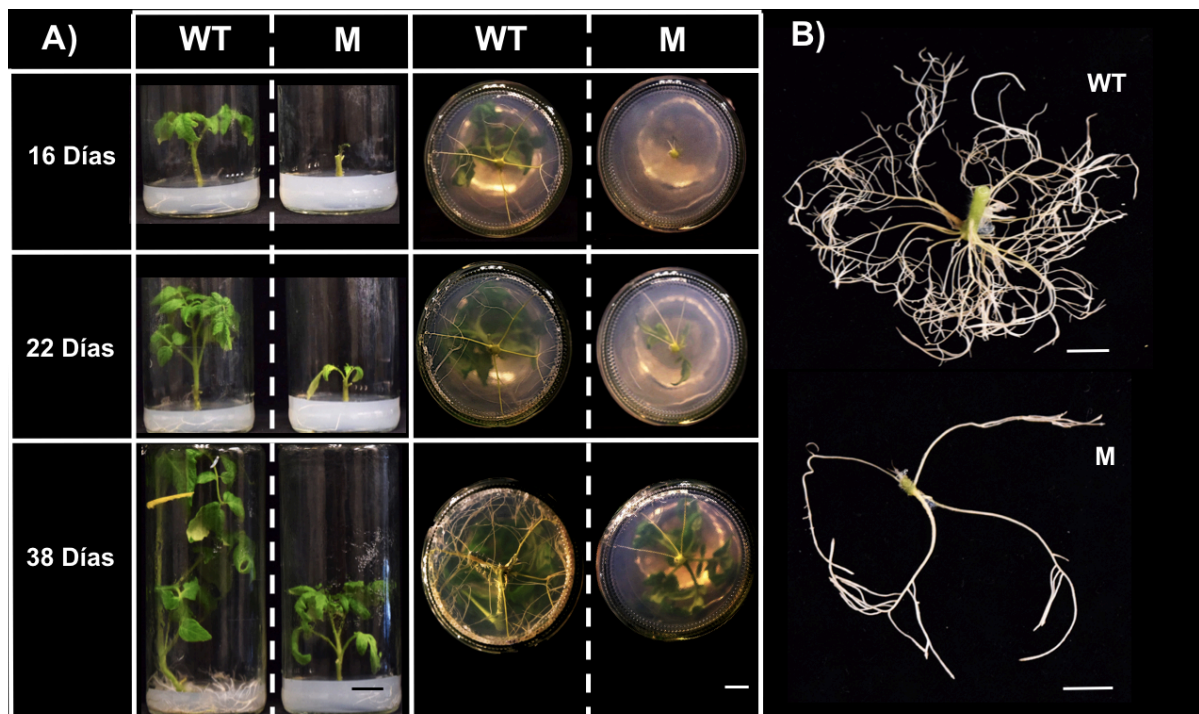


Figura 8 Fenotipo en planta axénica de la línea 2646 ET MM. A) Seguimiento del crecimiento de la parte aérea y el Sistema radicular a los 16, 22 y 38 días de cultivo en MB3. B) Detalle del sistema radicular de un individuo WT y uno M a los 38 días de cultivo. Las barras representan 1 cm.

Con la finalidad de corroborar la consistencia fenotípica de esta mutación en condiciones de cultivo *in vivo* se sembró un semillero de 24 individuos TG2 en el invernadero. Se puso de manifiesto que las observaciones previas *in vitro* se reproducían también en estas condiciones de cultivo (Figura 9).

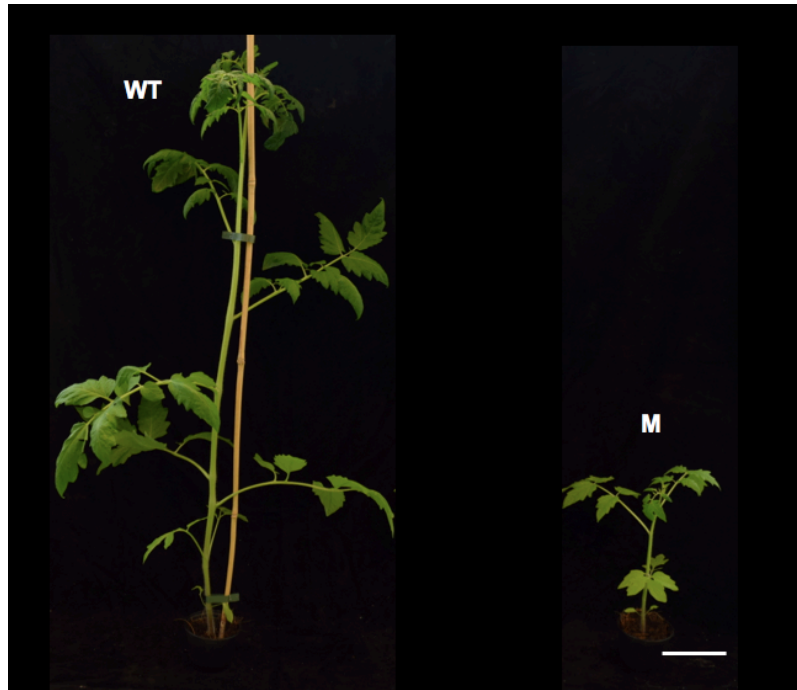


Figura 9 Fenotipo en condiciones de cultivo *in vivo* de la línea 2646 ET MM después de 35 días de cultivo en el invernadero. La barra representa 10 cm.

Tras este experimento se mantuvieron varios individuos WT y M en el invernadero con la finalidad de obtener progenie TG3 y poder seguir realizando nuevos análisis.

4.1.1 Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante

Se analizaron un total de 112 individuos TG2 en tres experimentos independientes, dos de éstos en condiciones de cultivo *in vitro* y el otro en condiciones de cultivo *in vivo*. Los datos fenotípicos indicaron que en condiciones de cultivo *in vitro* la segregación del fenotipo se ajustó perfectamente a una mutación monogénica recesiva. Sin embargo, en condiciones *in vivo* esto no ocurre y debido al bajo número de individuos M observados en este experimento. Aunque según el resultado obtenido con la χ^2 de homogeneidad los resultados de los tres experimentos se podían analizar conjuntamente, los datos acumulados indicaron que el modo de herencia no se ajustaba a una mutación monogénica recesiva (Tabla 3).

En estos casos lo más probable es que aunque la mutación sea monogénica recesiva exista cierto grado de subletalidad asociada a la mutación. Eso explicaría el menor número de individuos mutantes de lo esperado observado en los tres experimentos. Además, en este tipo de fenómenos, observados previamente en otros mutantes de nuestro grupo, lo esperable es que esa subletalidad afecte a más individuos en un experimento *in vivo* donde las condiciones de crecimiento son más exigentes para la planta.

Tabla 3 Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante de la línea 2646 ET MM ($P > 0,05$; $\chi^2_{1\text{g.l.}} = 3,84$)

	Segregación	WT	M	Total	χ^2
Experimento <i>in vitro</i> 1	Observada	22	2	24	3,56
	Esperada (3:1)	18	6		
Experimento <i>in vitro</i> 2	Observada	34	7	41	1,37
	Esperada (3:1)	30,75	10,25		
Experimento <i>in vivo</i>	Observada	44	3	47	8,69
	Esperada (3:1)	35,25	11,75		
Datos acumulados^a	Observada	100	12	112	12,19
	Esperada (3:1)	84	28		

^a Análisis χ^2 homogeneidad ($\chi^2_{\text{H}} = 1,43$;) indica que las muestras son homogéneas ($P > 0,05$; $\chi^2_{2\text{g.l.}} = 5,99$)

4.1.2 Análisis genético del número de insertos T-DNA

El análisis de resistencia a la kanamicina realizado con explantes de los experimentos 1 y 2 indicaron que las 65 plantas analizadas eran sensibles a la kanamicina. Esto puede tener diferentes explicaciones. La primera es que la planta TG1 original no portara ningún T-DNA con el gen *nptII* funcional. Esto sería muy improbable ya que el proceso de regeneración de plantas transgénicas se realizó utilizando en todas las etapas de regeneración kanamicina en el medio para evitar la aparición de este tipo de escapes. La otra explicación es que se hayan producido un fenómeno de silenciamiento por, por ejemplo, la integración de un número anormalmente elevado de copias de T-DNA. Para profundizar sobre estas cuestiones lo que se va a hacer es analizar molecularmente estas plantas para ver de esta forma si se detecta algún T-DNA presente en esta línea

4.1.3 Análisis de cosegregación fenotipo – inserto T-DNA

En este caso no se pudo abordar este apartado hasta averiguar mediante técnicas de biología molecular, como PCR o Southern, si esta línea porta o no algún inserto de T-DNA.

4.2 2751 ET MM. Mutante compacto

En este trabajo, además de identificar nuevos mutantes mediante el escrutinio de una pequeña colección de líneas T-DNA que no se habían analizado previamente, también se ha llevado a cabo la tarea de confirmar la naturaleza mutante de líneas en las que se había observado algún tipo de alteración pero con la que se había dejado de trabajar. En este contexto, tras la evaluación de siete de estos mutantes preseleccionados, se han confirmado y caracterizado dos líneas, la 2751 ET MM y la 2118 ET MM. A continuación se muestran los resultados obtenidos en la primera de estas líneas.

La detección de este fenotipo mutante se realizó *in vitro* en el estado de plántula. Las alteraciones fenotípicas se mantuvieron a lo largo de todos los subcultivos y cultivos *in vivo*. La primera observación se produjo a los 7 días del cultivo de semillas TG2 en medio de germinación MG. Se detectaron plántulas M de tamaño muy reducido en comparación con las WT. En este caso no se detectaron diferencias significativas entre las raíces embrionarias de ambos fenotipos (Figura 10).



Figura 10 Fenotipo en estado de plántula tras 7 días de cultivo en medio MG de la línea 2751 ET MM. La barra representa 1 cm.

Seguidamente se subcultivaron los ápices meristemáticos en MB3. Tras 20 días de cultivo se observó que el fenotipo compacto en planta axénica coincidía con los datos obtenidos anteriormente. Las plantas mutantes presentaban un menor crecimiento y el tamaño de los entrenudos era menor en comparación con los individuos WT. Su sistema radicular adventicio, al igual que ocurría con el embrionario, tampoco mostraba diferencias significativas respecto del WT (Figura 11).



Figura 11 Fenotipo en planta axénica tras 20 días en medio básico MB3 de la línea 2751 ET MM. La barra representa 1 cm.

En este mutante se disponía de muy poco material de partida por lo que se intentó aclimatar el material obtenido *in vitro* para poder evaluarlo también *in vivo*. Además, aunque *in vitro* no se pudo determinar con total seguridad el fenotipo de algún individuo, al llevarlo al invernadero se pudo adscribir sin ninguna duda a la categoría de WT o M todos los individuos. En estas condiciones las plantas M eran claramente compactas, de un tamaño reducido y con entrenudos más cortos que el WT. Además, presentaron hojas que tenían un cierto enrollamiento (Figura 12).



Figura 12 Fenotipo tras 60 días de cultivo en el invernadero de plantas aclimatadas de la línea 2751 ET MM. La barra representa 10 cm.

4.2.1 Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante

Debido a la escasez de material vegetal, el análisis del modo de herencia se realizó con 15 individuos TG2 en un único experimento. Los datos fenotípicos obtenidos *in vitro* se corroboraron *in vivo* para estar seguros de que la adscripción fenotípica de cada planta se realizaba correctamente. En este caso se observaron dos plantas mutantes. Según el análisis estadístico (Tabla 4), esta mutación se ajusta a una herencia monogénica recesiva. Al no disponer de más material vegetal, no se pudo aumentar el tamaño poblacional para una mayor consistencia de los datos.

Tabla 4 Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante de la línea 2751 ET MM ($P > 0,05$; $\chi^2_{1\text{g.l.}} = 3,84$)

	Segregación	WT	M	Total	χ^2
Experimento 1	Observada	13	2	15	1,09
	Esperada (3:1)	11,25	3,75		

4.2.2 Análisis genético del número de insertos T-DNA

Con la finalidad de determinar la resistencia a la kanamicina de los individuos de esta línea se subcultivaron yemas axilares de todos los individuos en medio de cultivo β y se evaluó la capacidad de enraizamiento de dichos explantes. El resultado fue que las 15 plantas eran resistentes a la kanamicina. El análisis estadístico nos indicó que esta línea cuenta con 2 o más insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional (Tabla 5). Hasta disponer de nuevo material vegetal no se podrá determinar con mayor exactitud la cantidad exacta de insertos integrados en esta línea.

Tabla 5 Análisis genético del número de insertos de T-DNA de la línea 2751 ET MM ($P > 0,05$; $\chi^2_{1\text{g.l.}} = 3,84$)

	Segregación	Kan ^R	Kan ^S	Total	χ^2
Experimento 1	Observada	15	0	15	5,00
	Esperada (3:1)	11,25	3,75		
	Esperada (15:1)	14,06	0,94		

4.2.3 Análisis de cosegregación fenotipo – inserto de T-DNA

Con los datos disponibles no es posible descartar la cosegregación entre el fenotipo mutante y un inserto de T-DNA con el gen *nptII* funcional ya que todas las plantas eran resistentes, incluidos los dos mutantes. Esperamos disponer de nuevo material TG3 en breve para poder seguir analizando este aspecto.

4.3. 2118 ET MM. Mutante compacto

Este mutante que, como el caso anterior, se había preseleccionado por observaciones previas, resultó tener un fenotipo compacto. Esta alteración se detectó en estado de plántula obtenida a partir de semillas TG3. La alteración fenotípica se mantuvo y acentuó a lo largo del cultivo *in vitro* además de confirmarse en el cultivo *in vivo*. Las primeras plántulas mutantes se detectaron tras 7 días de cultivo de las semillas en medio de germinación MG. Las plántulas M presentaban un menor tamaño que las WT, mostrando una velocidad de crecimiento reducida, ya que no mostraban las primeras hojas, visibles en plántulas WT. Como en el mutante anterior, no se apreciaron diferencias significativas en el desarrollo de la raíz embrionaria (Figura 13).



Figura 13 Fenotipo en estado de plántula tras 7 días de cultivo en medio MG de la línea 2118 ET MM. La barra representa 1 cm.

Tras el cultivo de los ápices meristemáticos en medio MB3 el fenotipo pudo corroborarse, ya que las plantas M mostraron un menor tamaño que las WT. Además, desde las primeras etapas del desarrollo de la plantas axénica se observó como sus entrenudos eran más cortos y presentaban un mayor número de hojas (Figura 14).

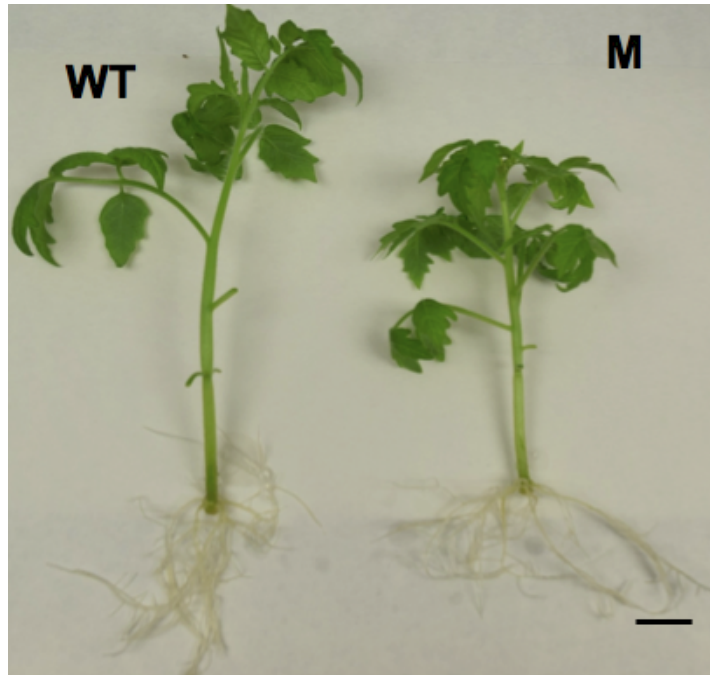


Figura 14 Fenotipo en planta axénica tras 20 días en medio básico MB3 de la línea 2751 ET MM. La barra representa 1 cm.

Por último, en condiciones de cultivo *in vivo* se vieron las mismas alteraciones que *in vitro*. La plántula M era de menor tamaño que la WT y sus hojas tardaron más en emerger (Figura 15A). Además, en etapas más avanzadas de su desarrollo la compacidad de las plantas mutantes era perfectamente visible. Las hojas, en este caso, eran de menor tamaño que el WT (Figura 15B).

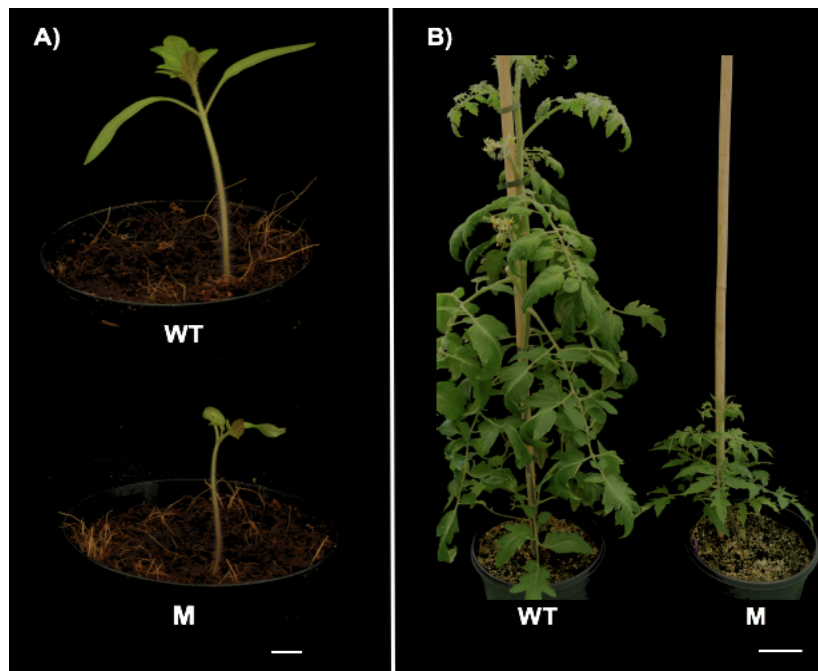


Figura 15 Fenotipo *in vivo* de la línea 2118. A) Tras 10 días de cultivo. B) Tras 60 días de cultivo. Las barras representan 1cm (A) y 10 cm (B).

4.3.1 Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante

Al no disponer de semillas TG2 viables este mutante se tuvo que estudiar a partir del cultivo de semillas TG3 procedentes de plantas WT. En estos casos, como no se sabía la naturaleza genética de estas líneas, es decir, si procedían de una planta hemicigota o acigota para la mutación, se tuvo que analizar varias familias TG3 para poder identificar aquellas con algunas plantas de fenotipo mutante. En total se analizaron cinco familias TG3. En dos de ellas no se observó ninguna planta con fenotipo mutante. Por tanto, suponemos que éstas provienen de plantas TG2 acigotas para la mutación. Por otra parte, se evaluaron un total de 108 plantas correspondientes a 3 familias TG3 en las cuales se comprobó la presencia de plantas mutantes (2118-1 ET MM, 2118-2 ET MM y 2118-3 ET MM). En total se realizaron cuatro experimentos, tres de ellos en condiciones *in vitro* con las tres líneas TG3 antes mencionadas y otro en el invernadero con la línea 2118-2 ET MM. Tres de los cuatro experimentos se ajustaron a la segregación esperada para una mutación monogénica recesiva, mientras que el cuarto no lo hizo. Aunque se pueden acumular los datos obtenidos en los cuatro experimentos, al final la segregación no se ajusta a la hipótesis de partida por haber menos individuos mutantes de los esperados (Tabla 6).

Tabla 6 Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante de la línea 2118 ET MM ($P > 0,05$; $\chi^2_{1 g.l.} = 3,84$)

	Segregación	WT	M	Total	χ^2
Experimento <i>in vitro</i> 1 (2118-1)	Observada	25	3	28	3,05
	Esperada (3:1)	21	7		
Experimento <i>in vitro</i> 2 (2118-2)	Observada	29	6	35	1,37
	Esperada (3:1)	26,25	8,75		
Experimento <i>in vitro</i> 3 (2118-3)	Observada	25	1	26	6,21
	Esperada (3:1)	35,25	11,75		
Experimento <i>in vivo</i> (2118-2)	Observada	16	3	19	0,86
	Esperada (3:1)	14,25	4,75		
Datos acumulados ^a	Observada	95	13	108	9,68
	Esperada (3:1)	81	27		

^a Análisis χ^2 homogeneidad ($\chi^2_H = 1,59$) indica que las muestras son homogéneas ($P > 0,05$; $\chi^2_{3 g.l.} = 7,82$)

Como ocurrió en el primer mutante presentado en este trabajo, la explicación más sencilla para esta desviación respecto de los datos esperados es un fenómeno de subletalidad asociado al fenotipo mutante. Esperamos poder confirmar este punto analizando más material vegetal obtenido recientemente.

4.3.2 Análisis genético del número de insertos T-DNA

En los casos en los que no se disponía de la línea TG2 para evaluar el número de insertos no se puede llegar a saber con total seguridad esta información. Cuando se analizan familias TG3 se puede

averiguar el número de insertos que al menos tenía la línea porque los que en esa familia hayan quedado en acigosis no será posible detectarlos. En estos casos lo que se pretende no es tanto conocer el número de insertos de la línea sino identificar alguna familia TG3 que segregue para el fenotipo mutante y que segregue también para uno o, si no es posible, dos insertos de T-DNA. De esta forma tendríamos una familia similar a una TG2 con la que realizar los análisis de cosegregación.

En esta línea se han analizado tres familias TG3. En dos de ellas todas las plantas evaluadas resultaron ser resistentes a la kanamicina. Esto se podría explicar por la presencia de varios insertos en hemicigosis o de al menos un inserto en homocigosis. Por suerte, se encontró una familia, la 2188-2 ET MM, con una segregación que se ajustaba a la presencia de un único inserto de T-DNA con el gen *nptII* funcional (Tabla 7).

Tabla 7 Análisis genético del número de insertos de T-DNA de la línea 2118-2 ET MM ($P > 0,05$; $\chi^2_{1g.l.} = 3,84$)

	Segregación	Kan ^R	Kan ^S	Total	χ^2
Experimento 1	Observada	28	7	35	0,47
	Esperada (3:1)	26,25	8,75		

4.3.3 Análisis de cosegregación fenotipo – inserto de T-DNA.

Con los datos sobre la expresión del gen *nptII* y las observaciones fenotípicas realizadas en la familia 2118-2 ET MM, no se puede descartar la existencia de cosegregación entre el fenotipo mutante y el inserto de T-DNA con el gen *nptII* funcional presente en dicha familia ya que ningún individuo mutante presentaba susceptibilidad a la kanamicina (Tabla 8).

Tabla 8 Análisis de la cosegregación fenotipo - inserto T-DNA de la familia 2118-2 ET MM ($P > 0,05$; $\chi^2_{2g.l.} = 5,99$)

Segregación	Kan ^R		Kan ^S		Total	χ^2
	WT	M	WT	M		
Observada	22	7	6	0	35	2,37
Esperada	17,5	8,75	8,75	0		

En este caso la hipótesis sería que las plantas se distribuyeron con una segregación 2:1:1. 50% de plantas WT – Kan^R, hemicigóticas para el T-DNA; 25% de plantas M – Kan^R, homocigóticas para el T-DNA; 25% de plantas WT – Kan^S, acigóticas para el T-DNA. Al ajustar la segregación observada con el test de χ^2 no hay motivos para dudar de que se ajusta a dicha hipótesis. Por tanto, en este mutante se

van a seguir cultivando plantas de esta TG3 hasta llegar a obtener una probabilidad de fallo menor del 5% para comenzar a abordar la clonación del gen supuestamente etiquetado mediante técnicas de Anchor-PCR.

5. DISCUSIÓN

5.1 Identificación de líneas T-DNA mutantes para caracteres del desarrollo temprano

Mediante técnicas de mutagénesis insercional con T-DNA nuestro grupo ha sido capaz de generar más de 3000 líneas T-DNA de *S. lycopersicum* así como otras 3500 líneas de algunas especies silvestres relacionadas como *S. pimpinellifolium*, *S. pennellii* y *S. galapagense*. La finalidad de esta generación en masa de líneas transgénicas es la identificación de mutantes para la posterior clonación de los genes afectados y etiquetados por el T-DNA. Este primer paso no podría haberse realizado sin técnicas eficientes de transformación genética para las especies implicadas. La eficiencia de un protocolo de transformación va en consonancia con el número de plantas diploides que se obtienen mediante eventos de transformación independiente. En nuestro grupo, se ha alcanzado una eficacia útil de transformación en el tomate de 20-25%, indicando que por cada 100 explantes se obtienen de 20 a 25 plantas diploides transgénicas. En alguna de las especies silvestres que también han sido incluidas en este programa por su interés para identificar genes relacionados con la tolerancia a estreses abióticos esta eficacia ha llegado a superar el 100%.

El principal problema que se afronta al analizar estas líneas T-DNA es la gran cantidad de material vegetal que hay que manejar para poder detectar las líneas mutantes de naturaleza recesiva. Las líneas con este tipo de mutaciones sólo presentan alteraciones en el 25% de la población TG2, por lo que para detectar un mutante con una probabilidad de fallo menor al 5%, hace falta cultivar como mínimo 12 plantas TG2 por línea. Debido a esto, es necesario trabajar minimizando el gasto de tiempo, recursos y espacio. En este contexto el cultivo *in vitro* muestra una gran ventaja respecto al cultivo convencional para realizar escrutinios de grandes poblaciones mutagenizadas ya que es posible cultivar muchos individuos en poco tiempo, en un espacio muy reducido y con un control exhaustivo de las condiciones ambientales en las que se cultivan las plantas. Además, este tipo de cultivo nos permite multiplicar y mantener genotipos mutantes de interés para caracterizarlos mejor fenotípicamente o para realizar ensayos que necesitan de repeticiones. Otra característica muy importante de este tipo de análisis es la posibilidad de detectar mutaciones que en condiciones de cultivo normales pasarían desapercibidas, bien por acarrear en muchos casos una letalidad temprana y no poder verse fácilmente en condiciones de cultivo en invernadero (clorosis o albinismo) o por ser difícilmente detectables por la opacidad de los sustratos empleados (alteraciones radiculares). Gracias al empleo de las técnicas de cultivo *in vitro* se pueden identificar y caracterizar mucho mejor mutaciones que afectan a la viabilidad de las plantas en etapas tempranas del desarrollo y, sobre todo, permite la visualización continua del desarrollo radicular, uno de los aspectos en los que más se está investigando dada la importancia de este órgano en el desarrollo final de la planta.

En cuanto a la eficacia de detección de mutantes entre las líneas mutagenizadas, en este trabajo se ha utilizado el cultivo *in vitro* con la finalidad de identificar nuevos mutantes de *S. lycopersicum* var. *Money Maker*. Se han analizado 33 líneas de T-DNA y se ha encontrado un nuevo mutante, lo cual supone el 3,3% del total. Este dato es algo menor que la tasa de identificación de mutantes entre las líneas mutagenizadas del programa que es algo superior al 10 %. Sin embargo, hay que tener en cuenta que este porcentaje se ha conseguido mediante el abordaje de diferentes métodos de escrutinio (*in vitro*, en invernadero, aplicando estrés salino, etc.). En el caso de este trabajo, debido a los plazos que había que cumplir, sólo se ha llevado a cabo el escrutinio por uno de esos métodos, el cultivo *in vitro*. Por tanto, es lógico que la cantidad de mutantes identificados se algo menos a ese porcentaje general. En definitiva, en este trabajo se puede considerar adecuada la eficacia de identificación de nuevos mutantes con el método utilizado.

5.2 Modo de herencia del fenotipo mutante

En este trabajo se ha presentado la caracterización fenotípica y genética de tres mutantes. Los tres tiene una naturaleza monogénica recesiva y en dos de ellos se ha observado cierta subletalidad. En el conjunto de mutantes analizados en el programa de mutagénesis el porcentaje de mutantes dominantes es inferior al 10%. En otras especies se han reportado resultados similares. Así, en otro programa de mutagénesis insercional en *Arabidopsis* donde se analizaron este tipo de características se menciona que los mutantes de naturaleza recesiva constituyeron un 94% del total (Bernà *et al.*, 1999).

Por otra parte, en algunos experimentos realizados se observó como el número de plantas mutantes contabilizadas era menor que el esperado. Este fenómeno de subletalidad se ha observado no sólo en estos mutantes sino en otros muchos evaluados en nuestro grupo. En muchos casos este fenómeno es fácilmente explicable por los efectos que puede tener la mutación en las etapas de crecimiento temprano de las plántulas. Por ejemplo, si la mutación afecta al desarrollo de la raíz embrionaria, no sería extraño que algunas plantas mutantes no lleguen siquiera a poder iniciar su germinación debido a dicha alteración. Pero no sólo eso, si la mutación afectara a la formación del polen o el óvulo el efecto sería similar ya que los gametos portadores de la mutación tendrían menos probabilidad de dar un nuevo individuo. En algunos casos se ha visto que este fenómeno puede variar con el estado del material vegetal. Así, lotes de semillas envejecidas podrían mostrar una mayor incidencia de este problema mientras que en lotes de semillas obtenidos más recientemente el problema disminuiría o desaparecería. Por tanto, en estos casos es muy importante disponer de semillas recién obtenidas para poder confirmar dicho fenómeno y poder estudiarlo en profundidad.

5.3 Número de insertos T-DNA

En cuanto al número de insertos con el gen *nptII* funcional en el programa de mutagénesis el número medio de insertos con el gen *nptII* funcional por línea se encuentra en 1,7. Nosotros consideramos que este número es adecuado ya que tener líneas con un elevado número de insertos dificultaría las labores de identificación del gen responsable de la mutación observada. En este trabajo, se han encontrado tres casos totalmente diferentes entre los mutantes analizados.

En el caso de la línea 2646 ET MM, todas las plantas mostraron sensibilidad a la kanamicina. Como ya se ha comentado, es posible que esto se deba a una inserción parcial del T-DNA y que como consecuencia el gen *nptII* no se haya integrado o no sea funcional. Aunque esto es muy poco probable por el método de obtención de las plantas transgénicas, para determinar si se ha producido alguno de estos eventos sería necesario realizar un análisis molecular de las plantas sensibles. Un posible abordaje sería realizar diferentes PCRs's cuyas combinaciones de cebadores abarcaran diferentes secuencias del T-DNA y del cuerpo del vector. Si los resultados de este análisis fueran negativos, es posible que se trate de un variante somaclonal asociada al cultivo *in vitro*. Sin embargo, se podrían estudiar otras posibilidades si el resultado fuera que si hay un T-DNA en la línea analizada y que éste está completo. En ese caso habría que buscar una explicación a la ausencia de resistencia al antibiótico. La primera explicación podría buscarse en los fenómenos de silenciamiento que se pueden activar cuando una células expresa un gen en exceso. En nuestro caso, la inserción de múltiples copias de T-DNA podría disparar los mecanismos de silenciamiento génico post-transcripcional y producir que las plantas portadoras de todos esos insertos fueran sensibles a la kanamicina. Una explicación alternativa es que mediante un proceso de paramutación del gen *nptII* aunque la planta porte dicho gen no sea capaz de expresarlo y, por tanto, muestre una sensibilidad a la kanamicina propia de las plantas que no lo han integrado.

En el caso de la línea 2751 ET MM no se ha identificado ninguna planta sensible a la kanamicina entre las semillas TG2 disponibles. Por lo visto hasta ahora es una línea que porta dos o más insertos. Para saber el número de insertos se podría hacer un mezcla con muestras de plantas TG2 y usarlo para realizar un Southern. Sin embargo, nuestro interés por saber el número de insertos de T-DNA no es finalista sino que se hace para poder llevar a cabo el establecimiento o no de la cosegregación con el fenotipo mutante. En este contexto, lo más directo sería obtener familias TG3 y, como se ha hecho en el caso de la línea 2118 ET MM buscar alguna que segregue para el fenotipo mutante y que segregue también para uno o dos insertos de T-DNA con el gen *nptII* funcional. De esta forma esa TG3 se podría utilizar como material para determinar si existe dicha cosegregación.

Por último, en el mutante 2118 ET MM aunque no se puede saber cuál era el número de insertos que portaba la planta TG1 original sí que se ha detectado una familia TG3 en la que la resistencia a la kanamicina segrega para un inserto de T-DNA con el gen *nptII* funcional.

5.4 Cosegregación entre un inserto de T-DNA y el fenotipo mutante

En ninguno de los tres mutantes estudiados se puede descartar la posibilidad de que exista cosegregación. Hay que tener en cuenta que nunca se puede estar totalmente seguro de la existencia de cosegregación ya que siempre cabe una mínima posibilidad de que aparezca alguna planta mutante sensible a la kanamicina. Por tanto, lo que se pretende es llegar a tener una cierta seguridad (probabilidad de fallo menor del 5%) de que existe dicha cosegregación.

En el caso de la línea 2646 ET MM todavía no estamos en disposición de realizar este estudio. En el caso de las otras dos líneas, 2751 ET MM y 2118 ET MM, la problemática es similar, aunque no se ha descartado la existencia de cosegregación son necesarios más experimentos para llegar a ese 5% de probabilidad de fallo que nos hemos marcado como límite para considerar que existe cosegregación.

En el programa de mutagénesis insercional de nuestro grupo el porcentaje de líneas mutantes cuyo fenotipo mutante cosegregaba con un inserto de T-DNA con el gen *nptII* funcional es algo inferior al 15%. Este porcentaje es difícilmente comparable con el que aparece en otros trabajos con otras especies porque las metodologías no son las mismas. Sin embargo, es un porcentaje que se ha mantenido constante desde el inicio del proyecto en el que ya se han analizado más de 300 líneas para evaluar si existe cosegregación.

A pesar del bajo porcentaje de líneas T-DNA que presentaron cosegregación es importante llevar a cabo este análisis por la diferencia tan grande que hay entre poder abordar la clonación de un gen mediante técnicas como el Anchor-PCR y el tener que llevar a cabo su clonación mediante mapeo por secuenciación. En el primer caso sólo son necesarias unas pocas semanas y llevar a cabo varias PCR para poder clonar el gen etiquetado. Sin embargo, cuando no existe cosegregación habría que realizar cruces de individuos mutantes sensibles con *S. pimpinellifolium* con la finalidad de obtener progenie F2 con individuos M y WT y realizar mapeo por secuenciación en busca de regiones genómicas diferenciales causantes de la mutación. En definitiva, en este segundo caso es necesaria una mayor cantidad tanto de trabajo como de tiempo para lograr averiguar cuál es el gen alterado.

En cuanto a los procedimientos a seguir para clonar el gen responsable, en el caso de que la línea 2118 ET MM presente una probabilidad de fallo menor del 5%, sería realizar lo que se conoce como Anchor-PCR. En esta PCR los cebadores están diseñados para ampliar a partir de los RB y LB del T-DNA hacia el ADN genómico. De esta forma al secuenciar los fragmentos amplificados se puede conocer el punto exacto del genoma en el que se ha integrado el T-DNA.

5.4 Mutantes de enraizamiento

El sistema radicular de una planta es muy importante para su desarrollo ya que se encarga de la absorción de nutrientes y agua, actúa como órgano de reserva de algunas sustancias y constituye la interfaz entre la parte aérea y multitud de factores bióticos (patógenos) y abióticos (salinidad, sequía...) del suelo. Por lo que identificar y analizar genes que estén implicados en la arquitectura y función radicular puede ayudarnos a comprender y manipular las características de las raíces con la finalidad de obtener organismos más productivos (Den Herder *et al.*, 2010).

La línea 2646 ET MM es un mutante afectado en el sistema radicular, tanto el embrionario como el adventicio. En este caso se ha llegado a su identificación y a su caracterización básica. Existen una serie de evaluaciones fenotípicas que se realizan normalmente en este tipo de mutantes y sería necesario llevar a cabo para caracterizar mejor la alteración presente en estos mutantes. Primero, se evalúa el fenotipo cuando se cultivan explantes de ápices meristemáticos en medios con diferentes concentraciones de hormonas, con la finalidad de elucidar si la deficiencia en el enraizamiento se puede suplir con alguna de estas. También se caracteriza la concentración hormonal endógena de individuos M y WT con la finalidad de encontrar diferencias significativas. Las hormonas a tener en cuenta para estos procedimientos son principalmente las auxinas y también el etileno. Por una parte, las auxinas han demostrado jugar un papel regulatorio positivo en la formación de raíces secundarias y adventicias en la mayoría de las especies. En tomate se ha caracterizado el efecto positivo en el enraizamiento tanto secundario (Ivanchenko *et al.*, 2006) como adventicio (Tyburski y Tretyn, 2004). En cuanto al etileno, mutantes deficientes en receptores de etileno, descritos en tomate como *nr* (never ripe) o *nor* (non-ripening), muestran un mayor vigor en el enraizamiento. Mientras que mutantes contrarios, como es el caso de *epi* (epinastic), con hipersensibilidad al etileno, muestran un menor desarrollo radicular (Negi *et al.*, 2010).

Además de tener en cuenta los niveles hormonales, se deberían realizar injertos con todas las combinaciones de parte aérea y patrón entre individuos M y WT posibles, para determinar qué parte o partes de la planta dan lugar a este fenotipo mutante. Por último, se realizarían cortes histológicos

para monitorizar la expresión del patrón GUS con la finalidad de determinar el patrón de expresión espacio-temporal del gen afectado. Para realizar esta última técnica en la línea 2646 ET MM, deberíamos primero realizar el análisis de la integridad del T-DNA porque si no se encuentra el gen delador cerca del gen afectado no habría resultados de este ensayo.

5.5 Mutantes compactos

En el contexto fenotípico compacto se han identificado dos líneas mutantes, la línea 2118 ET MM y la 2751 ET MM. Se ha realizado una primera aproximación fenotípica y se han clasificado en esta categoría porque el fenotipo mutante se caracteriza por contar con entrenudos más cortos, menor crecimiento y un mayor número de hojas. Los pasos a seguir para la caracterización más exhaustiva del fenotipo empiezan por elaborar un gráfico recogiendo los datos sobre los tamaños de los entrenudos, las alturas y el número de hojas, y en dos grupos, uno de M y otro de WT realizar comparaciones entre estos para determinar si las diferencias son estadísticamente significativas. Seguidamente con la intención de elucidar el mecanismo molecular subyacente a este fenotipo, una buena aproximación sería realizar un análisis hormonal endógeno y buscar diferencias significativas en alguna de las hormonas. Como en el caso de los mutantes de raíz sería conveniente realizar ensayos de crecimiento en medios con diferentes concentraciones de hormonas así como la realización de injertos. El motivo principal para realizar este tipo de análisis hormonales es porque se han descrito mutantes de este tipo en diferentes cultivos. Estos mutantes han resultado ser deficientes en reguladores del crecimiento. Por ejemplo, en tomate, mutantes para la síntesis de giberelinas (GA) mostraban menor tamaño de crecimiento (Xiao *et al.*, 2006). Otro grupo hormonal a tener en cuenta cuando se presentan estos fenotipos son los brasinosteroides (BR), ya que mutantes para la ruta biosintética de estos también han mostrado un fenotipo compacto. En el caso del tomate, un ejemplo es el mutante *dpy*. Estos mutantes tras ser suplementados exógenamente con BR revertían su fenotipo a WT (Koka *et al.*, 2000).

6. CONCLUSIONES

- ▶ Se han analizado un total de 40 líneas de T-DNA de tomate, 33 de ellas sin información fenotípica previa y 7 con algún indicio de exhibir un fenotipo mutante por observaciones previas de nuestro grupo. Se ha identificado un nuevo mutante en la línea 2646 ET MM. Además, se ha confirmado la presencia de mutaciones en dos de las líneas pre-seleccionadas: 2118 ET MM y 2751 ET MM.
- ▶ En las tres líneas se ha realizado la caracterización fenotípica en condiciones *in vitro* e *in vivo*. Además, se ha analizado el modo de herencia de la mutación así como el número de insertos de T-DNA y la existencia de cosegregación entre estas dos características.
- ▶ La 2646 ET MM presenta alteraciones en el enraizamiento secundario, tanto en la raíz embrionaria como en las raíces adventicias procedentes de ápices meristemáticos. Se trata, de una mutación monogénica recesiva con cierta subletalidad. Al no haber detectado ninguna planta resistente a la kanamicina no se ha podido inferir ni el número de insertos ni la existencia de cosegregación.
- ▶ Se han encontrado dos líneas, la 2751 ET MM y la 2118 ET MM con fenotipo compacto, es decir, un tamaño reducido y menor tamaño de los entrenudos.
- ▶ La línea 2751 ET MM muestra también ciertas alteraciones en el desarrollo de las hojas. Esta línea presenta una mutación monogénica recesiva y cuenta con más de un inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional. De momento no se descarta la existencia de cosegregación.
- ▶ La línea 2118 ET MM que tiene hojas de menor tamaño, presenta una mutación monogénica recesiva con cierta subletalidad. Al no disponer de semillas TG2 viables no se ha podido analizar el número de insertos T-DNA. Sin embargo se dispone de una familia TG3 que segrega para el fenotipo mutante y para un inserto de T-DNA en la que no se ha descartado la presencia de cosegregación entre estas dos características.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Ajenifujah-Solebo, S., N. Isu, O. Olorode and I. Ingelbrecht (2013). Effect of cultivar and explants type on tissue culture regeneration of three Nigerian cultivars of tomatoes. *Sustainable Agriculture Research*, 2, 58.
- Ashraf, M. and N. A. Akram (2009). Improving salinity tolerance of plants through conventional breeding and genetic engineering: an analytical comparison. *Biotechnology advances*, 27, 744-752.
- Atarés, A., E. Moyano, B. Morales, P. Schleicher, J. O. García-Abellán, T. Antón, B. García-Sogo, F. Perez-Martin, R. Lozano, F. B. Flores, V. Moreno, M. Carmen Bolarin and B. Pineda (2011). An insertional mutagenesis programme with an enhancer trap for the identification and tagging of genes involved in abiotic stress tolerance in the tomato wild-related species *Solanum pennellii*. *Plant Cell Reports*, 30, 1865-1879.
- Bauchet, G. and M. Causse (2012). Genetic diversity in tomato (*Solanum lycopersicum*) and its wild relatives. In: P. M. Caliskan (ed.), *Genetic Diversity in Plants*. InTech.
- Bergougnoux, V. (2014). The history of tomato: from domestication to biopharming. *Biotechnology advances*, 32, 170-189.
- Bernà, G., Robles, P. & Micol, J. (1999). A mutational analysis of leaf morphology in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, pp. 152:729-742.
- Blanca, J., Montero-Pau, J., Sauvage, C., Bauchet, G., Illa, E., Díez, M. J., Cañizares, J. (2015). Genomic variation in tomato, from wild ancestors to contemporary breeding accessions. *BMC Genomics*, 16(1), 257. Brar, D. S., & Khush, G. S. (1997). Alien introgression in rice. *Plant Molecular Biology*, 35, 35-47.
- De Vries, J., & Wackernagel, W. (1998). Detection of nptII (kanamycin resistance) genes in genomes of transgenic plants by marker-rescue transformation. *Molecular and General Genetics MGG*, 257(6), 606-613.
- Den Herder, G., Van Isterdael, G., Beeckman, T., & De Smet, I. (2010). The roots of a new green revolution. *Trends in plant science*, 15(11), 600-607.
- Dooner, H. K., & Belachew, A. (1989). Transposition Pattern of the Maize Element Ac from the Bz-M2(ac) Allele. *Genetics*, 122(2), 447-457.
- Evans, D. A., & Sharp, W. R. (1983). Single gene mutations in tomato plants regenerated from tissue culture. *Science*, 221(4614), 949-951.
- Foolad MR (2007). Genome mapping and molecular breeding of tomato. *Int J Plant Genomics* 64358:52. doi:10.1155/2007/64358.
- Foolad, M. R., & Panthee, D. R. (2012). Marker-assisted selection in tomato breeding. *Critical reviews in plant sciences*, 31(2), 93-123.

- Germanà, M. A. (2011). Another culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 104(3), 283–300.
- Gerszberg A., Hnatuszko-Konka K., Kowalczyk T., & Kononowicz A.K. (2015). Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the service of biotechnology. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 120(3), 881–902.
- Ivanchenko, M.G., Muday, G.K. and Dubrovsky, J.G. (2008). Ethylene-auxin interactions regulate lateral root initiation and emergence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 55, 335–347.
- Jacobs, T. B., Zhang, N., Patel, D., & Martin, G. B. (2017). Generation of a collection of mutant tomato lines using pooled CRISPR libraries. *Plant physiology*, pp-00489.
- Jeon, J. S., Lee, S., Jung, K. H., Jun, S. H., Jeong, D. H., Lee, J. & Nam, J. (2000). T-DNA insertional mutagenesis for functional genomics in rice. *The Plant Journal*, 22(6), 561-570.
- Koka, C. V., Cerny, R. E., Gardner, R. G., Noguchi, T., Fujioka, S., Takatsuto, S. & Clouse, S. D. (2000). A putative role for the tomato genes DUMPY and CURL-3 in brassinosteroid biosynthesis and response. *Plant physiology*, 122(1), 85-98.
- LanZhuang, C., & Adachi, T. (1996). Efficient hybridization between *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum* via 'embryo rescue' and in vitro propagation. *Plant Breeding*, 115(4), 251-256.
- Li, Y., M. G. Rosso, N. Strizhov, P. Viehoveer and B. Weisshaar (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.
- McClintock, B. (1950). The Origin and Behavior of Mutable *Loci* in Maize. *These PROCEEDINGS Am. J. Botany J. Genetics Nature Nature PROCEEDINGS*, 36(6), 344–355.
- Meissner, R., Chague, 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(3), 265-274.
- Menda, N., Y. Semel, D. Peled, Y. Eshed and D. Zamir (2004). In silico screening of a saturated mutation library of tomato. *The Plant Journal*, 38, 861-872.
- Murashige, T. & S. F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, Volumen 15(3), pp. 473-497.
- Nakazato, T. and E. A. Housworth (2011). Spatial genetics of wild tomato species reveals roles of the Andean geography on demographic history. *American journal of botany*, 98, 88- 98.
- Namitha, K. K., & Negi, P. S. (2013). Morphogenetic Potential of Tomato (*Lycopersicon esculentum*) cv. "Arka Ahuti" to Plant GroWTh Regulators. *Not Sci Biol*, 5(2), 220–225.

- Negi, S., Sukumar, P., Liu, X., Cohen, J. D., & Muday, G. K. (2010). Genetic dissection of the role of ethylene in regulating auxin-dependent lateral and adventitious root formation in tomato. *The Plant Journal*, *61*(1), 3-15.
- Peralta IE, Spooner DM, Knapp S (2008). Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (Solanum sections Lycopersicoides, Juglandifolia, Lycopersicon; Solanaceae). *Syst Bot Monogr* 84:1–186.
- 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.
- Pnueli, L., Carmel-Goren, L., Hareven, D., Gutfinger, T., Alvarez, J., Ganai, M. & 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*(11), 1979-1989.
- Radhamony, R. N., A. Mohan Prasad and R. Srinivasan (2005). T-DNA insertional mutagenesis in Arabidopsis: a tool for functional genomics. *Electronic Journal of Biotechnology*, *8*, 82- 106.
- Ranc, N., S. Muños, S. Santoni and M. Causse (2008). A clarified position for Solanum lycopersicum var. cerasiforme in the evolutionary history of tomatoes (solanaceae). *BMC plant biology*, *8*.
- Roldán, J. J., Alvarez, M. C., Pérez, R., Pina, J. A., Duran-Vila, N., Vives, M. C. & Rozalén, P. A. N. (2005). El programa de mejora sanitaria de variedades de cítricos en España: 30 años de historia. *Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal*, (170), 66-79.
- Rubio, F., Alonso, A., García-Martínez, S., & Ruiz, J. J. (2016). Introgression of virus-resistance genes into traditional Spanish tomato cultivars (Solanum lycopersicum L.): Effects on yield and quality. *Scientia horticulturae*, *198*, 183-190.
- Shahin, E. A., (1985). Totipotency of tomato protoplasts. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, Volumen 69(3), pp. 235-240.
- Sim S-C, Robbins MD, Chilcott C, Zhu T, Francis DM (2009). Oligonucleotide array discovery of polymorphisms in cultivated tomato (Solanum lycopersicum L) reveals patterns of SNP variation associated with breeding. *BMC Genomics*. *10*: 466.
- Sim S-C, Robbins MD, Van Deynze A, Michel AP, Francis DM (2011). Population structure and genetic differentiation associated with breeding history and selection in tomato (Solanum lycopersicum L.). *Heredity (Edinb)*. *106*: 927–35.
- Skoog, F., & Miller, C. O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured. *In vitro. Symp. Soc. Exp. Biol.*, v. 11, p. 118-131.
- Springer, P. S. (2000). Gene traps: tools for plant development and genomics. *The Plant Cell*, *12*(7), 1007–1020.

- Sun, S., Kang, X. P., Xing, X. J., Xu, X. Y., Cheng, J., Zheng, S. W., & Xing, G. M. (2015). Agrobacterium-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* L. cv. Hezuo 908) with improved efficiency. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(5), 861-868.
- Tanksley, S. D. (2004). The Genetic, Developmental, and Molecular Bases of Fruit Size and Shape Variation in Tomato. *The Plant Cell*, pp. Jun 16 (suppl 1) S181-S189.
- Tinland, B. (1996). The integration of T-DNA into plant genomes. *Trends Plant Sci.* 1, 178–184.
- Tyburski, J. and Tretyn, A. (2004). The role of light and polar auxin transport in root regeneration from hypocotyls of tomato seedling cuttings. *Plant Growth Regul.* 42, 39–48.
- Van Lijsebettens, M., Den Boer, B., Hernalsteens, J. P., & Van Montagu, M. (1991). Insertional mutagenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*, 80(1-2), 27-37.
- Wijbrandi, J., Wolters, A. M. A., & Koornneef, M. (1990). Asymmetric somatic hybrids between *Lycopersicon esculentum* and irradiated *Lycopersicon peruvianum*. *Theoretical and applied genetics*, 80(5), 665-672.
- Xiao, J., Li, H., Zhang, J., Chen, R., Zhang, Y., Ouyang, B. & Ye, Z. (2006). Dissection of GA 20-oxidase members affecting tomato morphology by RNAi-mediated silencing. *Plant Growth Regulation*, 50(2-3), 179-189.
- Zubko, E., Adams, C. J., Macháèková, I., Malbeck, J., Scollan, C., & Meyer, P. (2002). Activation tagging identifies a gene from *Petunia hybrida* responsible for the production of active cytokinins in plants. *Plant Journal*, 29(6), 797–808.