

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas

Trabajo Fin de Máster

Identificación y caracterización de mutantes afectados en caracteres del desarrollo temprano en líneas T-DNA de tomate



Autora:

Inés Medina Lozano

Directores:

Alejandro Atarés Huerta

Vicente Moreno Ferrero

Directora experimental:

Marybel Jáquez Gutiérrez

ENERO 2019

Resumen

El tomate es uno de los cultivos hortícolas más importantes a nivel económico y constituye una especie modelo en investigación, especialmente dentro de las dicotiledóneas con frutos carnosos. Por estas razones, la identificación de los genes implicados en el desarrollo de la planta es clave, tanto a nivel aplicado como a nivel de investigación básica. La detección de mutantes afectados en este desarrollo es la mejor estrategia para abordar este objetivo. Para generar colecciones de mutantes, la mutagénesis insercional con T-DNA constituye una herramienta muy útil. Tras conseguir una colección de mutantes, permite el etiquetado de los genes afectados con un inserto de ADN conocido, cuya clonación mediante técnicas basadas en la PCR es rápida y sencilla. Además, si se utilizan trampas génicas se puede obtener información adicional sobre la función del gen a partir del estudio de su patrón de expresión.

En el marco de distintos proyectos de investigación se ha generado una colección de unas 7800 líneas T-DNA de tomate y especies silvestres relacionadas gracias al desarrollo de protocolos eficaces de transformación genética en estas especies. Para la identificación de las líneas mutantes se han utilizado técnicas de cultivo *in vitro*, junto con el cultivo de plantas en el invernadero. A partir de los mutantes identificados se ha clonado una serie de genes relacionados con el desarrollo vegetativo y reproductivo y la tolerancia a distintos estreses abióticos.

En el presente trabajo se ha planteado un objetivo doble: por un lado, la identificación de nuevos mutantes alterados en la respuesta morfogénica *in vitro*, así como en caracteres del desarrollo temprano y, por otro lado, la caracterización de mutantes compactos previamente identificados en el grupo. Tras el escrutinio de 80 líneas T-DNA, se ha conseguido la identificación de tres nuevos mutantes con un sistema radicular dañado y/o clorosis. Además, tras el estudio de 15 líneas candidatas, se ha caracterizado un mutante compacto previamente identificado. En las cuatro líneas estudiadas la mutación fue de carácter monogénico recesivo, se integró un único inserto de T-DNA y en ningún caso hubo cosegregación entre el fenotipo mutante y dicho inserto de T-DNA. En todos los casos se están llevando a cabo las tareas necesarias para lograr identificar el gen alterado mediante técnicas de mapeo por secuenciación.

Palabras clave: Cultivo *in vitro*, mutagénesis insercional, tomate, desarrollo temprano

Abstract

Tomato is one of the most important crops at the economical level and it has become a model species in research, especially for dicots with fleshy fruit. For these reasons, one of the keys of the success is the identification of genes involved in plant development, both at applied level and in basic research. The best strategy to achieve this objective is the detection of mutants which are affected in this development. In order to obtain mutant collections, insertional mutagenesis using T-DNA is a very useful tool. After generating a mutant collection, it allows the tagging of the affected genes with a known DNA insert, whose cloning using PCR-based techniques is fast and simple. Furthermore, if gene traps are used, additional information about the function of the gene can be obtained from the study of its expression pattern.

Within the context of different research projects, a collection of about 7800 T-DNA lines of tomato and related wild species has been obtained thanks to the development of efficient genetic transformation protocols for these species. In order to identify the mutant lines, *in vitro* culture techniques have been used, together with the growth of plants in the greenhouse. A series of genes have been cloned related to vegetative and reproductive development, and the tolerance to different abiotic stresses from the identified mutants.

In this work, a double objective has been proposed: on the one hand, the identification of new mutants altered in the morphogenetic response *in vitro*, as well as in characters implied in early development and, on the other hand, the characterization of compact mutants previously identified in the group. After the screening of 80 T-DNA lines, the identification of three new mutants with a damaged root system and/or chlorosis has been achieved. In addition, after the study of 15 candidate lines, a previously identified compact mutant has been characterized. In the four studied lines, the mutation had a recessive monogenic nature, a single T-DNA insert was integrated and in no case there was a cosegregation between the mutant phenotype and this T-DNA insert. In all cases, the necessary tasks are being carried out to identify the altered gene by sequencing mapping techniques.

Keywords: *In vitro* culture, insertional mutagenesis, tomato, early development

Índice de contenidos

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1. El tomate | 1 |
| 1.1.1. Origen y domesticación..... | 1 |
| 1.1.2. Importancia económica | 1 |
| 1.1.3. El tomate como organismo modelo en investigación y su mejora genética..... | 2 |
| 1.2. Mutagénesis insercional | 5 |
| 1.3. Trampas génicas | 6 |
| 1.4. Evaluación de mutantes afectados en caracteres del desarrollo temprano..... | 7 |
| 2. OBJETIVOS | 8 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 9 |
| 3.1. Material vegetal..... | 9 |
| 3.2. Identificación y estudio de mutantes afectados en caracteres del desarrollo temprano en líneas T-DNA de tomate | 10 |
| 3.2.1. Esterilización de semillas | 10 |
| 3.2.2. Fenotipado <i>in vitro</i> | 11 |
| 3.2.2.1. Preparación de medios de cultivo..... | 11 |
| 3.2.2.2. Germinación y obtención de plántulas y plantas axénicas | 11 |
| 3.2.2.3. Clonación de plantas | 12 |
| 3.2.3. Fenotipado <i>in vivo</i> | 12 |
| 3.2.3.1. Aclimatación de plantas | 13 |
| 3.2.3.2. Semilleros <i>in vivo</i> | 13 |
| 3.2.3.3. Injertos..... | 14 |
| 3.2.4. Cruces sexuales | 14 |
| 3.3. Análisis genético | 14 |
| 3.3.1. Análisis del modo de herencia de la mutación..... | 14 |
| 3.3.2. Análisis genético del número de insertos de T-DNA..... | 15 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.3.3. Análisis de cosegregación del inserto de T-DNA y el fenotipo mutante | 15 |
| 3.3.4. Análisis estadístico: Test χ^2 | 16 |
| 3.4. Caracterización de mutantes compactos candidatos en líneas T-DNA de tomate | 16 |
| 4. RESULTADOS..... | 17 |
| 4.1. 561 ET 73 | 17 |
| 4.1.1. Análisis del modo de herencia de la mutación | 20 |
| 4.1.2. Análisis del número de insertos de T-DNA | 20 |
| 4.1.3. Análisis de cosegregación del fenotipo mutante y el inserto <i>nptII</i> funcional | 21 |
| 4.2. 2486 ET MM..... | 22 |
| 4.2.1. Análisis del modo de herencia de la mutación | 26 |
| 4.2.2. Análisis del número de insertos de T-DNA | 26 |
| 4.2.3. Análisis de cosegregación del fenotipo mutante y el inserto <i>nptII</i> funcional | 27 |
| 4.3. 2641 ET MM..... | 28 |
| 4.3.1. Análisis del modo de herencia de la mutación | 39 |
| 4.3.2. Análisis del número de insertos de T-DNA | 40 |
| 4.3.3. Análisis de cosegregación del fenotipo mutante y el inserto <i>nptII</i> funcional | 41 |
| 4.4. 2657 ET MM..... | 42 |
| 4.4.1. Análisis del modo de herencia de la mutación | 48 |
| 4.4.2. Análisis del número de insertos de T-DNA | 49 |
| 4.4.3. Análisis de cosegregación del fenotipo mutante y el inserto <i>nptII</i> funcional | 49 |
| 5. DISCUSIÓN..... | 50 |
| 6. CONCLUSIONES..... | 56 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA..... | 57 |

Índice de figuras

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Comparación entre <i>S. pimpinellifolium</i> , <i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> y <i>S. lycopersicum</i> 1 | |
| Figura 2. (A) Distribución de la producción mundial de tomate en el año 2017. (B) Producción en toneladas de tomate por los principales países productores en 2017. | 2 |
| Figura 3. Diversidad del fruto del tomate..... | 3 |
| Figura 4. Representación esquemática de las construcciones utilizadas como trampas génicas..... | 7 |
| Figura 5. Mapa genético del plásmido pD991 utilizado para la transformación de <i>S. lycopersicum</i> | 9 |
| Figura 6. Proceso de esterilización de semillas..... | 10 |
| Figura 7. Obtención de plántulas y plantas axénicas..... | 12 |
| Figura 8. Fenotipo en planta axénica de la línea 561 ET 73 en MB3 | 17 |
| Figura 9. Fenotipo <i>in vivo</i> de plantas WT y M aclimatadas de la línea 561 ET 73..... | 18 |
| Figura 10. Fenotipo <i>in vivo</i> de la línea 561 ET 73. | 18 |
| Figura 11. Longitud en cm de los 15 primeros entrenudos de plantas WT y M de la línea 561 ET 73 | 19 |
| Figura 12. Organogénesis adventicia en explantes de cotiledón de la línea 561 ET 73..... | 19 |
| Figura 13. Fenotipo en plántula de la línea 2486 ET MM en medio MG | 22 |
| Figura 14. Fenotipo de plantas axénicas WT y M de la línea 2486 ET MM en medio MB3 | 23 |
| Figura 15. Fenotipo en planta axénica de la línea 2486 ET MM en medio α | 23 |
| Figura 16. Fenotipo de plántulas WT y M de la línea 2486 ET MM en medio MB3 y medio MB3 con distintos suplementos nutricionales..... | 24 |
| Figura 17. Organogénesis adventicia en explantes de cotiledón de la línea 2486 ET MM..... | 25 |
| Figura 18. Fenotipo <i>in vivo</i> de plántulas WT y M de la línea 2486 ET MM. | 25 |
| Figura 19. Análisis de la resistencia a la kanamicina de la línea 2486 ET MM en explantes de hoja y peciolo para plantas WT y de raíz para plantas M. | 26 |
| Figura 20. Fenotipo en plántula de la línea 2641 ET MM en medio MG | 28 |
| Figura 21. Organogénesis adventicia de la línea 2641 ET MM. | 29 |
| Figura 22. Fenotipo de la línea 2641 ET MM en distintos medios a partir de distintos explantes. | 30 |
| Figura 23. Fenotipo de raíces adventicias de la línea 2641 ET MM desarrolladas a partir de explantes de ápice en medio MB3..... | 31 |
| Figura 24. Fenotipo de raíces adventicias de la línea 2641 ET MM desarrolladas a partir de explantes de ápice en medio α | 32 |
| Figura 25. Fenotipo de raíces adventicias de la línea 2641 ET MM desarrolladas a partir de explantes de ápice en medio IK..... | 32 |
| Figura 26. Fenotipo de raíces adventicias de la línea 2641 ET MM desarrolladas a partir de explantes de hoja en medio I40.. | 33 |
| Figura 27. Fenotipo de plantas axénicas de la línea 2641 ET MM en medio MB3 con distintas concentraciones de IAA. | 34 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 28. Fenotipo de plantas axénicas de la línea 2641 ET MM en medio MB3 con distintas concentraciones de IBA..... | 35 |
| Figura 29. Fenotipo de plantas axénicas de la línea 2641 ET MM en medio básico con distintas auxinas sintéticas..... | 36 |
| Figura 30. Evolución a lo largo del tiempo del desarrollo radicular en plantas axénicas mutantes de la línea 2641 ET MM cultivadas en medio MB3. | 37 |
| Figura 31. Fenotipo en planta axénica de la línea 2641 ET MM en medio IK. | 38 |
| Figura 32. Fenotipo <i>in vivo</i> de plántulas WT y M de la línea 2641 ET MM. | 38 |
| Figura 33. Fenotipo <i>in vivo</i> de plantas WT y M aclimatadas de la línea 2641 ET MM..... | 39 |
| Figura 34. Fenotipo en plántulas de la línea 2657 ET MM en MG..... | 42 |
| Figura 35. Fenotipo en planta axénica de la línea 2657 ET MM en MB3 | 43 |
| Figura 36. Fenotipo en planta axénica de la línea 2657 ET MM en MB3 | 43 |
| Figura 37. Fenotipo de plantas axénicas de la línea 2657 ET MM en medio básico con IAA e IBA.. | 44 |
| Figura 38. Fenotipo de plantas axénicas de la línea 2657 ET MM en medio básico con distintas auxinas sintéticas..... | 45 |
| Figura 39. Organogénesis adventicia de la línea 2657 ET MM..... | 46 |
| Figura 40. Fenotipo <i>in vivo</i> de la línea 2657 ET MM. | 46 |
| Figura 41. Fenotipo <i>in vivo</i> de plantas aclimatadas de la línea 2657 ET MM | 47 |
| Figura 42. Evolución de una planta M aclimatada de la línea 2657 ET MM en el invernadero. | 47 |
| Figura 43. Fenotipo de injertos de la línea 2657 ET MM en el invernadero.. | 48 |

Índice de tablas

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 1. Composición de los medios de cultivo empleados..... | 11 |
| Tabla 2. Composición de la solución nutritiva de riego | 13 |
| Tabla 3. Análisis del modo de herencia de la mutación de la línea 561 ET 73. | 20 |
| Tabla 4. Análisis del número de insertos de T-DNA de la línea 561 ET 73. | 21 |
| Tabla 5. Análisis de cosegregación del fenotipo mutante y el inserto de T-DNA de la línea 561 ET 73. | 21 |
| Tabla 6. Análisis del modo de herencia de la mutación de la línea 2486 ET MM..... | 26 |
| Tabla 7. Análisis del número de insertos de T-DNA la línea 2486 ET MM. | 27 |
| Tabla 8. Análisis de cosegregación del fenotipo mutante y el inserto de T-DNA de la línea 2486 ET MM..... | 27 |
| Tabla 9. Análisis del modo de herencia de la mutación de la línea 2641 ET MM..... | 40 |
| Tabla 10. Análisis del número de insertos de T-DNA de la línea 2641 ET MM. | 40 |
| Tabla 11. Análisis de cosegregación del fenotipo mutante y el inserto de T-DNA de la línea 2641 ET MM..... | 41 |
| Tabla 12. Análisis del modo de herencia de la mutación de la línea 2657 ET MM..... | 48 |
| Tabla 13. Análisis del número de insertos de T-DNA de la línea 2657 ET MM. | 49 |
| Tabla 14. Análisis de cosegregación del fenotipo mutante y el inserto de T-DNA de la línea 2657 ET MM..... | 49 |

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El tomate

1.1.1. Origen y domesticación

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) pertenece a la familia Solanaceae, dentro de la cual se encuentran más de 3000 especies, entre las que, aparte del tomate, se incluyen algunos de los cultivos más importantes a nivel económico, como la patata, el pimiento, la berenjena y el tabaco.

El origen evolutivo de las especies silvestres de tomate se sitúa en Sudamérica, concretamente en la región andina que se extiende desde el norte de Ecuador hasta el norte de Chile, así como en las islas Galápagos. Por otro lado, el origen de su domesticación aún no se conoce con exactitud, aunque trabajos recientes, a través del estudio de más de mil accesiones de tomate, indican que esta domesticación ocurrió en dos pasos. El primero tuvo lugar en Sudamérica, donde se produjo el paso de *S. pimpinellifolium* (especie silvestre que se considera el ancestro más cercano al tomate cultivado) a *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*, y el segundo, en Mesoamérica, donde se originó el tomate cultivado (Blanca *et al.*, 2015). Este proceso de

domesticación de la especie silvestre permitió la obtención de frutos de mayor tamaño, como se puede observar en la Figura 1, donde se muestra de manera esquemática la evolución en dos pasos del tamaño del fruto del tomate mediante una comparación entre *S. pimpinellifolium*, *S. lycopersicum* var.



Figura 1. Comparación entre *S. pimpinellifolium*, *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* y *S. lycopersicum*. Fuente: Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences

var. *cerasiforme* y *S. lycopersicum*. Fue en el siglo XVI cuando se introdujo el tomate en el sur de

Europa (Jenkins, 1948), aunque en un principio sólo se empleaba como planta ornamental pues su similitud con solanáceas tóxicas como la belladona o la mandrágora hizo que su aceptación a nivel de consumo fuera mínima. No obstante, esta aceptación creció paulatinamente, el cultivo se expandió por el norte de Europa, llegó a Asia y hoy en día es una de las especies hortícolas más importantes para el consumo humano en todo el mundo (Bergougnoux, 2014).

1.1.2. Importancia económica

En cuanto a su importancia económica, el tomate es uno de los cultivos más consumidos a nivel mundial, no solamente como producto fresco sino también en formatos procesados como

zumos, sopas, salsas, etc. (Bergougnoux, 2014). Según datos de la FAO, la producción del tomate en el año 2017 alcanzó los 182 millones de toneladas, dato que aumentó un 25% con respecto a la producción conseguida 10 años atrás. Durante este año, a nivel de continentes la mayor producción tuvo lugar en Asia (Figura 2A), siendo China el primer productor en el ranking de países, con 59,5 millones de toneladas, mientras que España ocupó el octavo puesto, con 5,2 millones de toneladas (Figura 2B). El área total cultivada fue de 4,8 millones de ha y en este caso China también ocupa el primer lugar, contando con algo más de 1 millón de ha, mientras que España se encuentra en el decimoséptimo puesto, con un área cultivada de 60.852 ha.

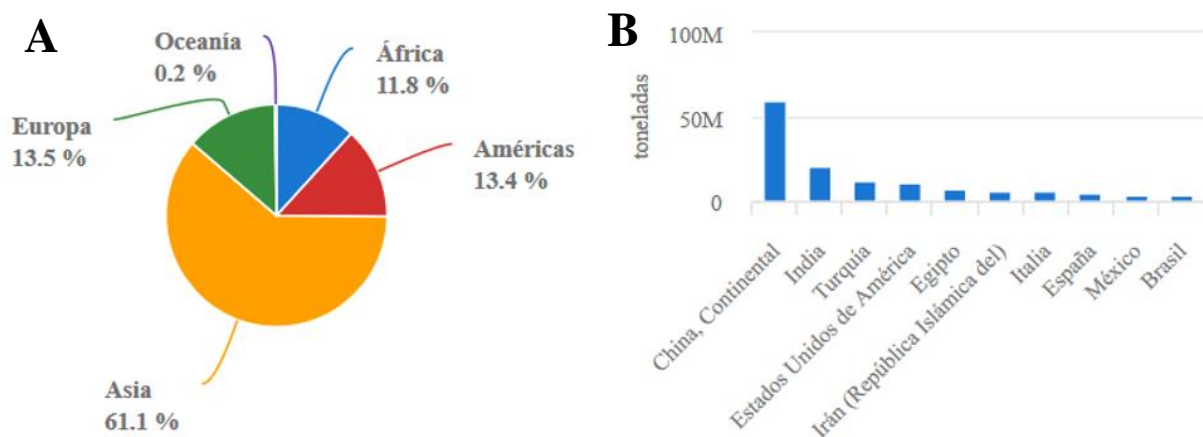


Figura 2. (A) Distribución de la producción mundial de tomate en el año 2017. (B) Producción en toneladas de tomate por los principales países productores en 2017. Fuente: FAOSTAT, 2019.

1.1.3. El tomate como organismo modelo en investigación y su mejora genética

El tomate, además de ser un cultivo de alta relevancia económica y una fuente importante de nutrientes beneficiosos para la salud como licopeno, β -caroteno y vitamina C, es también una planta modelo dentro de las dicotiledóneas, especialmente para aquellas con frutos carnosos (Meissner *et al.*, 1997). Asimismo, se ha convertido en una herramienta fundamental en investigación debido a que presenta una amplia lista de ventajas, entre las que destacan el hecho de que es fácil de cultivar, presenta un ciclo de vida corto y una alta tasa de multiplicación, es una especie autógama pero es posible el cruce sexual con otras especies y tiene la capacidad para propagarse de manera asexual. Además, existe un método apropiado para su transformación vía *Agrobacterium tumefaciens* y se dispone de la secuencia completa de su genoma (The Tomato Genome Consortium, 2012), así como de un gran número de marcadores moleculares y de colecciones de mutantes (Mathews *et al.*, 2003, Pérez-Martín *et al.*, 2017).

La importancia económica de los cultivos depende fuertemente de su capacidad para la mejora genética y la eficacia de la misma (Borlaug, 1983). En el caso del tomate, su mejora genética comenzó con la domesticación del mismo. Sin embargo, este proceso de domesticación junto con la expansión del mismo por todo el mundo y los procesos de selección locales han dado lugar a una reducción en la variabilidad genética de la especie para algunos caracteres. Además, la mejora genética del tomate ha ido variando en cuanto a sus objetivos a lo largo de los años. En un principio, es probable que estuviera enfocada a la mejora de las propiedades nutritivas, pero a partir de los años 30 los mejoradores del tomate se centraron en la productividad dejando de lado la calidad del fruto. Esto puede explicar una disminución de esta calidad, así como del sabor y del aroma del tomate, lo que indirectamente provoca un impacto negativo en la consumición del fruto (Klee, 2010). Hoy en día existe en el mercado una gran cantidad de variedades con diferentes tamaños, formas y colores (Figura 3). Sin embargo, los objetivos de la mejora genética del tomate están limitados por la variabilidad genética disponible para satisfacer tanto las necesidades de los productores como los gustos de los consumidores.



Figura 3. Diversidad del fruto del tomate. Fuente: MilkwoodPermaculture

La mejora clásica se ha basado en el cruce sexual entre líneas élite de cultivares adaptados o entre una línea élite y especies silvestres, siendo estas últimas las que aportan mayor variabilidad genética, pues se estima que los cultivares de tomate contienen menos de un 5% de la variabilidad genética de sus parientes silvestres (Miller y Tanksley, 1990). No obstante, la producción de un nuevo cultivar mediante este método supone el empleo de una gran cantidad de recursos, tanto materiales como de tiempo. Esto se debe a que, una vez obtenido el híbrido entre ambas variedades hay que llevar a cabo una serie de retrocruzamientos para eliminar de manera progresiva los genes no deseados de la variedad donadora, proceso que puede llevar entre 5 o 7 años, si el cruce es entre líneas élite, o hasta 20 años si la variedad donadora es una especie silvestre (Causse *et al.*, 2007).

Hoy en día, gracias a los avances de la biología molecular, se han conseguido llevar a cabo los procesos de mejora clásica de manera más eficaz mediante el desarrollo de marcadores moleculares y mapas genéticos. La mejora asistida por marcadores permite identificar genes o QTLs asociados a caracteres de manera mucho más rápida, ya que no es necesario llegar a observar el fenotipo deseado, facilitando, de esta manera, la introgresión de genes en los cultivares élite (Bauchet y Causse, 2012). No obstante, aunque se ha reducido en cierto modo el tiempo necesario para la consecución de los objetivos, este sigue siendo un inconveniente, al que va unido el hecho de que la mejora clásica sólo se puede aplicar entre especies sexualmente compatibles.

El cultivo *in vitro* de plantas nos aporta una serie de herramientas muy útiles para la multiplicación, el saneamiento o la mejora genética de las plantas. La micropropagación se puede utilizar para la multiplicación del material vegetal y el saneamiento del material se puede realizar mediante cultivo de meristemas apicales o microinjerto. Por otro lado, entre las técnicas de cultivo *in vitro* que permiten la mejora genética de plantas destaca el aprovechamiento de la variación somaclonal, es decir, de la variación genética que aparece como consecuencia del cultivo *in vitro*. Este fenómeno es mucho más probable cuando el material de partida son explantes diferenciados en lugar de explantes con meristemas preexistentes (Duncan, 1997), cuanto más viejos son estos explantes de partida, cuanto más largo es el período de cultivo y cuanto mayor es el número de subcultivos (Kuznetsova *et al.*, 2006), así como cuanto más enriquecido está el medio y mayor es la concentración de reguladores del crecimiento (Gao *et al.*, 2010). Gracias a esto, se puede aumentar la variabilidad intraespecífica de los cultivos que presentan una variabilidad genética reducida, lo que supone una buena alternativa, rápida y sin necesidad de tecnología sofisticada para la mejora genética de los mismos (Krishna *et al.*, 2016). Otras aplicaciones del cultivo *in vitro* dirigidas a la mejora genética de los cultivos son el método haplo-diploide, el rescate de embriones y la fusión de protoplastos. El primero está enfocado a la obtención de líneas puras de manera mucho más rápida que en los programas de mejora tradicional que emplean las autofecundaciones repetidas (Germanà, 2011), mientras que los dos últimos permiten superar las barreras de incompatibilidad presente en los procesos de mejora clásica (Bai y Lindhout, 2007).

No obstante, la transformación genética de plantas es la técnica más potente en la mejora genética de los cultivos, ya que permite la introducción de genes en la especie de interés, superando cualquier barrera interespecífica. Aunque también se han conseguido resultados mediante biolística o transformación directa de protoplastos, el método de transformación

mediada por *Agrobacterium tumefaciens* es el más ampliamente usado hoy en día para la transferencia de genes en tomate. La primera transformación de tomate mediada por *Agrobacterium* tuvo lugar en 1986 (McCormick *et al.*, 1986), con el objetivo de evaluar las condiciones óptimas para la transformación y de evitar la necesidad de crear un método para la regeneración de plantas a partir de protoplastos. A partir de aquí, se ha conseguido, mediante este método, la mejora de caracteres agronómicos como la calidad del fruto y su maduración, así como la resistencia a virus, herbicidas e insectos (Bai y Lindhout, 2007).

Además, en los últimos años la edición génica ha adquirido especial importancia en la mejora genética de cultivos, pues mediante técnicas como TALENs o, sobre todo, CRISPR-Cas9, se permite el control preciso durante la modificación de un gen y, por lo tanto, la obtención de plantas con los caracteres deseados (Gascuel *et al.*, 2017). Para conseguir una edición génica correcta es necesario conocer cuáles son los genes clave en los distintos procesos y para ello, el estudio de mutaciones es uno de los métodos más eficientes, pues permite el aislamiento de genes y la comprensión de su función. En plantas, las mutaciones pueden haber aparecido de manera espontánea o bien, pueden haber sido inducidas mediante agentes químicos y físicos. Sin embargo, la principal desventaja que presentan este tipo de mutaciones es la dificultad para identificar el gen mutado, lo que requiere estrategias de clonaje posicional y/o de mapeo por secuenciación (Schneeberger *et al.*, 2009). Una solución a este problema es la mutagénesis insercional.

1.2. Mutagénesis insercional

La mutagénesis insercional es un sistema genético rastreable en el cual, una secuencia de ADN (T-DNA, transposones o retrotransposones) se usa para mutar y etiquetar el genoma, con la ventaja de poder buscar el sitio mutado usando estos fragmentos de ADN de secuencia conocida. Una vez que el mutante es identificado a partir de su fenotipo, es relativamente fácil clonar el gen mediante técnicas basadas en la PCR, tales como Anchor-PCR.

En tomate se han obtenido resultados positivos mediante la mutagénesis insercional con transposones, concretamente con el sistema Ac/Ds del maíz (Schneeberger *et al.*, 2009), pero el mayor éxito se ha conseguido con la utilización del T-DNA. Este éxito se ha debido a las ventajas que esta técnica presenta: el número de copias de T-DNA que se insertan es bajo, la inserción presenta una naturaleza básicamente aleatoria, sin preferencias de ningún tipo en la integración en el genoma y, además, se genera directamente una inserción estable, que no requiere pasos adicionales para estabilizar el inserto (Tzfira *et al.*, 2004). Además, en función

de las características del inserto de T-DNA y del lugar del gen en el que este se localice (secuencia estructural o elementos regulatorios), se puede conseguir la pérdida de función del gen al producirse su interrupción (fenómeno más frecuente), la ganancia de función o la alteración en sus niveles de expresión (Krysan *et al.*, 1999). De esta manera, se ha conseguido la producción de colecciones de mutantes en tomate, que son muy útiles para la identificación de genes y elementos reguladores de los mismos (Mathews *et al.*, 2003, Carter *et al.*, 2013, Pérez-Martín *et al.*, 2017).

1.3. Trampas génicas

Para la generación de las poblaciones mutagenizadas se han desarrollado construcciones específicas, como las trampas génicas, que son elementos insercionales modificados (Springer, 2000). Hay tres tipos de trampas diferentes que son las trampas de promotores, de genes o de intensificadores, las cuales son construcciones que normalmente no se expresan, a menos que se integren cerca o en la región estructural de un gen. Como cualquier otro T-DNA, estas trampas actúan como mutágenos insercionales, pero además, cuando se integran en la orientación apropiada, el gen delator que portan se sitúa bajo el control de elementos regulatorios del gen endógeno interrumpido. De esta manera, mediante el análisis de la expresión del gen delator es posible tener una idea precisa del patrón de expresión del gen etiquetado.

La trampa de promotores consiste en un T-DNA con gen delator sin promotor y un gen marcador que permite la identificación de los individuos transformados que han integrado al menos una copia del T-DNA (Figura 4A). La expresión del gen delator tiene lugar cuando el vector se inserta en un exón, de forma que se transcriben de forma fusionada el exón endógeno y, aguas abajo, el gen delator. La trampa de genes contiene una o más secuencias aceptoras de *splicing* inmediatamente aguas arriba del gen delator sin promotor y del gen marcador (Figura 4B). En este caso, se produce la expresión del gen delator si la inserción tiene lugar en un intrón. Finalmente, la trampa de intensificadores se basa en la integración de un elemento insercional que lleva un gen delator bajo el control de un promotor constitutivo mínimo, aparte del gen marcador (Figura 4C). Si este promotor se sitúa bajo el control de un elemento regulador en *cis*, el gen delator se expresa bajo un patrón temporal y espacial específico (Springer, 2000).

Todas estas trampas, usadas junto con métodos que permiten un aislamiento y clonaje rápidos y eficaces del segmento de ADN genómico que flanquea el inserto, constituyen

estrategias potentes para la asociación directa de la naturaleza molecular de un gen específico con su función en el organismo (Acosta-García *et al.*, 2004).

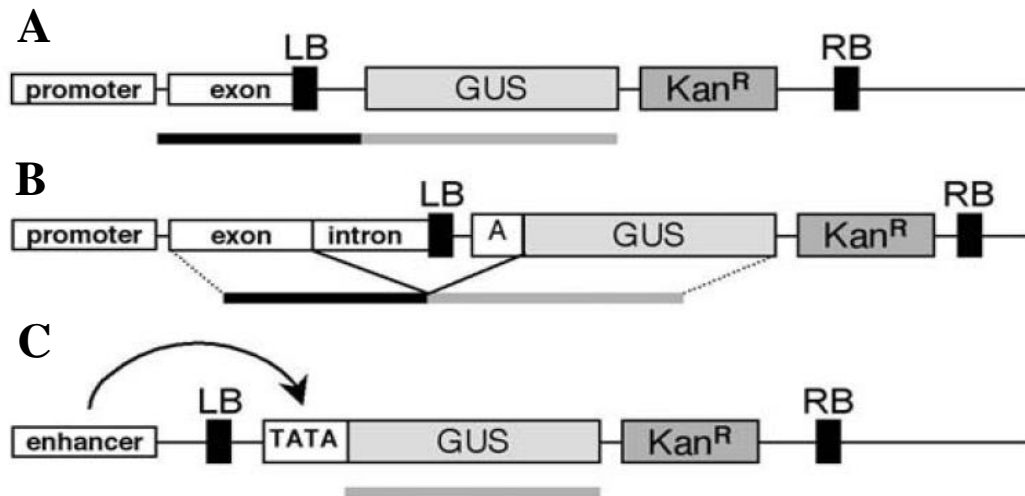


Figura 4. Representación esquemática de las construcciones utilizadas como trampas génicas. (A) Trampa de promotores. (B) Trampa de genes. (C) Trampa de intensificadores. GUS: Gen delator *uidA*, Kan^R: Gen marcador *nptII*, A: sitio aceptor de *splicing*, TATA: promotor mínimo (caja TATA), LB (*left border*): borde izquierdo del T-DNA y RB (*right border*): borde derecho del T-DNA. Fuente: Acosta-García *et al.*, (2004).

En concreto, en este trabajo se empleó la trampa de intensificadores, pues sobre los otros dos tipos de trampas presenta la ventaja de que no es necesaria su inserción dentro de la secuencia codificante de un gen. Sin embargo, presenta el inconveniente de que el intensificador es capaz de activar la expresión del gen delator incluso si se localiza a una gran distancia, lo que dificulta, en cierta manera, el clonaje del gen endógeno afectado (Springer, 2000).

1.4. Evaluación de mutantes afectados en caracteres del desarrollo temprano

El desarrollo temprano de una planta es el período que transcurre desde que emerge la radícula hasta que forma las primeras hojas verdaderas. El estudio de este período es fundamental, pues es posible la detección de alteraciones que pueden tener consecuencias importantes en el desarrollo completo de la planta y que en otras etapas del desarrollo serían difíciles de identificar.

Para llevar a cabo la evaluación de estos caracteres, el cultivo *in vitro* constituye una herramienta esencial, pues permite un estudio en tiempo y espacio reducidos con condiciones ambientales controladas. Además, facilita en gran medida la evaluación de las raíces, tanto embrionarias como adventicias, y posibilita el análisis de la organogénesis adventicia, que sería inabordable sin técnicas de cultivo *in vitro*. Cabe destacar que la complementación del cultivo *in vitro* con el cultivo *in vivo* de plantas es muy importante para conseguir una caracterización más completa de las líneas mutantes.

2. OBJETIVOS

En nuestro grupo se ha generado una colección de unas 7800 líneas de T-DNA de *S. lycopersicum* y especies silvestres relacionadas (*S. pimpinellifolium*, *S. penelli* y *S. galapagense*) con el fin de identificar genes responsables de caracteres de interés agronómico. Actualmente se han identificado más de 500 mutantes afectados en caracteres muy diversos, relacionados con el desarrollo vegetativo, el desarrollo reproductivo o la tolerancia a distintos tipos de estrés abiótico, y se han clonado unos 30 genes responsables de estos caracteres.

En base a estos antecedentes, el objetivo general de este trabajo es la identificación de nuevos mutantes afectados en caracteres del desarrollo temprano a partir de líneas T-DNA de tomate (cultivares *Moneymaker* o *P73*), así como la caracterización de mutantes compactos previamente identificados. En este marco general, los objetivos concretos son los siguientes:

1. Continuar con el escrutinio de la colección de líneas T-DNA de tomate generada en el grupo para identificar nuevos mutantes.
2. Realizar estudios adicionales en mutantes previamente identificados.
3. Caracterizar fenotípicamente los mutantes, tanto *in vitro* como *in vivo*.
4. Caracterizar genéticamente los mutantes mediante:
 - Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante.
 - Análisis del número de insertos de T-DNA con el gen *nptII* funcional.
 - Análisis de la cosegregación del fenotipo mutante con el inserto de T-DNA.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material vegetal

En el presente trabajo se ha empleado una colección de líneas T-DNA de tomate que se generaron en trabajos previos de nuestro grupo de investigación, en colaboración con el grupo del Dr. Rafael Lozano (Centro de Investigación en Biotecnología Agroalimentaria de la Universidad de Almería) y de la Dra. Mari Carmen Bolarín (CEBAS-CSIC, Murcia), mediante la transformación de los cultivares *Moneymaker* y *P73* de *Solanum lycopersicum*, con una trampa de intensificadores incluida en el plásmido pD991 (Figura 5) cedido amablemente por el Dr. Thomas Jack de la Universidad de Darmouth.

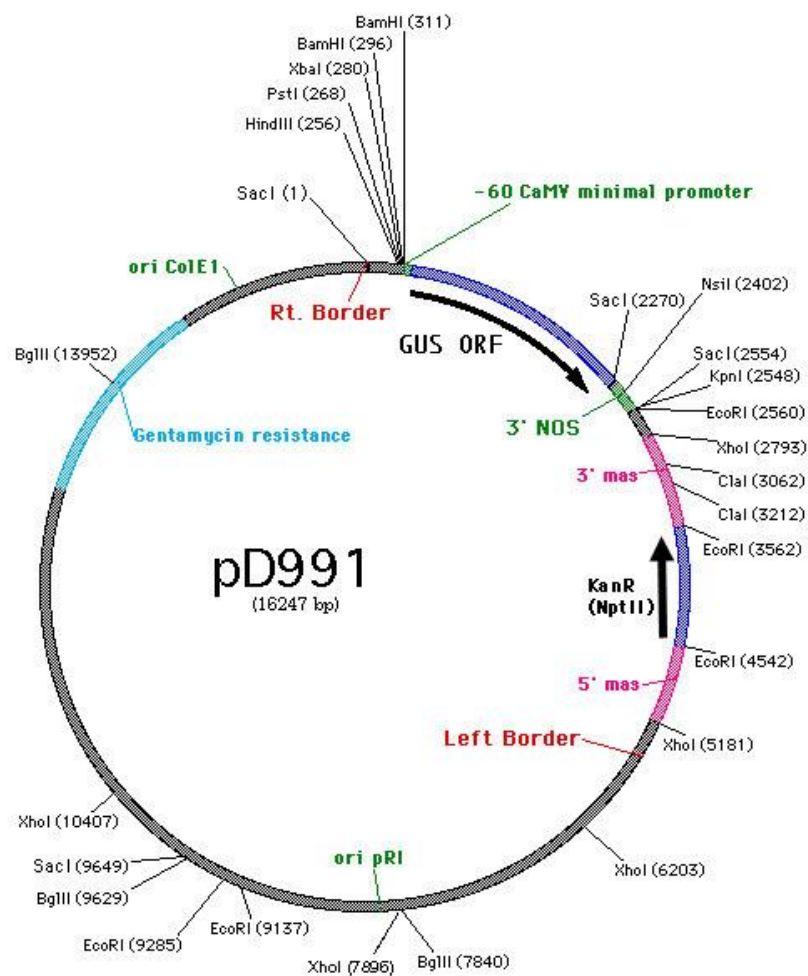


Figura 5. Mapa genético del plásmido pD991 utilizado para la transformación de *S. lycopersicum*.

Por un lado, las líneas T-DNA utilizadas se denominaron con un número que representa la planta transgénica de la que procede, seguido del acrónimo ET MM o ET 73, donde ET son las siglas de *Enhancer Trapping* y MM o 73 se emplearon en función del cultivar: *Moneymaker*

o P73, respectivamente. Por otro lado, para la primera generación de plantas transformadas se empleó la nomenclatura de TG1, siendo estas hemicigotas para el T-DNA. En consecuencia, la descendencia de las mismas obtenida por autofecundación se denominó TG2, pudiendo encontrarse en este caso plantas homocigotas, hemicigotas o acigotas para cada T-DNA integrado. La descendencia de estas plantas se denominó TG3 y así sucesivamente.

Concretamente, se realizó el análisis de plantas TG2 procedentes de 80 líneas T-DNA de *S. lycopersicum* mediante un escrutinio *in vitro* de las mismas para comprobar si eran o no mutantes, y de plantas TG2 y/o TG3 de otras 15 líneas candidatas, en las cuales el grupo ya había observado la mutación previamente, pero no habían sido caracterizadas en profundidad.

3.2. Identificación y estudio de mutantes afectados en caracteres del desarrollo temprano en líneas T-DNA de tomate

Se llevó a cabo la misma metodología, descrita en los siguientes puntos, para todas las líneas analizadas en este trabajo.

3.2.1. Esterilización de semillas

El paso inicial en todo experimento fue la esterilización superficial de semillas, necesaria para lograr las condiciones axénicas propias del cultivo *in vitro*. Para ello, se sumergieron las mismas en una solución de lejía comercial diluida al 50% con unas gotas de Tween 20, agente humectante que facilita la unión entre el material vegetal y la solución esterilizante. Tras 30 minutos en esta solución, las semillas se sometieron a tres lavados consecutivos de 5, 10 y 15 minutos en agua destilada estéril con el objetivo de eliminar o reducir al máximo la presencia del agente esterilizante (Figura 6). Este mismo procedimiento se realizó pasadas 24 horas, lo que constituye una esterilización doble, facilitando así una germinación homogénea de las semillas.



Figura 6. Proceso de esterilización de semillas. De izquierda a derecha: paquetes de semillas, bote con lejía comercial diluida al 50% con unas gotas de Tween 20 y tres botes con agua destilada estéril. Escala: 1 cm.

3.2.2. Fenotipado *in vitro*

3.2.2.1. Preparación de medios de cultivo

Para llevar a cabo la preparación de los distintos medios, se disolvieron en agua destilada los componentes necesarios (Tabla 1), los cuales variaron en función del ensayo realizado, y se ajustó el pH a 5.7 en todos los casos. Posteriormente se añadió agar bacteriológico (Pronadisa®) o agar-agar según el experimento, se distribuyó el medio en botes y se esterilizó en autoclave (30 minutos a 121°C).

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo empleados.

| | MG | MB3 | α | β | I40 | IK | IKZ | ε |
|------------------------------------------------|-----------|------------|----------|----------|------------|-----------|------------|----------|
| Sales minerales^a | MS/2 | MS | MS | MS | MS | MS | MS | MS |
| Azúcar (g·L⁻¹) | 10.0 | 30.0 | 20.0 | 20.0 | 30.0 | 30.0 | 30.0 | 30.0 |
| Inositol (g·L⁻¹) | | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 |
| Tiamina clorhídrica (mg·L⁻¹) | | 1.0 | 1.0 | 1.0 | | | | |
| Vitaminas^b | | | | | SH | SH | SH | SH |
| Ácido indolacético (mg·L⁻¹) | | | 0.1 | 0.1 | 4.0 | 4.0 | 4.0 | 4.0 |
| Kinetina (mg·L⁻¹) | | | | | | 4.0 | 4.0 | 4.0 |
| Zeatina (mg·L⁻¹) | | | | | | | 1.0 | 1.0 |
| Kanamicina (mg·L⁻¹) | | | | 100.0 | | | | 100.0 |

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

3.2.2.2. Germinación y obtención de plántulas y plantas axénicas

Tras la esterilización de las semillas, estas se pasaron a placas Petri con dos discos de papel de filtro y 10 mL de agua destilada estéril y se incubaron en oscuridad en una estufa a 28°C. Al cabo de aproximadamente 3 días las semillas comenzaron a germinar, es decir, tenía lugar la emisión de la radícula (Figura 7A), y, en este momento, se sembraron en botes con medio de germinación MG (Figura 7B). Una vez sembradas, los botes se mantuvieron en cámaras de cultivo *in vitro* durante 7 días en condiciones de fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, intensidad lumínica de 45 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ y temperatura de 25°C. Pasados estos 7 días, las semillas dieron lugar a plántulas (Figura 7C), donde se pudo evaluar el desarrollo embrionario, tanto radicular como aéreo.

A partir de las plántulas se obtuvieron explantes de ápice meristemático, cotiledón e hipocótilo llevando a cabo los cortes necesarios (Figura 7D). Por un lado, los explantes de cotiledón e hipocótilo se subcultivaron en placas Petri con medio de regeneración IKZ para el análisis de la regeneración adventicia (Figura 7E). En ocasiones también se cultivaron explantes de cotiledón en medio I40 para evaluar el enraizamiento adventicio. Por otro lado, los explantes de ápice se subcultivaron en botes con medio básico MB3 para obtener plantas axénicas, en las

cuales se pudo analizar el desarrollo adventicio de la raíz y de la parte aérea (Figura 7F). Tanto los botes como las placas se incubaron en cámaras de cultivo en las mismas condiciones descritas anteriormente para las plántulas en medio MG.

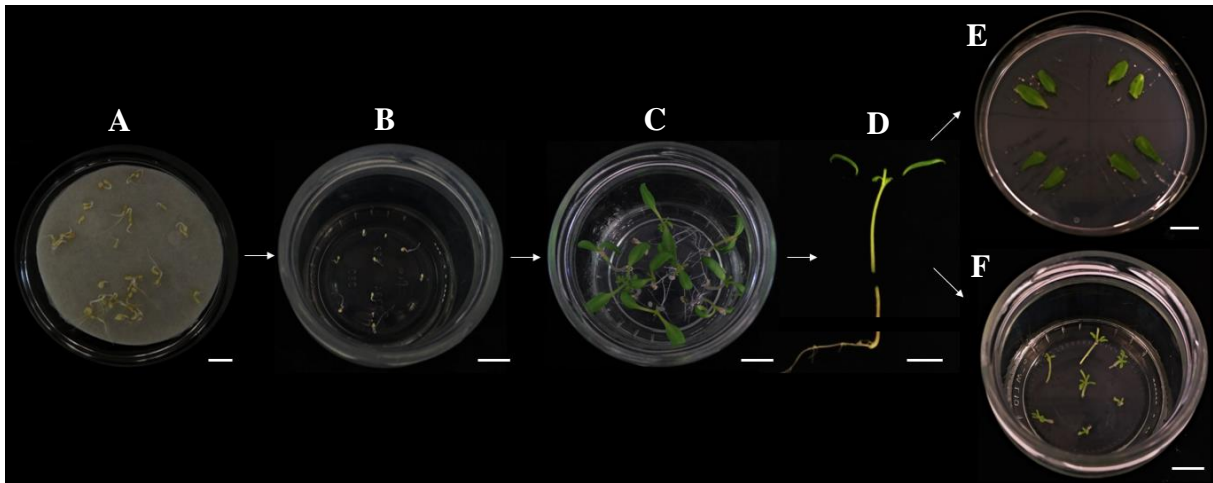


Figura 7. Obtención de plántulas y plantas axénicas. (A) Germinación de semillas en placa sobre papel de filtro y agua. (B) Semillas germinadas en medio MG. (C) Plántulas a los 7 días de cultivo en medio MG. (D) Cortes en plántulas para la obtención de explantes de cotiledón, ápice e hipocótilo. (E) Explantes de cotiledón en placa. (F) Explantes de ápice en bote. Escala: 1 cm.

3.2.2.3. Clonación de plantas

Las líneas mutantes identificadas han de mantenerse en condiciones de cultivo *in vitro* para poder llevar a cabo un estudio más exhaustivo de las mismas. Para ello, se clonaron tanto las plantas con fenotipo mutante como aquellas con fenotipo *wild type* (WT) a través del cultivo de ápices meristemáticos o de yemas axilares, bien en medio MB3 o bien en medio α . Además, en ocasiones, se emplearon medios con distintas hormonas o vitaminas para estudiar la respuesta de las plantas mutantes a los mismos.

3.2.3. Fenotipado *in vivo*

El fenotipado *in vivo*, al igual que el fenotipado *in vitro*, es fundamental para la caracterización de las líneas T-DNA y para llevarlo a cabo fue necesario tanto aclimatar plantas procedentes de condiciones *in vitro*, como poner semilleros *in vivo* de forma directa.

Todos los experimentos enfocados al fenotipado *in vivo* se realizaron en los invernaderos del IBMCP, en los que se dispone de luz artificial de apoyo, un sistema de fertirrigación y se llevan a cabo tratamientos plaguicidas periódicos. La composición del sustrato empleado fue, bien de turba y perlita o bien de fibra de coco, y este se regó con una solución nutritiva de riego (Tabla 2).

Tabla 2. Composición de la solución nutritiva de riego

| 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 |

3.2.3.1. Aclimatación de plantas

La aclimatación de las plantas es necesaria para disminuir las diferencias entre las condiciones de cultivo *in vitro* y las de cultivo *ex vitro*, tales como el ambiente axénico, heterótrofo, con baja intensidad luminosa y elevada humedad ambiental propios del cultivo *in vitro*. Con ello se intenta reducir, en la mayor medida posible, el estrés producido por el cambio.

Para llevar a cabo este proceso, en primer lugar, se seleccionaron plantas, tanto mutantes como WT, en buen estado y con un tamaño de la parte aérea de al menos 5 cm, las cuales se extrajeron con extremo cuidado del bote de cultivo para evitar dañar tanto la parte aérea como la parte radicular. Una vez completamente eliminado el medio adherido a las raíces, las plantas se cultivaron en macetas de 9 cm de diámetro con sustrato humedecido con agua. Además, se taparon las plantas con un vaso de plástico invertido sobre la maceta para evitar la deshidratación de las mismas debido a una disminución de la humedad ambiental. A lo largo del proceso de aclimatación se perforó el vaso y, por último, se retiró totalmente, o se retiró totalmente de forma directa.

3.2.3.2. Semilleros in vivo

La preparación de semilleros *in vivo* se llevó a cabo mediante la siembra directa de semillas pregerminadas en macetas de 9 cm de diámetro con sustrato humedecido con agua. Estos fueron necesarios para la evaluación de las plantas en condiciones *ex vitro*, es decir, sin haber pasado por condiciones de cultivo *in vitro*. A medida que las plantas crecieron, se trasplantaron a macetas de 27 cm de diámetro y se podaron las yemas axilares para promover el crecimiento de un único tallo principal, así como la obtención de flores y frutos (mediante autopolinización o cruces sexuales).

3.2.3.3. Injertos

En ciertos casos, se realizaron injertos entre plantas mutantes y plantas WT para comprobar el efecto tanto de la parte aérea como de la parte radicular en el fenotipo mutante observado. Se llevaron a cabo a los 10 días del cultivo de plántulas desarrolladas directamente en macetas con sustrato en el invernadero a partir de semillas esterilizadas. En las plántulas se eliminaron los cotiledones y las primeras hojas verdaderas expandidas desde el ápice y se realizó un corte en bisel por debajo de los cotiledones en dos plántulas. De esta manera, la parte superior del corte constituirá la parte aérea del injerto y la parte inferior, el patrón. Por último, se unieron ambas partes con una pinza de silicona.

3.2.4. Cruces sexuales

Se llevaron a cabo cruces sexuales entre *S. lycopersicum* y la especie silvestre *S. pimpinellifolium* con el objetivo de realizar posteriormente una autofecundación de la descendencia del cruce, necesaria para encontrar el gen causante de la mutación en aquellas líneas mutantes en las que no cosegregan el fenotipo mutante y el inserto de T-DNA

Para ello se recogió, por un lado, el polen de flores en anthesis de *S. pimpinellifolium* (parental masculino) con ayuda de unas pinzas y una placa de vidrio. Por otro lado, las flores en pre-anthesis de *S. lycopersicum* (parental femenino) se emascularon retirando pétalos, sépalos y estambres utilizando unas pinzas. Finalmente, se depositó cierta cantidad del polen recogido en el estigma de la flor emasculada.

3.3. Análisis genético

3.3.1. Análisis del modo de herencia de la mutación

Por lo general, el material empleado en este trabajo fue de plantas correspondientes a la generación TG2, es decir, procedentes de la autofecundación de plantas TG1 hemicigóticas. Por lo tanto, en la TG2 pudieron encontrarse plantas acigóticas, hemicigóticas u homocigóticas y en función del número de plantas de cada condición se encontró lo siguiente:

- Mutación dominante, si $\frac{3}{4}$ de la descendencia eran mutantes (homocigóticas y hemicigóticas) y el $\frac{1}{4}$ restante, WT (acigóticas).
- Mutación recesiva, si $\frac{1}{4}$ de la descendencia era mutante (homocigóticas) y $\frac{3}{4}$, WT (hemicigóticas y acigóticas).

En el caso de plantas TG3 se pudieron encontrar plantas WT, bien acigotas o bien hemicigotas, y plantas mutantes. Las únicas que segregaron para la mutación fueron las TG3 procedentes de plantas TG2 hemicigotas.

3.3.2. Análisis genético del número de insertos de T-DNA

En el T-DNA de la construcción empleada está presente el gen *nptII* expresado bajo un promotor constitutivo, el cual proporciona resistencia a la kanamicina a las plantas tanto homocigotas como hemicigotas. Para analizar esta resistencia fue necesario cultivar distintos explantes en medios en los que estaba presente el antibiótico, concretamente, cultivo de semillas en medio MG con kanamicina (100 mg/L), cultivo de ápices en medio β o cultivo de explantes de cotiledón y peciolo en medio ϵ . Para cada uno de los casos, las semillas sensibles dieron lugar a plántulas, pero estas no desarrollaron correctamente el sistema radicular ni fueron capaces de desarrollar hojas primarias, los ápices sensibles no enraizaron y los explantes de cotiledón y peciolo sensibles no fueron capaces de regenerar y, además, sufrieron un cambio de color perceptible a simple vista.

A partir de la información obtenida se pudo conocer el número de plantas acigóticas, pues fueron sensibles a la kanamicina, y también el número de insertos de T-DNA con el gen *nptII* funcional que presentó cada línea:

- Un inserto, si la línea segregaba ajustándose a la distribución $3 \text{ KAN}^R : 1 \text{ kan}^S$.
- Dos insertos, si la línea segregaba ajustándose a la distribución $15 \text{ KAN}^R : 1 \text{ kan}^S$.
- Tres insertos, si la línea segregaba ajustándose a la distribución $63 \text{ KAN}^R : 1 \text{ kan}^S$.

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

El análisis de la cosegregación del inserto de T-DNA con el gen *nptII* funcional y el fenotipo mutante también se llevó a cabo en función de la resistencia a la kanamicina:

- No se descartó la cosegregación cuando todas las plantas mutantes de una línea fueron resistentes a la kanamicina, pues el gen *nptII* fue funcional y segregó junto con el fenotipo mutante, lo que significa que es muy probable que la mutación se debiera a la inserción de T-DNA en el genoma de la planta y se aceptó la cosegregación con cierta probabilidad de fallo.
- Se descartó la cosegregación cuando aparecieron una o más plantas mutantes sensibles a la kanamicina, lo que quiere decir que el gen *nptII* no fue funcional o no estuvo

presente porque el T-DNA no se había insertado. En consecuencia, se descartó la cosegregación ya que la mutación no fue consecuencia de la inserción de un T-DNA con el gen *nptII* funcional.

3.3.4. Análisis estadístico: Test χ^2

El análisis estadístico del test χ^2 se aplicó para el estudio del modo de herencia de la mutación y del número de insertos de T-DNA, pues permite comprobar el ajuste de los datos obtenidos a una hipótesis, siendo esta hipótesis aceptada si la probabilidad de fallo es menor del 5%.

También se aplicó el test χ^2 de homogeneidad de los datos obtenidos en diferentes experimentos de una misma línea T-DNA para comprobar si los datos eran acumulables y, de esta manera, poder analizarlos conjuntamente.

3.4. Caracterización de mutantes compactos candidatos en líneas T-DNA de tomate

Se llevó a cabo la misma metodología que se ha descrito anteriormente, pero partiendo de líneas T-DNA candidatas, es decir, con mutaciones de compacidad previamente identificadas en el grupo.

4. RESULTADOS

En el presente trabajo se realizó en primer lugar un escrutinio de 80 líneas T-DNA. Las semillas de 50 de estas líneas no fueron capaces de germinar. Entre las 30 restantes, se encontraron tres nuevos mutantes que presentaron alteraciones en caracteres tempranos y estos se caracterizaron desde cero. Posteriormente, tras el estudio en profundidad de 15 líneas mutantes previamente identificadas en el grupo, se amplió especialmente la caracterización de una de ellas, tanto a nivel fenotípico (*in vitro* e *in vivo*) como genético.

4.1. 561 ET 73

La mutación de la línea 561 ET 73 había sido identificada previamente. Para continuar con su caracterización se intentó utilizar la progenie TG2, pero estas semillas no fueron capaces de germinar debido al tiempo que habían estado almacenadas. Por lo tanto, la caracterización se realizó en diferentes líneas TG3 obtenidas a partir de plantas TG2 con fenotipo WT. Estas plantas TG2 podían ser acigóticas o hemicigóticas y, en consecuencia, las progenies TG3 podían ser no segregantes (todas las plantas WT) o segregantes (en principio, 3 con fenotipo WT y 1 con fenotipo mutante). Por este motivo, se evaluaron varias progenies TG3 para tratar de encontrar al menos una línea TG3 que segregara para la mutación.

En concreto, se evaluaron 3 líneas TG3 y se encontró que una de ellas procedía de una planta TG2 acigótica, mientras que las dos restantes procedían de plantas TG2 hemicigóticas. Estas dos últimas fueron las líneas que se emplearon para el estudio de la mutación. En ambos, casos el fenotipo mutante se detectó en planta axénica en medio MB3. Este fenotipo se caracterizó por un menor tamaño de las plantas mutantes, que además presentaron un aspecto algo más compacto debido a la menor distancia entre los nudos del tallo (Figura 8).

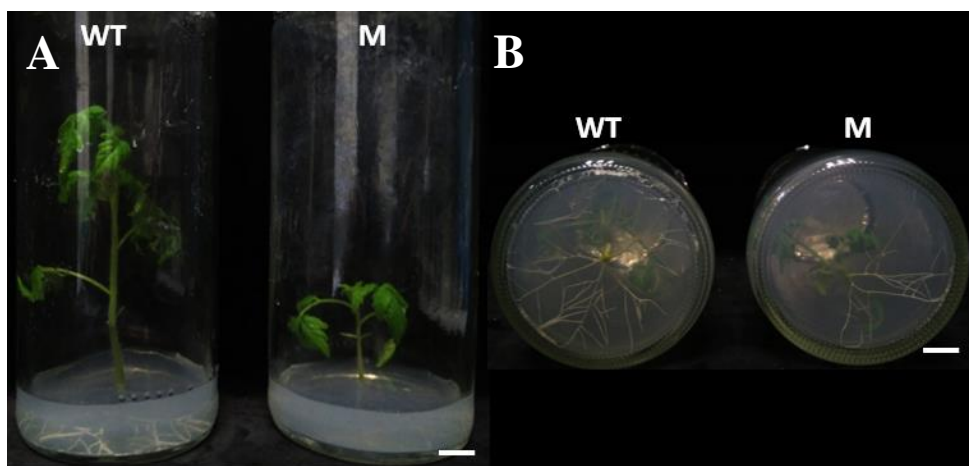


Figura 8. Fenotipo en planta axénica de la línea 561 ET 73 a los 25 días de cultivo en MB3. Comparación entre (A) la parte aérea y (B) la parte radicular de plantas WT y mutante (M). Escala: 1 cm.

Para comprobar si el fenotipo algo más compacto observado *in vitro* se apreciaba *in vivo*, se procedió a la aclimatación de las plantas mutantes. En tan solo 30 días de cultivo en el invernadero se pudo apreciar una diferencia clara entre plantas WT y mutantes. Las mutantes fueron más pequeñas que las WT debido a un menor número de entrenudos y a que estos eran más cortos, lo que confirió una apariencia compacta (Figura 9).



Figura 9. Fenotipo *in vivo* de plantas WT y M aclimatadas de la línea 561 ET 73 tras 30 días en el invernadero. Escala: 5 cm.

Asimismo, se analizó el fenotipo *in vivo* en plantas obtenidas a partir de semilla. Fue en estas condiciones cuando el fenotipo mutante se mostró más evidente. En efecto, las plantas mutantes fueron más pequeñas que las WT desde el principio (Figura 10A,B) y mostraron un fenotipo claramente compacto tras 100 días en el invernadero (Figura 10C).



Figura 10. Fenotipo *in vivo* de la línea 561 ET 73. (A) Plantas WT y M obtenidas de semilla a los 40 días de cultivo en el invernadero. (B) Zoom de la planta M a los 40 días de cultivo en el invernadero. (C) Planta M a los 100 días de cultivo en el invernadero. Escalas: 3 cm (A y B) y 10 cm (C).

Para una mejor caracterización de la mutación, se llevó a cabo la medición del número y longitud de entrenudos de las plantas cultivadas en el invernadero. En un estado intermedio del desarrollo de las plantas, el fenotipo compacto de las mutantes se debió a que el número medio de entrenudos, así como la longitud media de los mismos fueron menores: 26 entrenudos y 2,6 m en plantas WT frente a 19 entrenudos y 1,3 m en plantas mutantes. Esta compactidad se mantuvo en una fase más avanzada del cultivo de las plantas y, en este sentido, en la Figura 11 se muestra cómo la longitud media de los primeros 15 entrenudos de las plantas mutantes fue menor que la de las plantas WT.

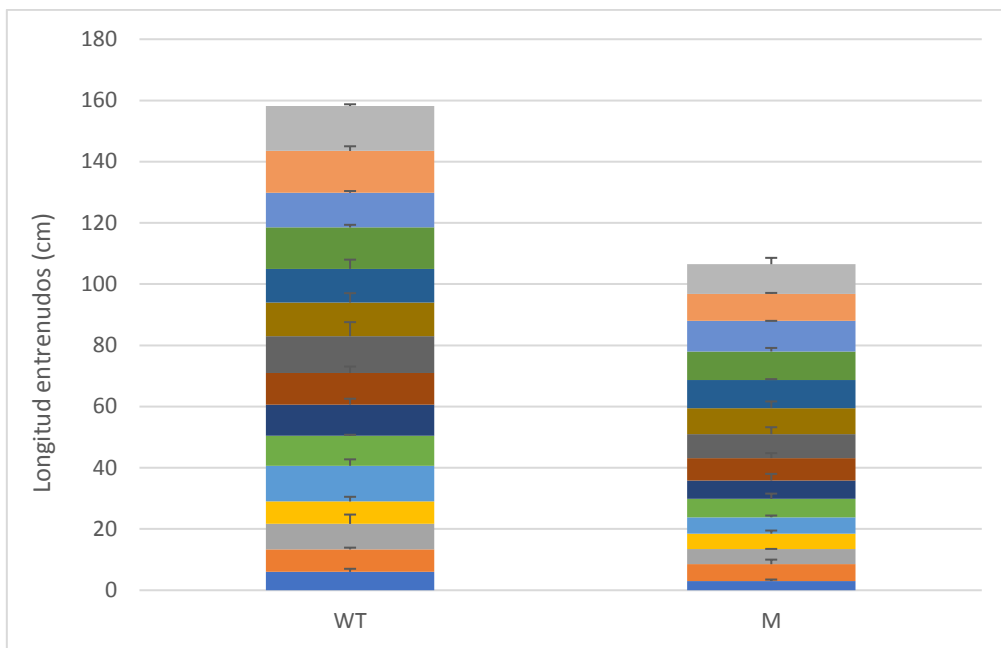


Figura 11. Longitud en cm de los 15 primeros entrenudos de plantas WT y M de la línea 561 ET 73 en fase avanzada del desarrollo. Los datos representan la media y la desviación típica de tres réplicas biológicas.

A continuación, se analizó la organogénesis adventicia en explantes de cotiledón en medio de regeneración IKZ. Los resultados indicaron que la respuesta morfogénica del mutante no se vio afectada, pues no se observaron diferencias respecto al WT (Figura 12).

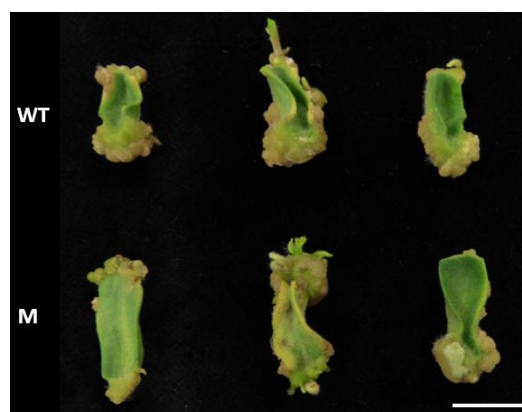


Figura 12. Organogénesis adventicia en explantes de cotiledón de la línea 561 ET 73. Explantes WT y M a los 30 días de cultivo en IKZ. Escala: 1 cm.

4.1.1. Análisis del modo de herencia de la mutación

Los experimentos realizados *in vitro* e *in vivo* se llevaron a cabo en las dos líneas TG3 segregantes (i.e. procedentes de plantas TG2 hemicigóticas) mencionadas anteriormente y, como se muestra a continuación, los datos se analizaron de manera independiente. En la progenie TG3-561-1 ET 73 se realizaron tres experimentos, dos *in vitro* y uno *in vivo*, y en la TG3-561-8 ET 73, dos experimentos, uno *in vitro* y otro *in vivo*. Tras la realización de los respectivos tests χ^2 de homogeneidad, se comprobó que los datos podían tratarse de forma acumulada. En ambos casos los datos se ajustaron a un modo de herencia monogénico recesivo (Tabla 3).

Tabla 3. Análisis del modo de herencia de la mutación de la línea 561 ET 73.

| | | Segregación | WT | M | Total | χ^2 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|-----------------|-------|------|-------|----------|
| 561-1 ET 73 | Experimento 1 | Observados | 9 | 2 | 11 | 0.27 |
| | | Esperados (3:1) | 8.25 | 2.75 | 11 | |
| | Experimento 2 | Observados | 12 | 3 | 15 | 0.20 |
| | | Esperados (3:1) | 11.25 | 3.75 | 15 | |
| | Experimento 3 | Observados | 15 | 1 | 16 | 3.00 |
| | | Esperados (3:1) | 12 | 4 | 16 | |
| | Datos acumulados* | Observados | 36 | 6 | 42 | 2.57 |
| | | Esperados (3:1) | 31.5 | 10.5 | 42 | |
| 561-8 ET 73 | Experimento 1 | Observados | 15 | 6 | 21 | 0.14 |
| | | Esperados (3:1) | 15.75 | 5.25 | 21 | |
| | Experimento 2 | Observados | 17 | 2 | 19 | 2.12 |
| | | Esperados (3:1) | 14.25 | 4.75 | 19 | |
| | Datos acumulados* | Observados | 32 | 8 | 40 | 0.53 |
| | | Esperados (3:1) | 30 | 10 | 40 | |
| *Análisis χ^2 homogeneidad ($\chi^2_H = 0.90$ (561-1 ET 73) y 1.73 (561-8 ET 73)) indica que las muestras son homogéneas ($P > 0.05$; $\chi^2_{1\text{ g.l.}} = 3.84$) | | | | | | |

4.1.2. Análisis del número de insertos de T-DNA

Tras el análisis de la resistencia a la kanamicina realizado en los tres experimentos *in vitro*, los datos permitieron aceptar, con un 95% de certeza, la presencia de un inserto con el gen *nptII* funcional en la línea 561 ET 73. Asimismo, se comprobó que los datos de la progenie TG3-561-1 ET 73 se podían tratar de forma acumulada tras la realización del test χ^2 de homogeneidad (Tabla 4).

Tabla 4. Análisis del número de insertos de T-DNA de la línea 561 ET 73.

| | | Segregación | KAN ^R | kan ^S | Total | χ^2 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|-----------------|------------------|------------------|-------|----------|
| 561-1 ET 73 | Experimento 1 | Observados | 8 | 3 | 11 | 0.03 |
| | | Esperados (3:1) | 8.25 | 2.75 | 11 | |
| | Experimento 2 | Observados | 12 | 3 | 20 | 0.20 |
| | | Esperados (3:1) | 11.25 | 3.75 | 20 | |
| | Datos acumulados* | Observados | 20 | 6 | 26 | 0.05 |
| | | Esperados (3:1) | 19.5 | 6.5 | 26 | |
| 561-8 ET 73 | Experimento 1 | Observados | 17 | 4 | 21 | 0.40 |
| | | Esperados (3:1) | 15.75 | 5.25 | 21 | |
| *Análisis χ^2 homogeneidad ($\chi^2_H = 0.18$) indica que las muestras son homogéneas ($P > 0.05$; $\chi^2_{1\text{ g.l.}} = 3.84$) | | | | | | |

4.1.3. Análisis de cosegregación del fenotipo mutante y el inserto *nptII* funcional

En el análisis con la progenie 561-1 ET 73 no se llegó a descartar la cosegregación, ya que no apareció ninguna planta mutante sensible a la kanamicina. Sin embargo, en el efectuado con la progenie 561-8 ET 73 sí aparecieron plantas mutantes sensibles a la kanamicina. Por lo tanto, se descartó la cosegregación entre el fenotipo mutante y el inserto *nptII* funcional (Tabla 5).

Tabla 5. Análisis de cosegregación del fenotipo mutante y el inserto de T-DNA de la línea 561 ET 73.

| | | WT | | M | | Total |
|-------------|---------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-------|
| | | KAN ^R | kan ^S | KAN ^R | kan ^S | |
| 561-1 ET 73 | Experimento 1 | 6 | 3 | 2 | 0 | 11 |
| | Experimento 2 | 9 | 3 | 3 | 0 | 15 |
| 561-8 ET 73 | Experimento 1 | 14 | 1 | 3 | 3 | 21 |

4.2. 2486 ET MM

El mutante 2486 ET MM fue identificado en el escrutinio de nuevas líneas T-DNA. En este caso, las semillas TG2 se habían obtenido recientemente y, por tanto, constituyeron el material de partida. El fenotipo mutante de esta línea se detectó en el estado de plántula a los 7 días de cultivo en medio MG. En esta fase del desarrollo, se observó una clorosis generalizada y un crecimiento ligeramente menor de las plántulas mutantes, aunque el sistema radicular no se vio afectado (Figura 13A,B). Las plántulas mutantes consiguieron desarrollar hojas primarias, pero las plantas terminaron por colapsar (Figura 13C).

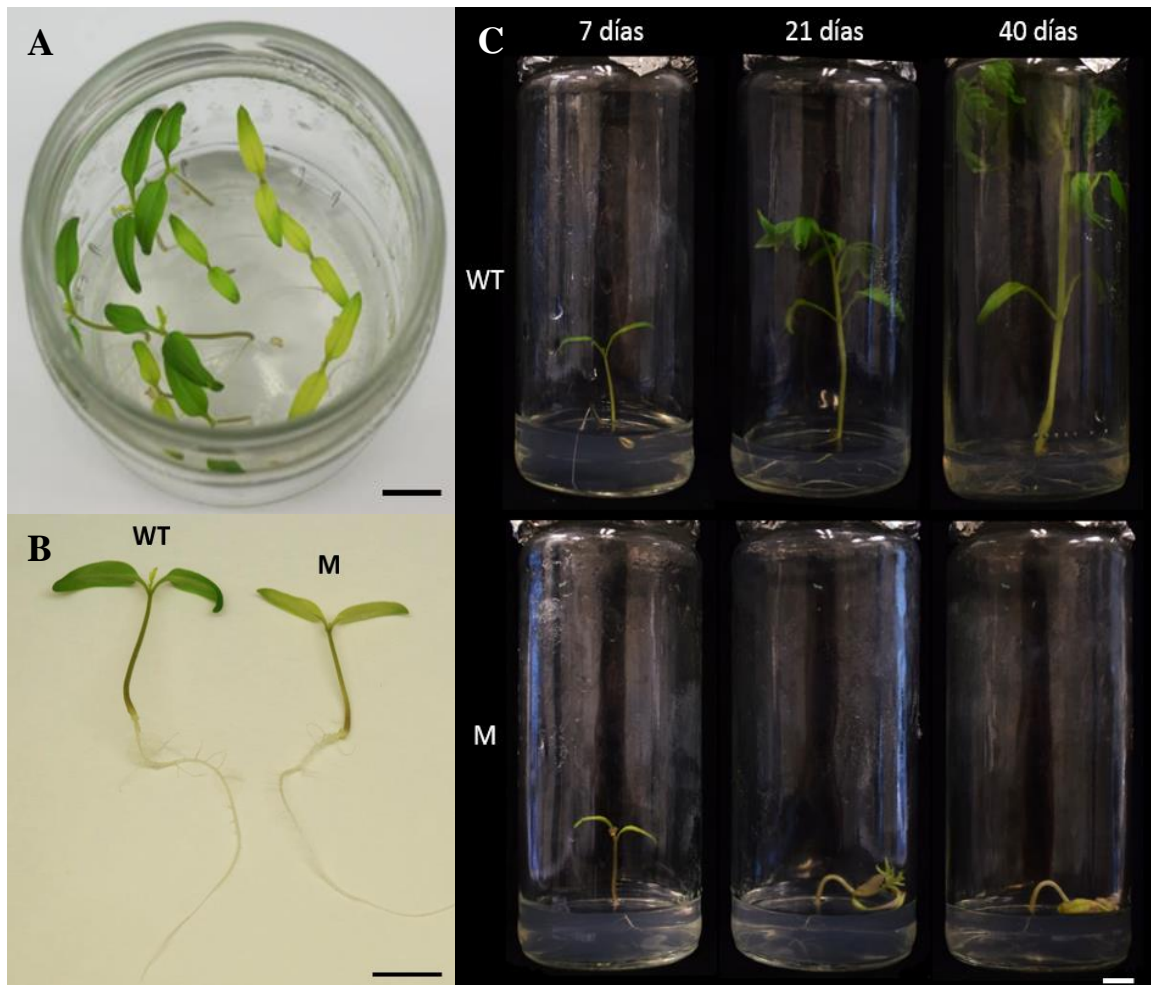


Figura 13. Fenotipo en plántula de la línea 2486 ET MM en medio MG. (A) Vista aérea de plántulas WT y M a los 7 días de cultivo, (B) Comparación WT y M a los 7 días de cultivo y (C) Comparación entre WT y M a lo largo del desarrollo (7, 21 y 40 días de cultivo). Escala: 1 cm.

Posteriormente, se subcultivaron los ápices meristemáticos en medio MB3. Las plantas axénicas también mostraron clorosis generalizada (Figura 14). Cabe destacar que fueron capaces de enraizar, pero la parte aérea no presentó ningún tipo de crecimiento y, al igual que las plántulas, terminaron por colapsar. No obstante, en la planta axénica la letalidad fue más tardía que en estado de plántula.

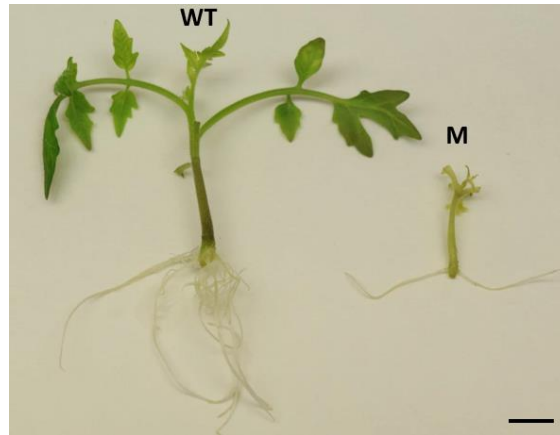


Figura 14. Fenotipo de plantas axénicas WT y M de la línea 2486 ET MM a los 15 días en medio MB3. Escala: 1 cm

Se cultivaron plantas axénicas en otro medio diferente (α). En este medio el fenotipo de las plantas axénicas fue el mismo que en el medio MB3 (Figura 15).

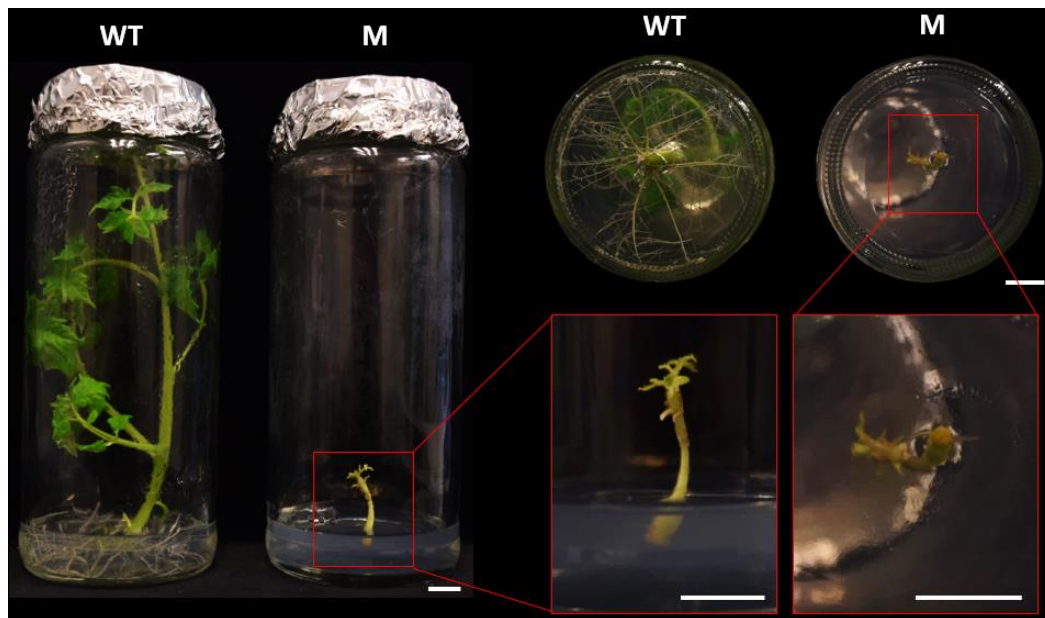


Figura 15. Fenotipo en planta axénica de la línea 2486 ET MM a los 30 días en medio α . Escala: 1 cm.

A la vista de los resultados, y con el objetivo de comprobar si la mutación estaba provocada por un déficit de vitaminas (e.g. tiamina) o de aminoácidos, se llevó a cabo un ensayo en el que se añadieron distintos compuestos al medio básico, tales como tiamina clorhídrica (THCl) a una concentración 10 veces mayor de lo habitual (10 mg/L), sustitución de THCl por la solución de vitaminas SH (Shahin, 1985) y adición de 100 mg/L de hidrolizado de caseína. Lo que se pretendió fue ver si estos suplementos nutricionales eran capaces de reducir la clorosis de las plántulas, así como de evitar el colapso. Debido a que las plantas axénicas no fueron capaces de crecer, se cultivaron directamente semillas germinadas en los distintos medios y los resultados se analizaron a los 15 días de cultivo.

En ninguno de los casos se consiguió revertir el fenotipo mutante, aunque el colapso fue ligeramente más lento en el medio con las vitaminas SH, lo que concuerda con un crecimiento más rápido de las plantas WT en este medio con respecto a los suplementados con otros compuestos (Figura 16).

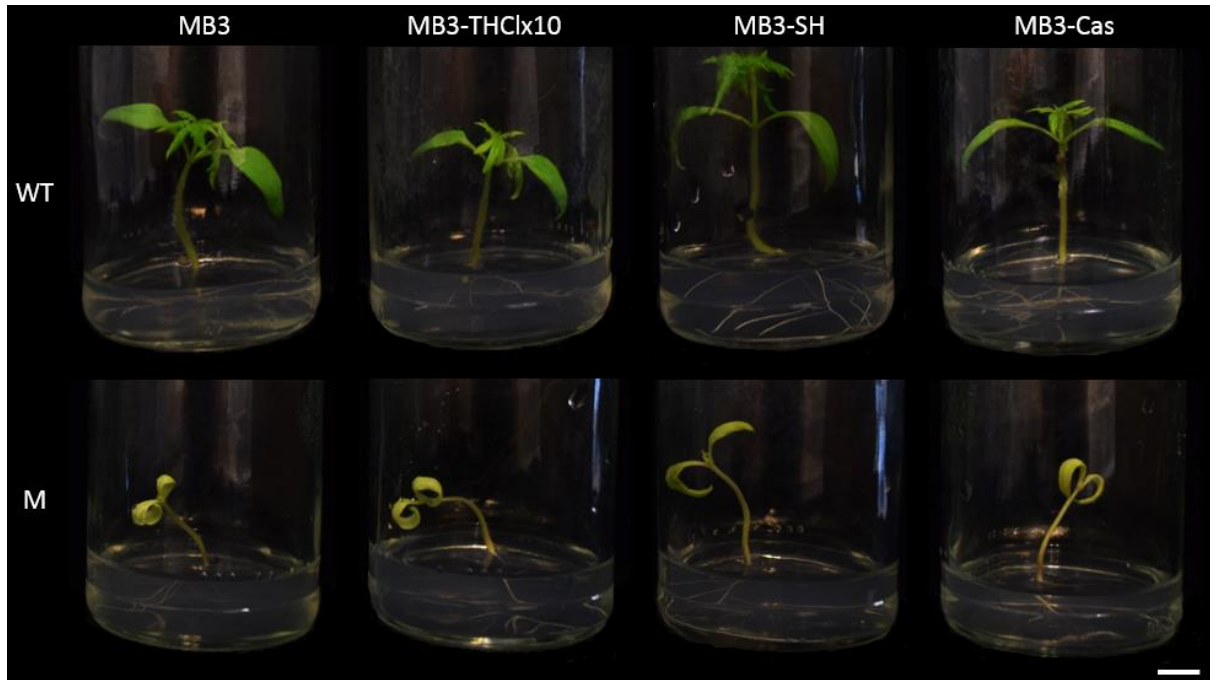


Figura 16. Fenotipo de plántulas WT y M de la línea 2486 ET MM a los 15 días en medio MB3 y medio MB3 con distintos suplementos nutricionales: Concentración 10 veces superior de THCl (MB3-THClx10), sustitución de THCl por SH (MB3-SH) y adición de hidrolizado de caseína (MB3-Cas). Escala: 1 cm.

La organogénesis adventicia de la línea 2486 ET MM se analizó en explantes de cotiledón. Se observó que los procedentes de plantas mutantes, aunque mantenían la clorosis, sí fueron capaces de regenerar de manera similar a los procedentes de plantas WT a los 15 días de cultivo en medio IKZ, pero con importante retraso a los 30 días (Figura 17A).

Se consiguió la elongación de los brotes en medio IK y, a los 30 días de cultivo en este medio, se obtuvieron plantas mutantes cloróticas más pequeñas que las WT, pero que no colapsaron (Figura 17B). Sin embargo, al subcultivar de nuevo los ápices en medio MB3 el fenotipo mutante inicial se repitió: plantas cloróticas que, aunque llegaron a enraizar, no fueron capaces de crecer y terminaron por colapsar (Figura 17C).

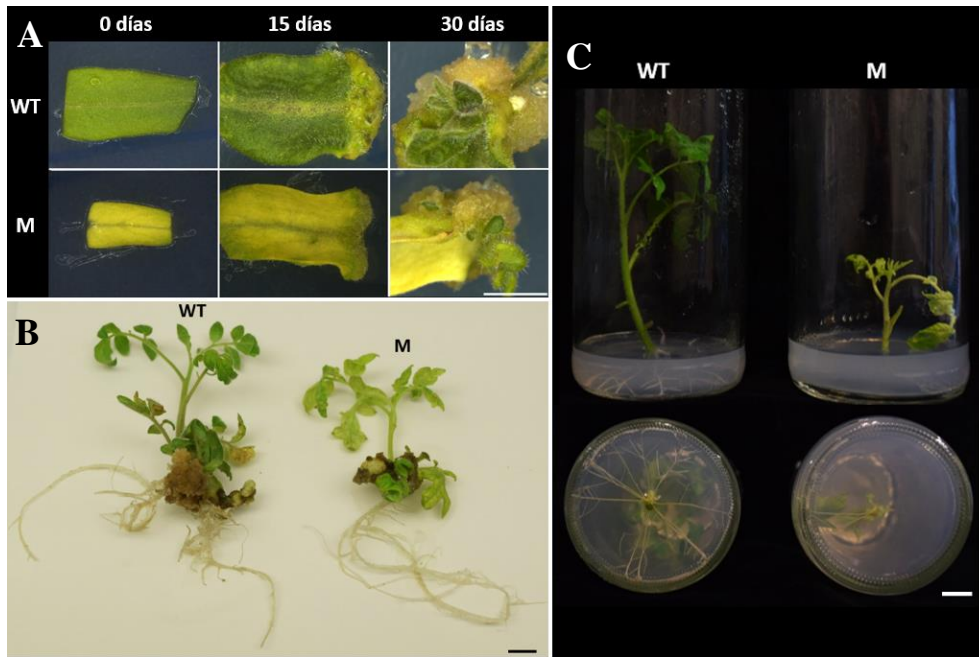


Figura 17. Organogénesis adventicia en explantes de cotiledón de la línea 2486 ET MM. (A) Cultivo de explantes en medio IKZ a los 0, 15 y 30 días. (B) Elongación de brotes en medio IK a los 30 días. (C) Desarrollo de los brotes tras subcultivo en medio MB3 a los 20 días. Escalas: 0.5 cm (A) y 1 cm (B y C).

A continuación, se evaluó el fenotipo *in vivo* de las plántulas mutantes. El fenotipo mutante fue el mismo que el observado *in vitro*: plántulas mutantes cloróticas y con menor crecimiento que terminaron por colapsar (Figura 18). En este caso, no fueron capaces de sobrevivir más de 12 días.

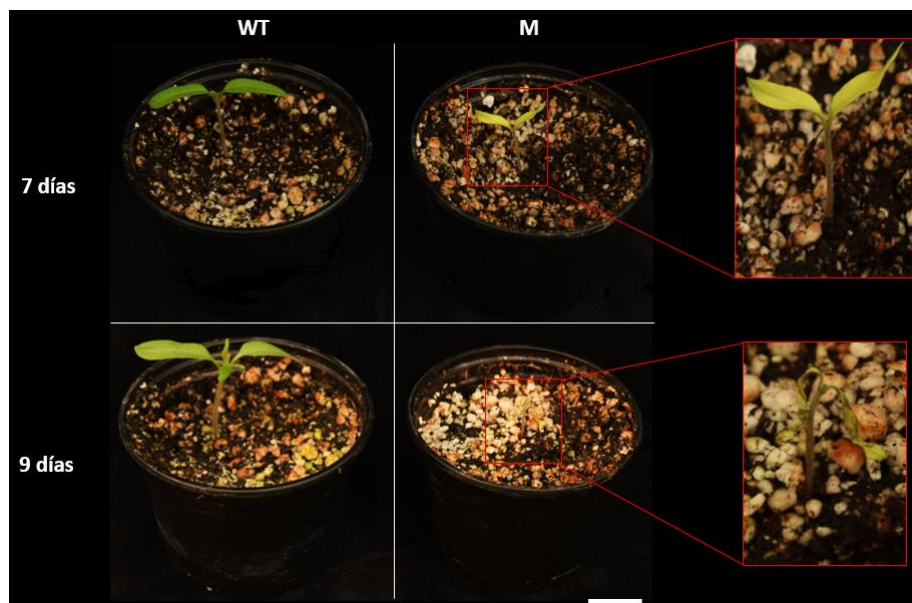


Figura 18. Fenotipo *in vivo* de plántulas WT y M de la línea 2486 ET MM a los 7 y 9 días de desarrollo. Escala: 2 cm.

Tal y como se ha comentado antes, las plantas axénicas de la línea 2486 ET MM sufren un colapso que impide su aclimatación en el invernadero. Por esta razón sólo se muestra el fenotipo *in vivo* de las plantas procedentes de semilla.

4.2.1. Análisis del modo de herencia de la mutación

Tras la realización de cinco experimentos independientes (tres *in vitro* y dos *in vivo*), se pudo asegurar con un 95% de certeza que la mutación se ajusta a un modelo de segregación monogénico recesivo. Además, mediante el test χ^2 de homogeneidad, se comprobó que los datos se podían emplear de manera acumulada (Tabla 6).

Tabla 6. Análisis del modo de herencia de la mutación de la línea 2486 ET MM.

| | Segregación | WT | M | Total | χ^2 |
|--------------------------|-----------------|------|-----|-------|----------|
| Experimento 1 | Observados | 16 | 8 | 24 | 0.89 |
| | Esperados (3:1) | 18 | 6 | 24 | |
| Experimento 2 | Observados | 25 | 7 | 32 | 0.17 |
| | Esperados (3:1) | 24 | 8 | 32 | |
| Experimento 3 | Observados | 31 | 14 | 55 | 0.90 |
| | Esperados (3:1) | 34 | 11 | 55 | |
| Experimento 4 | Observados | 17 | 7 | 24 | 0.22 |
| | Esperados (3:1) | 18 | 6 | 24 | |
| Experimento 5 | Observados | 18 | 4 | 22 | 0.55 |
| | Esperados (3:1) | 16.5 | 5.5 | 22 | |
| Datos acumulados* | Observados | 107 | 40 | 147 | 0.38 |
| | Esperados (3:1) | 110 | 37 | 147 | |

**Análisis χ^2 homogeneidad ($\chi^2_H = 2.34$) indica que las muestras son homogéneas ($P > 0.05$; $\chi^2_{1\text{ g.l.}} = 3.84$)*

4.2.2. Análisis del número de insertos de T-DNA

En esta línea, debido al pequeño tamaño de las plantas mutantes provocado por la ausencia de crecimiento asociada a la mutación, la resistencia a kanamicina se analizó empleando explantes de raíz, como se muestra en la Figura 19. La resistencia a este antibiótico en plantas WT se analizó con explantes de hoja y peciolo, como es habitual.

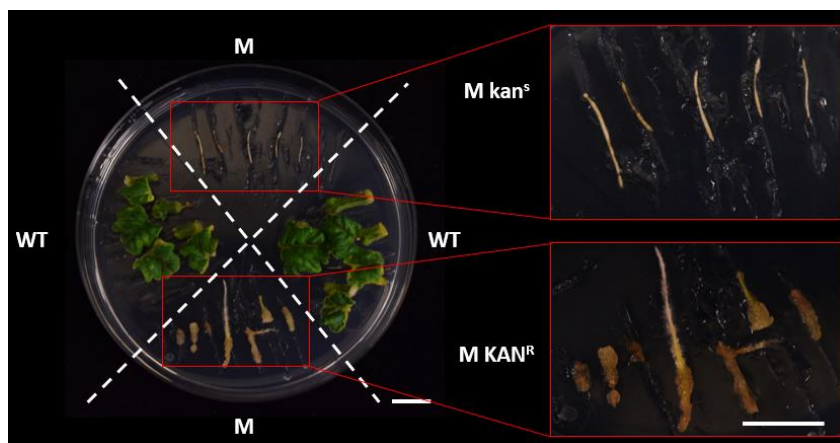


Figura 19. Análisis de la resistencia a la kanamicina de la línea 2486 ET MM en explantes de hoja y peciolo para plantas WT y de raíz para plantas M. Escala: 1 cm.

Tras el análisis de la resistencia a la kanamicina realizado en dos de los experimentos, los resultados permitieron asegurar con un 95% de certeza que la línea 2486 ET MM presenta únicamente un inserto *nptII* funcional. Asimismo, el valor del test χ^2 de homogeneidad permitió utilizar los datos de manera acumulada (Tabla 7).

Tabla 7. Análisis del número de insertos de T-DNA la línea 2486 ET MM.

| | Segregación | KAN ^R | kan ^S | Total | χ^2 |
|--------------------------|-----------------|------------------|------------------|-------|----------|
| Experimento 1 | Observados | 21 | 3 | 24 | 2.00 |
| | Esperados (3:1) | 18 | 6 | 24 | |
| Experimento 2 | Observados | 22 | 10 | 32 | 0.67 |
| | Esperados (3:1) | 24 | 8 | 32 | |
| Datos acumulados* | Observados | 43 | 13 | 56 | 0.10 |
| | Esperados (3:1) | 42 | 17 | 56 | |

**Análisis χ^2 homogeneidad ($\chi^2_H = 2.57$) indica que las muestras son homogéneas ($P > 0.05$; $\chi^2_{1 g.l.} = 3.84$)*

4.2.3. Análisis de cosegregación del fenotipo mutante y el inserto *nptII* funcional

Se descartó la cosegregación de la mutación con el inserto del gen *nptII* funcional en la línea 2486 ET MM, ya que en los experimentos llevados a cabo se obtuvieron 6 plantas mutantes sensibles a la kanamicina (Tabla 8).

Tabla 8. Análisis de cosegregación del fenotipo mutante y el inserto de T-DNA de la línea 2486 ET MM.

| | WT | | M | | Total |
|-------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-------|
| | KAN ^R | kan ^S | KAN ^R | kan ^S | |
| Experimento 1 | 14 | 2 | 7 | 1 | 24 |
| Experimento 2 | 20 | 5 | 2 | 5 | 32 |
| Datos acumulados | 38 | 7 | 9 | 6 | 56 |

4.3. 2641 ET MM

Durante el escrutinio realizado a lo largo de este trabajo se identificó otro mutante a partir de la línea 2641 ET MM. El fenotipo se detectó inicialmente en planta axénica, partiendo de semillas TG2. Conviene aclarar que, en los primeros experimentos, tanto *in vitro* como *in vivo*, se pensó que el fenotipo en plántula era WT y que el fenotipo mutante, consistente en una alteración de la raíz, sólo aparecía en plantas axénicas. Fue en estudios posteriores donde, tras un análisis más exhaustivo, se detectó una alteración en la raíz embrionaria, que se caracterizó en ocasiones por una menor elongación de las raíces secundarias, o por una menor elongación de las raíces tanto primarias como secundarias, siendo este último caso el más frecuente (plantas M1 y M2 de la Figura 20, respectivamente). No obstante, la alteración de la raíz embrionaria en plántulas no fue tan evidente como la observada en plantas axénicas (ver Figura 22A y Figura 23). Por ello, actualmente se está obteniendo semilla de progenies TG3-M, es decir, derivadas de plantas TG2 mutantes, para corroborar el fenotipo mutante en estado de plántula.

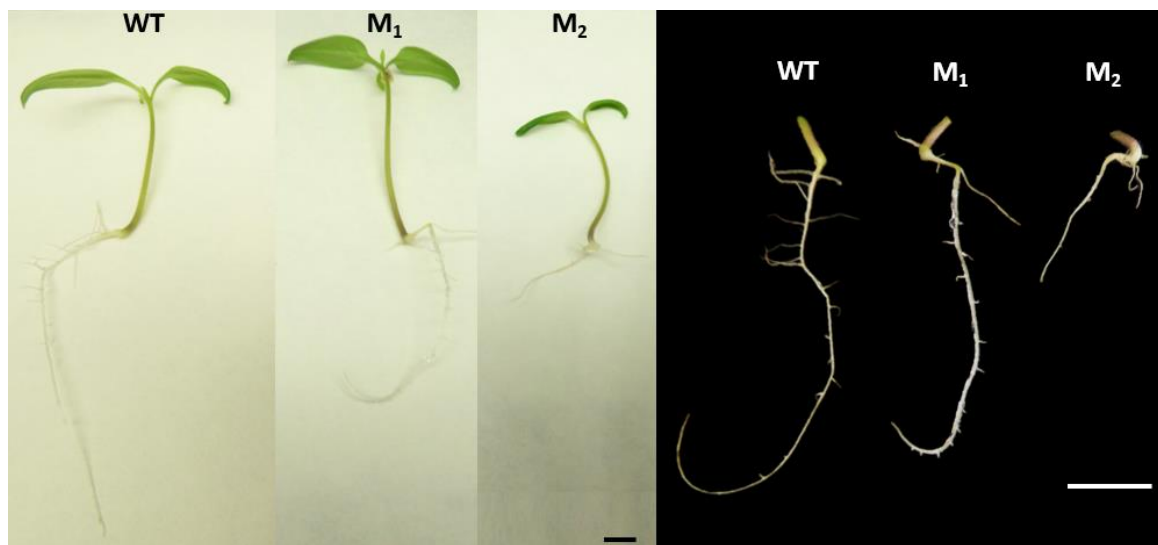


Figura 20. Fenotipo en plántula de la línea 2641 ET MM en medio MG a los 7 días de cultivo. (A) Comparación entre plántulas WT y M. (B) Detalle de raíces WT y M. Escala: 1 cm.

A partir de las plántulas se obtuvieron explantes de cotiledón para evaluar la organogénesis adventicia. En los explantes mutantes, la formación de yemas adventicias y brotes no se vio afectada, ya que fueron capaces de regenerar en medio IKZ, aunque con cierto retraso con respecto a los WT (Figura 21A). Asimismo, los brotes mutantes fueron capaces de elongar en medio IK de manera equivalente a los WT. Lo inesperado fue que el enraizamiento de los brotes regenerados fuera indistinguible con respecto al WT (Figura 21B). Este resultado fue sorprendente, ya que, como se ha indicado antes, las plantas axénicas del mutante presentaron una alteración en el sistema radicular adventicio.

El hecho de que en el mutante no haya una alteración en las fases del proceso de organogénesis adventicia (inducción de yemas adventicias, desarrollo, elongación de brotes y enraizamiento) se corroboró en experimentos adicionales realizados con explantes de hoja. Los resultados fueron los mismos que los obtenidos con explantes de cotiledón: los explantes de hoja de plantas mutantes fueron capaces de regenerar en medio IKZ, aunque con cierto retraso (Figura 21C) y los brotes y raíces se desarrollaron normalmente (Figura 21D).

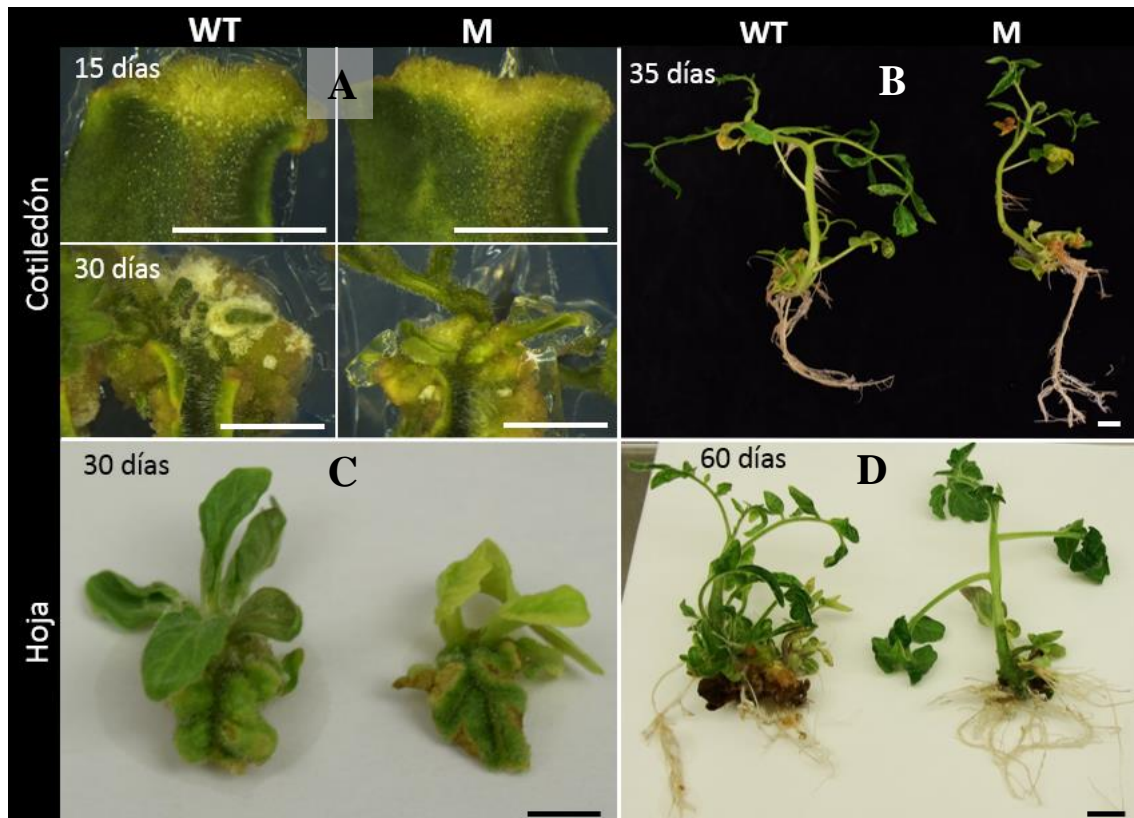


Figura 21. Organogénesis adventicia de la línea 2641 ET MM. (A) Regeneración de explantes WT y M de cotiledón en medio IKZ a los 15 y 30 días. (B) Elongación de brotes WT y M de cotiledón en medio IK a los 35 días. (C) Regeneración de explantes WT y M de hoja en medio IKZ a los 30 días. (D) Elongación de brotes WT y M procedentes de hoja en medio IK a los 60 días. Escalas: (A) 0.5 cm, (B, C y D) 1 cm.

Como se ha mencionado antes, el fenotipo mutante se identificó en plantas axénicas cultivadas en medio básico MB3, y se caracterizó por una elongación anómala del sistema radicular adventicio, de forma que el tamaño de las raíces, tanto primarias como secundarias, fue menor que el de las plantas WT (Figura 22A). En cambio, los brotes adventicios procedentes de explantes de cotiledón y hoja mostraron un enraizamiento normal. A la vista de estos resultados, se ensayaron distintos medios y tipos de explantes para estudiar su respuesta en diferentes condiciones.

En primer lugar, se cultivaron explantes de ápice en medio α (Figura 22B), explantes de ápice en medio IK (Figura 22C) y explantes de hoja de plantas axénicas en medio de enraizamiento I40 (Figura 22D). En los tres casos, el fenotipo de las raíces mutantes fue el

mismo que el observado en medio MB3 (Figura 22A), es decir, un menor desarrollo y elongación de las raíces adventicias. Cabe destacar que en el medio I40 no todos los explantes de hoja mutante fueron capaces de enraizar y, cuando sí fueron capaces, el desarrollo radicular fue escaso y lento.

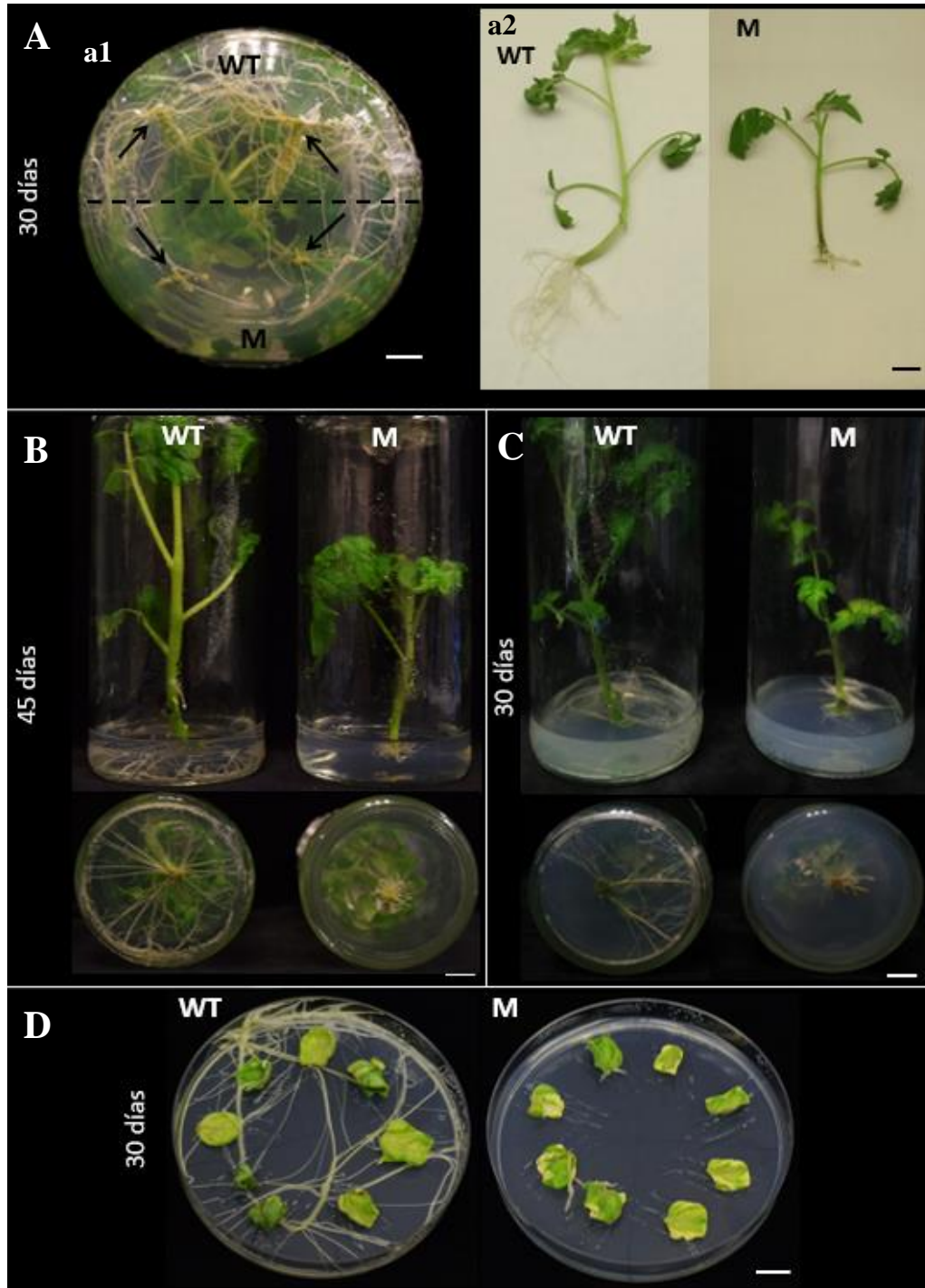


Figura 22. Fenotipo de la línea 2641 ET MM en distintos medios a partir de distintos explantes. (A) Plantas axénicas WT y M desarrolladas a partir de explantes de ápice a los 30 días de cultivo en medio MB3: (a1) detalle de raíces en bote (dos plantas axénicas WT en la parte superior del mismo y dos M en la parte inferior); (a2) plantas axénicas WT y M. (B) Plantas axénicas desarrolladas a partir de explantes WT y M de ápice a los 45 días de cultivo en medio α . (C) Plantas axénicas desarrolladas a partir de explantes WT y M de ápice a los 30 días de cultivo en medio IK. (D) Raíces adventicias desarrolladas a partir de explantes WT y M de hoja a los 30 días de cultivo en medio I40. Escala: 1 cm.

En la Figura 23 se muestra con mayor detalle el fenotipo de las raíces adventicias en los explantes mutantes procedentes de ápices meristemáticos cultivados en medio MB3. Como puede verse, el sistema radicular adventicio mutante exhibió una elongación alterada tanto en las raíces primarias como secundarias (Figura 23A,C). Además, se observó una cierta necrosis en el meristemo apical de las raíces primarias, lo que dio lugar a la formación de una especie de muñones (Figura 23B,D,E).

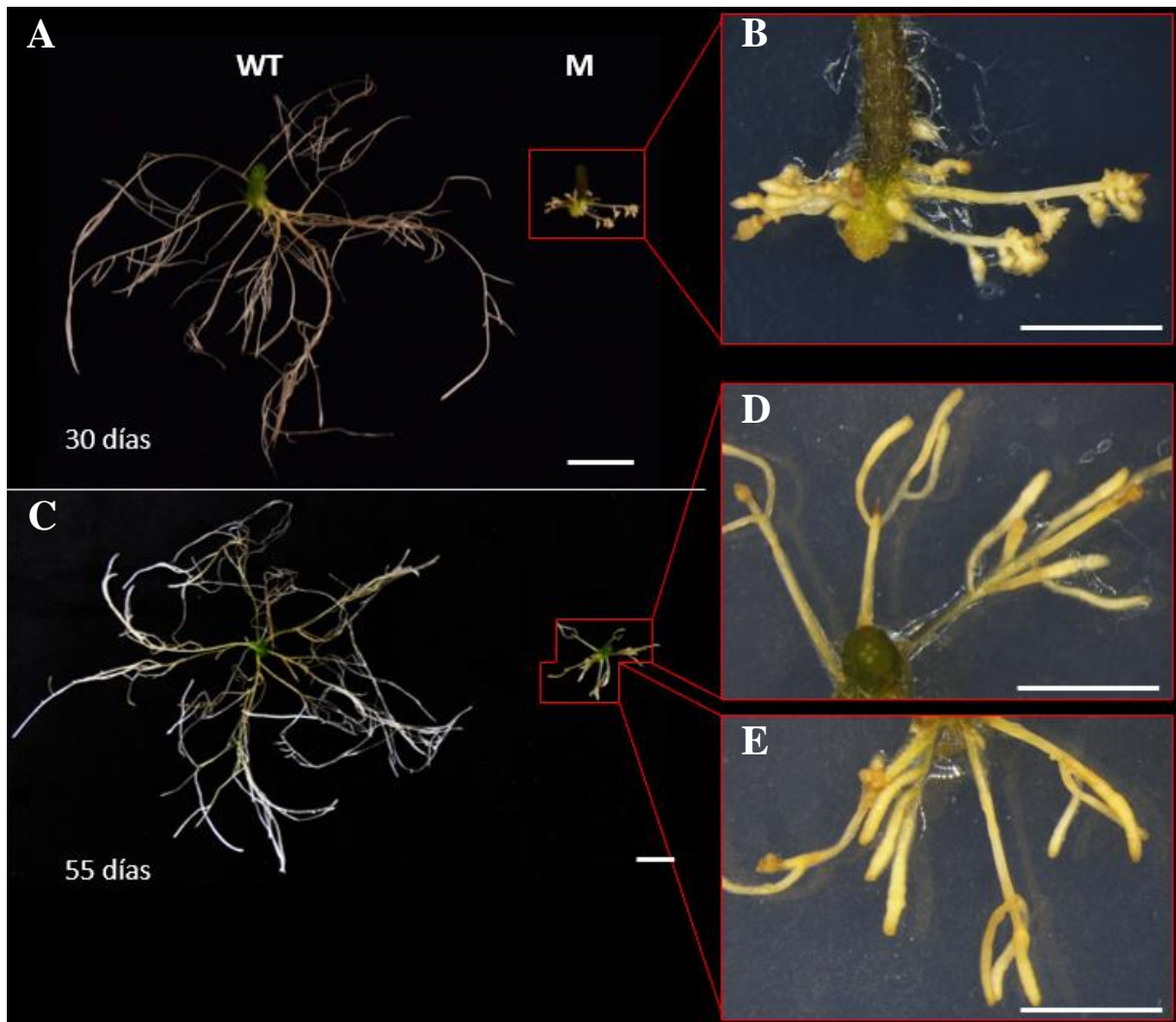


Figura 23. Fenotipo de raíces adventicias de la línea 2641 ET MM desarrolladas a partir de explantes de ápice en medio MB3. (A) Raíces WT y M a los 30 días de cultivo. (B) Raíz M con 0.8 aumentos en la lupa a los 30 días de cultivo. (C) Raíces WT y M a los 55 días de cultivo. (D) y (E) Raíz M con 0.8 aumentos en la lupa a los 55 días de cultivo. Escalas: 1 cm (A y C) y 0.5 cm (B, D y E).

En medio α se volvió a ver la misma alteración en la elongación de las raíces, si bien la necrosis no fue tan evidente y, en comparación con el medio MB3, la formación de raíces adventicias primarias fue mayor. En cuanto a la formación de secundarias, esta fue menor a los 20 días de cultivo, pero a los 45 presentaron un desarrollo notable (Figura 24).

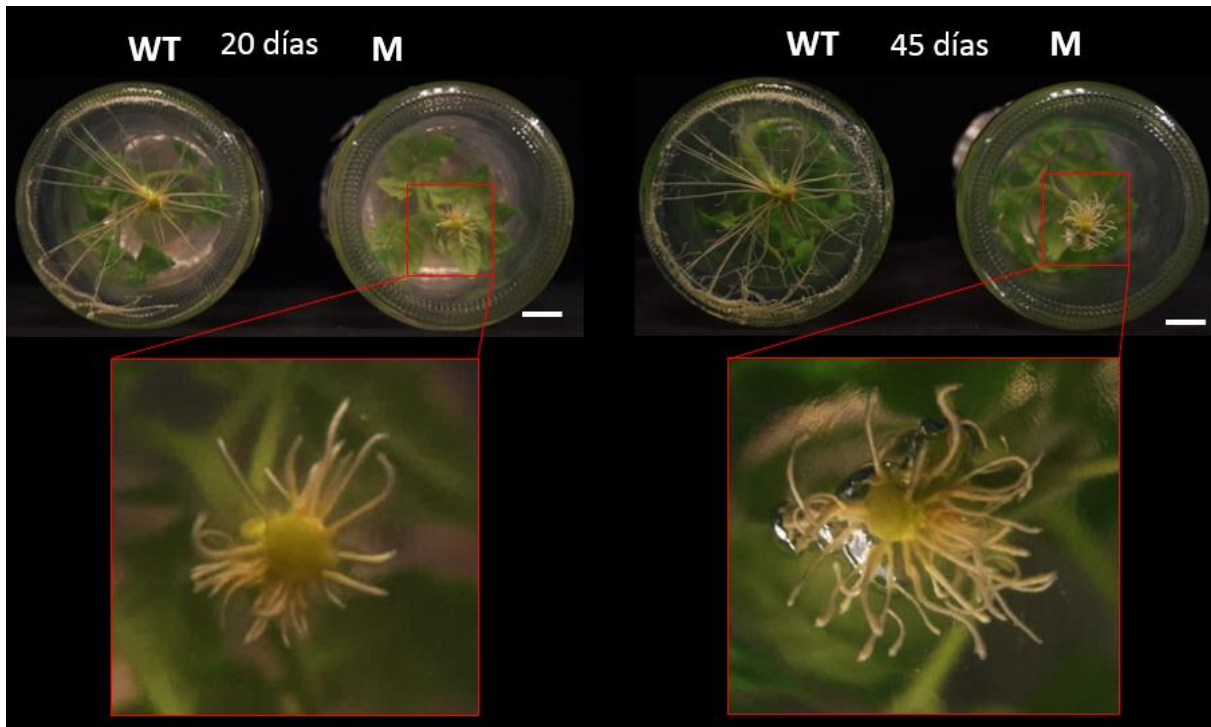


Figura 24. Fenotipo de raíces adventicias de la línea 2641 ET MM desarrolladas a partir de explantes de ápice en medio α tras 20 y 45 días de cultivo. Escala: 1 cm.

En medio IK también se repitió el fenotipo mutante caracterizado por una alteración en la elongación de las raíces, si bien la formación de raíces secundarias fue escasa (Figura 25).

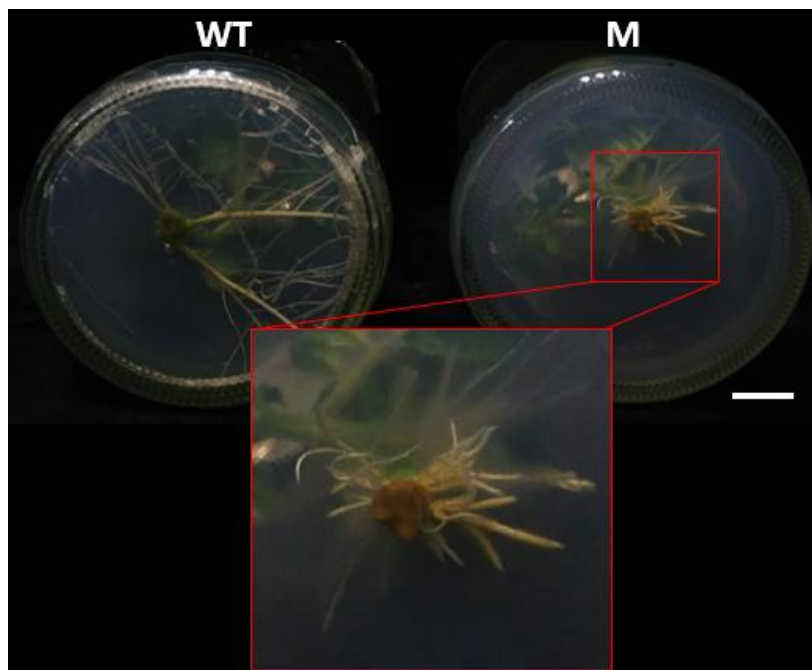


Figura 25. Fenotipo de raíces adventicias de la línea 2641 ET MM desarrolladas a partir de explantes de ápice en medio IK a los 30 días de cultivo. Escala: 1 cm.

En la Figura 26 se muestra con mayor detalle el fenotipo de las raíces en medio de enraizamiento I40. Como se ha mencionado anteriormente, sólo algunos explantes mutantes fueron capaces de enraizar y, cuando lo hicieron, la elongación de las raíces primarias fue escasa y la formación de raíces secundarias fue nula.

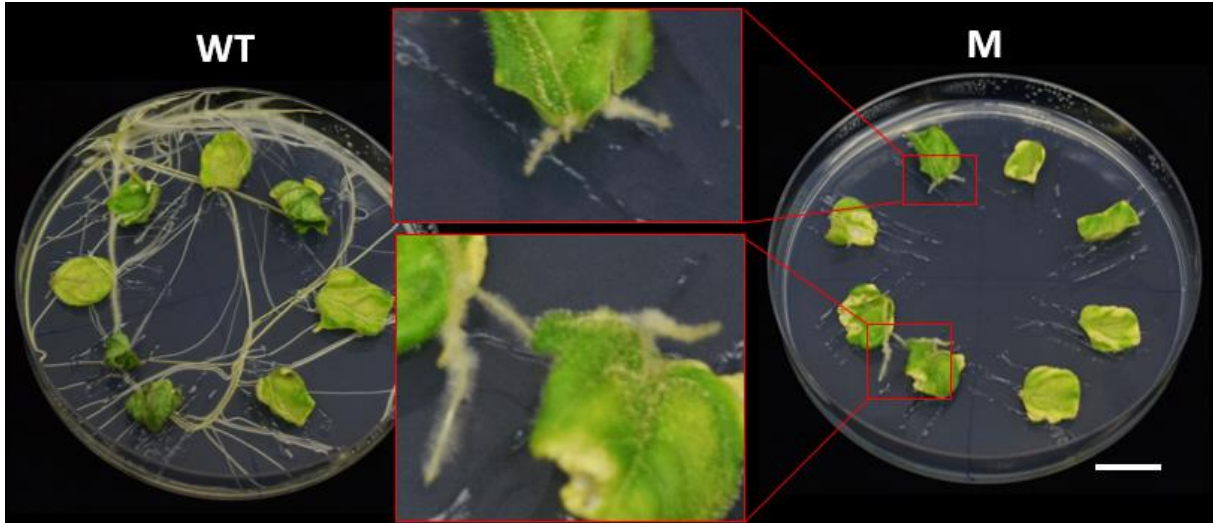


Figura 26. Fenotipo de raíces adventicias de la línea 2641 ET MM desarrolladas a partir de explantes de hoja en medio I40 a los 30 días de cultivo. Escala: 1 cm.

Por otro lado, y con el fin de comprobar si la anomalía en el desarrollo del sistema radicular adventicio estaba relacionada con un déficit de auxinas endógenas, se realizó un experimento en el que se cultivaron ápices meristemáticos en medio MB3 suplementado con 0.1, 1 y 10 mg/L de ácido indolacético (IAA) y de ácido indolbutírico (IBA).

Los resultados se analizaron a los 30 días de cultivo. En las plantas WT, el incremento de la concentración de IAA generó un aumento de la masa radicular, aunque el medio con 10 mg/L disminuyó el número de raíces secundarias y el crecimiento de la parte aérea. En las plantas mutantes, sólo se observó un ligero aumento de la masa radicular en el medio con una concentración de 10 mg/L de IAA, pero en ningún caso se obtuvo una fenocopia del WT (Figura 27).

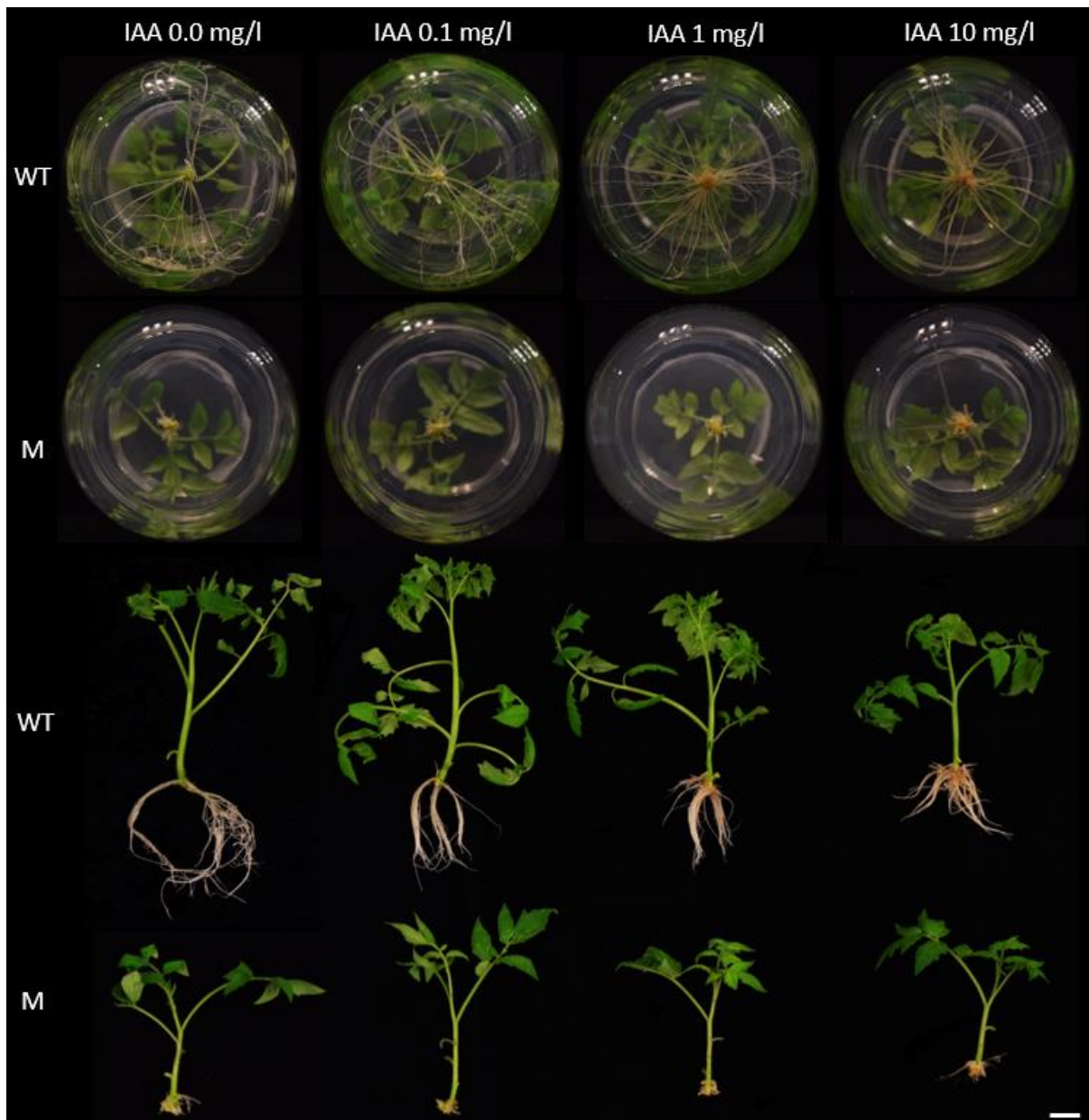


Figura 27. Fenotipo de plantas axénicas de la línea 2641 ET MM a los 30 días de cultivo en medio MB3 con distintas concentraciones de IAA. Escala: 1 cm.

La adición de IBA al medio tuvo los mismos efectos en plantas WT y mutantes que la adición de IAA, y tampoco condujo a la reversión del fenotipo o, lo que es lo mismo, a la obtención de una fenocopia del WT (Figura 28).



Figura 28. Fenotipo de plantas axénica de la línea 2641 ET MM a los 30 días de cultivo en medio MB3 con distintas concentraciones de IBA. Escala: 1 cm.

Posteriormente, se probaron algunas auxinas sintéticas: ácido 1-naftalenacético (ANA), ácido 2,4-diclorofenxiacético (2,4-D), ácido 4-clorofenoxiacético (4-CPA) y ácido 2,4,5-tricolofenoxiacético (2,4,5-T), a una concentración de 0.1 mg/l.

La adición de estas auxinas sintéticas se tradujo a veces en la formación de un callo en la base del ápice, pero, por lo que se refiere al enraizamiento, tampoco condujo a la reversión del fenotipo mutante y la obtención de una fenocopia del WT (Figura 29).

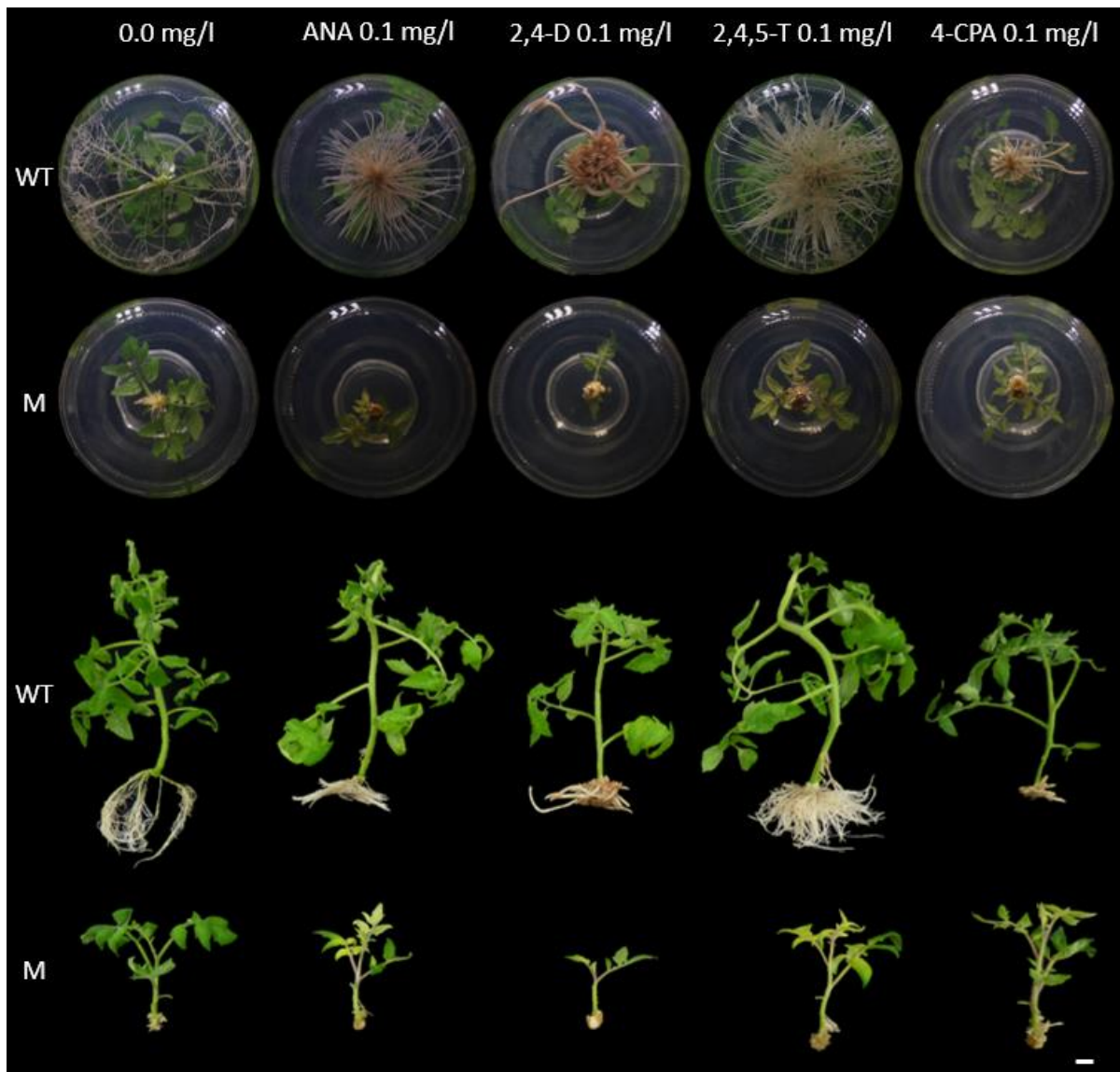


Figura 29. Fenotipo de plantas axénicas de la línea 2641 ET MM a los 30 días de cultivo en medio básico con distintas auxinas sintéticas (0.1 mg/L). Escala: 1 cm.

A fin de profundizar en la caracterización del mutante, se realizó un nuevo experimento en el que de nuevo se cultivaron ápices meristemáticos en medio MB3, pero extendiendo el periodo de cultivo hasta los 130 días. Como se muestra en la Figura 30, en el periodo habitual de cultivo (30 días de incubación) se observó el mismo fenotipo mutante, es decir, escaso desarrollo del sistema radicular adventicio que debería aparecer en la base (zona de corte) de las plantas. Sin embargo, a partir de los 45 días, se empezaron a desarrollar raíces aéreas que, poco a poco, penetraron en el medio de cultivo, sustentando el progresivo desarrollo de la parte aérea. A los 130 días de cultivo, si se observan los recipientes por su parte inferior parece que el enraizamiento de las plantas mutantes es similar al de las plantas WT. Sin embargo, cuando se observan los botes de frente resulta evidente que las raíces no han surgido de la base de la planta (zona de corte) sino del tallo, es decir, se trata de raíces adventicias aéreas. Además, lo

llamativo en este desarrollo de raíces adventicias aéreas fue el fenotipo WT de las mismas en las plantas mutantes, así como su aparición más temprana y más frecuente que en plantas WT.

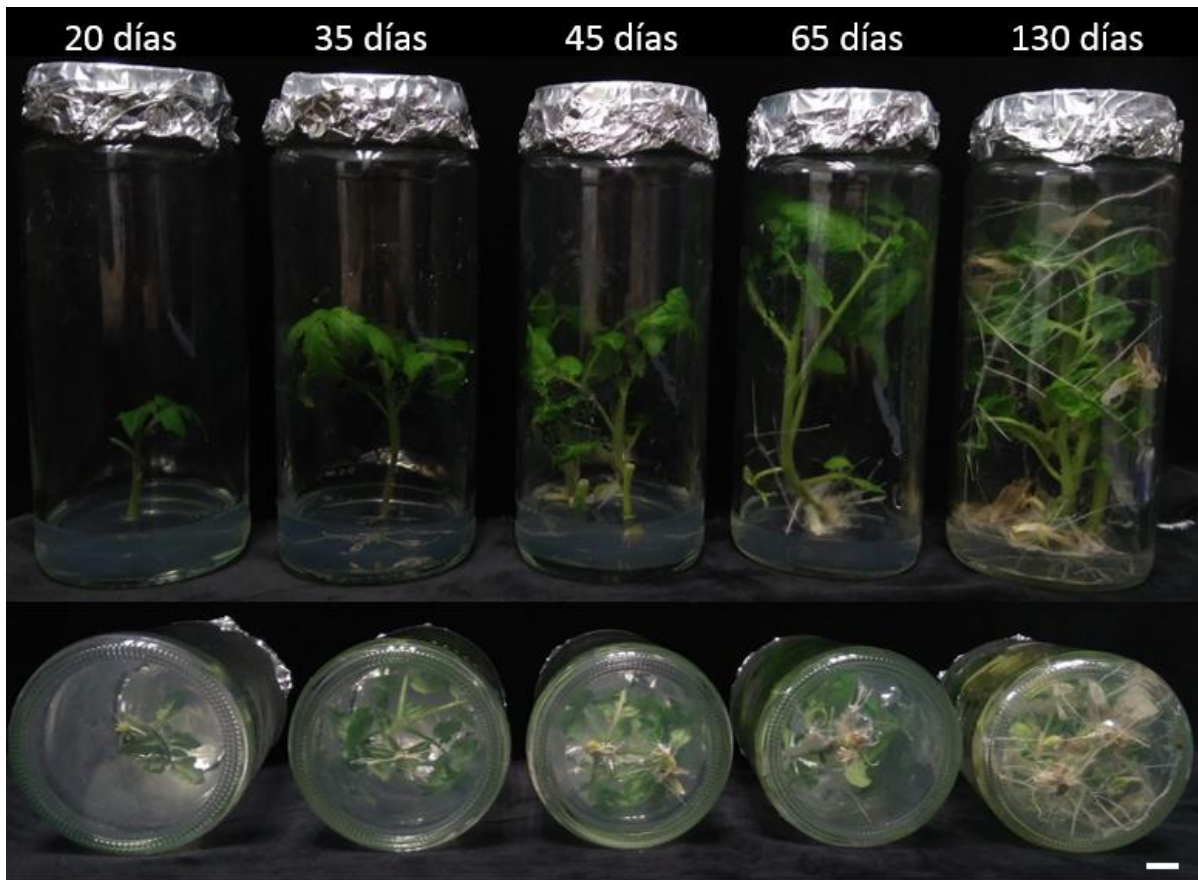


Figura 30. Evolución a lo largo del tiempo del desarrollo radicular en plantas axénicas mutantes de la línea 2641 ET MM cultivadas en medio MB3. Ecala: 1 cm.

El proceso de formación de raíces aéreas también se observó en plantas axénicas desarrolladas a partir de ápices mutantes cultivados en medio IK, aunque en este caso la emergencia de raíces aéreas se observó un poco antes (a los 25 días) y su desarrollo también fue mayor con el tiempo (Figura 31). Igual que ocurrió en medio MB3, estas raíces adventicias de las plantas mutantes presentaron fenotipo WT. Otros ejemplos de formación de raíces aéreas se dieron en plantas axénicas cultivadas en medio básico con las auxinas sintéticas 2,4,5-T y 4-CPA a los 30 días de cultivo (ver Figura 29).

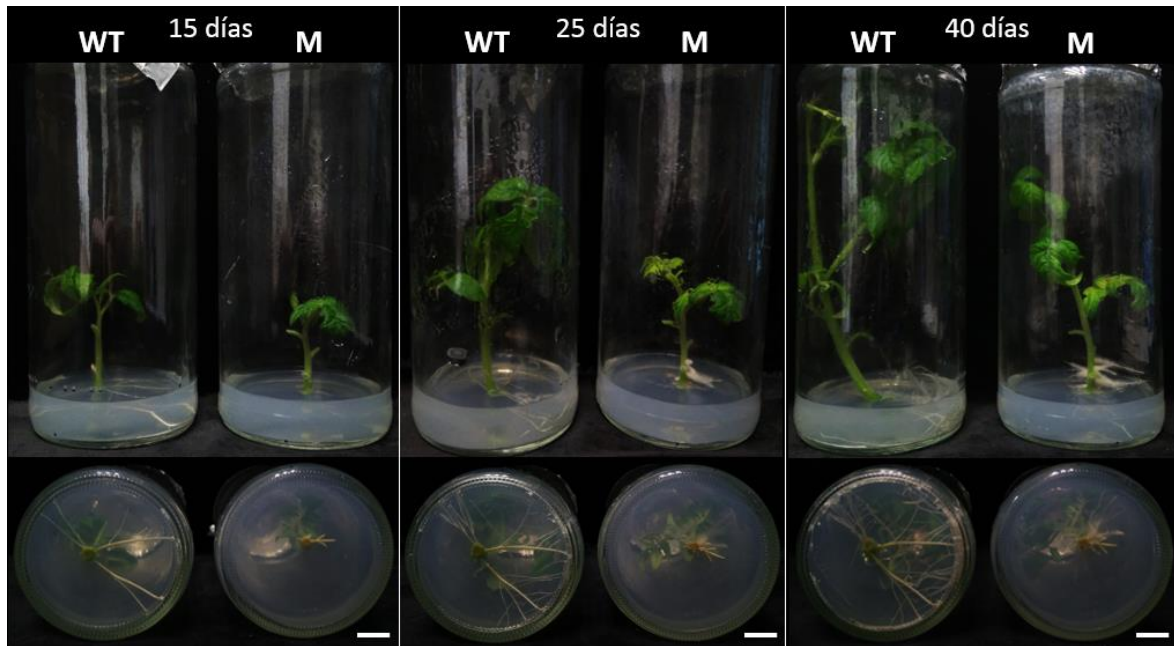


Figura 31. Fenotipo en planta axénica de la línea 2641 ET MM en medio IK tras 15, 25 y 40 días de cultivo en plantas WT y M. Escala: 1 cm.

Las plántulas mutantes cultivadas *in vivo* también presentaron un menor desarrollo de la raíz embrionaria con respecto a las plántulas WT, aunque el fenotipo no fue extremo (Figura 32).

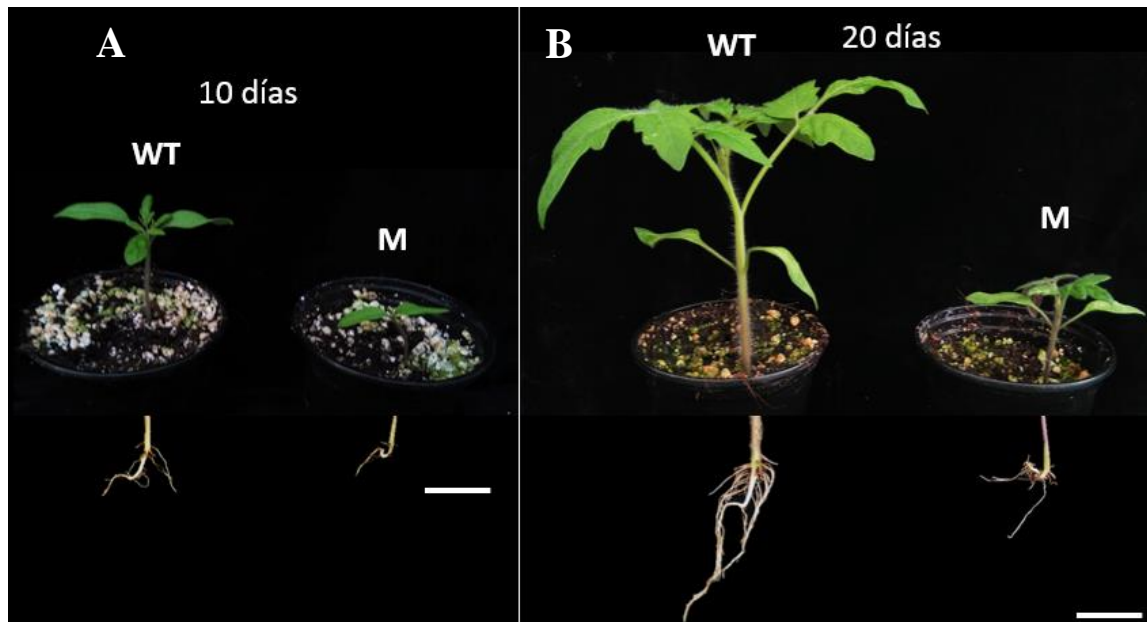


Figura 32. Fenotipo *in vivo* de plántulas WT y M de la línea 2641 ET MM a los (A) 10 y (B) 20 días de cultivo en el invernadero. Escala: 3 cm.

El fenotipo de las plantas axénicas aclimatadas *in vivo* fue dependiente del periodo de incubación de las plantas axénicas, es decir, de si se había producido o no la emergencia de raíces aéreas. Cuando se aclimataron plantas axénicas cultivadas durante 30 o menos días, es

decir, sin raíces aéreas, el crecimiento de la parte aérea fue menor que el de plantas WT y, por lo que se refiere al sistema radicular, al principio se desarrolló de forma muy lenta (Figura 33A), aunque con el tiempo se fue recuperando (Figura 33B). En cambio, cuando se aclimataron plantas axénicas que ya habían desarrollado raíces aéreas, el fenotipo de las plantas mutantes en el invernadero fue indistinguible del de plantas WT.



Figura 33. Fenotipo *in vivo* de plantas WT y M aclimatadas de la línea 2641 ET MM a los (A) 10 y (B) 30 días tras la aclimatación. Escala: 5 cm.

4.3.1. Análisis del modo de herencia de la mutación

Tras la realización de cinco experimentos independientes, se pudo concluir que la mutación se ajusta a una segregación monogénica recesiva con un 95% de certeza. Además, tras la realización del test χ^2 de homogeneidad, se comprobó que los datos de los distintos experimentos se podían emplear de forma acumulada (Tabla 9).

Tabla 9. Análisis del modo de herencia de la mutación de la línea 2641 ET MM.

| | Segregación | WT | M | Total | χ^2 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|-------|------|-------|----------|
| Experimento 1 | Observados | 9 | 2 | 11 | 0.27 |
| | Esperados (3:1) | 8.25 | 2.75 | 11 | |
| Experimento 2 | Observados | 10 | 2 | 12 | 0.44 |
| | Esperados (3:1) | 9 | 3 | 12 | |
| Experimento 3 | Observados | 15 | 6 | 21 | 0.14 |
| | Esperados (3:1) | 15.75 | 5.25 | 21 | |
| Experimento 4 | Observados | 18 | 6 | 24 | 0.00 |
| | Esperados (3:1) | 18 | 6 | 24 | |
| Experimento 5 | Observados | 11 | 5 | 16 | 0.33 |
| | Esperados (3:1) | 12 | 4 | 16 | |
| Datos acumulados* | Observados | 63 | 21 | 84 | 0.00 |
| | Esperados (3:1) | 63 | 21 | 84 | |
| *Análisis χ^2 homogeneidad ($\chi^2_H = 1.19$) indica que las muestras son homogéneas ($P > 0.05$; $\chi^2_{1\text{ g.l.}} = 3.84$) | | | | | |

4.3.2. Análisis del número de insertos de T-DNA

Tras el análisis de los datos obtenidos, estos no deberían usarse de forma acumulada según el valor del test χ^2 de homogeneidad. No obstante, se aceptó la presencia de un único inserto del gen *nptII* funcional debido a que en cuatro de los cinco experimentos se pudo aceptar la hipótesis nula de un único inserto con un 95% de certeza (Tabla 10).

Tabla 10. Análisis del número de insertos de T-DNA de la línea 2641 ET MM.

| | Segregación | KAN ^R | kan ^S | Total | χ^2 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|------------------|------------------|-------|----------|
| Experimento 1 | Observados | 8 | 3 | 11 | 0.03 |
| | Esperados (3:1) | 8.25 | 2.75 | 11 | |
| Experimento 2 | Observados | 10 | 2 | 12 | 0.44 |
| | Esperados (3:1) | 9 | 3 | 12 | |
| Experimento 3 | Observados | 18 | 3 | 21 | 1.29 |
| | Esperados (3:1) | 15.75 | 5.25 | 21 | |
| Experimento 4 | Observados | 13 | 11 | 24 | 5.56 |
| | Esperados (3:1) | 18 | 6 | 24 | |
| Experimento 5 | Observados | 13 | 3 | 16 | 0.33 |
| | Esperados (3:1) | 12 | 4 | 16 | |
| Datos acumulados* | Observados | 62 | 22 | 84 | 0.06 |
| | Esperados (3:1) | 63 | 21 | 84 | |
| *Análisis χ^2 homogeneidad ($\chi^2_H = 7.59$) indica que las muestras son homogéneas ($P > 0.05$; $\chi^2_{1\text{ g.l.}} = 3.84$) | | | | | |

4.3.3. Análisis de cosegregación del fenotipo mutante y el inserto *nptII* funcional

Se descartó la cosegregación del fenotipo mutante de la línea 2641 ET MM y el inserto *nptII* funcional debido a la aparición de plantas mutantes sensibles a la kanamicina en dos de los experimentos (Tabla 11).

Tabla 11. Análisis de cosegregación del fenotipo mutante y el inserto de T-DNA de la línea 2641 ET MM

| | WT | | M | | Total |
|-------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-------|
| | KAN ^R | kan ^S | KAN ^R | kan ^S | |
| Experimento 1 | 6 | 3 | 2 | 0 | 11 |
| Experimento 2 | 7 | 2 | 3 | 0 | 12 |
| Experimento 3 | 13 | 2 | 5 | 1 | 21 |
| Experimento 4 | 12 | 6 | 1 | 5 | 24 |
| Experimento 5 | 8 | 3 | 5 | 0 | 16 |
| Datos acumulados | 46 | 16 | 17 | 6 | 84 |

4.4. 2657 ET MM

El último mutante se identificó en el escrutinio a partir de la línea 2657 ET MM. Se detectó, también a partir de semillas TG2, en estado de plántula a los 7 días de cultivo en medio MG. Las plántulas mutantes fueron de menor tamaño que las WT. En este momento, las mutantes aún no habían desarrollado hojas primarias, mientras que las WT sí lo habían hecho (Figura 34A). También se observó una ligera clorosis en los cotiledones de las plántulas mutantes (Figura 34B) y un desarrollo alterado de la raíz embrionaria, pues la elongación de la raíz primaria fue mucho menor que en plántulas WT y la formación de raíces laterales fue mínima (Figura 34C).

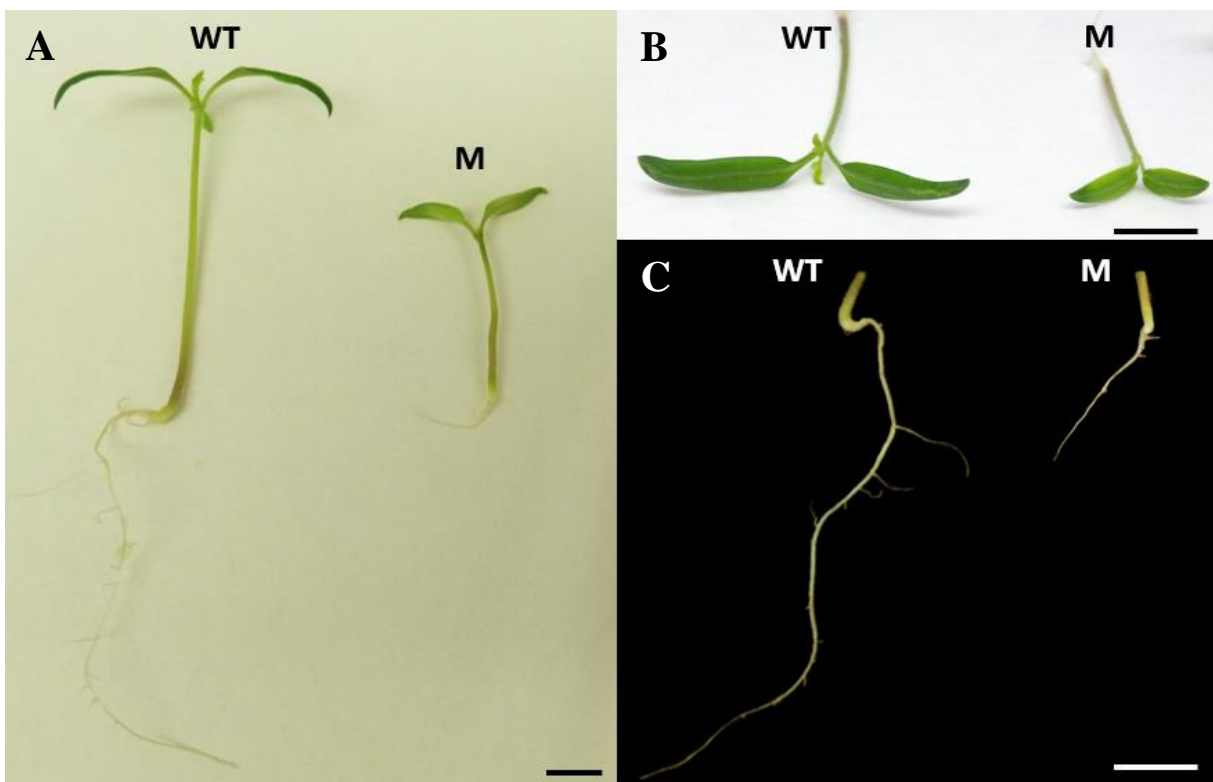


Figura 34. Fenotipo en plántula de la línea 2657 ET MM a los 7 días de cultivo en MG. (A) Comparación entre plántulas WT y M y (B) Detalle de cotiledones WT y M. (C) Detalle de raíces embrionarias WT y M Escala: 1 cm.

El fenotipo mutante se repitió en planta axénica, pero fue aún más evidente en este caso: las raíces adventicias de plantas mutantes fueron mucho más pequeñas que las de plantas WT y, en consecuencia, la parte aérea también tuvo un desarrollo mucho menor (Figura 35A). Además, se corroboró la clorosis de la parte aérea observada en estado de plántula, que fue mucho más clara en planta axénica (Figura 35B).



Figura 35. Fenotipo en planta axénica de la línea 2657 ET MM a los 21 días de cultivo en MB3. (A) Comparación entre plantas WT y M. (B) Detalle de las hojas de la planta M. Escala: 1 cm.

En la Figura 36 se puede observar que las plantas mutantes fueron capaces de crecer, pero con mucho más retraso que las WT. La clorosis fue disminuyendo a los 45 días (Figura 36B), pero las raíces mantuvieron su fenotipo mutante de menor elongación de raíces primarias, así como una menor formación y elongación de las secundarias (Figura 36C).

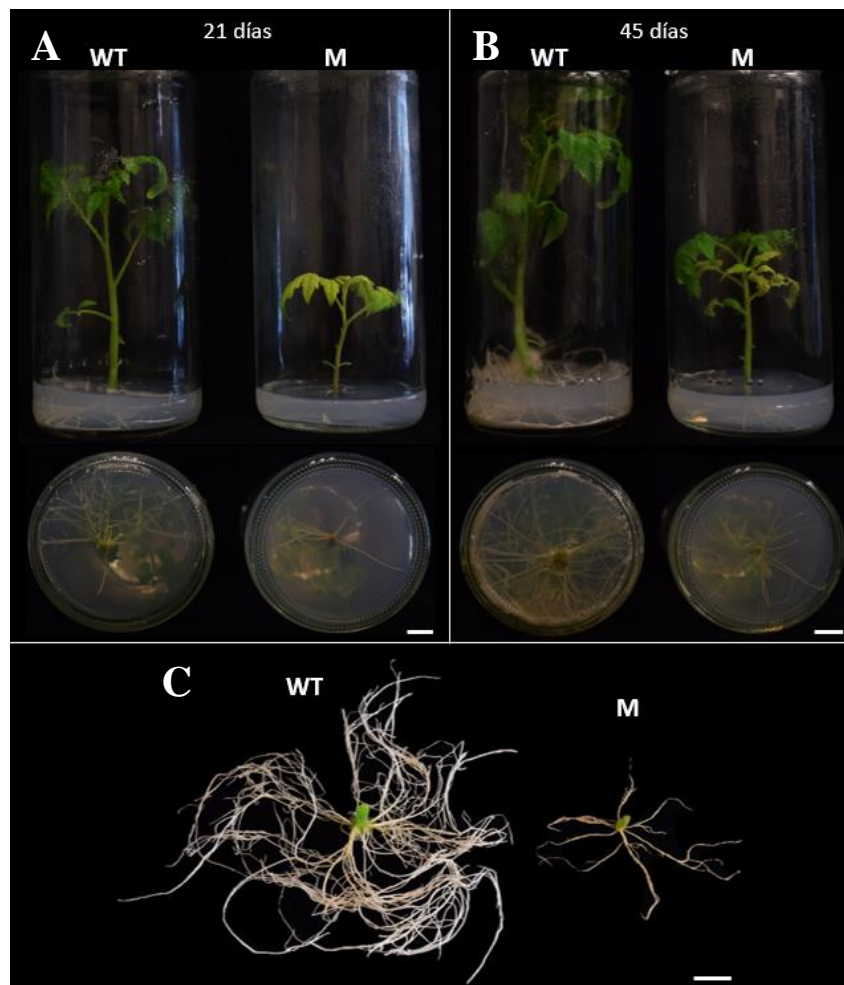


Figura 36. Fenotipo en planta axénica de la línea 2657 ET MM (A) a los 21 días y (B) a los 45 días de cultivo en MB3. (C) Detalle de las raíces WT y M a los 45 días de cultivo en MB3. Escala: 1 cm.

A continuación, se cultivaron ápices meristemáticos en medio básico con diferentes auxinas (0.1 mg/L) para comprobar si la causa del fenotipo estaba relacionada con un déficit de auxinas.

La adición de IAA e IBA (0.1 mg/L) no consiguió revertir el fenotipo mutante característico de esta línea: raíces primarias más cortas y escasa o nula formación de raíces secundarias. Además, en cuanto al desarrollo radicular, entre plantas WT no hubo diferencias importantes en los distintos medios, al igual que entre plantas mutantes (Figura 37).

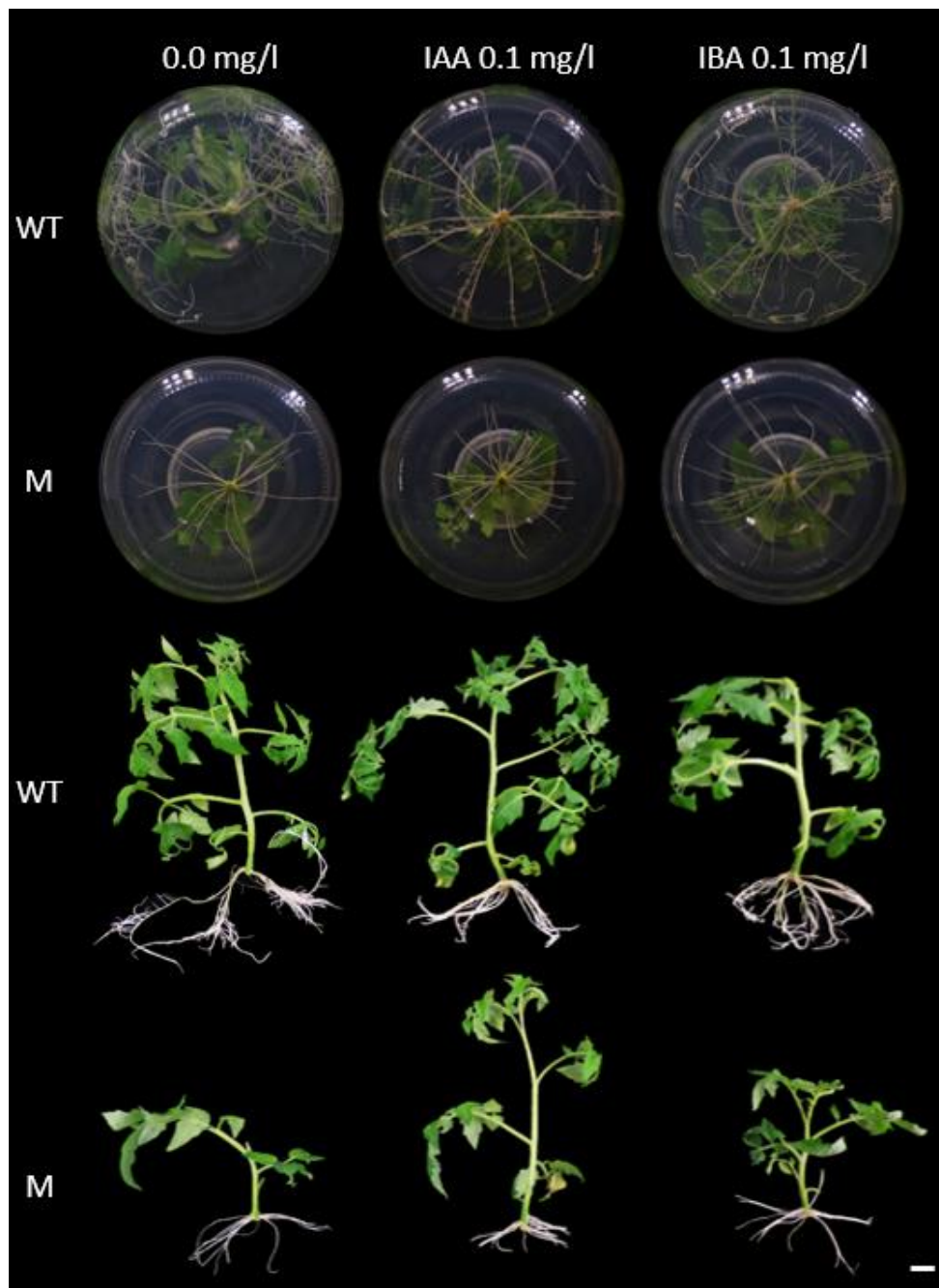


Figura 37. Fenotipo de plantas axénicas de la línea 2657 ET MM a los 30 días de cultivo en medio básico con IAA e IBA (0.1 mg/L). Escala: 1 cm.

La adición de auxinas sintéticas a las plantas mutantes tampoco condujo a la obtención de una fenocopia del WT, si bien las auxinas ANA y 2,4,5-T desencadenaron un desarrollo de raíces primarias más numerosas, aunque más cortas (Figura 38).

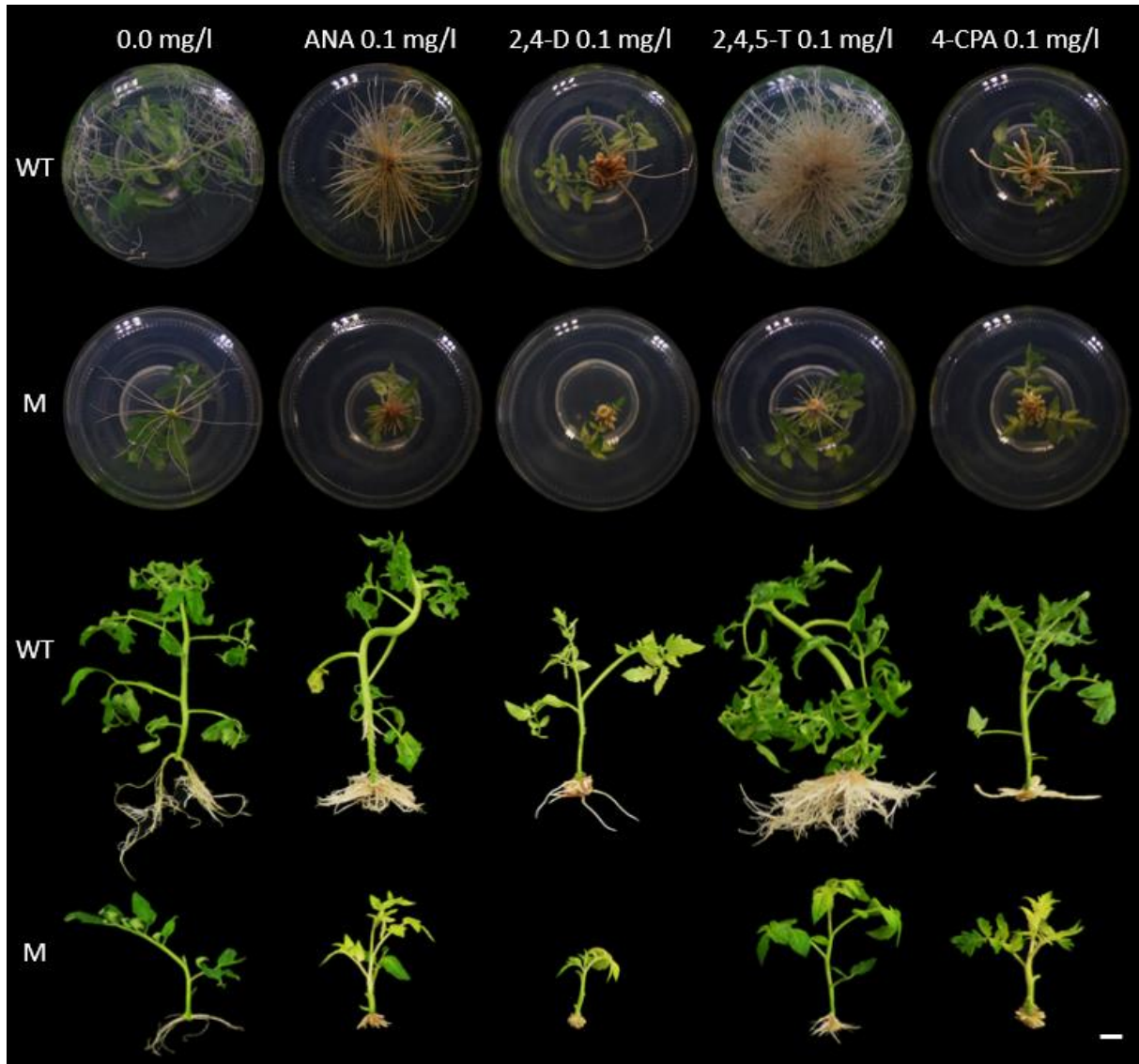


Figura 38. Fenotipo de plantas axénicas de la línea 2657 ET MM a los 30 días de cultivo en medio básico con distintas auxinas sintéticas (0.1 mg/L). Escala: 1 cm.

Se analizó también la organogénesis adventicia a partir de explantes, tanto de cotiledón como de hoja, de la línea 2657 ET MM en medio IKZ. En ambos casos, la regeneración de los explantes mutantes fue similar a la de los explantes WT (Figura 39A,B). La elongación y el enraizamiento de los brotes mutantes en medio IK también fue similar a la de los explantes WT (Figura 39C).

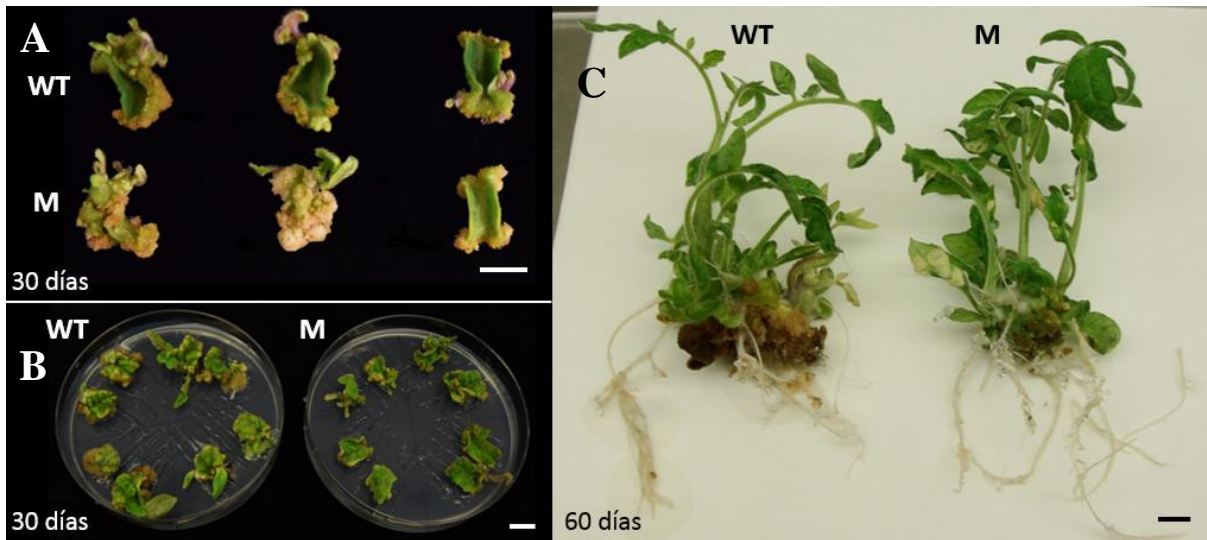


Figura 39. Organogénesis adventicia de la línea 2657 ET MM. Regeneración de explantes WT y M de (A) cotiledón y (B) hoja en medio IKZ a los 30 días de cultivo. (C) Elongación y enraizamiento de los brotes WT y M en medio IK a los 60 de días de cultivo. Escala: 1 cm.

El fenotipo mutante también se pudo observar *in vivo*. Como se aprecia en la Figura 40A, todas las plantas mutantes procedentes de semilla fueron de menor tamaño que las WT. Eso sí, dentro de las mismas hubo más o menos desarrollo y presentaron una clorosis más o menos acentuada. Por ejemplo, la planta que se muestra en la Figura 40B es más grande que la de la Figura 40C y, mientras que la primera presenta clorosis nítida, en la segunda no es tan acentuada.

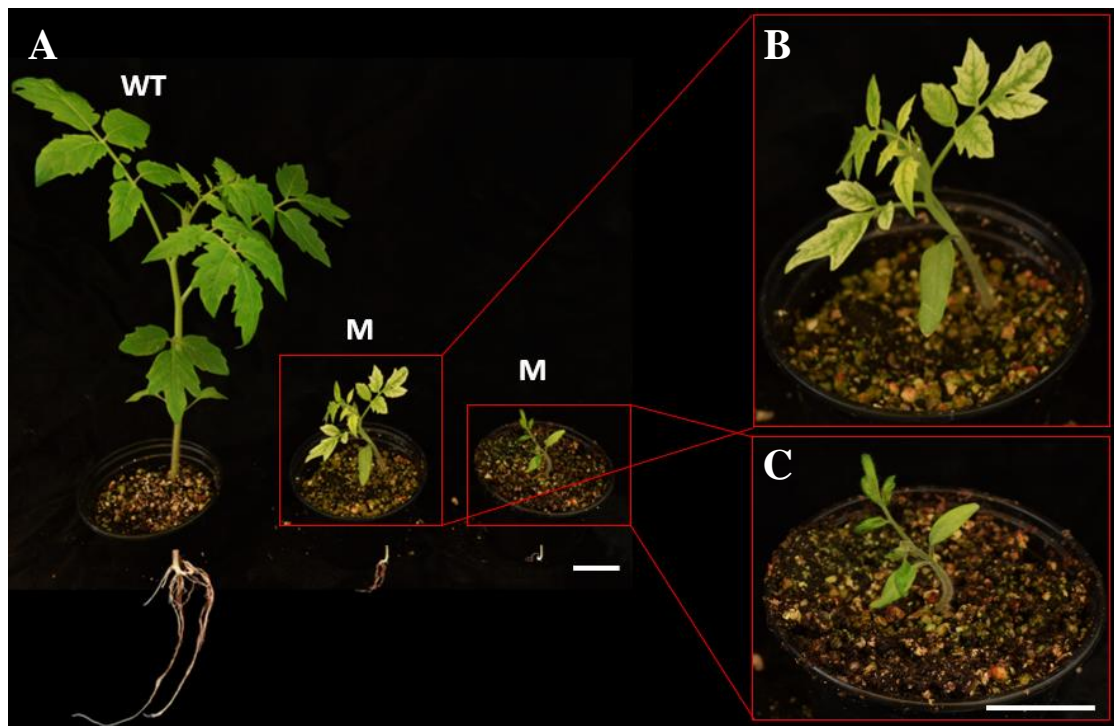


Figura 40. Fenotipo *in vivo* de la línea 2657 ET MM a los 30 días de cultivo. (A) Comparación de una planta WT con dos plantas M diferentes. (B) y (C) Zoom de las dos plantas M. Escala: 3 cm.

Las plantas aclimatadas en el invernadero a partir de plantas axénicas mutantes también exhibieron el fenotipo característico: menor desarrollo aéreo que el de plantas WT (Figura 41A) y clorosis en las hojas, que fue más acentuada que la observada *in vitro* (Figura 41B).

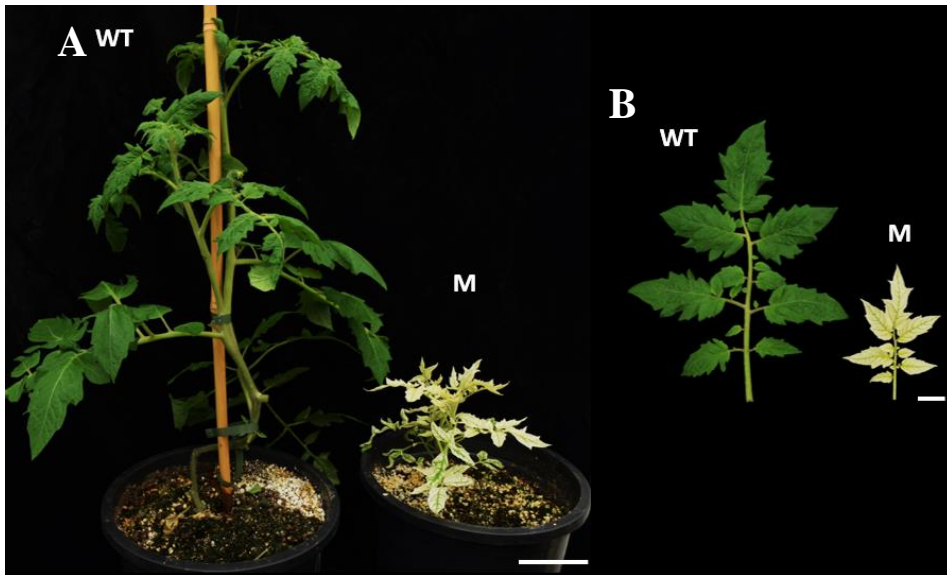


Figura 41. Fenotipo *in vivo* de plantas aclimatadas de la línea 2657 ET MM tras 40 días de la aclimatación. (A) Comparación de plantas WT y M. (B) Comparación de hojas jóvenes WT y M. Escalas: 10 cm (A) y 2 cm (B).

No obstante, tras 120 días en el invernadero, las plantas mutantes aclimatadas perdieron la clorosis e incrementaron su desarrollo aéreo de manera notable, aunque fue mucho menor que el de plantas WT. Además, las plantas mutantes presentaron un fenotipo compacto y las flores no fueron capaces de producir frutos (Figura 42).



Figura 42. Evolución de una planta M aclimatada de la línea 2657 ET MM en el invernadero desde los 50 días hasta los 120 tras la aclimatación. Escala: 5 cm.

Por último, se realizaron injertos para dilucidar cuál era la parte afectada por la mutación: la aérea o la radicular. Tras 25 días de cultivo en el invernadero, las plantas M/WT y WT/M fueron más pequeñas que la planta WT/WT. Entre las plantas M/WT y WT/M no hubo diferencias en la altura, si bien la parte M presentó un menor crecimiento que la parte WT en ambos casos (Figura 43). Esto indica que la mutación afecta tanto a la parte aérea como al sistema radicular.

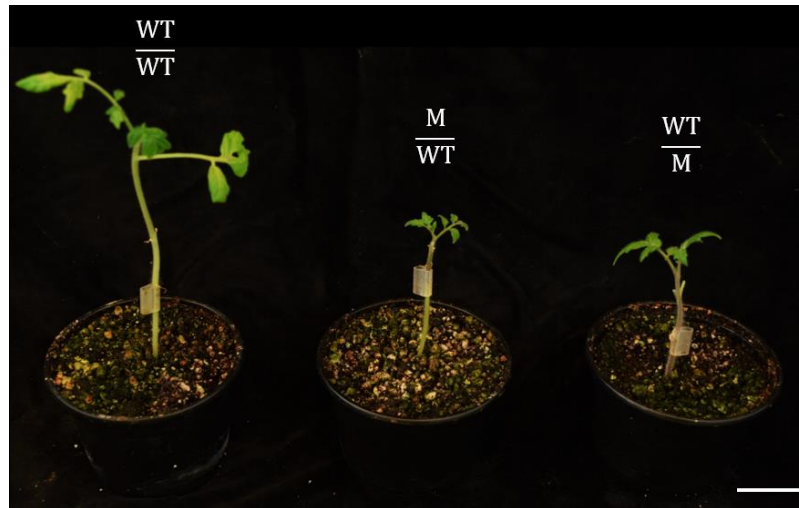


Figura 43. Fenotipo de injertos de la línea 2657 ET MM tras 25 días de cultivo en el invernadero. Escala: 3 cm.

4.4.1. Análisis del modo de herencia de la mutación

Se realizaron 4 experimentos independientes, 2 *in vitro* y 2 *in vivo*. El test χ^2 de homogeneidad justificó el uso de los datos acumulados. Los resultados permitieron aceptar un modo de herencia recesivo de la mutación con una probabilidad de fallo menor del 5% (Tabla 12).

Tabla 12. Análisis del modo de herencia de la mutación de la línea 2657 ET MM.

| | Segregación | WT | M | Total | χ^2 |
|--------------------------|-----------------|------|------|-------|----------|
| Experimento 1 | Observados | 19 | 7 | 26 | 0.05 |
| | Esperados (3:1) | 19.5 | 6.5 | 26 | |
| Experimento 2 | Observados | 16 | 4 | 20 | 0.27 |
| | Esperados (3:1) | 15 | 5 | 20 | |
| Experimento 3 | Observados | 16 | 6 | 24 | 0.06 |
| | Esperados (3:1) | 16.5 | 5.5 | 24 | |
| Experimento 4 | Observados | 10 | 8 | 18 | 3.68 |
| | Esperados (3:1) | 13.5 | 4.5 | 18 | |
| Datos acumulados* | Observados | 56 | 30 | 86 | 0.76 |
| | Esperados (3:1) | 64.5 | 21.5 | 86 | |

*Análisis χ^2 homogeneidad ($\chi^2_H = 3.25$) indica que las muestras son homogéneas ($P > 0.05$; $\chi^2_{1, g.l.} = 3.84$)

4.4.2. Análisis del número de insertos de T-DNA

El análisis de la resistencia a la kanamicina permitió afirmar con un 95% de certeza que la línea 2657 ET MM presenta un inserto del gen *nptII* funcional. Los datos se usaron de forma acumulada tras la realización del test χ^2 de homogeneidad (Tabla 13).

Tabla 13. Análisis del número de insertos de T-DNA de la línea 2657 ET MM.

| | Segregación | KAN ^R | kan ^S | Total | χ^2 |
|--------------------------|-----------------|------------------|------------------|-------|----------|
| Experimento 1 | Observados | 20 | 6 | 26 | 0.05 |
| | Esperados (3:1) | 19.5 | 6.5 | 26 | |
| Experimento 2 | Observados | 15 | 5 | 20 | 0.00 |
| | Esperados (3:1) | 15 | 5 | 20 | |
| Datos acumulados* | Observados | 35 | 11 | 46 | 0.03 |
| | Esperados (3:1) | 34.5 | 11.5 | 46 | |

**Análisis χ^2 homogeneidad ($\chi^2_H = 0.02$) indica que las muestras son homogéneas ($P > 0.05$; $\chi^2_{1 g.l.} = 3.84$)*

4.4.3. Análisis de cosegregación del fenotipo mutante y el inserto *nptII* funcional

En la línea 2657 ET MM también se descartó la cosegregación del fenotipo mutante y el inserto *nptII* funcional tras la aparición de plantas mutantes sensibles a la kanamicina en los dos experimentos realizados (Tabla 14).

Tabla 14. Análisis de cosegregación del fenotipo mutante y el inserto de T-DNA de la línea 2657 ET MM.

| | WT | | M | | Total |
|-------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-------|
| | KAN ^R | kan ^S | KAN ^R | kan ^S | |
| Experimento 1 | 15 | 4 | 5 | 2 | 26 |
| Experimento 2 | 13 | 3 | 2 | 2 | 20 |
| Datos acumulados | 28 | 7 | 7 | 4 | 46 |

5. DISCUSIÓN

El tomate es uno de los cultivos hortícolas más importantes a nivel económico y, debido a sus múltiples ventajas, constituye una especie modelo en investigación básica y a nivel agronómico, sobre todo en plantas con frutos carnosos. Actualmente, uno de los objetivos prioritarios es identificar la función de los genes anotados en el genoma del tomate, sobre todo los que regulan caracteres agronómicos. La mutagénesis insercional es una herramienta muy útil para conseguir este objetivo. De hecho, se han obtenido algunas colecciones de mutantes en *Micro-Tom* y *M82* (Mathews *et al.*, 2003, Carter *et al.*, 2013). En nuestro grupo, se ha generado una colección de mutantes de T-DNA a partir de los cultivares comerciales *MoneyMaker* y *P73* y de otras especies silvestres relacionadas. En concreto, se generaron unas 7800 líneas T-DNA mediante el uso de una trampa de intensificadores y para ello se utilizó un método de transformación vía *A. tumefaciens* cuya eficacia fue del 32.4% en *MoneyMaker* y del 42.9% en *P73* (Pérez-Martín *et al.*, 2017).

En base a estas premisas, el objetivo del presente trabajo fue el escrutinio de algunas líneas T-DNA de tomate (cultivares *MoneyMaker* y *P73*) para la identificación de nuevos mutantes afectados en caracteres del desarrollo temprano, así como la caracterización más profunda de líneas mutantes de compactidad previamente identificadas en el grupo. Concretamente, se consiguió la identificación de tres mutantes afectados en el desarrollo de la raíz y/o cloróticos y se profundizó en la caracterización de un mutante compacto identificado previamente. Para ello, fue esencial la aplicación de distintas técnicas de cultivo *in vitro*. Estas técnicas permiten, en un espacio y tiempo reducidos, el estudio de diversos caracteres de forma más homogénea al eliminar la variabilidad ambiental gracias a las condiciones controladas de luz, temperatura y humedad. También se consigue la ausencia de cualquier estrés biótico que pueda alterar el desarrollo de las plantas. Además, es posible la evaluación fenotípica del sistema radicular embrionario y adventicio, y el análisis de la organogénesis adventicia en distintos explantes. No obstante, también se realizaron estudios en el invernadero, especialmente en el mutante compacto, para corroborar el fenotipo de las plantas mutantes *in vivo*. Asimismo, la repetición de los distintos fenotipos mutantes en condiciones *in vivo* da pie a las posibles aplicaciones prácticas futuras. El cultivo *in vivo* también es esencial para poder completar el desarrollo reproductivo.

El análisis del modo de herencia de las cuatro líneas mutantes analizadas se ajustó a una mutación monogénica recesiva. En trabajos previos del grupo se obtuvieron resultados en los que el 91% de las mutaciones fueron de naturaleza recesiva y el 9% semidominante (Sánchez-

López, 2017) o el 91% recesivas y el 9% dominantes (Jáquez-Gutiérrez, 2018). No obstante, estos datos se refieren a dos Tesis Doctorales en las que, como es lógico, se trabajó con un número limitado de mutantes. En un artículo del grupo en el que se exponen diversos datos sobre nuestro programa de mutagénesis insercional, se describen los datos con una muestra de 4189 líneas T-DNA de tomate. Al utilizar esta muestra se observó que, de los 522 mutantes para caracteres del desarrollo, 274 eran recesivos, 205 eran dominantes y 47 mostraban una herencia compleja.

En el presente trabajo se encontró que las cuatro líneas T-DNA analizadas presentaron un solo inserto de T-DNA. En relación con los resultados obtenidos previamente en el grupo, estos datos están por debajo del promedio del número de insertos de T-DNA, que se encuentra en torno a 1.7 insertos por línea. Es decir, la mayor parte de las líneas mutantes tienen un único inserto, algunas tienen dos, y con menor frecuencia hay otras que tienen tres o más insertos. Estas diferencias se deben al tamaño muestral. En otras especies también es común encontrar un bajo número de copias de T-DNA en el genoma. Por ejemplo, en *Arabidopsis* se han encontrado promedios de 1.4 y 1.29 insertos (Feldmann, 1991; Ríos *et al.*, 2002) y en arroz, de 1.4 insertos (Jeon *et al.*, 2000). Estos resultados muestran una de las ventajas de la mutagénesis insercional con T-DNA, ya que el número de copias insertadas en el genoma es bajo (Tzfira *et al.*, 2004).

En cuanto a los análisis de cosegregación, los resultados indicaron que en las cuatro líneas analizadas no hubo asociación entre el fenotipo mutante y el inserto de T-DNA, ya que en cada una de ellas se encontraron una o más plantas mutantes sensibles a la kanamicina, es decir, sin un inserto del gen *nptII* funcional. Los resultados previos del grupo sitúan la frecuencia de cosegregación en torno al 15%, mientras que los resultados en este trabajo estuvieron por debajo del promedio del grupo debido al tamaño muestral. En estudios similares llevados a cabo en otras especies se han encontrado frecuencias de cosegregación bajas o muy bajas: del 10% en una colección de mutantes de *Arabidopsis* (Van Lijsebettens *et al.*, 1991) o del 1.4% en arroz (Li *et al.*, 2006).

El hecho de que no se observe cosegregación con un inserto que porta el gen *nptII* no quiere decir que no pueda haberla con otro inserto truncado (i.e. sin un *nptII* funcional) o con un inserto de una parte del cuerpo del vector (Miyao *et al.*, 2007). Estas cosegregaciones anómalas pueden ser las responsables de la mutación, pero lo más probable es que las cuatro

mutaciones estudiadas en este trabajo se deban a la variación somaclonal propia del cultivo *in vitro* (Koncz *et al.*, 1992).

Los resultados del análisis de cosegregación son determinantes a la hora de elegir el método más adecuado para llegar a la identificación del gen. Si existe cosegregación entre el fenotipo mutante y un inserto, simplemente hay que aplicar técnicas como Anchor-PCR en plantas con fenotipo mutante. Si no hay cosegregación, habría que realizar cruces con *S. pimpinellifolium*, obtener plantas F2 y secuenciar mediante mapeo por secuenciación con técnicas de *Next Generation Sequencing* (NGS) tanto plantas mutantes como WT. Esto conlleva más recursos, tiempo, y dinero. Aun así, en nuestro programa de mutagénesis se ha conseguido la identificación de algunos genes a través de este procedimiento. Por si fuera necesario, en este trabajo ya se ha obtenido la F1 de tres de las cuatro líneas mutantes para proseguir con la obtención de la F2 y la posterior clonación del gen.

El mutante 561 ET 73 es de tipo compacto y su compacidad se debe a la presencia de entrenudos más cortos y a un menor número de entrenudos, lo que da lugar a plantas de menor tamaño. Es posible que su fenotipo se deba a alteraciones de genes implicados en biosíntesis y señalización de reguladores del crecimiento como giberelinas (GA) o brasinosteroides (BR). Por ejemplo, Xiao *et al.*, (2006) obtuvieron mutantes compactos de tomate con la síntesis de GA alterada debido al silenciamiento de distintos genes de la familia de las GA20-oxidasas (GA20ox), enzimas limitantes en la ruta de síntesis de la hormona. También se ha observado que alteraciones en la síntesis de BR dan lugar a mutantes compactos de tomate (Koka *et al.*, 2000).

La compacidad de las plantas es un carácter importante a nivel agronómico en ciertas especies. En la Revolución Verde se obtuvieron nuevas variedades de trigo semienanas, debido a una mutación en los genes *Rth* implicados en la señalización de las GA (Peng *et al.*, 1999), y también nuevas variedades de arroz de menor tamaño, a causa de una mutación en un gen que codifica una GA20ox, es decir, a causa de una mutación en la síntesis de la hormona (Hedden, 2003). En ambos casos se consiguió un incremento en el rendimiento del cultivo, provocado por la mayor robustez y resistencia a vientos y tormentas de una planta compacta, entre otros factores. Es por esto que se ha intentado obtener plantas compactas en cultivos hortícolas diversos, como el pepino (Hou *et al.*, 2017). También cabe destacar el interés de la compacidad en plantas ornamentales como *Kalanchoe* (Lu *et al.*, 2010). En tomate, mediante la sobreexpresión de *DWARF*, un gen clave en la síntesis de BR, Li *et al.*, (2016) obtuvieron

plantas compactas, cuyo rendimiento fue mayor, no por un aumento en el número de frutos por planta, sino por un incremento del número de frutos por metro cuadrado.

Por otro lado, el fenotipo mutante de la línea 2486 ET MM se caracterizó por una clorosis generalizada tanto en estado de plántula como en estado de planta axénica que, finalmente, provocó el colapso total de las plantas. Teniendo en cuenta los resultados de los ensayos en los que se suplementó el medio base con vitaminas o aminoácidos, no parece que el fenotipo se deba a una deficiencia nutricional. En trabajos previos se han encontrado mutantes de tomate con un aspecto clorótico probablemente debido a aspectos relacionados con los pigmentos fotosintéticos. Destacan los mutantes *aurea* y *yellow-green-2*, cuya mutación está causada por una deficiencia en la síntesis del cromóforo en fitocromos (Terry y Kendrick, 1996), más concretamente en el gen que codifica la fitocromobilina sintasa, enzima implicada en la síntesis del cromóforo, para el caso del mutante *aurea* (Muramoto *et al.*, 2005). El mutante *lutescent* de tomate también presenta hojas de color amarillo debido a una pérdida temprana y progresiva de clorofila causada por un codón de stop prematuro en un gen homólogo al gen *EGY1* de *Arabidopsis*, que codifica una metaloproteasa de zinc requerida para el desarrollo de cloroplastos (Barry *et al.*, 2012).

Es muy probable que la clorosis del mutante 2486 ET MM esté causada por una deficiente capacidad fotosintética. La clonación del gen responsable de la mutación podría arrojar luz sobre este tema, pero se ve dificultada por la letalidad que provoca la clorosis, que imposibilita la realización de cruces sexuales con *S. pimpinellifolium*. No obstante, en trabajos previos del grupo con un mutante de letalidad temprana se ha clonado el gen *DXSI*, que codifica una enzima que cataliza la etapa limitante en la formación de isoprenoides plastidiales (García-alcázar *et al.*, 2017).

Además, la clorosis también puede ser consecuencia de un desarrollo radicular deficiente, como quizás ocurre en la línea 2657 ET MM, cuya mutación se caracterizó por una alteración en la raíz tanto embrionaria como adventicia, ambas con una menor elongación de las raíces primarias y, especialmente, una menor formación de raíces laterales, así como por cierta clorosis en cotiledones y en hojas. Estudios previos apoyan esta hipótesis: el mutante *fer* de tomate presenta un desarrollo anómalo de la raíz, con una elongación reducida de las raíces laterales, así como una alteración en la fisiología de la misma pues es incapaz de sintetizar la proteína bHLH implicada en la absorción de hierro, lo que resulta en hojas cloróticas (Ling *et al.*, 2002). No obstante, esta clorosis podría ser consecuencia de un sistema radicular alterado

en cualquier otro aspecto y no únicamente en la absorción de hierro, pues la raíz es el órgano encargado de la absorción de agua y del resto de nutrientes, es importante en el almacenamiento de diversas sustancias y actúa como punto de conexión entre la parte aérea y distintos factores tanto abióticos como bióticos. Por lo tanto, la identificación del gen implicado en el fenotipo de nuestro mutante podría ayudar a comprender y manipular distintos aspectos del desarrollo radicular con el fin de aumentar el rendimiento de las plantas (Herder *et al.*, 2010).

La línea 2641 ET MM también presentó una mutación de raíz, pero en este caso el fenotipo fue más severo. La raíz embrionaria experimentó un menor tamaño de raíces primarias y secundarias, o únicamente de estas últimas. El fenotipo en planta axénica fue mucho más evidente: elongación reducida de las raíces primarias y secundarias. Las primarias llegaron a necrosar en la parte apical dando una especie de muñones. Esta necrosis sugiere que una de las causas de la mutación puede estar relacionada con una alteración del meristemo apical de la raíz (RAM). En *Arabidopsis* se han identificado distintos genes relacionados con el RAM que regulan el crecimiento de la raíz. Los mutantes *scr* y *shr* de *Arabidopsis* presentan cierto retraso en el crecimiento de la raíz debido a alteraciones en *SCARECROW (SCR)* y *SHOOT ROOT (SHR)*, respectivamente, que son genes que codifican dos factores de transcripción encargados de mantener este meristemo (Di Laurenzio *et al.*, 1996; Helariutta *et al.*, 2000).

Por otra parte, las auxinas son las hormonas más importantes en la elongación celular de las raíces y en la formación de raíces laterales, pero en el ensayo en el que se suplementó el medio básico con distintos tipos de auxinas no permitió revertir el fenotipo mutante, probablemente porque la mutación no está causada por un déficit en la síntesis de la hormona. No obstante, son numerosos los genes implicados en esta ruta, tanto en síntesis como en señalización, así como los fenómenos de *crossstalk*, por lo que las auxinas sí pueden ser las responsables de la mutación. Por ejemplo, el correcto desarrollo de la raíz viene dado por un equilibrio entre los niveles de auxinas y citoquininas (Dello Ioio *et al.*, 2008) por lo que un aumento en el nivel de citoquininas o una disminución en el nivel de auxinas pueden ser los responsables de este crecimiento reducido de las raíces. Asimismo, las ROS también regulan la elongación de la raíz. Ivanchenko *et al.*, (2013) han descrito cómo las auxinas regulan los niveles de H₂O₂, de forma que un aumento en el nivel de auxinas desencadena una acumulación de H₂O₂ que provoca una inhibición de la elongación de las células de la raíz y del crecimiento de la raíz.

Uno de los aspectos más llamativos de esta línea es que las raíces adventicias aéreas tienen un fenotipo totalmente WT, aunque estas aparecen con más frecuencia y en estadios del desarrollo más tempranos que las desarrolladas en plantas WT. Es decir, la alteración en el sistema radicular adventicio sólo se da en las raíces desarrolladas en la zona de corte de las plantas. Es probable que esta alteración desencadene el desarrollo de raíces aéreas que puedan cubrir todas las necesidades de la planta. Esto cobra sentido tras comprobar que en el invernadero las plantas mutantes aclimatadas que *in vitro* presentaban raíces aéreas, mostraron un fenotipo indistinguible al de plantas WT, mientras que aquellas que *in vitro* aún no habían desencadenado el desarrollo de raíces aéreas, presentaron un crecimiento ligeramente más lento. En cualquier caso, lo que conviene destacar es la novedad de este fenómeno, pues en nuestro grupo hemos identificado otros mutantes similares que no tienen la capacidad de desarrollar raíces adventicias aéreas.

Mignolli *et al.*, (2017) han caracterizado el mutante *aer* de tomate que presenta un desarrollo temprano de raíces adventicias aéreas, pero no hay estudios previos que distingan la formación de raíces adventicias en la zona de corte de la de raíces adventicias aéreas. Por lo tanto, este mutante abre paso al descubrimiento de nuevos mecanismos implicados en la formación de raíces adventicias que sí distingan entre raíces formadas a partir de la zona de corte y raíces aéreas.

6. CONCLUSIONES

- Se analizaron un total de 95 líneas T-DNA de tomate. Tras el escrutinio de 80 líneas T-DNA se identificaron tres nuevas líneas mutantes (2486 ET MM, 2641 ET MM y 2657 ET MM). Además, se amplió la caracterización de 15 líneas candidatas, presentando especial interés los resultados obtenidos en la línea 561 ET 73.

- En las cuatro líneas estudiadas en el trabajo se llevó a cabo la caracterización fenotípica, tanto *in vitro* como *in vivo*, y la genética. Todas ellas presentaron una mutación monogénica recesiva y un único inserto de T-DNA. Además, en ninguna de ellas se detectó la cosegregación entre el fenotipo mutante y el inserto de T-DNA.

- La línea 561 ET 73 presentó un fenotipo de compacidad, causado por un menor número de entrenudos, así como una menor longitud de los mismos. Este mutante es importante porque al modificar la arquitectura de una planta se pueden obtener mejoras en características de interés agronómico.

- Las líneas 2486 ET MM y 2657 ET MM mostraron un fenotipo clorótico. En el caso de la línea 2486 ET MM, la clorosis fue generalizada y provocó la letalidad de las plantas. En cambio, en la línea 2657 ET MM la clorosis sólo estuvo presente en cotiledones y en hojas, si bien, esta línea también presentó una alteración en el sistema radicular embrionario y adventicio. Estas mutaciones resultan interesantes para ampliar el conocimiento sobre procesos fotosintéticos, así como sobre mecanismos implicados en el desarrollo de la raíz.

- En la línea 2641 ET MM la mutación afectó al sistema radicular de la planta. El fenotipo mutante fue más severo en raíces adventicias que en raíces embrionarias. De hecho, actualmente está en marcha la corroboración del fenotipo mutante en plántulas. Además, la alteración de las raíces adventicias sólo tuvo lugar en las raíces desarrolladas en la base (zona de corte) de la planta. En cambio, las raíces adventicias aéreas de las plantas mutantes presentaron fenotipo WT. Este fenómeno puede arrojar luz sobre un nuevo mecanismo que distingue entre la formación de raíces adventicias en la zona de corte y la formación de raíces adventicias aéreas.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta-García, G., Autran, D. y Vielle-Calzada, J.-P. (2004) "Enhancer detection and gene trapping as tools for functional genomics in plants.", *Methods in Molecular Biology*, 267(27), pp. 397-414.
- Bai, Y. y Lindhout, P. (2007) "Domestication and breeding of tomatoes: What have we gained and what can we gain in the future?", *Annals of Botany*, 100(5), pp. 1085-1094.
- Barry, C. S., Aldridge, G. M., Herzog, G., Ma, Q., Mcquinn, R. P., Hirschberg, J. y Giovannoni, J. J. (2012) "Altered chloroplast development and delayed fruit ripening caused by mutations in a zinc metalloprotease at the *lutescent2* locus of tomato", *Plant Physiology*, 159(3), pp. 1086-1098.
- Bauchet, G. y Causse, M. (2012) "Genetic Diversity in tomato (*Solanum lycopersicum*) and its wild relatives", *Genetic Diversity in Plants*, 199(351), pp. 133-162.
- Bergougnoux, V. (2014) "The history of tomato: From domestication to biopharming", *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc., 32(1), pp. 170-189.
- Berná, G., Robles, P. y Micol, L. (1999) "A mutational analysis of leaf morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*", *Genetics*, 152(2), pp. 729-742.
- Blanca, J., Montero-pau, J., Sauvage, C., Bauchet, G., Illa, E., Díez, M. J., Francis, D., Causse, M., Knaap, E. Van Der y Cañizares, J. (2015) "Genomic variation in tomato, from wild ancestors to contemporary breeding accessions", *BMC Genomics*, 16(1), pp. 1-19.
- Borlaug, N. E. (1983) "Contributions of conventional plant breeding to food production", *Science*, 219(4585), pp. 689-693.
- Carter, J.D., Pereira, A., Dickeman, A.W. y Veileux, R.E. (2013) "An active Ac/Ds transposon system for activation tagging in tomato cultivar M82 using clonal propagation", *Plant Physiology*, 162(1), pp. 145-146.
- Causse, M., Damidaux, R. y Rousselle, P. (2007) "Traditional and enhanced breeding for quality traits in tomato." En: Razdan MK, Matto AK, editors. Genetic improvement of Solanaceous crops. TomadoEnfield, NH: *Science Publishers*, pp. 153-192.
- Duncan, R. R. (1997) "Tissue culture-induced variation and crop improvement", *Advances in Agronomy*, 58(1), pp. 201-240.
- FAO, 2018. FAOSTAT, *Datos sobre alimentación y agricultura*. [En línea]. Available at: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>. [Último acceso: 10 de enero de 2019].
- Feldmann, K. A. (1991) "T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: mutational spectrum", *The Plant Journal*, 1(1), pp. 71-82.
- Frusciante, L., Carli, P., Ercolano, M. R., Pernice, R. y Matteo, A. Di (2007) "Antioxidant nutritional quality of tomato", *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(5), pp. 609-617.
- García-alcázar, M., Giménez, E., Pineda, B., Capel, C., Moreno, V. y Lozano, R. (2017) "Albino T-DNA tomato mutant reveals a key function of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (DXS1) in plant development and survival", *Scientific Reports*, 7(45333), pp. 1-12.
- Gao, X., Yang, D., Cao, D., Ao, M., Sui, X., Wang, Q., Kimatu, J.N. y Wang, L. (2010) "In vitro micropropagation of *Fressia* hybrid and the assessment of genetic and epigenetic stability in regenerated plantlets", *Journal of Plant Growth Regulation*, 29 (2), pp. 257-267.
- Gascuel, Q., Direccion, G., Monforte, A. J., Fortes, A. M. y Granell, A. (2017) "Use of natural diversity and biotechnology to increase the quality and nutritional content of tomato and grape", *Frontiers in Plant Science*, 8(652), pp. 1-24.

- Germanà, M. A. (2011) "Anther culture for haploid and doubled haploid production", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 104(3), pp. 283-300.
- Hedden, P. (2003) "The genes of the Green Revolution", *Trends in Genetics*, 19(1), pp. 5-9.
- Helariutta, Y., Fukaki, H., Wysocka-diller, J., Nakajima, K., Jung, J., Sena, G., Hauser, M. y Benfey, P. N. (2000) "The *SHORT-ROOT* gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling", *Cell*, 101(5), pp. 555-567.
- Herder, G. Den, Isterdael, G. Van, Beeckman, T. y Smet, I. De (2010) "The roots of a new green revolution", *Trends in Plant Science*. Elsevier Ltd, 15(11), pp. 600-607.
- Hou, S., Niu, H., Tao, Q., Wang, S. y Gong, Z. (2017) "A mutant in the *CsDET2* gene leads to a systemic brassinosteroid deficiency and super compact phenotype in cucumber (*Cucumis sativus* L.)", *Theoretical and Applied Genetics*. Springer Berlin Heidelberg, 130(8), pp. 1693-1703.
- Dello Ioio, R., Nakamura, K., Moubayidin, L., Perilli, S., Taniguchi, M., Morita, M. T., Aoyama, T., Costantino, P. y Sabatini, S. (2008) "A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem", *Science*, 332(5906), pp. 1380-1384.
- Ivanchenko, M. G., den Os, D., Monshausen, G. B., Dubrovsky, J. G., Bednárová, A. y Krishnan, N. (2013) "Auxin increases the hydrogen peroxide (H₂O₂) concentration in tomato (*Solanum lycopersicum*) root tips while inhibiting root growth", *Annals of Botany*, 112(6), pp. 1107-1116.
- Jáquez-Gutiérrez, M. (2018) "Caracterización de mutantes insercionales y somaclonales de tomate y *Solanum galapagense* alterados en la tolerancia a estrés abiótico y caracteres del desarrollo relacionados". Tesis doctoral. Universitat Politècnica de València.
- Jenkins, J. A. (1948) "The origin of the cultivated tomato", *Economic Botany*, 2(4), pp. 379-392.
- Jeon, J., Lee, S., Jung, K., Jun, S., Jeong, D., Lee, J., Kim, C., Jang, S., Lee, S., Yang, K., Nam, J., An, K., Han, M., Sung, R., Choi, H.-S., Yu, J.-H., Choi, J. H., Cho, S.-Y., Cha, S.-S., Kim, S.-I. y An, G. (2000) "T-DNA insertional mutagenesis for functional genomics in rice", *The Plant Journal*, 22(6), pp. 561-570.
- Klee, H. J. (2010) "Improving the flavor of fresh fruits: genomics, biochemistry and biotechnology", *New Phytologist*, 187(1), pp. 44-56.
- Koka, C. V., Cerny, R. E., Gardner, R. G., Noguchi, T., Fujioka, S., Takatsuto, S., Yoshida, S. y Clouse, S. D. (2000) "A putative role for the tomato genes *DUMPY* and *CURL-3* in brassinosteroid biosynthesis and response", *Plant Physiology*, 122(1), pp. 85-98.
- Koncz, C., Németh, K., Rédei, G. P. y Schell, J. (1992) "T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis*", *Plant Molecular Biology*, 20(5), pp. 963-976.
- Krishna, H., Alizadeh, M., Singh, D., Singh, U., Chauhan, N., Eftekhari, M. y Sadh, R. K. (2016) "Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement", *3 Biotech*. Springer Berlin Heidelberg, 6(54), pp. 1-18.
- Krysan, P. J., Young, J. C. y Sussman, M. R. (1999) "T-DNA as an insertional mutagen in *Arabidopsis*", *Plant Cell*, 11(12), pp. 2283-2290.
- Kuznetsova, O. I., Ash, O. A. y Gostimsky, S. A. (2006) "The effect of the duration of callus culture on the accumulation of genetic alterations in pea *Pisum sativum* L.", *Russian Journal of Genetics*, 42(5), pp. 555-562.
- Di Laurenzio, L., Wysocka-diller, J., Malamy, J. E., Pysh, L., Helariutta, Y., Freshour, G., Hahn, M. G., Feldmann, K. A. y Benfey, P. N. (1996) "The *SCARECROW* gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root", *Cell*, 86(3), pp. 423-433.

Li, A.-H., Zhang, Y.-F., Wu, C.-Y., Tang, W., Wu, R., Dai, Z.-Y., Liu, G.-Q., Zhang, H.-X. y Pan, X.-B. (2006) "Screening for and genetic analysis on t-dna-inserted mutant pool in rice", *Acta Genetica Sinica*, 33(4), pp. 319-329.

Li, X., Chen, X., Guo, X., Yin, L., Ahammed, G. J., Xu, C., Chen, K., Liu, C., Xia, X., Shi, K., Zhou, J., Zhou, Y. y Yu, J. (2016) "*DWARF* overexpression induces alteration in phytohormone homeostasis, development, architecture and carotenoid accumulation in tomato", *Plant Biotechnology Journal*, 14(3), pp. 1021-1033.

Ling, H., Bauer, P., Berezky, Z., Keller, B. y Ganai, M. (2002) "The tomato *fer* gene encoding a bHLH protein controls iron-uptake responses in roots", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(21), pp. 13938-13943.

Lu, H., Jensen, L. S., Topp, S. H., Mibus, H., Mu, R. y Ramussen, S. K. (2010) "Production of compact plants by overexpression of *AtSHI* in the ornamental *Kalanchoe*", *Plant Biotechnology Journal*, 8(2), pp. 211-222.

Mathews, H., Clendennen, S. K., Caldwell, C. G., Liu, X. L., Matheis N., Schuster, D. K., Menasco, D. J., Wagoner, W., Lightner, J. y Wagner, D. R. (2003) "Activation tagging in tomato identifies a transcriptional regulator of anthocyanin biosynthesis, modification, and transport", *Plant Cell*, 15 (8), pp. 1689-1703.

Mccormick, S., Niedermeyer, J., Fry, J., Barnason, A., Horsch, R. y Fraley, R. (1986) "Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*", *Plant Cell Reports*, 5(2), pp. 81-84.

Meissner, R., Jacobson, Y., Melamed, S., Levyatuv, S., Shalev, G., Ashri, A., Elkind, Y. y Levy, A. (1997) "A new model system for tomato genetics", *The Plant Journal*, 12(6), pp. 1465-1472.

Mignolli, F., Mariotti, L., Picciarelli, P. y Vidoz, M. L. (2017) "Differential auxin transport and accumulation in the stem base lead to profuse adventitious root primordia formation in the aerial roots (aer) mutant of tomato (*Solanum lycopersicum* L.)", *Journal of Plant Physiology*. Elsevier GmbH., 213(1), pp. 55-65.

Miller, J. C. y Tanksley, S. D. (1990) "RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*", *Theoretical and Applied Genetics*, 80(4), pp. 437-448.

Miyao, A., Iwasaki, Y., Kitano, H., Itoh, J.-I., Maekawa, M., Murata, K., Yatou, O., Nagato, Y. y Hirochika, H. (2007) "A large-scale collection of phenotypic data describing an insertional mutant population to facilitate functional analysis of rice genes", *Plant Molecular Biology*, 63(5), pp. 625-635.

Muramoto, T., Kami, C., Kataoka, H., Iwata, N., Linley, P. J., Yokota, A. y Kohchi, T. (2005) "The tomato photomorphogenic mutant, *aurea*, is deficient in phytochromobilin synthase for phytochrome hromophore biosynthesis", *Plant Cell Physiology*, 46(4), pp. 661-665.

Peng, J., Richards, D. E., Hartley, N. M., Murphy, G. P., Devos, K. M., Flintham, J. E., Beales, J., Fish, L. J., Worland, A. J., Pelica, F., Sudhakar, D., Christou, P., Snape, J. W., Gale, M. D. y Harberd, N. P. (1999) "“Green revolution” genes encode mutant gibberellin response modulators", *Nature*, 400(6741), pp. 256-261.

Pérez-Martín, F., Yuste-Lisbona, F. J., Pineda, B., Angarita-Díaz, M. P., García-Sogo, B., Antón, T., Sánchez, S., Giménez, E., Atarés, A., Fernández-Lozano, A., Ortíz-Atienza, A., García-Alcázar, M., Castañeja, L., Fonseca, R., Capel, C., Georgen, G., Sánchez, J., Quispe, J. L., Capel, J., Angosto, T., Moreno, V. y Lozano, R. (2017) "A collection of enhancer trap insertional mutants for functional genomics in tomato", *Plant Biotechnology Journal*, 15(11), pp. 1439-1452.

Ríos, G., Lossow, A., Herte, B., Breuer, F., Schaefer, S., Broich, M., Kleinow, T., Jásik, J., Winter, J., Ferrando, A., Farrás, R., Panicot, M., Henriques, R., Mariaux, J.-B., Oberschall, A., Molnár, G., Berendzen, K., Shukla, V., Lafos, M., Koncz, Z., Rédei, G. P., Schell, J. y Koncz, C. (2002) "Rapid identification of *Arabidopsis* insertion mutants by non-radioactive detection of T-DNA tagged genes", *The Plant Journal*, 32(2), pp. 243-253.

Sánchez-López (2017) "Generación de líneas T-DNA de tomate (*Solanum lycopersicum*) para la

identificación de mutantes de inserción alterados en la morfogénesis y el desarrollo vegetal". Tesis doctoral. Universitat Politècnica de València.

Schneeberger, K., Ossowski, S., Lanz, C., Juul, T., Petersen, A. H., Nielsen, K. L., Jorgensen, J.-E., Weigel, D. y Andersen, S. U. (2009) "SHOREmap: simultaneous mapping and mutation identification by deep sequencing", *Nature Methods*, 6(8), pp. 550-551.

Shahin, E. A. (1985) "Totipotency of tomato protoplast", *TAG Theoretican and Applied Genetics*, 69(3), pp. 235-240.

Springer, P. S. (2000) "Gene traps: tools for plant development and genomics", *The Plan Cell*, 12(7), pp. 1007-1020.

Terry, M. J. y Kendrick, R. E. (1996) "The *aurea* and *yellow-green-2* mutants of tomato are deficient in phytochrome chromophore synthesis", *The Journal of Biological Chemistry*, 271(35), pp. 21681-21686.

The Tomato Genome Consortium. (2012) "The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution", *Nature*, 485(7400), pp. 635-641.

Tzfira, T., Vaidya, M. y Citovsky, V. (2004) "Involvement of targeted proteolysis in plant genetic transformation by *Agrobacterium*", *Nature*, 431(7004), pp. 87-92.

Xiao, J., Li, J., Zhang, R., Chen, B., Ouyang, T. y Ye, Z. (2006) "Dissection of GA20-oxidase members affecting tomato morphology by RNAi-mediated silencing" *Plant Growth Regulation*, 50(1), pp. 179-189.