



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas

Trabajo Final de Máster

**Caracterización de mutantes afectados en la
arquitectura de la planta en líneas T-DNA de
tomate (*Solanum lycopersicum* L.)**



Autora

Constanza Andrea Martin Vásquez

Directores

Alejandro Atarés Huerta

Vicente Moreno Ferrero

Marybel Jáquez Gutiérrez

Valencia, Enero 2019

RESUMEN

La detección de mutantes con alguna alteración en la arquitectura de la planta es la mejor estrategia para identificar los genes que controlan diversos caracteres relacionados con este aspecto del desarrollo vegetativo. Entre las alternativas posibles para generar mutantes (e.g. radiaciones, productos químicos como EMS, etc.), la mutagénesis insercional es la más adecuada para abordar este objetivo. Con esta estrategia, tras la obtención de un gran número de plantas transgénicas, se evalúa su fenotipo para poder detectar alteraciones causadas por la integración del T-DNA. De esta manera, si el gen endógeno queda etiquetado por el T-DNA, se puede llegar a la clonación del gen mediante métodos basados en la PCR (e.g. Anchor- o Tail-PCR), lo que proporciona una valiosa información sobre el papel de ese gen en el carácter evaluado.

El desarrollo de un protocolo eficaz de transformación genética en tomate y especies silvestres relacionadas (*Solanum pimpinellifolium*, *S. pennellii*, *S. galapagense*) ha permitido la obtención de unas 7800 líneas T-DNA en el contexto de varios proyectos. Se ha realizado el escrutinio de estas colecciones de líneas T-DNA para identificar mutantes con alteraciones en caracteres del desarrollo vegetativo y reproductivo, así como en el nivel de tolerancia a estreses abióticos, principalmente salinidad y sequía. La detección y caracterización de mutantes se ha realizado tanto *in vivo* (i.e. invernadero) como mediante técnicas de cultivo *in vitro*.

En el presente trabajo se han caracterizado líneas T-DNA mutantes, que se habían identificado previamente en nuestro grupo, con alteraciones en diferentes aspectos de la arquitectura de la planta, como crecimiento, ramificación y morfología de la hoja.

Palabras clave:

Mutagénesis insercional - Cultivo *in vitro* – Tomate - Arquitectura de la planta

ABSTRACT

Detection of mutants with some alteration in the architecture of the plant is the best strategy to identify the genes that control different characters related to this aspect of vegetative development. Among the possible alternatives to generate mutants (e.g., radiations, chemical products such as EMS, etc.), insertional mutagenesis is the most appropriate to address this objective. With this strategy, after obtaining a large number of transgenic plants, their phenotype is evaluated in order to detect alterations caused by the integration of T-DNA. In this way, if the endogenous gene is labeled by T-DNA, it is possible to reach cloning of the gene by means of PCR-based methods (eg Anchor- or Tail-PCR), which provides valuable information on the role of that gene in the evaluated character.

The development of an efficient genetic transformation protocol in tomato and related wild species (*Solanum pimpinellifolium*, *S. pennellii*, *S. galapagense*) has allowed obtaining some 7800 T-DNA lines in the context of several projects. We screened these collections of T-DNA lines to identify mutants with alterations in characters of vegetative and reproductive development, as well as in the level of tolerance to abiotic stresses, mainly salinity and drought. The detection and characterization of mutants has been carried out both *in vivo* (greenhouse i.e.) and by *in vitro* culture techniques.

In the present work, mutant T-DNA lines have been characterized, which had previously been identified in our group, with alterations in different aspects of the plant architecture, such as growth, branching and leaf morphology.

Keywords:

Insertional mutagenesis - *In vitro* culture -Tomato - Plant architecture

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Tomate.....	1
1.2	Investigación y mejora del tomate.....	2
1.3	Transformación genética y mutagénesis.....	4
1.4	Mutagénesis insercional.....	5
1.5	Trampas Génicas	6
1.6	Mutantes alterados en la arquitectura de la planta	7
2.	OBJETIVOS	9
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
3.1	Material Vegetal	10
3.2	Esterilización de semillas.....	11
3.3	Pre-germinación de semillas, obtención de plántulas y plantas axénicas.	12
3.4	Preparación de medios de cultivo.....	13
3.5	Clonación	13
3.6	Aclimatación	13
3.7	Fenotipado <i>in vivo</i>	14
3.8	Cruces sexuales.....	15
3.9	Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante.....	15
3.10	Análisis genético del número de inserto T-DNA.	16
3.11	Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante.....	16
3.12	Test χ^2	17
4.	RESULTADOS	18
4.1	Mutante 150 ET 73	18

4.2	Mutante 239 ET MM	25
4.2.1	Caracterización fenotípica <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	25
4.2.2	Modo de herencia de la mutación	32
4.2.3	Análisis genético del número de insertos T-DNA.....	33
4.2.4	Análisis de cosegregación del inserto T-DNA con el fenotipo mutante.....	34
4.3	Mutante 414 ET 73	35
4.3.1	Caracterización fenotípica <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	35
4.3.2	Modo de herencia de la mutación	42
4.3.3	Análisis genético del número de insertos T-DNA.....	43
4.3.4	Análisis de cosegregación del inserto T-DNA con el fenotipo mutante.....	43
4.4	Mutante 852 ET MM	44
4.4.1	Caracterización fenotípica <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	44
4.4.2	Modo de herencia de la mutación	47
4.4.3	Análisis genético del número de insertos T-DNA.....	47
4.4.4	Análisis de cosegregación del inserto T-DNA con el fenotipo mutante.....	48
5.	DISCUSIÓN.....	49
6.	CONCLUSIONES	54
7.	BIBLIOGRAFÍA	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción de tomate fresco a nivel mundial durante el año 2017	2
Figura 2. Esquema de las diferentes construcciones de trampas génicas	7
Figura 3. Mapa genético del plásmido pD991 utilizado para la transformación de cultivares de tomate. 10	
Figura 4. Serie de agua para la esterilización de semillas de tomate.	11
Figura 5. Cortes en plántula de tomate para la obtención de diferentes explantes.	12
Figura 6. Fenotipo de plantas axénicas WT (P73) y mutantes de la línea 150 ET 73	19
Figura 7. Fenotipo de plantas axénicas WT (P73) y mutante (150 ET 73) en medio α	20
Figura 8. Regeneración adventicia y enraizamiento a partir de explantes de hoja	21
Figura 9. Fenotipo <i>in vivo</i> de planta WT (P73) y mutante (150 ET 73)	22
Figura 10. Fenotipo de flores del WT (P73) y del mutante (150 ET 73)	23
Figura 11. Fenotipo de hojas <i>in vivo</i> de plantas WT (P73) y mutantes (150 ET 73)	24
Figura 12. Fenotipo de plantas axénicas WT (MM) y mutante (239 ETMM) en medio MB3.	26
Figura 13. Hoja de planta axénica WT (MM) y mutante (239 ET MM).	27
Figura 14. Fenotipo de plantas axénicas WT (MM) y mutantes (239 ET MM), días después de la decapitación del ápice.	28
Figura 15. Fenotipo de plantas axénicas WT (MM) y mutante (239 ET MM), tratadas con ácido giberélico.	29
Figura 16. Organogénesis de hoja WT (MM) y mutante (239 ET MM)	30
Figura 17. Fenotipo <i>in vivo</i> de plantas WT (MM) y mutantes de (239 ET MM-14)	31
Figura 18. Fenotipo de plantas TG2 de la línea 414 ET 73 a los 26 días de cultivo en MG.	35
Figura 19. Fenotipo de plantas axénicas WT (P73) y mutante (414 ET 73) en medio MB3	36
Figura 20. Fenotipo de plantas axénicas de la línea 414 ET 73-8 clonadas en MB3.	37
Figura 21. Respuesta cultural y organogénica de explantes de hoja y peciolo de plantas WT y mutantes de la línea 414 ET 73.	38
Figura 22. Fenotipo <i>in vivo</i> de plantas de la TG3 414 ET 73-8.	39
Figura 23. Flores WT y mutante de la línea 414 ET 73	40
Figura 24. Plantas TG2 <i>in vivo</i> de la línea 414 ET 73 en diferentes tiempos desde la aclimatación	41
Figura 25. Fenotipo de plantas axénicas WT (P73) y mutantes de la línea 414 ET 73 en diferentes periodos de cultivo en medio MB3 y en botes grandes	42
Figura 26. Plantas axénicas WT y mutantes de progenies TG3 de la línea 852 ET MM	45
Figura 27. Fenotipo <i>in vivo</i> de plantas WT y mutantes de la línea 852 ET MM.	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentraciones de los reactivos utilizados en los diferentes medios de cultivo usados.....	13
Tabla 2. Solución nutritiva usada para el riego de plantas en invernaderos del IBMCP.	15
Tabla 3. Análisis del modo de herencia de la mutación de la línea 239 ET MM.....	32
Tabla 4. Análisis genético del número de insertos T-DNA con el gen nptII en la línea 239 ET MM.	33
Tabla 5. Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 239 ET MM.	34
Tabla 6. Análisis del modo de herencia de la mutación de la línea 414 ET 73.	43
Tabla 7. Análisis genético del número de insertos T-DNA con el gen nptII en la línea 414 ET 73.	43
Tabla 8. Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 414 ET 73.	43
Tabla 9. Análisis del modo de herencia de la mutación de la línea 852 ET MM.....	47
Tabla 10. Análisis del número de insertos T-DNA en la línea 852 ET MM	47
Tabla 11. Análisis de cosegregación del inserto y el fenotipo mutante de la línea 852 ET MM.....	48

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Tomate

El tomate cultivado (*Solanum lycopersicum* L.), pertenece a la familia *Solanaceae*, que incluye muchas especies de importancia económica, como el tomate, la patata, el tabaco, el pimiento y la berenjena. El tomate es uno de los principales cultivos a nivel mundial y es de gran interés no solo como alimento, sino también por sus propiedades nutricionales, ya que es fuente de carotenoides, entre los que destaca el licopeno. Este compuesto tiene actividad antioxidante capaz de contrarrestar los efectos de las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Blanca et al., 2015; Erba et al., 2013).

El origen de las especies silvestres relacionadas con el tomate se encuentra en la región Andina comprendida entre Ecuador, Perú, Chile, Colombia y Bolivia (Bai & Lindhout, 2007; Bergougnoux, 2014). Basado en evidencias moleculares y morfológicas, *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* es considerado el progenitor directo del tomate cultivado. Se cree que la domesticación del tomate ocurrió en dos etapas: primero hubo un proceso de pre-domesticación de *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* a partir del tomate silvestre *Solanum pimpinellifolium*, que se piensa es el ancestro silvestre más cercano, y más tarde se pasó al tomate cultivado (Blanca et al., 2015; Sun, Chen, Xiao, & Yang, 2017). El lugar de domesticación no se conoce con certeza, pero hay dos hipótesis: una plantea que el origen de la domesticación fue en México y la otra en Perú. El tomate fue introducido en Europa en siglo XVI, pero primero fue usado como planta ornamental ya que fue asociado con otras solanáceas tóxicas como la belladona y mandrágora. Más tarde, entre el siglo XVII y XVIII, fue incorporado en la cocina local (Bai & Lindhout, 2007; Bergougnoux, 2014).

El tomate no solo tiene importancia económica como producto en fresco, sino que también se procesa para obtener diferentes productos como pastas, sopas, salsas, o concentrados, entre otros. Debido a esto, la producción ha ido en aumento. El principal productor es China con más de 59 millones de toneladas en 2017. En España, alcanza una producción de más de 5 millones de toneladas, ocupando el octavo lugar con mayor producción de tomate (Figura 2) (FAO,2019)

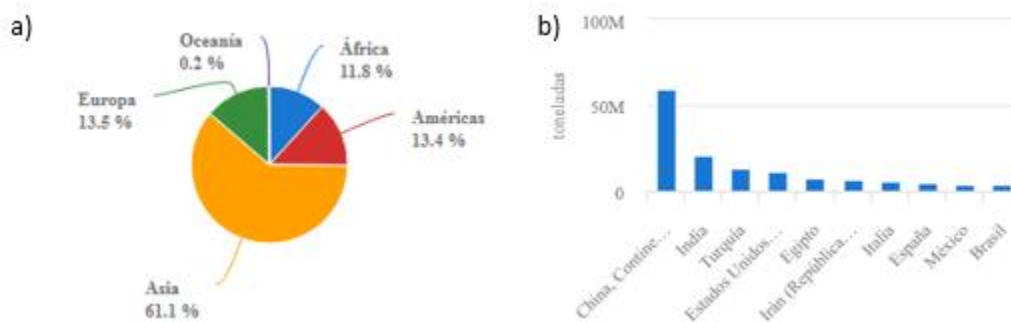


Figura 1. Producción de tomate fresco a nivel mundial durante el año 2017, **a)** porcentaje de producción por continente, **b)** los 10 países con mayor producción durante el 2017 (FAO,2019).

1.2 Investigación y mejora del tomate

Algunos autores consideran que la última fase de la domesticación del tomate, como una verdura comestible, comenzó en el siglo IX. A partir aquí se desarrollaron nuevos cultivares, que fueron originados por polinización abierta, mutaciones espontáneas o cruces naturales. La producción de estos cultivares llevó a la obtención de tomates con un amplio rango de rasgos morfológicos y fisiológicos, que aumentaron el interés por mejorar el tomate. De esta forma, se potenciaron caracteres como tamaño y forma de fruta, pasando así de los tomates con pequeños frutos a otros de mayor tamaño, lo que se tradujo en plantas con un mayor rendimiento (Bai & Lindhout, 2007; Bergougnoux, 2014; Blanca et al., 2015).

El interés de los investigadores por esta hortaliza comenzó a aumentar y pronto el objetivo de estudio fue variando. Durante la década de los 70's el principal objetivo fue mejorar el rendimiento de producción. En la década de los 80's el interés se centró en aumentar la duración de post-cosecha y, ya en los 90's, en la mejora de caracteres como el sabor y las propiedades nutricionales del tomate. En los años siguientes se empezó a trabajar en la resistencia a plagas y enfermedades, debido a que el tomate es huésped de una amplia variedad de agentes bióticos que pueden provocar grandes pérdidas económicas y agronómicas (Bai & Lindhout, 2007).

El aumento en la investigación de esta planta no fue solo por sus propiedades alimenticias. Además de pertenecer a una de las familias con mayor importancia económica,

tiene características que la destacan como una planta modelo de investigación, ya que tiene un ciclo de vida corto, una genética diploide simple, las técnicas de transformación son conocidas, es fácil de mantener, se puede controlar la polinización, se puede reproducir asexualmente mediante injertos, tiene una buena capacidad de regeneración *in vitro* y se conoce el genoma completo de, aproximadamente, 900 Mb. Además, se dispone de marcadores moleculares y mapas genéticos que facilitan la selección de accesiones que tengan características de interés (Ranjan, Ichihashi, & Sinha, 2012; The Tomato Genome et al., 2012).

El desarrollo de nuevas variedades mediante mejora tradicional se ha venido llevando a cabo, principalmente, mediante selección de plantas con características de interés o por el cruce de dos parentales que tengan rasgos deseables. Pero estas formas de mejora tienen sus limitaciones. Los cruces intra-específicos no ofrecen problemas pero, cuando se trata de cruces inter-específicos, las especies que se van a cruzar deben ser cercanas. Además, hacer cruces no garantiza que la descendencia tendrá las características deseadas, ya que la recombinación de los genomas parentales es aleatoria, y los rasgos de interés puede que no se expresen o que tengan un efecto contrario al esperado, como un menor rendimiento o frutos de mala calidad. El paso crítico en la mejora tradicional es la selección de parentales, y para ello es esencial la disponibilidad de fuentes de variación en los bancos de germoplasma. En el caso del tomate, hay más de 83.000 accesiones almacenadas en bancos de semillas alrededor del mundo. Con esta técnicas tradicionales de mejora se han obtenido muchas nuevas variedades, pero se requiere mucho tiempo (12 a 15 años) y trabajo para producir nuevos cultivos (Bauchet & Causse, 2012; M & G, 2012).

Con el avance de la tecnología se comenzó a disponer de nuevas herramientas y técnicas para el mejoramiento genético. En este sentido, la totipotencia, es decir, la capacidad de las células vegetales de regenerar un organismo completo *in vitro* ha proporcionados nuevas aproximaciones para la mejora. Con el cultivo de tejidos también se han desarrollado nuevas técnicas y aplicaciones, como el rescate de embriones, que permite la realización de cruces entre especies distantes. También se han podido desarrollar técnicas de manipulación genética, como la fusión de protoplastos (células sin pared celular), que permiten la obtención de híbridos somáticos. En particular, la técnica del rescate de embriones ha permitido la introgresión de

genes que determinan caracteres relevantes (tolerancia a diferentes tipos de estrés, aumento del contenido de diferentes compuestos beneficiosos para la salud como antioxidantes, características organolépticas) desde especies silvestres al tomate cultivado.

Por otra parte, el aprovechamiento de la variación somaclonal (la variación que se genera en procesos de regeneración de tipo indirecto o que surge como consecuencia de la variación pre-existente en el material de partida) puede aportar una nueva fuente de variación genética para la mejora del tomate o de otras especies cultivadas (Dagla, 2012; Loyola-Vargas, De-la-Peña, Galaz-Ávalos, & Quiroz-Figueroa, 2008).

El desarrollo de marcadores moleculares también ha tenido una enorme importancia en el ámbito del mejoramiento, ya que permite realizar una selección asistida por marcadores, que acorta considerablemente el tiempo necesario para obtener nuevas variedades.

Los descubrimientos y avances en el campo de la biología molecular ha abierto el camino para transferir DNA entre fuentes de variación próximas o lejanas, lo que ha supuesto un gran avance en el mejoramiento de cultivos (Bai & Lindhout, 2007; M & G, 2012).

1.3 Transformación genética y mutagénesis.

La transformación genética en plantas ha facilitado la introducción de rasgos de interés en especies de importancia agronómica. Esto ha sido posible por el hecho de que las células vegetales son totipotentes. Con esto se ha logrado la expresión de caracteres como resistencia a plagas, enfermedades y mejora de la calidad. Las plantas transgénicas han sido generadas mediante transformación con *Agrobacterium tumefaciens*, biolística e introducción de DNA en protoplastos. La integración del transgén con estos métodos es aleatoria y puede llevar a mutaciones redundantes. Sin embargo, con el avance de la tecnología se han desarrollado técnicas que permiten la integración de genes en una localización predeterminada. Estas son las llamadas técnicas de edición genómica mediante ZFNs (Zinc-Finger Nucleasas), TALENs (Transcription Activator-Like Efactor Nucleases) y CRISPR/cas9 (Ann, 2009; Sanagala, Moola, & Bollipo Diana, 2017).

Para poder utilizar las técnicas de edición genómica, es necesario conocer los genes que controlan los diferentes caracteres. Una de las maneras de identificar la función de un gen es

mediante el análisis de plantas con variación fenotípica y su comparación con una planta Wild Type (WT). Para esto se deben desarrollar colecciones de mutantes, que se pueden obtener aprovechando la variación somaclonal, mediante mutágenos físicos como la radiación, o mediante agentes químicos como EMS (etil-metano-sulfonato), que provocan cambios aleatorios en la secuencia de DNA. Luego se seleccionan las líneas en las que se vea alguna posible mutación de interés, y se lleva a cabo la caracterización del fenotipo mutante. Las líneas candidatas son reevaluadas usando un mayor tamaño de muestra (generalmente con la progenie de las líneas candidatas) hasta confirmar la mutación. Después sigue el desafío de identificar qué gen fue afectado, lo que a veces supone una gran inversión de tiempo, conocimiento y recursos. Por suerte hay aproximaciones, como la mutagénesis insercional, que ayudan a solucionar estos problemas (FAO, 2011; Health, 2004; Perez-Martin et al., 2017).

1.4 Mutagénesis insercional

La mutagénesis insercional consiste en transformar las plantas con un fragmento de DNA de secuencia conocida. Así, el gen que se haya modificado quedará etiquetado y será más sencillo identificarlo y clonarlo. Gracias a las técnicas de cultivo *in vitro* es posible obtener plantas transgénicas de interés agronómico y comercial, ya que a diferencia de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* no es posible hacer transformación *In planta*. Para poder transformar se utiliza *Agrobacterium tumefaciens* o biolística, que consiste en el bombardeo de partículas recubiertas con DNA sobre explantes (Atarés et al., 2011; Schleicher, 2017).

Nuestro grupo generó una colección de mutantes mediante mutagénesis con *Agrobacterium tumefaciens*. Se obtuvo una colección de unas 7800 líneas T-DNA. Para seleccionar las líneas transformadas se realiza un proceso de selección, basado en la expresión del gen *nptII* (resistencia a la kanamicina). Una vez seleccionadas las líneas se realiza un escrutinio y verificación de las líneas mutantes. Para esto se realizan análisis de segregación del fenotipo mutante y un análisis cosegregación, para saber si la mutación observada se debe al inserto de T-DNA o no. En el laboratorio se han puesto a punto diferentes técnicas de cultivo *In vitro* para identificar y caracterizar las posibles líneas mutantes. Se observa si hay alteraciones en el desarrollo y arquitectura de la parte aérea o del sistema radicular, y también se observa si hay alteración en la capacidad de regeneración adventicia.

1.5 Trampas Génicas

El uso de la mutagénesis insercional con vectores de tipo convencional ha sido una gran herramienta para identificar y conocer la función de un gen. Luego se fueron desarrollando vectores más potentes (trampas génicas) que ayudaron a la identificación de nuevos genes, ya que el T-DNA contiene un gen delator y un marcador de selección. Hay tres tipos de trampas, denominadas como 'trampas de intensificadores', 'trampas de promotores' y 'trampas de genes' (Figura 2). La trampa de intensificadores tiene el gen delator con un promotor mínimo, mientras que en las otras dos el gen delator no tiene promotor y, por tanto, su expresión ocurre solo si se insertan en una unidad transcripcional y en la orientación correcta. En el caso de la trampa de promotores, el gen delator se debe insertar en un exón; por el contrario, la trampa de genes tiene un sitio aceptor de *splicing* y, para se exprese, se debe insertar en un intrón (Springer, 2000).

Para obtener la colección de mutantes de nuestro grupo, se utilizó la trampa de intensificadores. Como se mencionó anteriormente, consta de un promotor mínimo (caja TATA y sitio inicio de transcripción) fusionado al gen delator, además del gen marcador *nptII* (resistencia a la kanamicina) bajo control de un promotor constitutivo. El gen delator no es capaz de expresarse por sí solo, sino que requiere de los elementos intensificadores de un gen endógeno y que se inserte en la dirección correcta. En nuestro caso hemos empleado el delator *uidA*, que codifica la proteína GUS, que además de ser estable, mantiene su actividad cuando se une a otras proteínas y se puede detectar mediante tinciones histoquímicas usando sustratos como X-gluc (Anjani, V.K, & Harsh, 2018; Springer, 2000).

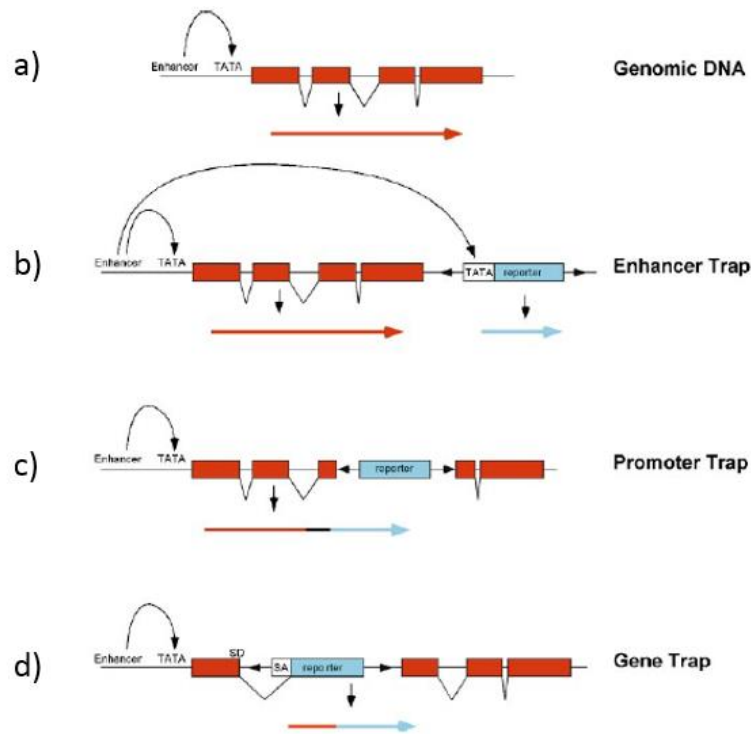


Figura 2. Esquema de las diferentes construcciones de trampas génicas, **a)** DNA genómico sin inserto, **b)** vector de trampa de intensificadores, **c)** vector trampa de promotor y **d)** vector de trampa de genes (Springer, 2000).

1.6 Mutantes alterados en la arquitectura de la planta

En el presente trabajo se realizó la caracterización de mutantes de tomate afectados en la arquitectura de la planta. Esto significa que se puede alterar cualquier característica que este implicada en la organización del cuerpo de la planta.

Hace años se comenzó con el estudio de las modificaciones de la arquitectura de la planta, para llegar a tener un mayor entendimiento de las bases genéticas que regulan estos caracteres. Conocer cómo se regulan nos ayudaría a modificar específicamente rasgos agronómicos de interés(Reinhardt & Kuhlemeier, 2002).

Dentro de lo que ya se ha descubierto, y que se relaciona con los mutantes caracterizados en este trabajo, se encuentran las plantas alteradas en los brotes laterales (ramificaciones). En la mayoría de las plantas, el desarrollo de las yemas axilares se encuentra inicialmente suprimido por la dominancia apical. En maíz se encontró que esta dominancia

estaba regulada por el gen *TEOSINTE BRANCHED1 (TB1)* y el mutante (*tb1*) efectivamente mostró un fenotipo de plantas muy ramificadas (Doebley, Stec, & Hubbard, 1997). Por el contrario, en el caso del tomate se encontraron mutantes con la ramificación suprimida y que no desarrollaban las yemas axilares. Gracias a estos mutantes se identificó el gen *Lateral suppressor (Ls)* (Schumacher, Schmitt, Rossberg, Schmitz, & Theres, 1999).

La morfología de la hoja y las flores son los principales determinantes de la arquitectura de la planta, ya que estas van a variar mucho entre las diferentes especies. Pueden ser hojas simples como en *Arabidopsis* y tabaco, o compuestas como las de tomate y guisantes. En el estudio de hojas compuestas se ha encontrado que la formación de folíolos laterales está asociado a una actividad meristemática extendida en la base de los primordios de la hoja. Por ejemplo, Hareven et al., (1996), encontraron que la sobreexpresión de genes KNOX, promueve una repetida formación de folíolos, dando como resultado hojas supercompuestas.

En el presente trabajo se han caracterizado mutantes relacionados con la supresión del desarrollo de yemas axilares, afectados en la arquitectura de la hoja y otros con un menor crecimiento.

2. OBJETIVOS

En el grupo se han generado unas 7800 líneas de T-DNA de *Solanum lycopersicum* y especies silvestres relacionadas, como *S. pimpinellifolium*, *S. pennelli* y *S. galapagense* con el objetivo de obtener una colección de mutantes afectados en diferentes caracteres y así poder identificar los genes relacionados con la mutación detectada. Con esta metodología ya se han podido identificar y clonar varios genes relacionados con caracteres del desarrollo vegetativo (parte aérea y raíz), desarrollo reproductivo (flor y fruto) y tolerancia a diferentes tipos de estrés abiótico (salinidad y sequía). Ya se han clonado unos 30 genes relacionados con diferentes alteraciones identificadas.

El objetivo principal de este trabajo es la caracterización de diversos mutantes alterados en la arquitectura de la planta para hacer factible la posterior identificación y clonación del gen mutado en cada línea. Para esto se analizaron 87 líneas T-DNA de *S. lycopersicum* y 11 líneas que se habían preseleccionado en trabajos anteriores del grupo. El análisis de estas líneas implicó las siguientes etapas:

1. Identificación de líneas T-DNA mutantes.
2. Caracterización fenotípica *in vitro* e *in vivo*.
3. Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante.
4. Determinación del número de insertos de T-DNA con el gen *nptII* funcional.
5. Análisis de la cosegregación entre el fenotipo mutante y el inserto T-DNA.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

El material vegetal usado en el presente trabajo proviene de una colección de líneas T-DNA generadas en colaboración con los grupos del Dr. Rafael Lozano (Centro de Investigación en Biotecnología Agroalimentaria de la Universidad de Almería) y la Dra. Mari Carmen Bolarín (CEBAS-CSIC, Murcia). La colección de mutantes de tomate (*S.lycopersicum* cv. *Money Maker* y cv. P73) se generó mediante transformación con *Agrobacterium tumefaciens*. Se utilizó el vector pD991 (Figura 3), que porta el gen de resistencia a la kanamicina (*nptII* funcional) y el gen delator *uidA* bajo control de un promotor mínimo que, por sí solo, no conduce a un nivel de transcripción detectable. Se trata, pues, de una trampa de intensificadores, la cual se denominó ET, por sus siglas en inglés *Enhancer Trapping*.

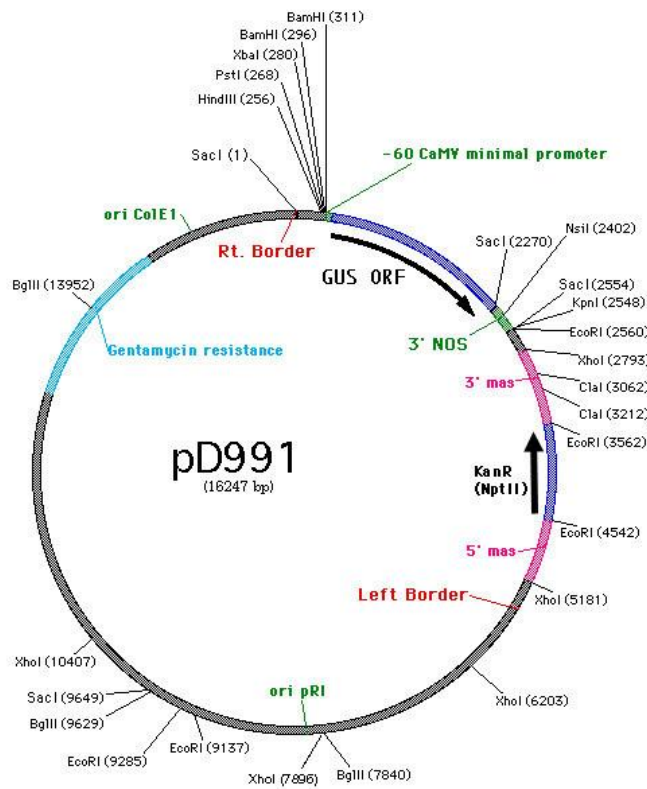


Figura 3. Mapa genético del plásmido pD991 utilizado para la transformación de cultivares de tomate.

Las plantas transformadas con este vector se nombraron como ET. En este trabajo se utilizaron los cultivares MoneyMaker y P73, por lo cual las líneas se denominaron con un número seguido de las siglas ET MM y ET 73, respectivamente.

Las plantas sometidas a la transformación fueron nombradas como TG1, que tendrán el inserto de T-DNA en hemigiosis. Las plantas obtenidas de la autofecundación de estas serán la TG2, que pueden ser hemigóticas, homocigóticas o acigotas para el inserto. La descendencia de éstas serán las TG3, y así sucesivamente. En el presente trabajo se evaluaron semillas TG2 y TG3 obtenidas con anterioridad en el grupo de investigación.

3.2 Esterilización de semillas

La esterilización es un proceso para eliminar posibles contaminantes presentes en las semillas. Para esto se utilizaron series de agua. Se utilizaron 4 botes estériles, uno vacío donde se puso una solución con lejía al 50% y unas gotas de Tween 20. Los otros tres botes contenían agua estéril para los lavados (Figura 4). Las semillas se prepararon en paquetes con una tela de gasa, se cerró con una etiqueta y se anotó la línea que se va a esterilizar. En el caso de las semillas de tomate se hizo una esterilización doble, para mejorar la tasa de germinación. En el bote con la solución de lejía las semillas se dejaron 30 min, luego se realizaron tres lavados sucesivos de 5, 10 y 15 min en cada bote con el agua estéril. Al día siguiente, se repitió el mismo procedimiento.

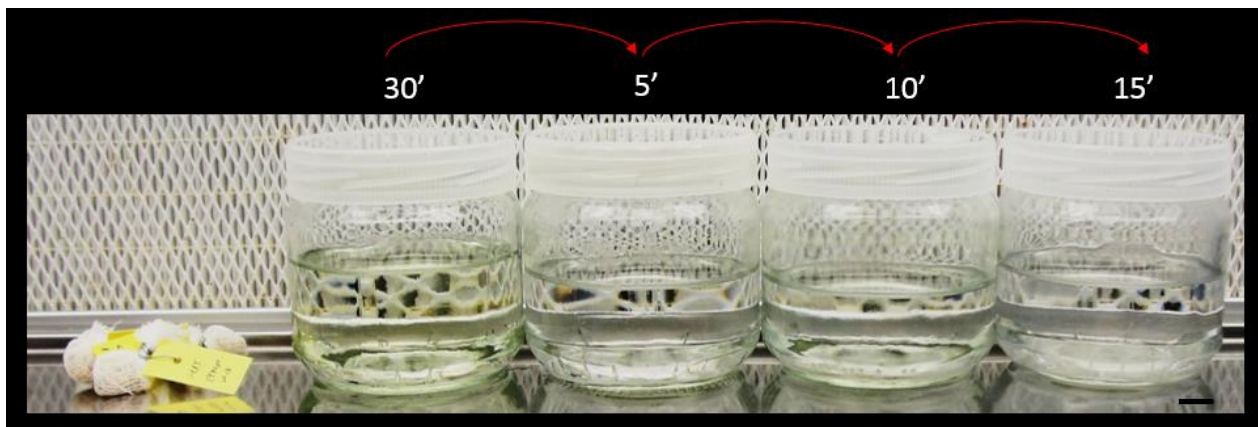


Figura 4. Serie de agua para la esterilización de semillas de tomate, el primer bote a la izquierda corresponde a la solución de lejía, los tres siguientes los botes con agua estéril. Escala: 1cm.

3.3 Pre-germinación de semillas, obtención de plántulas y plantas axénicas.

Una vez que se ha realizado la esterilización doble de las semillas, estas se pasaron a una placa Petri estéril con discos de papel de filtro y 9 mL de agua estéril. Se incubaron a 27°C en oscuridad hasta que emergió radícula, generalmente a los 2 días. A continuación, las semillas con radícula se sembraron en botes con medio de germinación (MG) (**Tabla 1**). Se dejaron creciendo en cámara de cultivo *in vitro* con intensidad lumínica de $45 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad a 25°C. Se incubaron hasta obtener plántulas (aproximadamente 7 días). A partir de ese momento se inició la evaluación fenotípica para la identificación y caracterización de mutantes, observando tamaño de plántula, desarrollo de raíz embrionaria y de los cotiledones y las primeras hojas. Luego se subcultivó el ápice meristemático a medio básico (MB3) (**Tabla 1**) para la obtención de plantas axénicas. Los explantes de cotiledón e hipocótilo se pusieron en medio IKZ y/o medio ϵ (**Tabla 1**), para evaluar la organogénesis adventicia y/o resistencia a kanamicina, respectivamente. En la Figura 5, se muestran los cortes que se realizaron a la plántula para la obtención de explantes.



Figura 5. Cortes en plántula de tomate para la obtención de diferentes explantes. Cotiledón, ápice meristemático e hipocótilo, según el experimento que se fuera a realizar. Escala:1 cm.

3.4 Preparación de medios de cultivo

Para la preparación de los diferentes medios de cultivo, se mezclaron los reactivos correspondientes en agua destilada. Una vez obtenida una solución homogénea, se midió el pH y se ajustó con hidróxido de potasio (KOH) o ácido clorhídrico (HCl), hasta obtener un pH de 5.7. En la **Tabla 1** se muestran las concentraciones de los reactivos empleados en los diferentes medios utilizados a lo largo de este trabajo. Tras el ajuste del pH, se agregó el agente gelificante, En este trabajo se usó agar bacteriológico (6,8 g/L) o M (8 g/L). Los medios que no llevan algún compuesto termolábil, como antibióticos u hormonas, se distribuyeron en botes y se esterilizaron en autoclave a 115°C por 30 minutos. La kanamicina (β y ϵ) o zeatina (IKZ), se añadieron al medio autoclavado en cabina y, a continuación, se distribuyó en placas o botes estériles.

Tabla 1. Concentraciones de los reactivos utilizados en los diferentes medios de cultivo usados.
^a(Murashige & Skoog, 1962) y ^b(Shahin, 1985).

	MG	MB3	α	β	I₄₀	IK	IKZ	ϵ
Sales minerales^a	MS/2	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Azúcar [g/L]	10	30	20	20	30	30	30	30
Inositol [g/L]		0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Tiamina-HCl [mg/L]		1	1	1				
Vitaminas^b					SH	SH	SH	SH
Ácido Indolacético [mg/L]			0.1	0.1	4	4	4	4
Kinetina [mh/L]						4	4	4
Zeatina [mg/L]							1	1
Kanamicina [mg/L]				100				100

3.5 Clonación

Con el objetivo de mantener y/o multiplicar el material vegetal, se realizó la clonación de la planta. Para esto se subcultivaron explantes con tejido meristemático, como el ápice y las yemas axilares.

3.6 Aclimatación

Las plantas crecidas en condiciones axénicas no están sometidas a ningún tipo de estrés ni interaccionan con otros organismos. Esto difiere de las condiciones de invernadero y campo,

por lo cual al transferir una planta crecida *in vitro* a condiciones *ex vitro* es necesario pasar por un proceso de aclimatación, para disminuir el estrés ocasionado.

Para aclimatar una planta, se seleccionó aquella que se encontraba bien desarrollada, tanto la parte aérea como sistema radicular. Una vez se tuvo un clon *in vitro*, se sacó la planta del bote, con cuidado de dañar lo menos posible la planta y con especial cuidado en las raíces. Se limpiaron los restos de medio de cultivo que había en las raíces. Después se trasplantaron a una maceta de 9 cm, previamente preparada con sustrato y humedecida con agua. Una vez, que se ha puesto la planta en la maceta se tapó la planta con un vaso de plástico transparente, para que no pierda tanta humedad ni se deshidrate. El vaso, se fue levantando poco a poco, o se le realizaron perforaciones para que la planta se fuera aclimatando a las nuevas condiciones. Cuando ya estaban completamente aclimatadas se trasplantaron a una maceta más grande, de acuerdo con los experimentos que se fueran a realizar.

3.7 Fenotipado *in vivo*

Además de observar el crecimiento y desarrollo de las plantas en cultivo *in vitro*, se debe analizar el fenotipo *in vivo* desde las primeras etapas. Para esto, tras la esterilización y pregerminación, se sembraron 24 semillas en macetas de 9 cm con sustrato y humedecidas con solución nutritiva (Tabla 2). Tras evaluar los caracteres del desarrollo vegetativo temprano se fueron dejando las plantas necesarias para la obtención de frutos, ya sea por autofecundación o cruzamiento. Estas fueron trasplantadas a macetas de 30 cm y, a lo largo de su crecimiento, se entutoraron y podaron las yemas axilares para que solo creciera un tallo principal.

Los ensayos *in vivo*, ya sea aclimatación o crecimiento desde semilla, se realizaron en los invernaderos del IBMCP en donde se dispone de iluminación artificial y sistema de fertirrigación. El riego fue con solución nutritiva (Tabla 2) y se aplicaban tratamientos plaguicidas periódicamente. El sustrato utilizado consistió en turba, perlita y en algunos casos fibra de coco.

Tabla 2. Solución nutritiva usada para el riego de plantas en invernaderos del IBMCP.

Nutriente	Concentración
Ca(NO₃)₂·4H₂O	2.36 g·L ⁻¹
KNO₃	1.012 g·L ⁻¹
MgSO₄·7H₂O	0.98 g·L ⁻¹
KH₂PO₄	0.272 g·L ⁻¹
g Fe (quelato)	0.056 mg·L ⁻¹
ZnSO₄·5H₂O	0.014 mg·L ⁻¹
MnO₄·H₂O	0.0332 mg·L ⁻¹
CuSO₄·5H₂O	0.0026 mg·L ⁻¹
H₃BO₃	0.038 mg·L ⁻¹
(NH₄)₆Mo₇·4H₂O	0.00176 mg·L ⁻¹

3.8 Cruces sexuales

Para la realización de cruces, se tomó polen de flores en anthesis del parental masculino usando una pinza y una placa de vidrio. Del parental femenino, se escogieron flores en pre-anthesis y con cuidado se eliminaron los sépalos, pétalos y estambres. Luego se depositó polen recolectado en el estigma de la flor emasculada y se etiquetó la flor. Esto se realizó principalmente en aquellas plantas que no daban frutos por autofecundación.

3.9 Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante

Para evaluar el modo de herencia de la mutación, se analizó la descendencia de las TG1 (i.e., la planta transformada con el inserto T-DNA). Si la mutación fuese dominante, las plantas TG1 presentarían fenotipo mutante y la descendencia de autofecundación (TG2) segregaría: $\frac{3}{4}$ con fenotipo mutante (homocigotas y hemicigotas) y $\frac{1}{4}$ con fenotipo WT (acigotas). Por el contrario, si la mutación fuese recesiva la descendencia segregaría de la siguiente forma: $\frac{1}{4}$ fenotipo mutante (homocigota) y $\frac{3}{4}$ fenotipo WT (hemicigotas y acigotas). En el presente trabajo se utilizaron principalmente semillas TG2 y TG3. Al evaluar las TG2 y no tener información de las TG1, se pudo conocer primero si había mutación y segundo si esta era dominante o recesiva. También se trabajó con semillas TG3 que podían descender de dos tipos de TG2 (para una mutación recesiva):

- ✓ TG2 con fenotipo mutante, por lo que toda la descendencia sería mutante (TG3-M).

- ✓ TG2 con fenotipo WT (TG3-WT). Está puede ser hemicingota para la mutación, por lo cual su descendencia presentaría fenotipo wild-type o mutante. En el caso que la TG2 WT haya sido acigota para el inserto T-DNA, las plantas procedentes de estas no presentarán fenotipo mutante.

3.10 Análisis genético del número de inserto T-DNA.

Como se mencionó anteriormente, la construcción utilizada para la transformación incluye el gen *nptII* funcional que le confiere resistencia a kanamicina tanto a las plantas homocigotas como las hemicingotas si ha insertado correctamente el T-DNA. Para evaluar la resistencia a la kanamicina, se usaron dos estrategias: la más usada fue poner explantes de cotiledón o de hojas en medio ϵ ; la otra consistió en cultivar los ápices meristemáticos en medio β . En ambos casos los medios contenían 100 mg/L de kanamicina. En el primer caso, las plantas sensibles al antibiótico (i.e. sin el inserto T-DNA) no regeneran brotes, mientras que las resistentes sí lo hacen. En el segundo caso, los ápices de plantas sin el inserto no enraízan mientras que las que portan un inserto con un *nptII* funcional sí lo hacen.

Con el análisis de la resistencia a kanamicina no sólo se pudo determinar si las plantas portan algún inserto T-DNA o no, sino que también se pudo saber el número de insertos con el gen *nptII* funcional. Las segregaciones para uno o dos insertos serían las siguientes:

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

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

El análisis de cosegregación consistió en determinar si el fenotipo mutante observado estaba asociado a la presencia del inserto T-DNA del gen *nptII* funcional. Para esto, se analizaron los datos de segregación de fenotipo y la resistencia a la kanamicina de poblaciones segregantes (TG2 o TG3). En el caso que haya cosegregación (i.e. que el gen está etiquetado por un fragmento de DNA de secuencia conocida), se puede abordar la clonación del gen causante de la mutación mediante Anchor-PCR.

Para descartar la cosegregación, bastó con detectar un mutante sensible a la kanamicina, ya que esto indicaría la ausencia del inserto T-DNA y que la mutación se debe a variación somaclonal. En este caso, para conocer el gen causante de la mutación, se deberá recurrir a otras técnicas como el mapeo por secuenciación (NGS) que requiere más tiempo y esfuerzo.

3.12 Test χ^2

Para analizar si los datos observados se ajustan a lo esperado se realizó un test χ^2 . Si los datos se ajustan a un modelo de segregación mendeliana se acepta la hipótesis de partida con una probabilidad de fallo del 5%. Esta prueba, se aplicó para los datos del modo de herencia del fenotipo, para el análisis del número de insertos T-DNA y para evaluar la homogeneidad de datos de diferentes experimentos. Esto nos permitió trabajar con los datos de diferentes experimentos como si se tratara de un único experimento.

4. RESULTADOS

El presente trabajo se inició con un escrutinio de un total de 80 progenies TG2 procedentes de plantas transgénicas (TG1). Del análisis de germinación, se observó que en 50 líneas con semillas de entre 2006 y 2007 no germinaron. Los 30 restantes si germinaron, pero no se observó fenotipo mutante. También se emplearon líneas T-DNA candidatas en las que se había observado fenotipo mutante en investigaciones anteriores del grupo. En este trabajo se presentan los resultados de la caracterización tanto *in vitro* como *in vivo* de líneas con mutaciones en la arquitectura de la planta.

4.1 Mutante 150 ET 73

Este mutante se detectó *in vivo* en un ensayo realizado por el grupo de Almería. Se observaron hojas filiformes, pérdida de dominancia apical, inflorescencias con gran cantidad de flores que presentaban pétalos y sépalos finos, y frutos de diferente tamaño y un número de lóculos variable.

Se intentó realizar la caracterización *in vitro* con semillas TG2, pero, debido al tiempo de almacenamiento (se obtuvieron en 2006), no germinaron. Se continuó con las progenies TG3-M disponibles (i.e que procedían de TG2 identificadas como mutantes) pero, por el motivo antes mencionado, solo se obtuvieron cuatro plantas *in vitro* de la progenie TG3-M-2, de las cuales se aclimataron dos para la caracterización *in vivo*.

A los 22 días de cultivo de las plantas axénicas en medio MB3, se observaron hojas filiformes y un menor número de raíces secundarias en comparación con las plantas WT (P73) (Figura 6).



Figura 6. Fenotipo de plantas axénicas WT (P73) y mutante (M) de la línea 150 ET 73 a los 22 días de cultivo en medio MB3. Escala: 1 cm.

También se realizó una clonación en medio α . Como se observa en la Figura 7, a los 12 días hubo un retraso en el crecimiento del ápice, hojas filiformes y en este caso no hubo desarrollo de raíces secundarias. A los 24 días se siguió observando el mismo fenotipo, pero se vio también la formación de yemas florales. A los 63 días se continuó observando el mismo fenotipo mutante, aunque con una mayor ramificación (Figura 7).

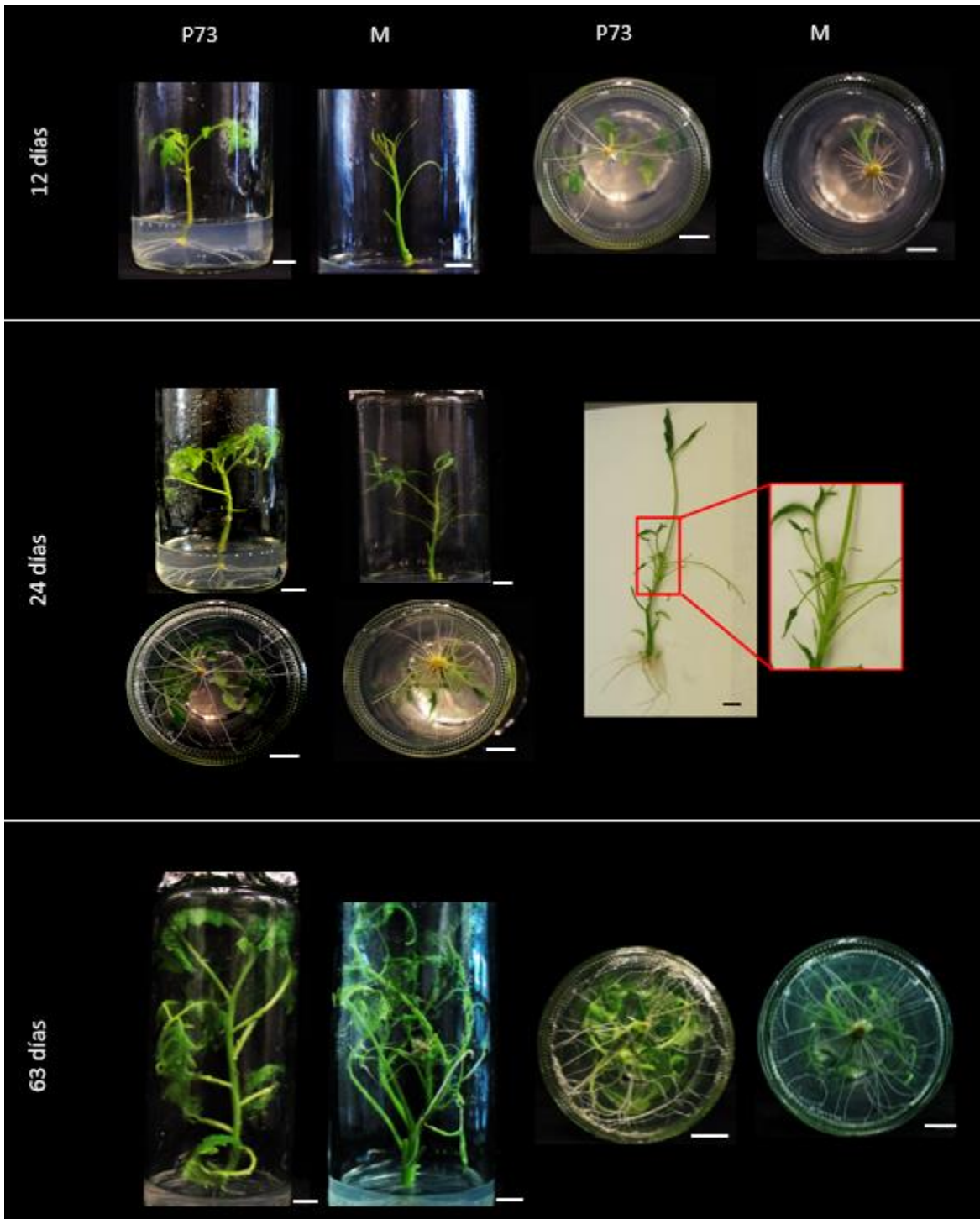


Figura 7. Fenotipo de plantas axénicas WT (P73) y mutante (150 ET 73) en medio α a los 12, 24 y 63 días desde la clonación. Escala: 1 cm.

Se analizó la capacidad de organogénesis adventicia, para lo cual se pusieron explantes de hoja en medio IKZ. Se observó formación de callo desorganizado y brotes adventicios, lo cual indica que los explantes del mutante tienen una respuesta morfogénica similar a los del WT. Para evaluar la capacidad de enraizamiento se cultivaron explantes de hoja en medio de enraizamiento I40. Se observó que los explantes del mutante enraizaron de manera normal (Figura 8).

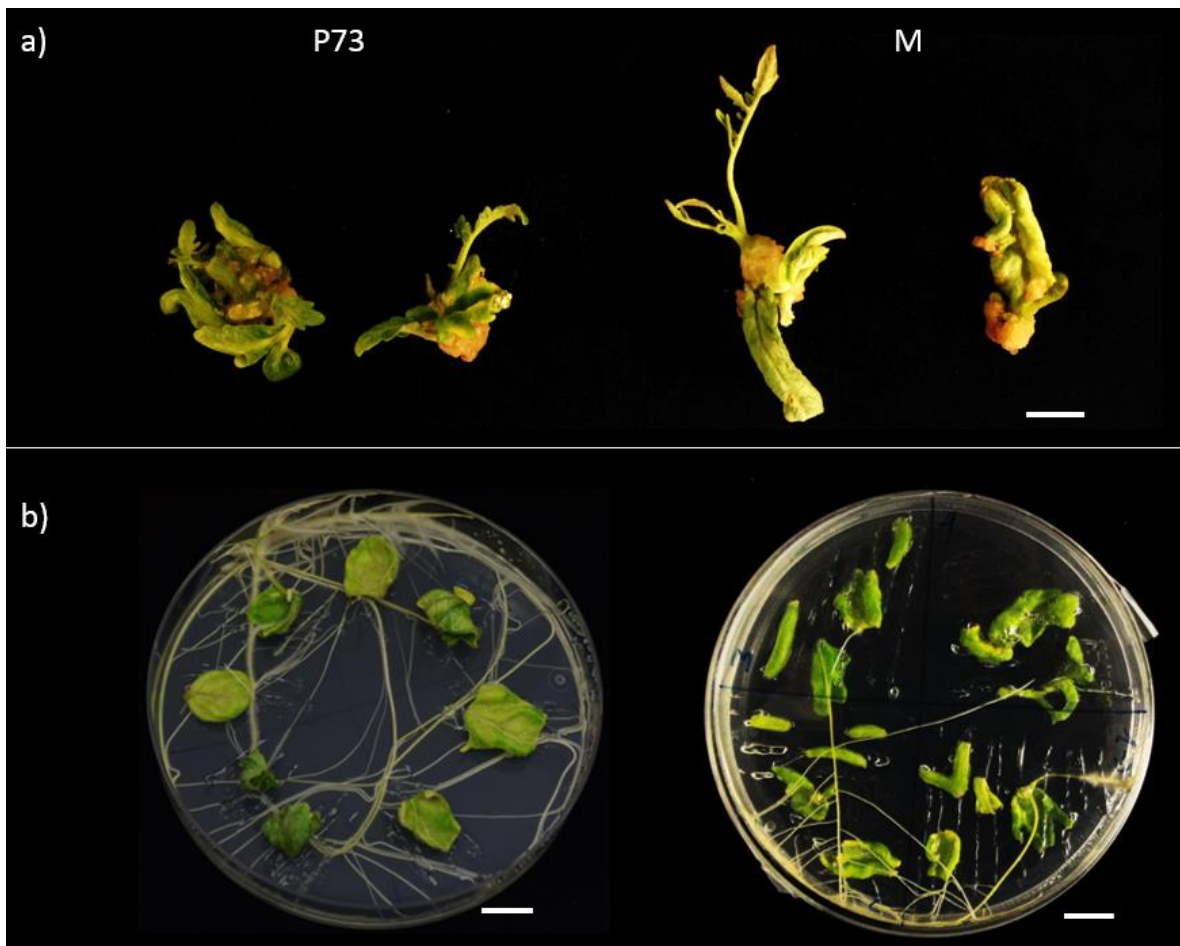


Figura 8. Regeneración adventicia y enraizamiento a partir de explantes de hoja del WT (P73) y del mutante (150 ET 73), a los 38 días de cultivo en: **a)** medio IKZ y **b)** medio I40. Escala: 1 cm.

Para la caracterización *in vivo*, se aclimataron dos plantas axénicas. Su crecimiento inicial fue muy lento. A los 40 días desde la aclimatación se observaron yemas florales en el ápice, además de hojas filiformes. El crecimiento retrasado del ápice provocó un mayor desarrollo de

las yemas axilares. A los 167 días la planta mutante estaba muy ramificada y con una gran cantidad de flores por rama. Pese a ello, ninguna de estas flores cuajó frutos de autofecundación (Figura 9). Al no conseguir frutos de autofecundación, se realizaron retrocruces con P73.



Figura 9. Fenotipo *in vivo* de planta WT (P73) y mutante (150 ET 73), a los 40 y 167 días desde la aclimatación. Escala: 1 cm.

Las flores también tuvieron un fenotipo diferente al normal, ya que los pétalos tenían una forma alargada y delgada, y no estaban fusionados. Los sépalos también fueron delgados y, tras el desarrollo de la flor quedaron más cortos y pequeños que los pétalos. El gineceo también se vio afectado: el estilo tuvo un mayor grosor y fue más corto en comparación con el de las flores de P73 (Figura 10).



Figura 10. Fenotipo de flores del WT (P73) y del mutante (150 ET 73): **a)** visión general de flores en diferentes etapas del desarrollo, **b)** detalle de la flor mutante en pre-antesis y antesis, así como de sus respectivos cortes longitudinales. Escala 0.5 cm.

Como se mencionó anteriormente, el fenotipo de las hojas mutantes fue completamente distinto al WT. Se observaron diferentes formas de hojas, unas completamente filiformes, algunas con un foliolo redondeado terminal, otras con más de un foliolo, pero arrugado y formando una hoja en forma de taza. Se observaron también algunas hojas parecidas al control, pero con foliolos arrugados (Figura 11).



Figura 11. Fenotipo de hojas *in vivo* de plantas WT (P73) y mutantes (150 ET 73). Escala: 1 cm.

En este caso, debido a la escasa germinación de los lotes de semillas (TG2 y TG3) disponibles, no se pudo realizar el análisis del número de insertos ni el análisis de cosegregación. En cualquier caso, los resultados de la caracterización *in vitro* e *in vivo* indican que se trata de un nuevo mutante wiry de tomate, lo que tiene un gran interés.

4.2 Mutante 239 ET MM

Esta línea se detectó previamente por otros miembros del grupo *in vivo*. Observaron un fenotipo mutante que consistía en plantas con poco follaje, flores con pétalos rizados y frutos con mamelones y sin semillas. En este trabajo se realizó una caracterización *in vitro* e *in vivo*, para complementar lo observado previamente y tener más detalles de los procesos afectados por la mutación.

4.2.1 Caracterización fenotípica *in vitro* e *in vivo*

Para el análisis *in vitro* se intentó germinar semillas TG2, pero debido a que se habían obtenido en 2006, no germinaron. Se continuó el análisis con semillas TG3 que sí tuvieron una buena germinación. La mutación se detectó en plantas axénicas a los 21 días en medio MB3. Como se observa en la Figura 12a, la planta mutante presentó un retraso en el crecimiento de la parte aérea y no se observó desarrollo de raíces secundarias. Tras subcultivar el ápice meristemático del mutante a medio básico, se continuó observando el retraso en el crecimiento. Tampoco hubo desarrollo de yemas axilares, se vieron signos de marchitez temprana y el sistema radicular estaba afectado, con escaso desarrollo de raíces secundarias. A los 27 días hubo una abscisión temprana de hojas, que fue más evidente a los 62 días (Figura 12b).

Debido al menor crecimiento de la parte aérea, las hojas de las plantas mutantes también se vieron afectadas, con un menor tamaño y una morfología un poco diferente a las plantas WT. Los folíolos fueron más pequeños, alargados y de un color verde más claro (Figura 13).

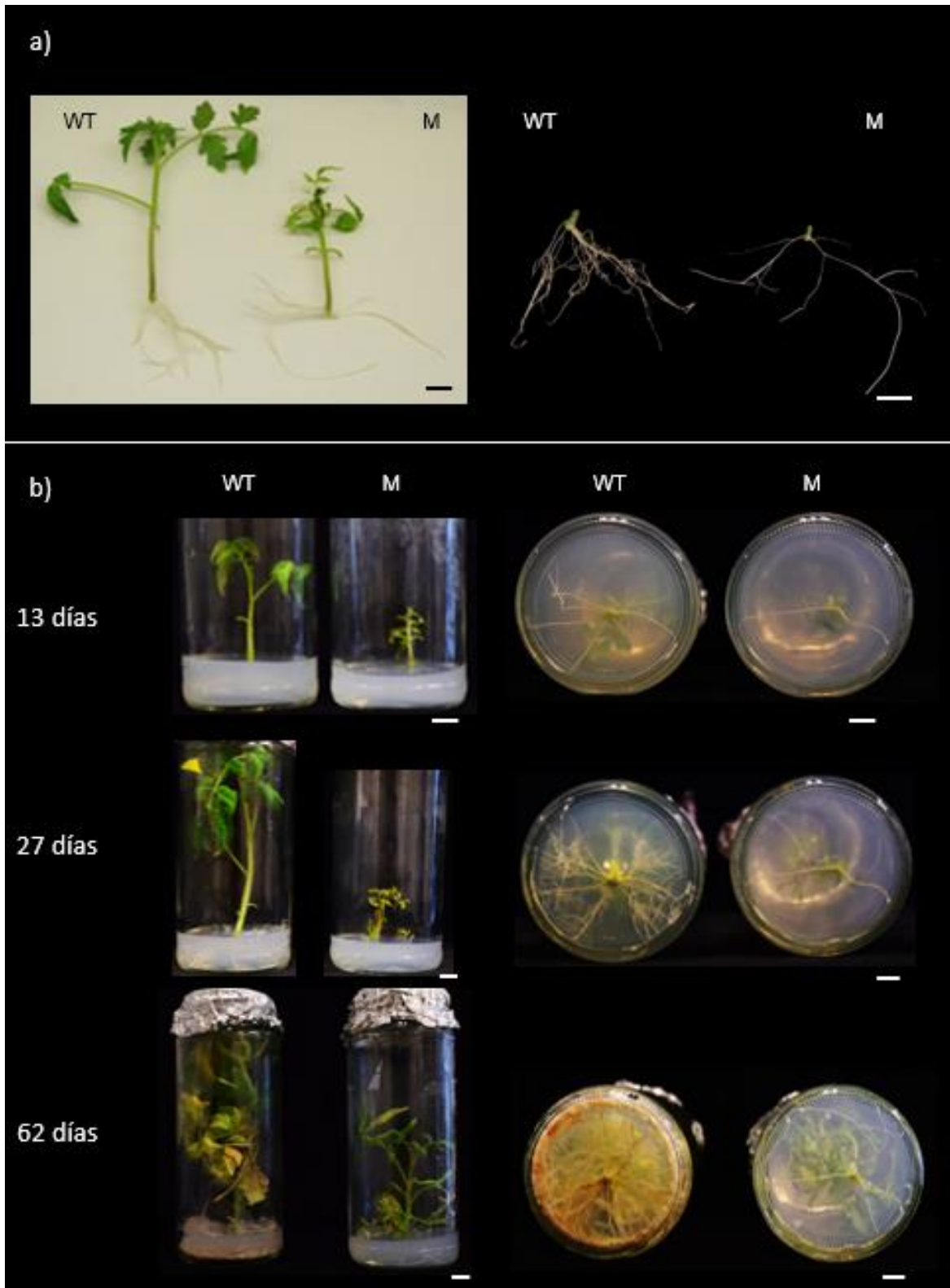


Figura 12. Fenotipo de plantas axénicas WT (MM) y mutante (239 ET MM) en medio MB3, **a)** plantas axénicas a los 21 días de cultivo y **b)** plantas axénicas a distintos días de incubación. Escala: 1 cm.



Figura 13. Hoja de planta axénica WT (MM) y mutante (239 ET MM) a los 61 días de cultivo en medio MB3. Escala: 1 cm.

Al no observar desarrollo de yemas axilares, se decidió hacer experimentos para evaluar si hay activación de las yemas. Por una parte, se cortó el ápice para ver si al perder la dominancia apical hay activación de las yemas axilares. Este tipo de mutantes generalmente está relacionado con la biosíntesis de giberelina, por lo cual se decidió suplementar el medio básico con 1 mg/l de ácido giberélico.

Al decapitar una planta axénica WT y una mutante, se observó una activación de las yemas axilares en ambos casos. En la Figura 14 se observa la transición de las plantas a los 7, 14 y 21 días desde el corte de ápice. También se observó que, en la planta mutante sin decapitar, las yemas axilares no elongaron tanto en comparación con la planta decapitada, a pesar de que estas estaban activas.

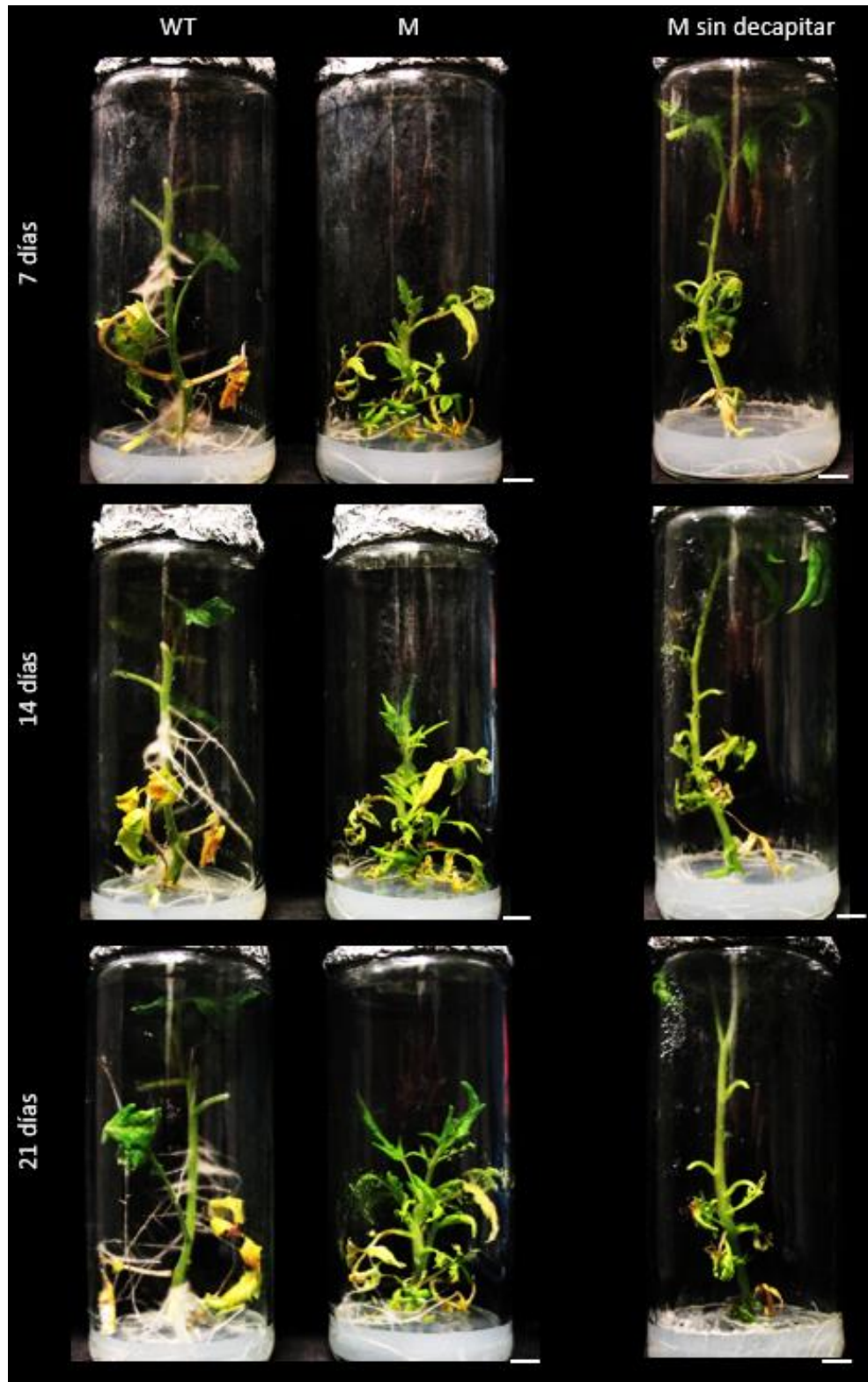


Figura 14. Fenotipo de plantas axénicas WT (MM) y mutantes (239 ET MM), días después de la decapitación del ápice. A la derecha se muestra el control de una planta mutante sin decapitar. Escala: 1 cm.

En plantas tratadas con ácido giberélico también se observó activación y desarrollo de yemas axilares. Como se ve en la Figura 15, la planta mutante tratada con ácido giberélico tuvo mayor activación de yemas que la mutante sin tratamiento. También se pudo ver que la planta WT tampoco experimentó una activación de yemas.

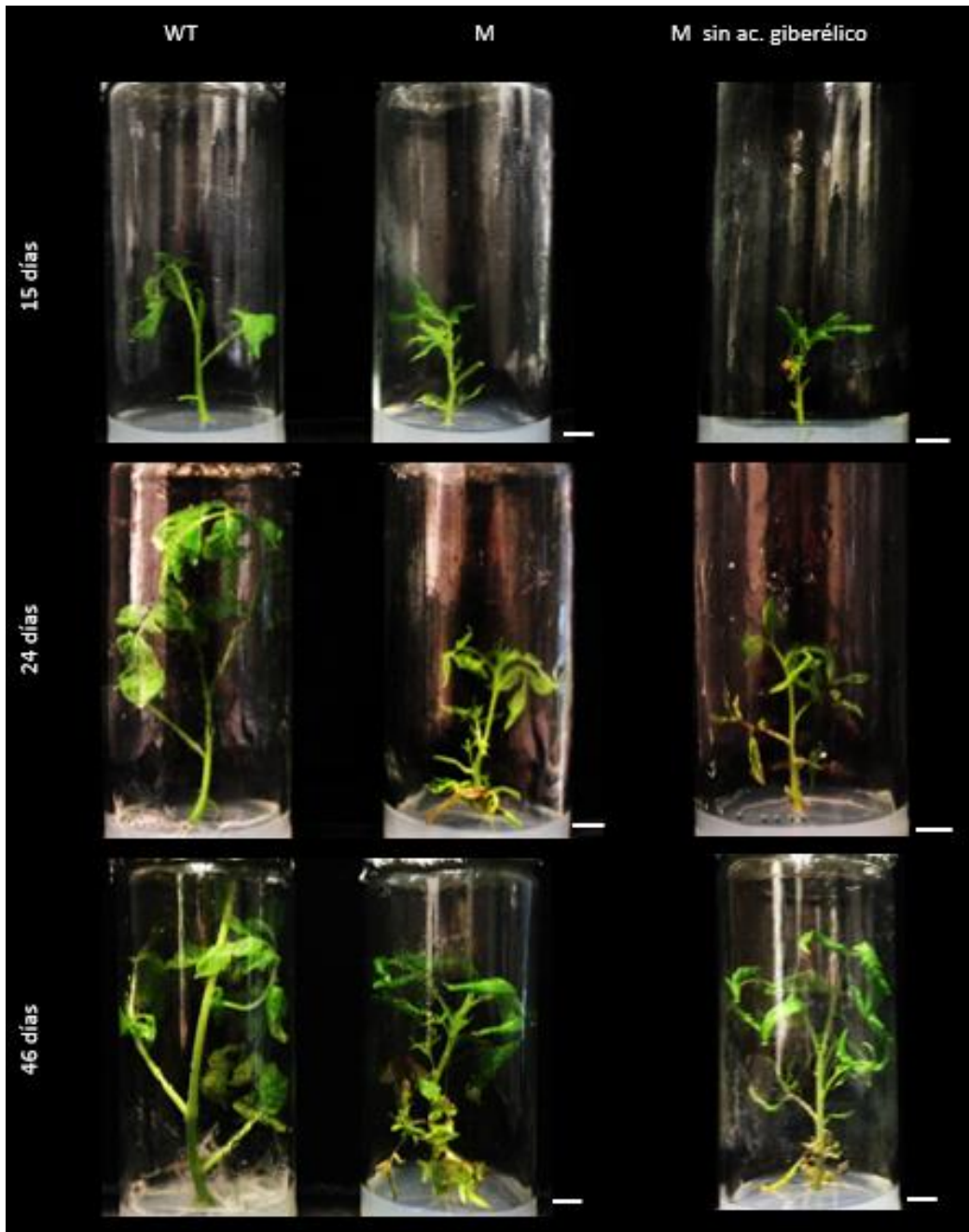


Figura 15. Fenotipo de plantas axénicas WT (MM) y mutante (239 ET MM), tratadas con ácido giberélico en diferentes momentos del desarrollo. Escala: 1 cm.

Para analizar la capacidad de regeneración se usaron explantes de hojas de plantas WT y mutantes. En medio IKZ se observó que las hojas de plantas mutantes tuvieron una regeneración más lenta que las hojas WT. También se evaluó la capacidad de enraizamiento en medio I40. No se observó generación de raíces ni en hoja ni en raquis (Figura 16).

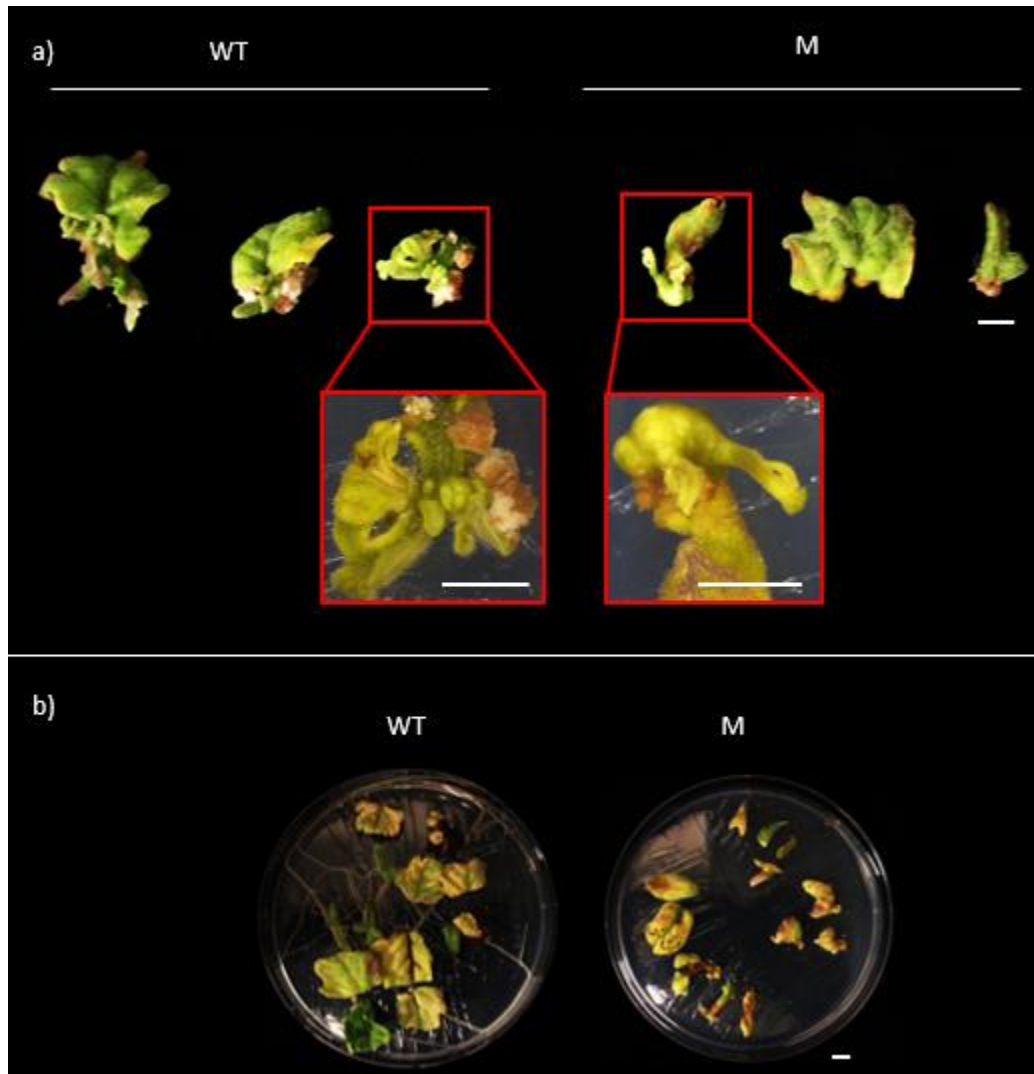


Figura 16. Organogénesis de hoja WT (MM) y mutante (239 ET MM) a los 44 días en **a)** medio de formación de brotes IKZ y **b)** medio de enraizamiento I40. Escala: 0.5 cm

Se realizó un semillero *in vivo* con las semillas de la línea en la que se detectó la mutación *in vitro*. En la Figura 17 se muestra el fenotipo del mutante en invernadero. A los 16 días ya se pudo identificar las plantas con fenotipo mutante, que fueron de menor tamaño y con las hojas menos expandidas que la planta WT. En las plantas mutantes nunca se observó

desarrollo de yemas axilares. Tampoco se desarrollaron frutos, por lo que no se obtuvo descendencia de ninguna planta mutante.



Figura 17. Fenotipo *in vivo* de plantas WT (MM) y mutantes de (239 ET MM-14), **a)** desarrollo del mutante en comparación con el WT en diferentes momentos, **b)** fenotipo mutante a los 62 y 105 días. Escala: 5 cm.

4.2.2 Modo de herencia de la mutación

Debido a que las semillas TG2 de esta línea no germinaron, el análisis se realizó con diferentes TG3 WT. De esta manera también se pudo determinar si la planta WT de la cual procedían las semillas, era hemi- o acigota. En la Tabla 3 se muestran los resultados del modo de herencia de la mutación de las diferentes TG3 y alguna TG4.

Tabla 3. Análisis del modo de herencia de la mutación de la línea 239 ET MM.

TG3/TG4	Segregación	WT	M	Total	χ^2
239-1	Observada	22	2	24	3.56
	Esperados (3:1)	18	6		
239-2 (experimento 1)	Observada	20	2	22	2.97
	Esperados (3:1)	16.5	5.5		
239-2 (experimento 2)	Observada	22	2	24	3.56
	Esperados (3:1)	18	6		
Datos acumulados* 239-2	Observados	42	4	46	6.52
	Esperados (3:1)	34.5	11.5		
239-3	Observada	20	2	22	2.97
	Esperados (3:1)	16.5	5.5		
239-7	Observada	21	2	23	3.26
	Esperados (3:1)	17.25	5.75		
239-14 (experimento 1)	Observados	23	1	24	5.56
	Esperados (3:1)	18	6		
239-14 (experimento 2)	Observados	23	1	24	5.56
	Esperados (3:1)	18	6		
In vivo 239-14	Observados	20	2	22	2.97
	Esperados (3:1)	16.5	5.5		
Datos acumulados** 239-14	Observados	66	4	70	13.89
	Esperados (3:1)	52.5	17.5		
239-14-51	Observada	28	2	30	5.38
	Esperados (3:1)	22.5	7.5		

* Análisis χ^2 de homogeneidad ($\chi^2H = 0.00$) indica que las muestras son homogéneas.

** Análisis χ^2 de homogeneidad ($\chi^2H = 0.20$) indica que las muestras son homogéneas.

Se evaluaron ocho líneas TG3 de las 15 disponibles. En tres de ellas no se observaron plantas con fenotipo mutante, lo que indicó que las TG2 de la cuales procedían eran acigóticas para el inserto T-DNA. Las cinco TG3 restantes sí dieron plantas con fenotipo mutante, sin embargo, solo tres TG3 (239-1, 239-3 y 239-7) se ajustaron a una segregación recesiva de 3 WT: 1 M. Las otras dos TG3 (239-2 y 239-14) no se ajustaron a esta segregación. Esto se puede deber

a que las plantas mutantes presenten un cierto grado de subletalidad. Esto explicaría que el número observado de plantas mutantes casi siempre es menor del esperado.

4.2.3 Análisis genético del número de insertos T-DNA

Para el análisis del número de insertos se evaluó la resistencia a la kanamicina de diferentes TG3 usando explantes de hoja en medio ϵ . Se observó que no todas eran portadoras de un inserto de T-DNA. Hubo dos TG3 que no se ajustaron a un inserto, en el primer caso (239-1) debido a que son todas las plantas sensibles a la kanamicina y en el segundo (239-2) a que todas son resistentes (Tabla 4).

Tabla 4. Análisis genético del número de insertos T-DNA con el gen *nptII* en la línea 239 ET MM.

TG3/TG4	Segregación	Kan ^R	Kan ^S	Total	χ^2
239-1	Observados	0	24	24	72
	Esperados (3:1)	18	6		
239-2 (experimento 1)	Observados	22	0	22	7.33
	Esperados (3:1)	16.5	5.5		
	Esperados (15:1)	20.63	1.4		
239-2 (experimento 2)	Observados	24	0	24	8.00
	Esperados (3:1)	18	6		
	Esperados (15:1)	22.5	1.5		
Datos acumulados* 239-2	Observados	46	0	46	15.33
	Esperados (3:1)	34.5	11.5		
	Esperados (15:1)	43.13	2.87		
239-3	Observados	18	4	22	0.55
	Esperados (3:1)	16.5	5.5		
239-7	Observados	18	5	23	0.13
	Esperados (3:1)	17.25	5.75		
239-14 (experimento 1)	Observados	17	7	24	0.22
	Esperados (3:1)	18	6		
239-14 (experimento 2)	Observados	17	7	24	0.22
	Esperados (3:1)	18	6		
Datos acumulados* 239-14	Observados	34	14	48	0.44
	Esperados (3:1)	36	12		
239 ETMM-14-51	Observados	26	4	30	2.18
	Esperados (3:1)	22.5	7.5		

* Análisis χ^2 de homogeneidad ($\chi^2_H = 0.00$) indica que las muestras son homogéneas.

Con los resultados obtenidos, se comprobó que las progenies de las líneas 239-3, 239-7, 239-14 y la TG4 239-14-51 eran portadoras de un inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional. En estos casos, la TG2 de la cual procedían estas TG3 eran hemicigotas para el inserto, lo cual hizo

que la segregación se ajustara a un modelo 3 Kan^R: 1 Kan^S. Por otra parte, la línea 239-2 puede proceder de una TG2 homocigota para un inserto (100% Kan R) o que sea portadora de dos insertos del gen *nptII* funcional en hemigosis (15 Kan^R: 1 Kan^S). La línea 239-1 fue acigótica para el inserto T-DNA (100% Kan S).

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

Para analizar la cosegregación se evaluó si había plantas mutantes sensibles. Como se muestra en la Tabla 5 se observaron 3 plantas mutantes sensibles a la kanamicina, con lo cual se concluyó que no había cosegregación entre el fenotipo mutante y un inserto de T-DNA.

Tabla 5. Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 239 ET MM.

TG3/TG4	WT		M		Total
	Kan ^R	Kan ^S	kan ^R	Kan ^S	
239 ETMM-1	0	22	0	2	24
239 ETMM-2	42	0	4	0	46
239 ETMM-3	17	3	1	1	22
239 ETMM-7	16	5	2	0	23
239 ETMM-14	32	14	2	0	48
239 ETMM-14-51	24	4	2	0	30

En estos casos de no cosegregación, se deben realizar una serie de PCR's para analizar si hay insertos parciales de T-DNA o insertos del cuerpo del vector que estén causando la mutación. En caso de que no sea así, se deben realizar cruces con *S. pimpinellifolium* para obtener plantas F2 a fin de poder identificar el gen afectado responsable de la mutación observada. Para este propósito, la línea 239-1 es una buena candidata, ya que segrega para la mutación, pero al parecer es acigótica para el inserto con el gen *nptII* funcional.

4.3 Mutante 414 ET 73

Este mutante fue detectado *in vivo* por el grupo de Almería y, según su descripción, se caracterizaba por exhibir un fenotipo bastante compacto (*bushy*). Las plantas tenían menor crecimiento y las hojas desarrollaban folíolos pequeños, cloróticos, retorcidos y con más tricomas. Las flores eran más pequeñas, tenían alteraciones en todos los verticilos y un cono estaminal no fusionado. Por lo que respecta a los caracteres del desarrollo reproductivo, según los componentes del grupo de Almería parecía como si la línea segregara para dos mutantes, uno con un mayor número de órganos florales, excepto sépalos, y otro que desarrollaba frutos con lóculos no fusionados. Esto último no era más que una hipótesis, ya que todas las plantas mutantes presentaban un desarrollo vegetativo similar. Por otro lado, podía suceder que, en lugar de tratarse de dos mutantes, las diferencias en el desarrollo reproductivo se debieron a diferentes grados de expresividad de un simple alelo mutante.

4.3.1 Caracterización fenotípica *in vitro* e *in vivo*

En primer lugar, se realizó un experimento con semillas TG2 de 2007, que tuvieron una germinación regular en placa. Al pasar las semillas pregerminadas a medio MG se observó un crecimiento asincrónico y el desarrollo de pequeños cotiledones. En esta etapa no fue posible identificar un fenotipo mutante. Se mantuvieron las plántulas en medio MG hasta que alcanzaron un tamaño adecuado para subcultivar el ápice meristemático a MB3 (Figura 18).

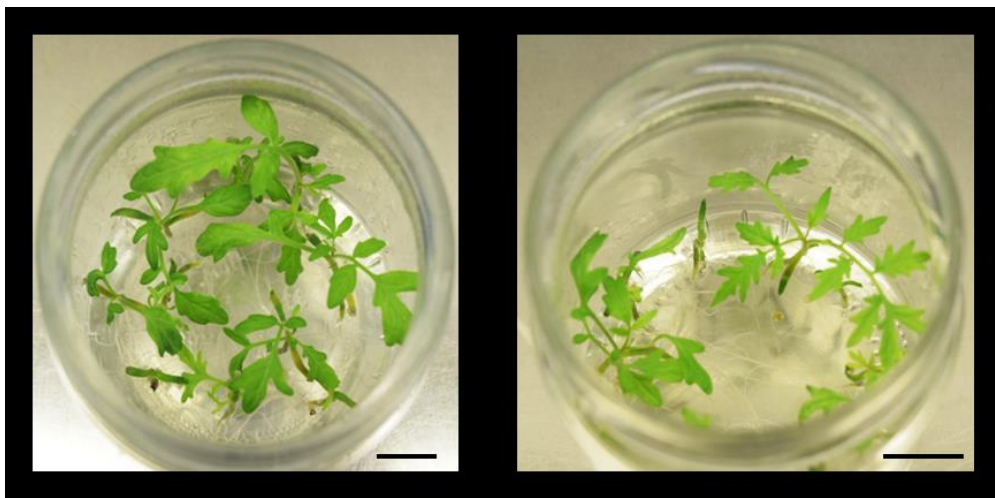


Figura 18. Fenotipo de plantas TG2 de la línea 414 ET 73 a los 26 días de cultivo en MG. Escala: 1cm.

Una vez realizado el subcultivo de los ápices en medio MB3, se esperó a que las plantas crecieran un poco más y se volvió a clonar para realizar el fenotipado a partir de un material homogéneo. A los 40 días de cultivo, se observó que había plantas con un menor crecimiento, entrenudos cortos y sistema radicular menos desarrollado en comparación con las plantas WT (Figura 19a). Al continuar con las clonaciones, en una de las plantas TG2 se observó un fenotipo compacto a los 50 días (Figura 19b).

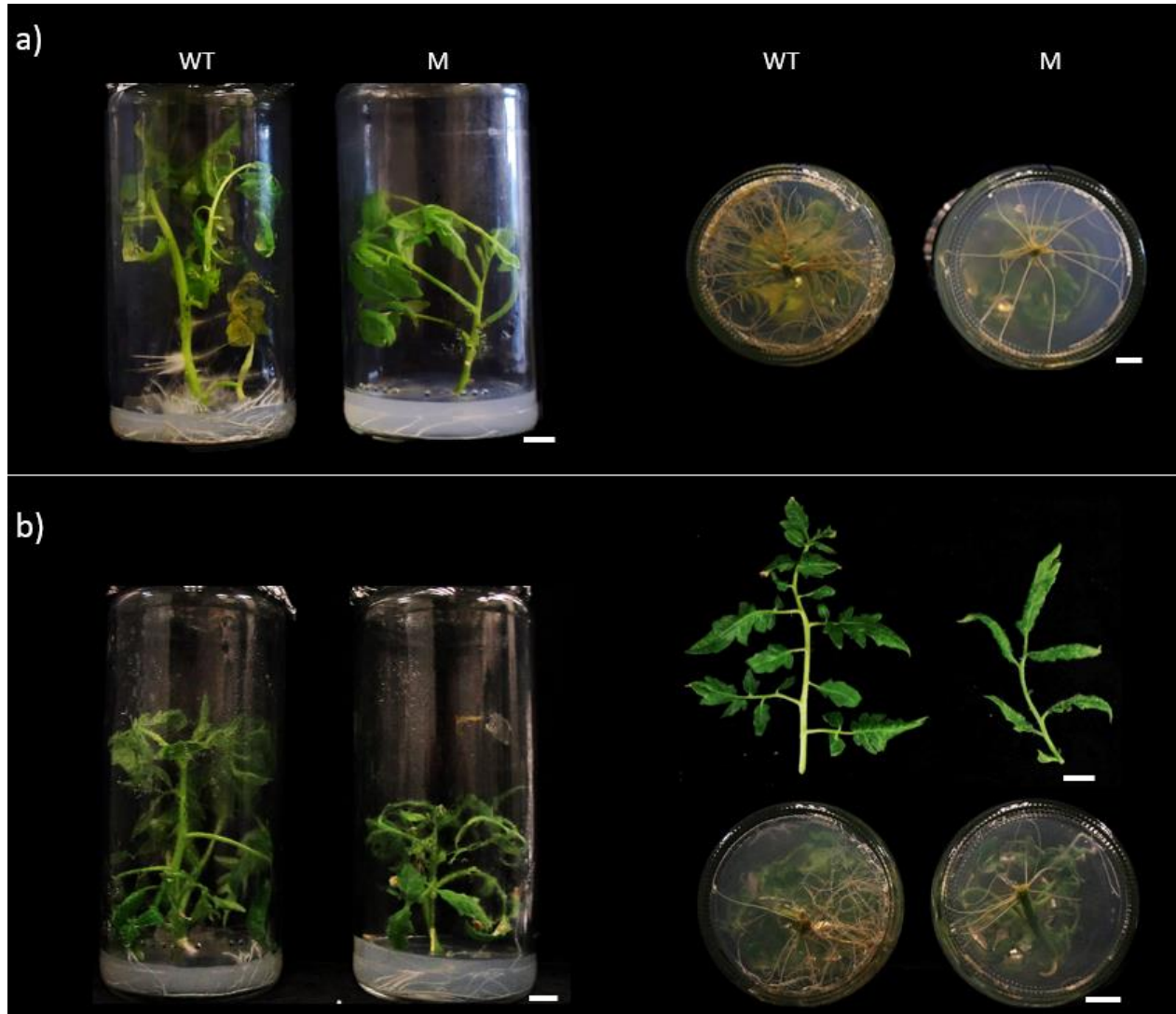


Figura 19. Fenotipo de plantas axénicas WT (P73) y mutante (414 ET 73) en medio MB3, **a)** con 40 días desde la clonación, **b)** con 50 días desde la clonación. Escala: 1 cm.

Se siguió con la evaluación de las cuatro progenies TG3 disponibles, tres procedentes de plantas TG2 mutantes y una de una planta TG2 WT. De estas líneas sólo germinó la TG3 que

procedía de una planta WT. La tasa de germinación tampoco fue muy buena ya que, de 50 semillas puestas a pregerminar, solo se obtuvieron 15 plantas. En las plantas obtenidas se observó el fenotipo mutante (Figura 20a). Se observaron también dos plantas axénicas que no estaban teniendo un crecimiento normal (Figura 20b) y que, más adelante, también presentaron fenotipo mutante.

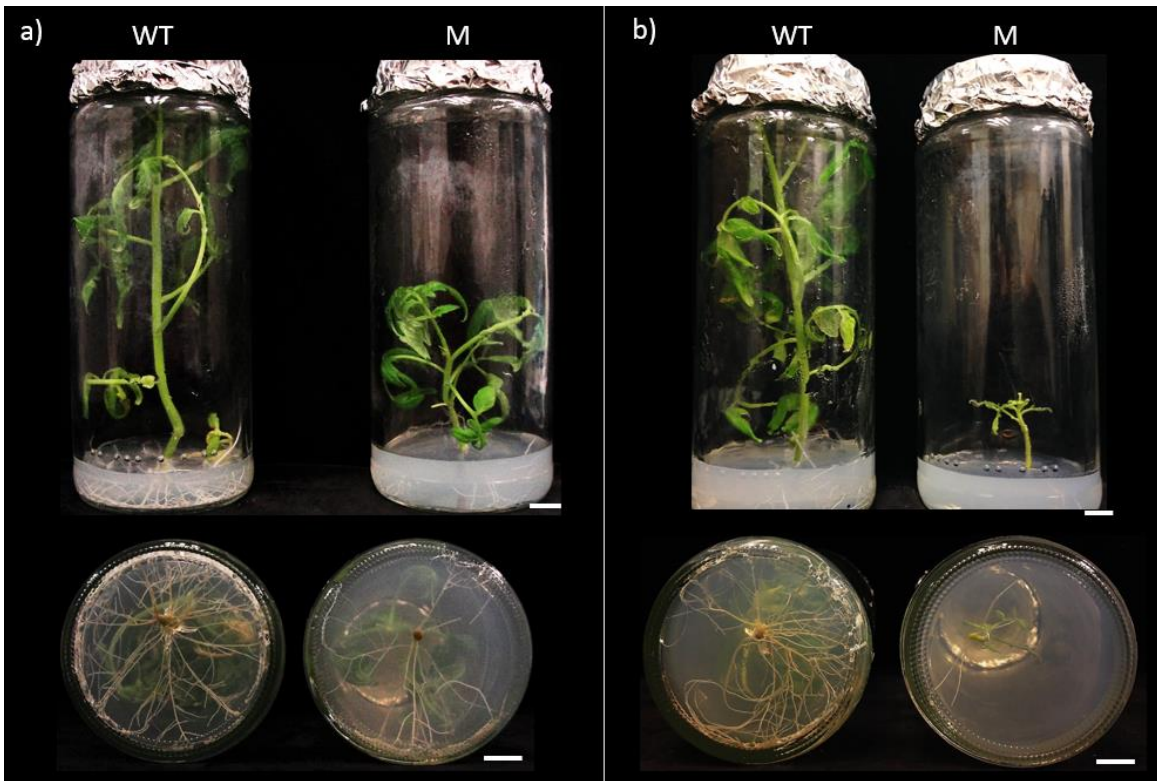


Figura 20. Fenotipo de plantas axénicas de la línea 414 ET 73-8 clonadas en MB3. **a)** plantas WT y mutantes a los 40 días desde la clonación, **b)** plantas WT y mutante a los 55 días desde la clonación. Escala: 1 cm.

Se evaluó la organogénesis adventicia en explantes de hoja y peciolo en medio de regeneración IKZ. En los explantes de plantas mutantes solo hubo formación de callo desorganizado. Por el contrario, en los explantes de plantas WT se observó desarrollo de brotes. Esto podría indicar que las plantas mutantes tienen afectada la capacidad de regeneración adventicia o esta podría ser más lenta en comparación con el WT (Figura 21).

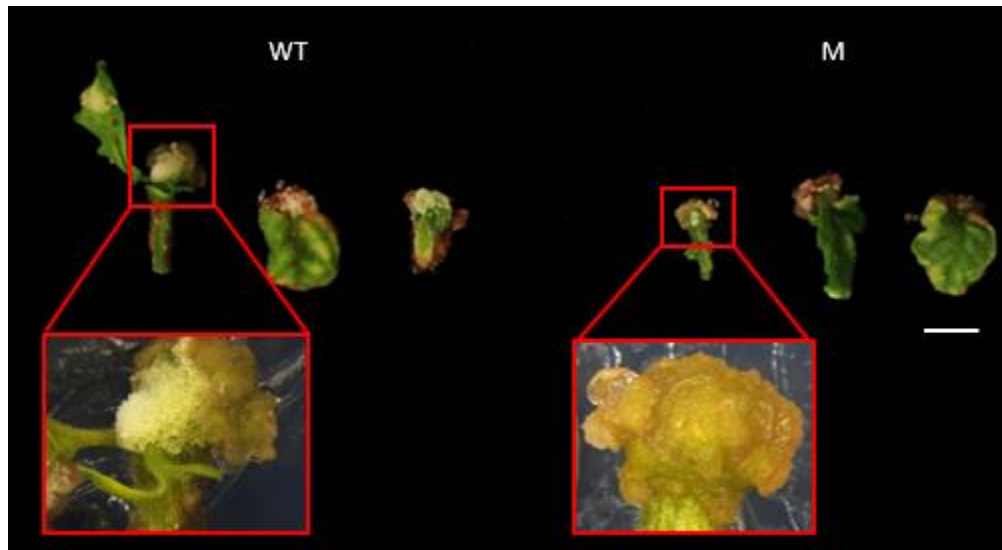


Figura 21. Respuesta cultural y organogénica de explantes de hoja y peciolo de plantas WT y mutantes de la línea 414 ET 73. Escala: 1 cm.

Para la caracterización *in vivo*, se puso un semillero de la TG3-8, ya que fue la única línea en la que germinaron las semillas. Se obtuvieron 13 plantas, de las cuales se detectaron algunas mutantes. Su crecimiento fue más lento, a los 40 días (Figura 22a) y a los 70 días (Figura 22b). Más adelante (120 – 150 días) desarrollaron hojas con folíolos filiformes, delgados, rizados y de un color verde más claro (Figura 22c).

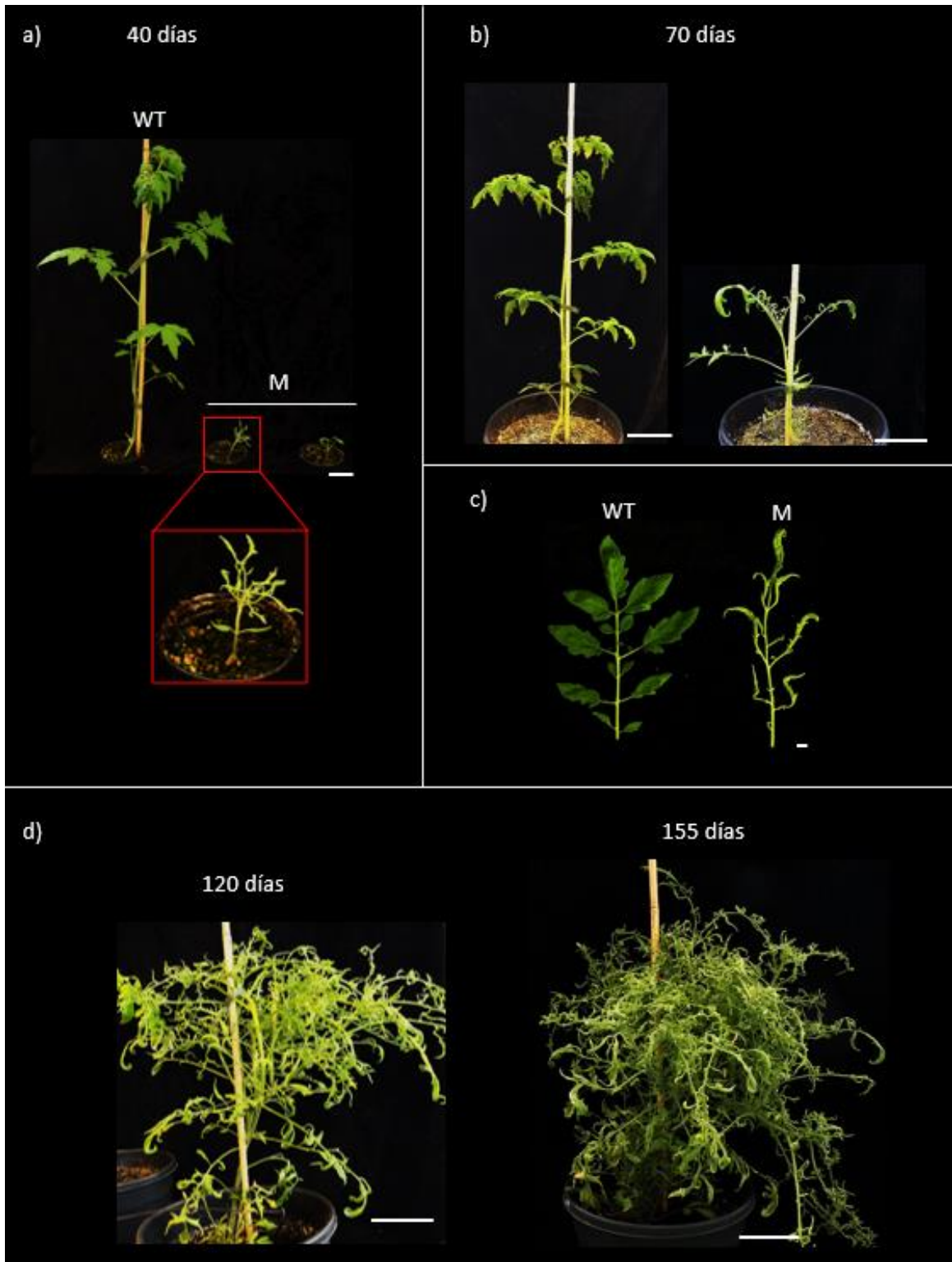


Figura 22. Fenotipo *in vivo* de plantas de la TG3 414 ET 73-8, **a)** plantas WT y mutante a los 40 días de la germinación. Escala: 5 cm. **b)** Plantas mutantes después de 70 días de cultivo. Escala:10 cm. **c)** Fenotipo de hoja WT y mutante. Escala: 1 cm. **d)** Planta mutante a los 120 y 155 días. Escala: 10 cm.

Las flores tampoco tuvieron un crecimiento normal y tenían diferentes formas y tamaños. En general, eran mucho más pequeñas que las del WT, y tenían afectado el desarrollo de todos los verticilos florales. En pre-antesis, hubo un tipo de flor mutante donde los pétalos eran cortos y no cubrían por completo el gineceo, que también se vio afectado (estilos cortos y gruesos). El ovario tenía un mayor tamaño con respecto al tamaño de la flor. Las flores no cuajaron en fruto y se observó que estas presentaron una zona de abscisión floral (Figura 23).

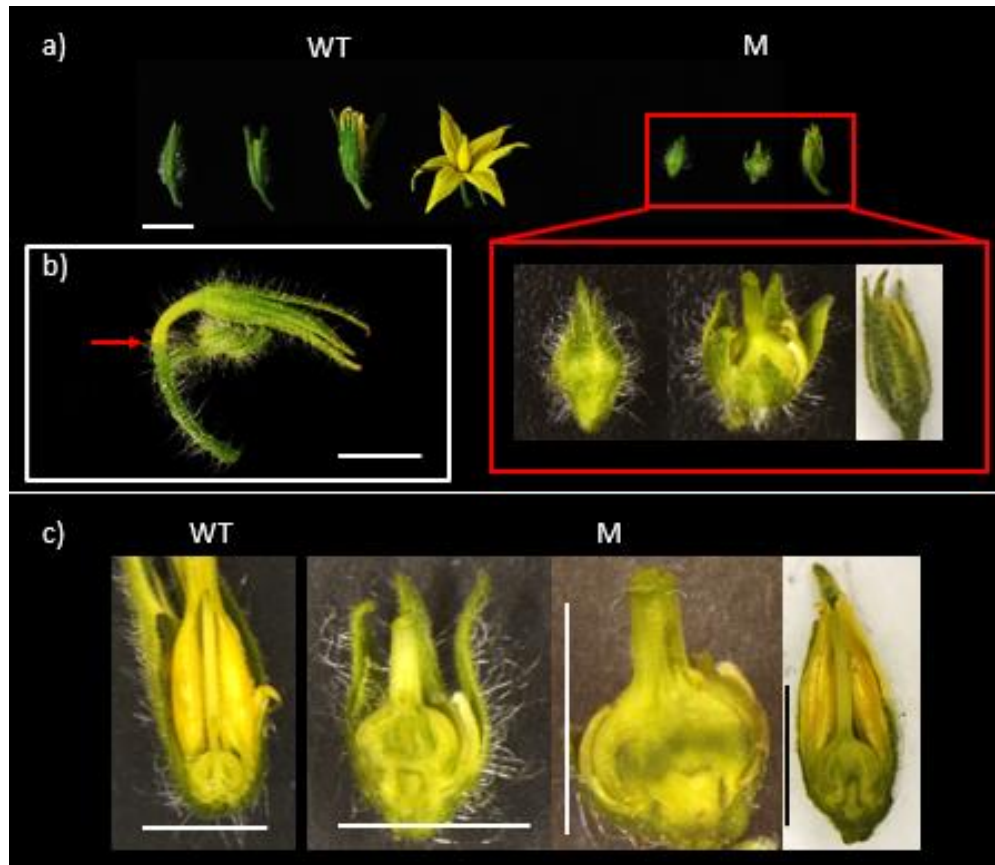


Figura 23. Flores WT y mutante de la línea 414 ET 73, **a)** flores en diferentes etapas del desarrollo, **b)** detalle de la zona de abscisión floral. Escala: 1cm, **c)** corte longitudinal de flores. Escala: 0.5 cm.

Para la caracterización *in vivo*, también se aclimataron dos plantas TG2 identificadas como mutantes *in vitro*. Se evaluó el crecimiento y, a los 35 días de la aclimatación, se observaron plantas con menor crecimiento, y hojas con folíolos delgados y rizados. A los 70 días se observó la presencia de yemas florales (Figura 24).



Figura 24. Plantas TG2 *in vivo* de la línea 414 ET 73 en diferentes tiempos desde la aclimatación. Escala: 10 cm.

Se cultivaron plantas mutantes en botes más grandes con medio MB3, para ver si al tener más espacio se observaba el fenotipo compacto *in vitro*. Pese al mayor tamaño del recipiente de cultivo, a los 50 días se observó un menor crecimiento, pero no un fenotipo compacto similar al observado *in vivo* (Figura 25).

En definitiva, el mutante tuvo un desarrollo bimodal en función del periodo de cultivo: a corto o medio plazo, tanto *in vitro* como *in vivo*, la planta tuvo un crecimiento lento, pero no exhibió un fenotipo compacto propiamente dicho; en cambio, cuando se cultivó *in vivo* a más largo plazo la planta tuvo un fenotipo totalmente distinto que se caracterizó por un crecimiento de tipo compacto, hojas con folíolos casi filiformes y diversas anomalías en el desarrollo de flores. Muy probablemente, si a un investigador que desconoce el material vegetal se le presentara la misma planta mutante a corto plazo y a largo plazo pensaría que se trata de dos mutantes completamente diferentes.

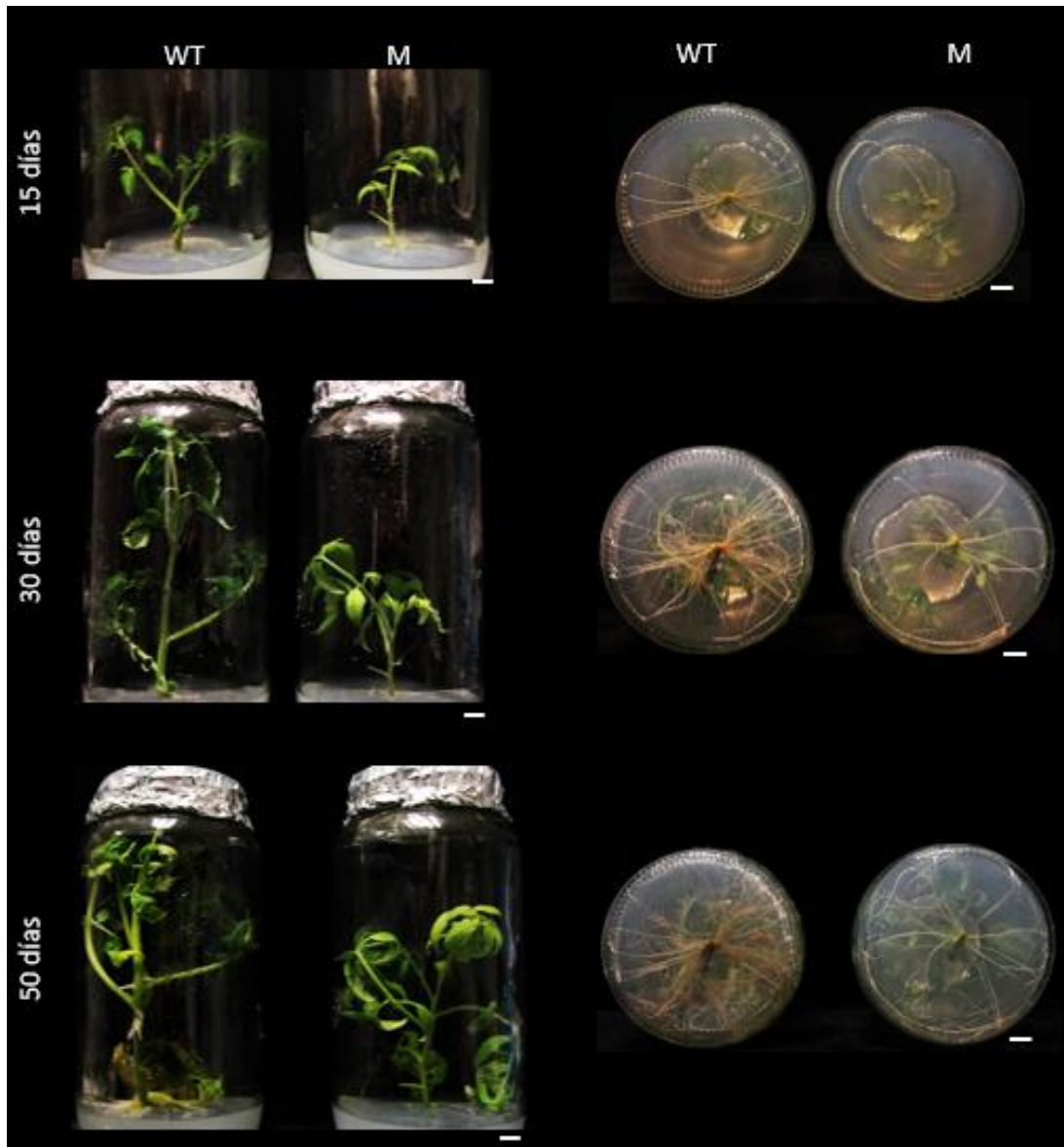


Figura 25. Fenotipo de plantas axénicas WT (P73) y mutantes de la línea 414 ET 73 en diferentes periodos de cultivo en medio MB3 y en botes grandes. Escala:1 cm.

4.3.2 Modo de herencia de la mutación

Se analizó el modo de herencia de la mutación considerando el fenotipo compacto *in vitro* de las plantas TG2 y TG3 obtenidas, así como las plantas TG3 obtenidas *in vivo*. La segregación observada se ajusta a un modelo recesivo monogénico (Tabla 6).

Tabla 6. Análisis del modo de herencia de la mutación de la línea 414 ET 73.

414 ET 73	Segregación	WT	M	Total	χ^2
TG2	Observada	14	6	20	0.27
	Esperados (3:1)	15	5		
TG3	Observada	8	7	15	3.76
	Esperados (3:1)	11.25	3.75		
<i>In vivo</i>	Observada	6	1	7	0.43
	Esperados (3:1)	5.25	1.75		
Datos acumulados* TG3	Observados	14	8	22	1.52
	Esperados (3:1)	16.5	5.5		

* Análisis χ^2 de homogeneidad ($\chi^2_H = 2.67$) indica que las muestras son homogéneas.

4.3.3 Análisis genético del número de insertos T-DNA

Para el análisis del número de insertos, se evaluó la resistencia a la kanamicina con explantes de hoja cultivados en medio ϵ y ápices meristemáticos de las TG2 en medio β . Con los datos obtenidos se pudo determinar que las líneas analizadas serían portadoras de un único inserto con el gen *nptII* funcional (Tabla 7).

Tabla 7. Análisis genético del número de insertos T-DNA con el gen *nptII* en la línea 414 ET 73.

414 ET 73	Segregación	Kan ^R	Kan ^S	Total	χ^2
TG2	Observados	17	3	20	1.07
	Esperados (3:1)	15	5		
TG3	Observados	9	6	15	1.80
	Esperados (3:1)	11.25	3.75		

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

Se detectaron cuatro mutantes sensibles a la kanamicina, por lo cual se descartó la cosegregación del fenotipo mutante con el inserto T-DNA (Tabla 8).

Tabla 8. Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 414 ET 73.

414 ET 73	WT		M		Total
	Kan ^R	Kan ^S	kan ^R	kan ^S	
TG2	12	2	5	1	20
TG3	5	3	4	3	15

4.4 Mutante 852 ET MM

En la evaluación preliminar realizada en Almería, las plantas mutantes cultivadas en el invernadero exhibían un menor crecimiento, menor distancia internodal, hojas pequeñas con folíolos arrugados y de color oscuro, una microinflorescencia en la zona apical, e inflorescencias basales con frutos pequeños, cordiformes y partenocárpicos. En este trabajo se amplió la caracterización *in vitro* para complementar lo observado.

4.4.1 Caracterización fenotípica *in vitro* e *in vivo*.

Primero se evaluó la germinación de las semillas TG2 recolectadas en 2007, pero no germinó ninguna. Se emplearon entonces las semillas de las progenies TG3 disponibles, en concreto ocho TG3-WT. De estas, cuatro tuvieron una mala germinación (menos del 30%) y, de los cuatro restantes, se observó fenotipo mutante en dos, motivo por el cual fueron las elegidas para llevar a cabo la caracterización.

En cultivo *in vitro*, las plántulas tenían un menor tamaño y anomalías en la raíz embrionaria. Tras subcultivar el ápice meristemático a medio MB3, a los 16 días las plantas axénicas también tenían menor tamaño y, más adelante, a los 21 días, además de menor tamaño exhibían una cierta compacidad (menor distancia internodal). Tras subcultivar nuevamente al mismo medio, a los 42 días se observó que las plantas axénicas mostraban el fenotipo compacto, un menor crecimiento y menor distancia internodal (Figura 26b). En sucesivos experimentos, se observó básicamente lo mismo, pero también se observaron plantas que, además de menor tamaño, presentaban hojas senescentes (Figura 26c).

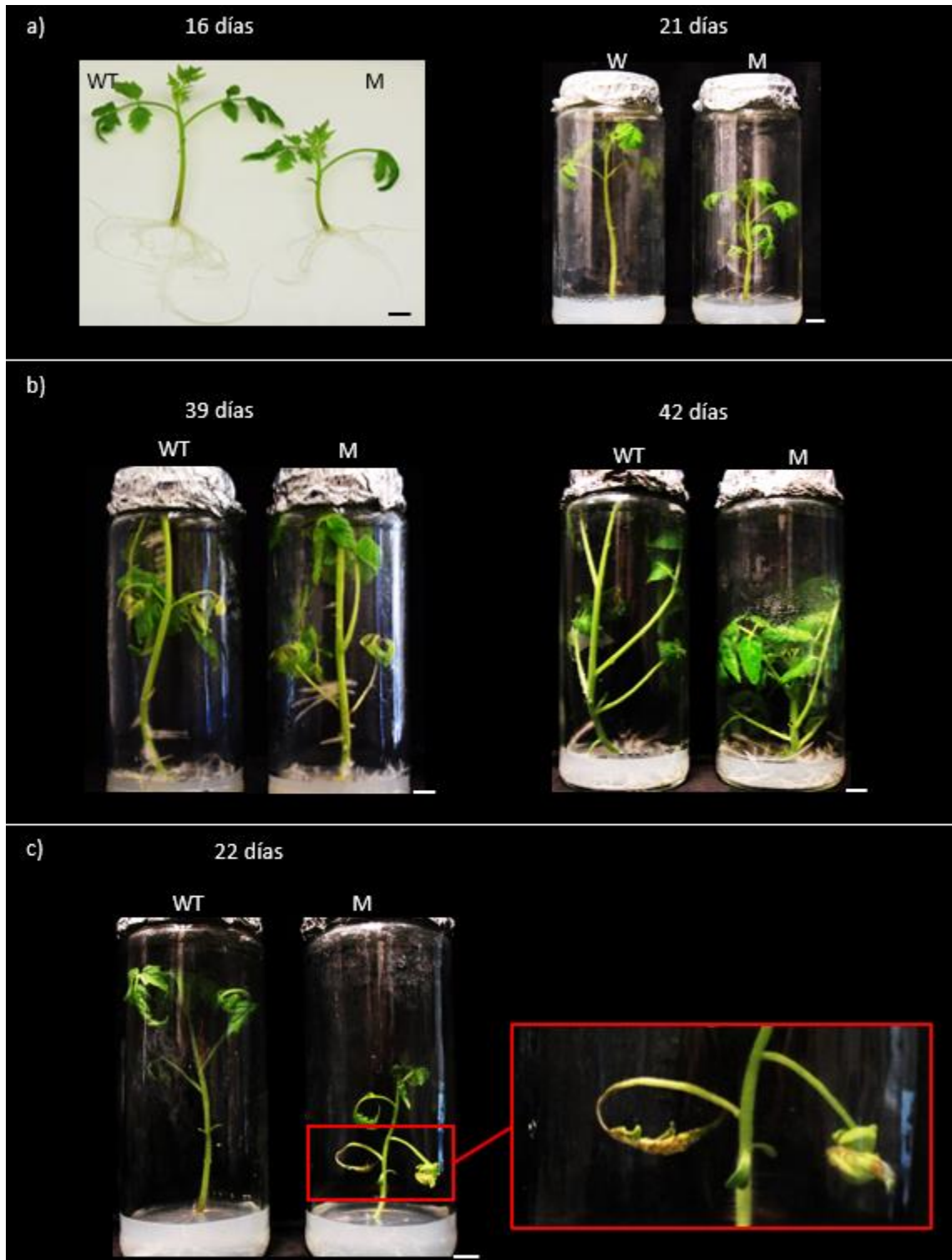


Figura 26. Plantas axénicas WT y mutantes de progenies TG3 de la línea 852 ET MM. **a)** Plantas subcultivadas desde MG a MB3, a los 16 y 21 días de cultivo. **b)** Plantas clonadas a los 39 y 42 días. **c)** Planta axénica con hojas senescentes a los 22 días desde la clonación. Escala: 1 cm.

Para la caracterización *in vivo*, se aclimataron todas las plantas mutantes, 12 en total. Al igual que ocurría *in vitro*, las plantas mutantes cultivadas en el invernadero tuvieron un menor tamaño y son algo más compactas.

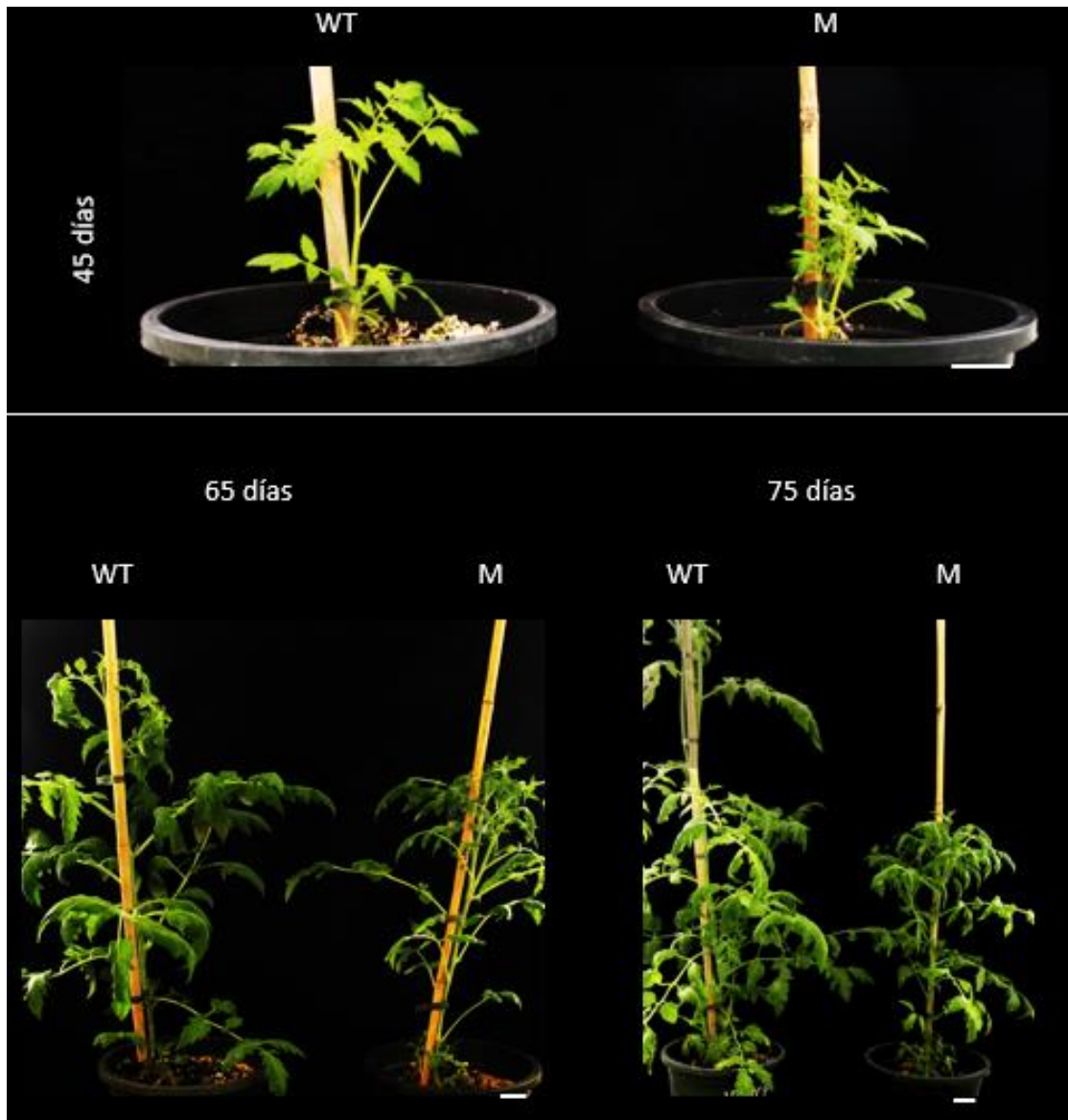


Figura 27. Fenotipo *in vivo* de plantas WT y mutantes de la línea 852 ET MM, días después de la aclimatación. Escala: 5 cm.

4.4.2 Modo de herencia de la mutación

En la Tabla 9, se muestran los resultados del análisis de modo herencia y el análisis con el test χ^2 . Como puede verse, en general los datos se ajustaron a lo esperado para una mutación monogénica recesiva, aunque en algunos casos se observó un menor número de plantas mutantes de lo esperado, lo que sugiere un cierto grado de subletalidad.

Tabla 9. Análisis del modo de herencia de la mutación de la línea 852 ET MM.

TG3	Segregación	WT	M	Total	χ^2
Experimento 1 (852-3)	Observada	11	3	14	0.10
	Esperados (3:1)	10.5	3.5		
Experimento 2 (852-3)	Observada	28	2	30	5.38
	Esperados (3:1)	22.5	7.5		
Datos acumulados* (852-3)	Observados	39	5	44	4.36
	Esperados (3:1)	33	11		
Experimento 1 (852-4)	Observada	9	3	12	0.00
	Esperados (3:1)	9	3		
Experimento 2 (852-4)	Observada	21	2	23	3.26
	Esperados (3:1)	17.25	5.75		
Experimento 3 (852-4)	Observada	14	4	18	0.07
	Esperados (3:1)	13.5	4.5		
Datos acumulados* 852-4	Observados	44	9	53	1.82
	Esperados (3:1)	39.75	13.25		

* Análisis χ^2 de homogeneidad ($\chi^2H=1.11$) indica que las muestras son homogéneas.

** Análisis χ^2 de homogeneidad ($\chi^2H=1.52$) indica que las muestras son homogéneas.

4.4.3 Análisis genético del número de insertos T-DNA.

En la Tabla 10 se muestra la segregación en dos TG3 analizadas. Como puede verse, los datos sugieren que la línea porta dos insertos de T-DNA con un gen nptII funcional.

Tabla 10. Análisis del número de insertos T-DNA en la línea 852 ET MM

TG3	Segregación	Kan ^R	Kan ^S	Total	χ^2
Experimento 1 (852-3)	Observada	14	0	14	4.67
	Esperados (3:1)	10.5	3.5		
	Esperados (15:1)	13.13	0.88		
Experimento 2 (852-3)	Observada	30	0	30	10.0
	Esperados (3:1)	22.5	7.5		
	Esperados (15:1)	28.13	1.88		

Datos acumulados* 852-3	Observados	44	0		
	Esperados (3:1)	33	11	44	14.67
	Esperados (15:1)	41.25	2.75		2.93
Experimento 1 (852-4)	Observada	12	0		
	Esperados (3:1)	9	3	12	4.00
	Esperados (15:1)	11.25	0.75		0.80
Experimento 2 (852-4)	Observada	23	0		
	Esperados (3:1)	17.25	5.75	23	7.67
	Esperados (15:1)	21.56	1.44		1.53
Experimento 3 (852-4)	Observada	18	0		
	Esperados (3:1)	13.5	4.5	18	6.0
	Esperados (15:1)	16.8	1.2		1.20
Datos acumulados* 852-4	Observados	53	0		
	Esperados (3:1)	39.75	13.25	53	17.67
	Esperados (15:1)	49.7	3.3		3.53

* Análisis χ^2 de homogeneidad ($\chi^2H=0.00$) indica que las muestras son homogéneas.

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

Como puede verse en la Tabla 11, al evaluar 97 plantas de dos progenies TG3 segregantes no se observó ninguna planta mutante sensible a la kanamicina. En el caso de que la línea 852 ETMM tuviera un inserto de T-DNA no habría ninguna duda de que existe cosegregación fenotipo – inserto. No obstante, como tiene dos insertos, se tendrían que evaluar 191 plantas de progenies segregantes para llegar a la conclusión de que existe cosegregación con una probabilidad de fallo del 5 %. Debido a la escasez del número de semillas, en este caso solo se pudo evaluar 97 plantas, lo que no excluye que exista cosegregación, aunque por el momento la probabilidad de fallo es demasiado grande (22 %). Por ello, en el momento actual, se están obteniendo nuevas progenies para conseguir suficientes semillas y tratar de llegar a una conclusión definitiva.

Tabla 11. Análisis de cosegregación del inserto y el fenotipo mutante de la línea 852 ET MM

TG3	WT		M		Total
	Kan ^R	Kan ^S	kan ^R	kan ^S	
852-3	39	0	5	0	44
852-4	44	0	9	0	53
Datos acumulados	83	0	14	0	97

5. DISCUSIÓN

En nuestro grupo se llevó a cabo un programa de mutagénesis insercional con T-DNA para generar una colección de mutantes de tomate (*Solanum lycopersicum* L cv Moneymaker y cv P73) y de especies silvestres relacionadas (*S.pennelli*, *S.galapagense* y *S.pimpinellifolium*).

El primer paso dentro de un programa de mutagénesis es identificar qué líneas presentan alteraciones. Si lo que se buscan son cambios en el desarrollo vegetativo, el cultivo *in vitro* ofrece grandes ventajas, ya que es posible fenotipar una mayor cantidad de plantas en menos espacio. Lo que permite controlar también las condiciones ambientales como la iluminación, temperatura, humedad, disponibilidad de agua y nutrientes, etc. Además, se evitan estreses bióticos (plagas y enfermedades) que podrían alterar el fenotipo. Por otra parte, es posible analizar tanto la raíz embrionaria en plántulas como el sistema radicular adventicio en plantas axénicas. Otra ventaja del cultivo *in vitro* es que se puede evaluar la capacidad de regeneración adventicia y de enraizamiento en diferentes tipos explantes. Por si fuera poco, el cultivo facilita el análisis del número de insertos, el análisis de cosegregación, e incluso la determinación del modo de herencia en el caso de mutaciones recesivas con un cierto grado de subletalidad.

La desventaja obvia de la evaluación *in vitro* es que no se pueden analizar caracteres del desarrollo vegetativo a largo plazo y sobre todo los relacionados con el desarrollo reproductivo. Para esto es necesario cultivar las plantas en el invernadero, lo que implica que las condiciones ya no serán tan controladas como *in vitro*, y que la planta estará expuesta al ataque de patógenos, lo que podría alterar el fenotipo.

Un factor determinante a la hora de fenotipar un mutante es la tasa de germinación de semillas. En nuestro caso, hubo problemas ya que las semillas TG2 de las líneas candidatas seleccionadas se habían obtenido en 2006 o 2007. La baja viabilidad de estas semillas, debido al extenso periodo de almacenamiento, nos obligó en ocasiones a realizar el análisis con progenies TG3, lo que representó un esfuerzo adicional.

De las cuatro líneas estudiadas, en la línea 852 ET MM no se descarta que haya cosegregación de un inserto con el gen *nptII* funcional y el fenotipo mutante. Sin embargo, en tres restantes se descartó la existencia de cosegregación ya que se observaron plantas mutantes sensibles a la kanamicina. Esto indicaría que el fenotipo no se debe a un inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional. Puede, no obstante, que haya cosegregación entre el fenotipo y un inserto truncado (i.e. sin un gen *nptII* funcional) o un fragmento del vector. Sin embargo, lo más probable en estos casos es que la mutación se deba a variación somaclonal (Perez-Martin et al., 2017). En nuestro programa de mutagénesis insercional con tomate, la frecuencia de cosegregación fenotipo – inserto en las líneas mutantes que hemos analizado (unas 200) está en torno al 15%. Nuestros resultados en tomate son similares a los obtenidos en programas de mutagénesis insercional con otras especies. Por ejemplo, en el análisis de una colección de líneas T-DNA de arroz sólo se observó cosegregación fenotipo –T-DNA en el 1.4% de las líneas (Li et al., 2006). En el caso de la planta modelo *Arabidopsis*, los trabajos en los que se ha analizado la cosegregación, la frecuencia está en torno al 10% (Van Lijsebettens, Vanderhaeghen, & Van Montagu, 1991). En algún caso se ha descrito una tasa de cosegregación cercana al 30% (Nam et al., 1999), pero esto no es lo más usual.

En el caso de que haya cosegregación, la identificación y clonación del gen se realiza habitualmente mediante Anchor-PCR. Si no hay cosegregación con un inserto que porte un gen marcador funcional, conviene analizar la presencia de algún fragmento del inserto o del cuerpo del vector. Al ser secuencias conocidas, se pueden detectar fácilmente mediante PCR. Si se trata de un mutante somaclonal, se deben realizar cruces con *S. pimpinellifolium*, obtener la F2 e identificar plantas WT y mutantes, con las que se realizará mapeo por secuenciación para detectar el gen alterado que está causando la mutación.

En la caracterización de mutantes afectados en la arquitectura de la planta, destacan dos que presentaron mayor ramificación y alteraciones en la morfología de la hoja (150 ET 73 y 414 ET 73). La línea 150 ET 73 destaca por sus peculiares hojas de tipo casi filiforme, lo que en inglés se denomina como *shoestring leaves* (Figura 11). El fenotipo es similar al de otra línea caracterizada anteriormente en el grupo (1527 ET MM), así como al de otros mutantes identificados por otros grupos, a los que llamaron *wiry*. El primer mutante de este tipo se

describió en 1928 por Lesley J.W y Lesley M.M. Estos autores indicaron que su fenotipo era similar al de un tomate infectado por un virus, con hojas muy variadas que tendían a la reducción laminar y flores con sépalos y pétalos no unidos (J & Lesley, 1928; Mach, 2012). Las características observadas llevan a pensar que podría haber una alteración de auxina, ya que esta hormona se relaciona con la determinación de la morfogénesis de las hojas (Koenig, Bayer, Kang, Kuhlemeier, & Sinha, 2009). Se ha descrito que los mutantes *wiry* tienen afectados *locis* que están relacionados con la biogénesis de ta-siRNA (*trans-acting short interfering RNAs*). Estos pequeños ARNs interferentes están involucrados en la respuesta a auxinas, actuando mediante la regulación de ARFs (AUXIN RESPONSE FACTORS) (Yifhar et al., 2012). Además de las auxinas, también hay otros factores involucrados en la determinación de la forma de hojas. Kim y colaboradores (2003), encontraron que en mutantes *wiry* había un bajo nivel de expresión del gen *LePHAN*. Este es un factor de transcripción con dominio MYB está involucrado en la regulación del destino de células adaxiales en los primordios foliares. Este es regulado negativamente por un gen tipo *KNOX (LeT6)*, que está implicado en la formación de hojas compuestas (Kim et al., 2003). Cabe destacar que las investigaciones mencionadas, hacen referencia a diferentes tipos de fenotipo *wiry*, ya que algunos son más severos que otros y no en todos se ven las mismas alteraciones de hoja y flor, sino que esto depende del *locus* afectado. En los trabajos de otros autores no se ha hecho referencia a la alteración de raíces secundarias, lo cual sí se observó en el presente trabajo. Con todo, la alteración en sistema radicular del mutante 150 ET 73 fue menos severa que la del otro mutante *wiry* identificado en el grupo (1527 ET MM).

Otra línea que presentó alteraciones en las hojas es la 414 ET 73. Esta, además de presentar hojas y flores alteradas, se destacó por su lento crecimiento y compacidad (Figura 22), un fenotipo similar al denominado *bushy*. En algunos trabajos se ha descrito que este fenotipo está asociado a la sobreexpresión de un micro RNA (miRNA), específicamente miR156. La diana de este miRNA son los genes SBP-box (SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-box), que codifican factores de transcripción específicos de planta, implicados en la regulación de diferentes procesos de desarrollo. Zhang y colaboradores (2011) observaron que la sobreexpresión de miR156a en tomate genera plantas enanas con mayor número de hojas de

menor tamaño, y menor distancia internodal. Además, observaron un desarrollo temprano de brotes laterales y un menor rendimiento por planta (Zhang et al., 2011). La descripción es similar a lo observado en nuestro trabajo, con la excepción que los mencionados autores observan mayor desarrollo de raíces adventicias, lo que no sucede en este mutante. En otras investigaciones, al sobreexpresar miR156a o miR157b en plantas de otras especies como *Torenia fournieri*, también se observó un alto grado de ramificación y entrenudos cortos. Observaron también alteraciones en las hojas, que presentaron una lámina foliar pequeña y con las orillas más lisas. Las flores de *Torenia* también estaban afectadas, ya que tenían un menor tamaño y órganos defectuosos (Shikata, Yamaguchi, Sasaki, & Ohtsubo, 2012). En un estudio con arroz también se observó que en un mutante de ganancia de función designado *Bushy dwarf tiller 1 (Bdt1)* había un aumento de transcrito de miR156d y que además la mutación en homocigosis generaba un fenotipo más severo que en heterocigosis (Hayashi-Tsugane, Maekawa, & Tsugane, 2015).

La línea 239 ET MM, se caracterizó por una supresión del desarrollo de yemas axilares. Se observó también signos de marchitez y abscisión temprana de hojas (Figura 12). Las plantas mutantes no desarrollaron flores en ningún momento del desarrollo, por lo que no se obtuvieron frutos. En un trabajo previo se identificó el gen *Lateral supressor (Ls)* en un mutante de tomate que tenía reprimido el desarrollo de meristemos axilares, además de una menor cantidad de flores, que exhibían ausencia de pétalos y disminución en la fertilidad masculina y femenina (Schumacher et al., 1999). Cuando realizaron el análisis de la proteína codificada por *Lateral supressor*, encontraron una gran similitud con la familia de proteínas GRAS. Entre los miembros de esta familia, se encuentran proteínas insensibles a giberelina (GAI) y un represor de giberelinas (RGA). Por otra parte, el mutante *blind (bl)* de tomate también presenta una supresión del desarrollo de yemas axilares. Este gen es miembro de la familia Myb, un grupo de factores de transcripción en plantas que están involucrados en varias rutas de regulación (Feng, Yuan, & Bao-zhong, 2012). A pesar de algunas similitudes entre el mutante caracterizado en este trabajo y los mencionados anteriormente, hay algunas características distintivas del mutante 239 ET MM, como la abscisión temprana de hojas y la marchitez prematura. Es posible que ello se deba a un desequilibrio hormonal causado por la mutación. De hecho se ha

reportado que el mutante *Ls* contenía altos niveles de auxina, ácido abscísico y giberelina, pero reducidos niveles de citoquininas (Bolle, 2004). Así pues, en breve se analizará el contenido de hormonas de nuestro mutante.

En relación con la línea 852 ET MM, esta presentó un fenotipo de menor crecimiento, entrenudos más cortos y compacidad. Este fenotipo es similar al observado en otras líneas identificadas en nuestro grupo, aunque con diferentes niveles de expresividad. Es probable que los mutantes compactos tengan alterados genes que estén implicados en la biosíntesis de diferentes hormonas, como las giberelinas (GA), una de cuyas principales funciones es la elongación del tallo. En investigaciones anteriores, se han evaluado mutantes con deficiencia en la biosíntesis de esta hormona, observando que las plantas tenían un menor crecimiento (Xiao et al., 2006). También se ha visto que algunos mutantes enanos tienen afectados genes relacionados con biosíntesis de brasinosteroides (BR). Esta hormona es esencial para el crecimiento y desarrollo de la planta. En concreto, los mutantes enanos *dwf 5*, *dwf 7* y *dwt1*, están afectados en la síntesis del precursor de BRs (Cheon, Fujioka, Dilkes, & Choe, 2013).

6. CONCLUSIONES

1. La línea 150 ET 73, presentó un fenotipo similar al de los mutantes *wiry* de tomate. Las plantas del mutante 150 ET 73 exhibieron severas alteraciones en la arquitectura de las hojas y de las flores. Las raíces adventicias presentaron inicialmente un menor número de raíces secundarias, aunque la alteración del sistema radicular no fue tan drástica como lo observado en otro mutante *wiry* (1527 ET MM) identificado por el grupo.
2. La línea 239 ET MM, presentó un fenotipo reminiscente a *Lateral suppressor*, se caracterizó por una supresión del desarrollo de yemas axilares. Pese a ello, los ensayos de decapitación del ápice y los tratamientos con ácido giberélico activaron el desarrollo de brotes laterales, lo que indicó que las yemas axilares eran funcionales. Las plantas mutantes presentaron un escaso desarrollo de raíces secundarias. Por lo que respecta al desarrollo reproductivo, las plantas mutantes no desarrollaron flores. Los análisis efectuados indicaron que la mutación no se debe a un inserto de T-DNA.
3. La línea 414 ET 73, presentó alteraciones en la altura de la planta, un menor crecimiento y menor distancia internodal, además de un menor desarrollo de raíces secundarias. También estaba afectada la arquitectura de la hoja y de las flores. El fenotipo estaba determinado por una mutación recesiva. La línea presentó un de T-DNA que no cosegrega con el fenotipo mutante. Sorprendentemente, el mutante mostró un desarrollo en dos fases en función del periodo de cultivo: a corto-medio plazo, el mutante tuvo un crecimiento lento, pero no exhibió un fenotipo compacto propiamente dicho; en cambio, cuando se cultivó en el invernadero a más largo plazo, la planta presentó un fenotipo totalmente distinto que se caracterizó por un crecimiento de tipo compacto, hojas con folíolos casi filiformes y diversas anomalías en el desarrollo de flores.
4. La línea 852 ET MM, se caracterizó por un menor crecimiento y distancia internodal, aunque el desarrollo del sistema radicular no estaba afectado. El fenotipo se debió a una mutación monogénica recesiva. La línea tenía más de un inserto de T-DNA (probablemente dos) y, de momento, no se puede descartar que haya cosegregación del fenotipo con uno de los insertos.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Anjani, K., V.K. S., & Harsh, K. (2018). Gene Trapping: A powerful tool of functional genomics to identify novel genes. *International Journal of Genetics*, 10(1), 325-332.
- Ann, T. J. (2009). Genetic Engineering of Plants. In H. W. Doelle, J. S. Rokem, & M. Berovic (Eds.), *BIOTECHNOLOGY, Methods in Gene Engineering* (Vol. 3, pp. 94-110).
- Atarés, A., Moyano, E., Morales, B., Schleicher, P., García-Abellán, J. O., Antón, T., . . . Pineda, B. (2011). An insertional mutagenesis programme with an enhancer trap for the identification and tagging of genes involved in abiotic stress tolerance in the tomato wild-related species *Solanum pennellii*. *Plant Cell Reports*, 30(10), 1865.
- Bai, Y., & Lindhout, P. (2007). *Domestication and Breeding of Tomatoes: What have We Gained and What Can We Gain in the Future?* (Vol. 100).
- Bauchet, G., & Causse, M. (2012). *Genetic Diversity in Tomato (Solanum lycopersicum) and Its Wild Relatives*.
- Bergougnoux, V. (2014). The history of tomato: from domestication to biopharming. *Biotechnol Adv*, 32(1), 170-189.
- 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.
- Bolle, C. (2004). The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. *Planta*, 218(5), 683-692.
- Cheon, J., Fujioka, S., Dilkes, B. P., & Choe, S. (2013). Brassinosteroids regulate plant growth through distinct signaling pathways in *Selaginella* and *Arabidopsis*. *PLoS One*, 8(12), e81938.
- Dagla, H. R. (2012). Plant tissue culture. *Resonance*, 17(8), 759-767.
- Doebley, J., Stec, A., & Hubbard, L. (1997). The evolution of apical dominance in maize. *Nature*, 386(6624), 485-488.
- Erba, D., Casiraghi, M. C., Ribas-Agustí, A., Cáceres, R., Marfà, O., & Castellari, M. (2013). Nutritional value of tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) grown in greenhouse by

- different agronomic techniques. *Journal of Food Composition and Analysis*, 31(2), 245-251.
- FAO. (2019). Food and Agriculture Organization of the United Nations <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize>.
- FAO. (2011). *Plant Mutation Breeding and Biotechnology* (Q. Y. Shu, B. P. Forster, & H. Nakagawa Eds.).
- Feng, J., Yuan, L., & Bao-zhong, H. (2012). *Overview of Plant Shooting Branch* (Vol. 19).
- Hareven, D., Gutfinger, T., Parnis, A., Eshed, Y., & Lifschitz, E. (1996). The Making of a Compound Leaf: Genetic Manipulation of Leaf Architecture in Tomato. *Cell*, 84(5), 735-744.
- Hayashi-Tsugane, M., Maekawa, M., & Tsugane, K. (2015). A gain-of-function Bushy dwarf tiller 1 mutation in rice microRNA gene miR156d caused by insertion of the DNA transposon nDart1. *Scientific reports*, 5, 14357-14357.
- Health, C. o. I. a. A. U. E. o. G. E. F. o. H. (2004). Methods and Mechanisms for Genetic Manipulation of Plants, Animals, and Microorganisms. In *Safety of Genetically Engineered Foods: Approaches to Assessing Unintended Health Effects*.
- J, W., & Lesley, M. M. (1928). THE "WIRY" TOMATO Recessive Mutant Form Resembling a Plant Affected with Mosaic Disease*. *Journal of Heredity*, 19(8), 337-344.
- Kim, M., Pham, T., Hamidi, A., McCormick, S., Kuzoff, R. K., & Sinha, N. (2003). Reduced leaf complexity in tomato wiry mutants suggests a role for PHAN and KNOX genes in generating compound leaves. *Development*, 130(18), 4405.
- Koenig, D., Bayer, E., Kang, J., Kuhlemeier, C., & Sinha, N. (2009). Auxin patterns in *Solanum lycopersicum* leaf morphogenesis. *Development*, 136(17), 2997.
- Li, A.-H., Zhang, Y.-F., Wu, C.-Y., Tang, W., Wu, R., Dai, Z.-Y., . . . Pan, X.-B. (2006). Screening for and Genetic Analysis on T-DNA-inserted Mutant Pool in Rice. *Acta Genetica Sinica*, 33(4), 319-329.
- Loyola-Vargas, V. M., De-la-Peña, C., Galaz-Ávalos, R. M., & Quiroz-Figueroa, F. R. (2008). Plant Tissue Culture. In J. M. Walker & R. Rapley (Eds.), *Molecular Biomethods Handbook* (pp. 875-904). Totowa, NJ: Humana Press.

- M, W. A., & G, W. M. (2012). History of Agricultural Biotechnology: How Crop Development has Evolved. In (Vol. 3). Nature Education Knowledge.
- Mach, J. (2012). Why Wiry? Tomato Mutants Reveal Connections among Small RNAs, Auxin Response Factors, Virus Infection, and Leaf Morphology. *The Plant Cell*, 24(9), 3486.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
- Nam, J., Mysore, K. S., Zheng, C., Knue, M. K., Matthyse, A. G., & Gelvin, S. B. (1999). Identification of T-DNA tagged Arabidopsis mutants that are resistant to transformation by Agrobacterium. *Mol Gen Genet*, 261(3), 429-438.
- Perez-Martin, F., Yuste-Lisbona, F. J., Pineda, B., Angarita-Diaz, M. P., Garcia-Sogo, B., Anton, T., . . . Lozano, R. (2017). A collection of enhancer trap insertional mutants for functional genomics in tomato. *Plant Biotechnol J*, 15(11), 1439-1452.
- Schleicher, P. (2017). *Mutagénesis insercional en tomate y Solanum pennellii: Identificación de mutantes de inserción alterados en el desarrollo y la tolerancia a la salinidad*. (Doctor), Universidad Politécnica de Valencia, Valencia.
- Ranjan, A., Ichihashi, Y., & Sinha, N. R. (2012). The tomato genome: implications for plant breeding, genomics and evolution. *Genome Biology*, 13(8), 167-167.
- Reinhardt, D., & Kuhlemeier, C. (2002). Plant architecture. *EMBO reports*, 3(9), 846.
- Sanagala, R., Moola, A. K., & Bollipo Diana, R. K. (2017). A review on advanced methods in plant gene targeting. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(2), 317-321.
- Schumacher, K., Schmitt, T., Rossberg, M., Schmitz, G., & Theres, K. (1999). The *Ls* gene of tomato encodes a new member of the VHIID protein family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(1), 290.
- Shahin, E. A. (1985). Totipotency of tomato protoplasts. *Theoretical and Applied Genetics*, 69(3), 235-240.
- Shikata, M., Yamaguchi, H., Sasaki, K., & Ohtsubo, N. (2012). Overexpression of Arabidopsis miR157b induces bushy architecture and delayed phase transition in *Torenia fournieri*. *Planta*, 236(4), 1027-1035.

- Springer, P. S. (2000). Gene Traps: Tools for Plant Development and Genomics. *The Plant Cell*, 12(7), 1007.
- Sun, L., Chen, J., Xiao, K., & Yang, W. (2017). Origin of the Domesticated Horticultural Species and Molecular Bases of Fruit Shape and Size Changes during the Domestication, Taking Tomato as an Example. *Horticultural Plant Journal*, 3(3), 125-132.
- The Tomato Genome, C., Sato, S., Tabata, S., Hirakawa, H., Asamizu, E., Shirasawa, K., . . . Gianese, G. (2012). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, 485, 635.
- Van Lijsebettens, M., Vanderhaeghen, R., & Van Montagu, M. (1991). Insertional mutagenesis in *Arabidopsis thaliana*: isolation of a T-DNA-linked mutation that alters leaf morphology. *Theoretical and Applied Genetics*, 81(2), 277-284.
- 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* (Vol. 50).
- Yifhar, T., Pekker, I., Peled, D., Friedlander, G., Pistunov, A., Sabban, M., . . . Eshed, Y. (2012). Failure of the Tomato *Trans*-Acting Short Interfering RNA Program to Regulate AUXIN RESPONSE FACTOR3 and ARF4 Underlies the Wiry Leaf Syndrome. *The Plant Cell*, 24(9), 3575.
- Zhang, X., Zou, Z., Zhang, J., Zhang, Y., Han, Q., Hu, T., . . . Ye, Z. (2011). Over-expression of sly-miR156a in tomato results in multiple vegetative and reproductive trait alterations and partial phenocopy of the sft mutant. *FEBS Lett*, 585(2), 435-439.