



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA

Instituto de Conservación y Mejora de la Agrobiodiversidad
Valenciana

Trabajo de Fin de Máster

Estudio de mutantes afectados en caracteres del desarrollo temprano en líneas T-DNA de tomate



Autora:

Silvia Rodríguez Marcos

Directores:

Alejandro Atarés Huerta

Vicente Moreno Ferrero

Directora experimental:

Marybel Jáquez Gutiérrez

SEPTIEMBRE 2019

RESUMEN

El conocimiento de aquellos genes que afectan al desarrollo de las plantas y a la interacción con agentes externos es un aspecto muy importante, tanto a nivel aplicado como desde un punto de vista de la investigación básica. El escrutinio de poblaciones de plantas mutagenizadas permite la identificación de mutantes y, a partir de ellos, averiguar los genes responsables de un carácter concreto. La mutagénesis insercional con T-DNA constituye una herramienta muy útil, comparada con otros métodos alternativos (mutágenos químicos o físicos), ya que el gen afectado queda etiquetado por el inserto de secuencia conocida, cuya clonación mediante técnicas basadas en la PCR es rápida y sencilla.

El desarrollo de un protocolo eficaz de transformación genética en tomate y especies silvestres relacionadas (*Solanum pimpinellifolium*, *S. pennellii*, *S. galapagense*) ha permitido la obtención de unas 7800 líneas T-DNA en el contexto de distintos proyectos de investigación. 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 han caracterizado líneas T-DNA mutantes, que se habían identificado previamente en nuestro grupo con alteraciones en diferentes aspectos relacionados con el desarrollo temprano del meristemo apical de las plantas de tomate.

Palabras clave: Cultivo *in vitro* - mutagénesis insercional- tomate - desarrollo temprano-meristemo apical.

ABSTRACT

Knowledge of genes that affect the development of plants and interaction with external agents is a very important aspect, both from an applied and a basic investigation point of view. Screening of mutagenized populations allows the identification of plants mutants and, from them, genes responsible for a character. The insertional mutagenesis using T-DNA is a very useful tool, compared with other alternatives methods (chemical or physical mutagens), because the affected gene is tagged by a known DNA insert, whose cloning using PCR-based techniques is fast and simple.

The development of an efficient genetic transformation protocol in tomato and related wild species (*Solanum pimpinellifolium*, *S. pennellii*, *S. galapagense*) has allowed obtaining some 7800 T-DNA lines in the context of several investigation projects. 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 the present work, mutant T-DNA lines have been characterized, which had previously been identified in our group, with alterations in different aspects related to the early development of apical meristem of tomato plants.

Keywords: Plant tissue culture - insertional mutagenesis - tomato - early development - apical meristem.

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	3
1.2. Mutagénesis insercional	6
1.3. Trampas génicas	7
1.4. Evaluación de mutantes afectados en caracteres del desarrollo temprano: alteraciones en la parte aérea	9
1.4.1. Desarrollo de la parte aérea	9
1.4.2. Mutantes de tomate con alteraciones en el desarrollo apical	11
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1. Material vegetal	15
3.2. Caracterización y estudio de mutantes en líneas T-DNA de tomate	16
3.2.1. Esterilización de semillas	16
3.2.2. Fenotipado <i>in vitro</i>	17
3.2.2.1. Preparación de medios de cultivo	17
3.2.2.2. Germinación y obtención de plántulas y plantas axénicas	17
3.2.2.3. Clonación de plantas	18
3.2.3. Fenotipado <i>in vivo</i>	18
3.2.3.1. Aclimatación de plantas	19
3.2.3.2. Semillero <i>in vivo</i>	19
3.2.3.3. Injertos	20
3.2.4. Cruces sexuales	20
3.3. Análisis genético	21
3.3.1. Análisis del modo de herencia de la mutación	21
3.3.2. Análisis genético del número de insertos de T-DNA	21
3.3.3. Análisis de cosegregación del inserto de T-DNA y el fenotipo mutante	22
3.3.4. Análisis estadístico: test χ^2	23
4. RESULTADOS	25
4.1. 1302 ET MM	25
4.1.1. Ensayo de regeneración adventicia	27
4.1.2. Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante	28
4.1.3. Análisis genético del número de insertos de T-DNA	29
4.1.4. Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante	29

4.2.	1461 ET MM	30
4.2.1.	Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante.....	32
4.2.2.	Análisis genético del número de insertos de T-DNA.....	33
4.2.3.	Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante.....	33
4.3.	1656 ET MM	34
4.3.1.	Ensayo de regeneración adventicia.....	36
4.3.2.	Análisis genético del número de insertos de T-DNA.....	37
4.4.	1440 ET MM	38
4.4.1.	Ensayo de regeneración adventicia.....	39
4.4.2.	Análisis funcional del gen responsable de la mutación.....	41
5.	DISCUSIÓN	43
5.1.1.	Modo de herencia fenotipo mutante, número de insertos T-DNA y cosegregación con el fenotipo mutante.....	44
5.1.2.	Mutantes afectados en el desarrollo del meristemo apical.....	47
6.	CONCLUSIONES	53
7.	BIBLIOGRAFÍA	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Países con mayor producción de tomate en 2017.....	2
Figura 2. Diversidad fenotípica en el fruto de tomate.....	3
Figura 3. Representación esquemática de las construcciones utilizadas como trampas génicas.....	8
Figura 4. Representación esquemática de capas celulares y dominios del SAM	10
Figura 5. Componentes del ciclo de retroalimentación central entre <i>CLAVATA</i> y <i>WUSCHEL</i>	11
Figura 6. Representación esquemática del plásmido pD991.....	15
Figura 7. Proceso de esterilización de las semillas de tomate.....	16
Figura 8. Obtención de plántulas y plantas axénicas de tomate.....	18
Figura 9. Plantas de tomate recién aclimatadas.....	19
Figura 10. Procedimiento para la realización de injertos en plántulas de tomate.....	20
Figura 11. Evaluación de la resistencia a la kanamicina en cotiledones de tomate.....	22
Figura 12. Fenotipo de plantas axénicas de la línea 1302 ET MM en las primeras etapas de crecimiento.....	25
Figura 13. Fenotipo de plantas axénicas de la línea 1302 ET MM tras 60 días de cultivo en MB3.....	26
Figura 14. Fenotipo de plantas procedentes de semilla de la línea 1302 ET MM cultivadas en el invernadero	27
Figura 15. Fenotipo de cotiledones de la línea 1302 ET MM tras 30 días de cultivo en medio de regeneración IKZ.....	28
Figura 16. Fenotipo de planta axénica de la línea 1461 ET MM tras 20 días de cultivo en MB3.....	30
Figura 17. Fenotipo de plantas procedentes de semilla de la línea 1461 ET MM cultivadas en el invernadero	31
Figura 18. Fenotipo de injertos de la línea 1461 ET MM tras 30 días de cultivo en el invernadero.....	31
Figura 19. Fenotipo de injertos de la línea 1461 ET MM tras 50 días de cultivo en el invernadero.....	32
Figura 20. Fenotipo de plántulas procedentes de semilla de la línea 1656 ET MM.....	34
Figura 21. Fenotipo de plántulas de la línea 1656-6 ET MM tras 15 días de cultivo en MG.....	35
Figura 22. Fenotipo de una plántula mutante de la línea 1656-6 ET MM tras 60 días de cultivo en MG.....	35
Figura 23. Fenotipo plantas de la línea 1656-6 ET MM y Money Maker. (A) Primer subcultivo a α . (B) Tres subcultivos a α	36

Figura 24. Fenotipo de cotiledones cultivados en medio de regeneración IKZ y callos organogénicos en medio de elongación IK de la línea 1656-6M ET MM.....	36
Figura 25. Fenotipo de plantas axénicas de la línea 1440 ET MM tras diez días de cultivo en medio básico.....	38
Figura 26. Fenotipo de plantas procedentes de semillas TG2 de la línea 1440 ET MM tras 35 días de cultivo en el invernadero.....	38
Figura 27. Fenotipo de explantes de cotiledón de la línea 1440-17 ET MM cultivados 30 días en medio de regeneración IKZ.....	40
Figura 28. Fenotipo de callos organogénicos de la línea 1440-17 ET MM tras 30 días de cultivo en medio de elongación IK.....	40
Figura 29. Fenotipo de brotes individualizados a partir de callos organogénicos de la línea 1440-17 ET MM tras 15 días de cultivo en MB3.....	40
Figura 30. Representación esquemática de la organización genómica del gen etiquetado por el inserto T-DNA en el mutante <i>dam1</i>	41
Figura 31. Fenotipo de plantas axénicas de Money Maker obtenidas tras la transformación con la construcción 1440 RNAi y cultivadas en MB3.....	42

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo empleados.....	17
Tabla 2. Composición de la solución de fertirrigación del invernadero.....	19
Tabla 3. Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante en la línea 1302 ET MM.....	28
Tabla 4. Análisis del número de insertos T-DNA con el gen <i>nptII</i> funcional en la línea 1302 ET MM.....	29
Tabla 5. Análisis de cosegregación del fenotipo mutante con algún inserto de T-DNA en la línea 1302 ET MM.....	29
Tabla 6. Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante en la línea 1461 ET MM.....	32
Tabla 7. Análisis del número de insertos T-DNA con el gen <i>nptII</i> funcional en la línea 1461 ET MM.....	33
Tabla 8. Análisis de cosegregación del fenotipo mutante con algún inserto de T-DNA en la línea 1461 ET MM.....	33
Tabla 9. Análisis del número de insertos T-DNA con el gen <i>nptII</i> funcional en la línea 1656 ET MM.....	37
Tabla 10. Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante en la línea 1440-17 ET MM.....	39

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- El tomate

1.1.1.- Origen y domesticación

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) pertenece a la familia *Solanaceae*, la cual contiene más de 3000 especies, incluyendo algunos de los cultivos más importantes a nivel económico, como la patata, el pimiento, la berenjena y el tabaco (Bai y Lindhout, 2007).

El origen del tomate y sus parientes silvestres se encuentra en Sudamérica, en concreto en la región andina que abarca desde el norte de Ecuador hasta el norte de Chile, así como en las islas Galápagos. Por su parte, el origen de la domesticación aún no se conoce con exactitud, aunque trabajos recientes indican que esta ocurrió en dos pasos. El primero tuvo lugar en Sudamérica, donde se produjo el paso de *S. pimpinellifolium*, la especie silvestre que se considera el ancestro más cercano al tomate cultivado (Zuriaga *et al.*, 2009), a *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*, y el segundo, en Mesoamérica, donde se originó el tomate cultivado (Blanca *et al.*, 2015). Este proceso, conocido como síndrome de domesticación, dio lugar a plantas con frutos de mayor tamaño, con mayor número de lóculos y formas más variadas.

Fue en el siglo XVI cuando se introdujo el tomate en el sur de Europa (Jenkins, 1948), sin embargo, debido a su similitud con solanáceas tóxicas como la belladona o la mandrágora, su consumo fue casi nulo y su principal uso era como planta ornamental. Con todo, esta aceptación creció paulatinamente, y a finales del siglo XVIII, el cultivo se había expandido por el norte de Europa, Asia y Norteamérica. Hoy en día, gracias a su riqueza vitamínica, junto con su agradable gusto y color, es una de las especies hortícolas más importantes para el consumo humano en todo el mundo (Bergougnoux, 2014).

1.1.2.- Importancia económica

El tomate se encuentra distribuido por todo el mundo y es una de las hortalizas con mayor importancia económica a nivel mundial. No se comercializa únicamente para el mercado en fresco, sino que también se usa en la industria para sopas, concentrados, zumos, ketchup, etc. Es una fuente importante de nutrientes como licopeno, β -caroteno y vitamina C, los cuales tienen un impacto positivo en la salud humana; y su producción

al igual que su consumo va en incremento a medida que la población mundial aumenta (Bergounoux, 2014).

Según los últimos datos de la FAO (*Food and Agriculture Organization*), en el año 2017, la producción mundial alcanzó los 182 millones de toneladas, dato que aumentó un 25% con respecto a la producción conseguida 10 años atrás. Durante este año, los principales países productores de tomate en el mundo fueron: China (59,5), India (20,7), Turquía (12,8), Estados Unidos (10,9) y Egipto (7,3), que en su conjunto contribuyeron al 61% de la producción mundial, lo cual equivale a 111,2 millones de toneladas (Figura 1). En cuanto a España, a nivel mundial, se encuentra en la octava posición con una producción de 5,2 millones de toneladas, mientras que, dentro del contexto europeo, ocupa el segundo lugar, después de Italia, tanto en superficie cultivada como en producción obtenida.

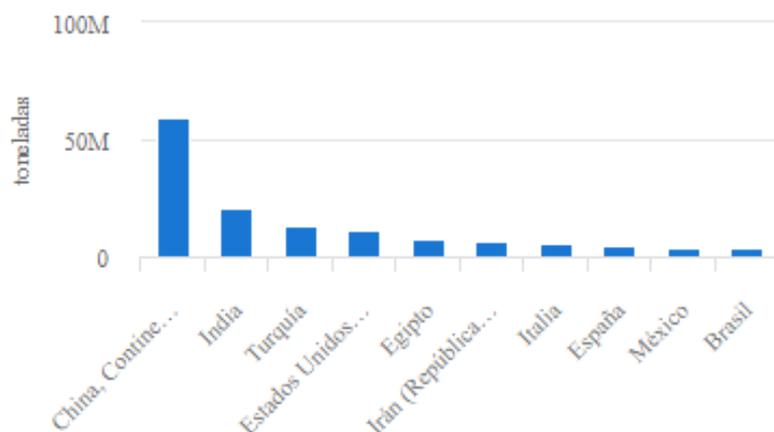


Figura 1. Países con mayor producción de tomate en 2017. Fuente: FAOSTAT, 2019.

Según el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, la producción de tomate en España está dominada por las comunidades autónomas de Andalucía y Extremadura, con un volumen conjunto de producción en torno a los 4 millones de toneladas, en el año 2017. La mayor parte del tomate producido en Extremadura (principalmente en la provincia de Badajoz) se destina a la industria. En Andalucía destaca Almería como provincia productora de tomate para consumo en fresco mayoritariamente. La mayor parte se cultivan en invernadero, siendo exportada una gran parte de la producción a países de la Unión Europea, principalmente a Alemania, Francia, Países Bajos, Reino Unido y Polonia.

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, también es una planta modelo dentro de las dicotiledóneas, especialmente para las que presentan frutos carnosos (Meissner *et al.*, 1997). Se ha convertido en una herramienta fundamental en investigación debido a que presenta una serie de ventajas, donde podemos destacar la facilidad de cultivo, el hecho de presentar un ciclo de vida corto y su alta tasa de multiplicación. Además, a pesar de ser una especie autógama, es posible el cruce sexual con otras especies y tiene la capacidad para propagarse de manera asexual. Finalmente, existe de 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).

En tomate, los programas de mejora están encaminados a producir y distribuir nuevos cultivares con mejores características agronómicas que variarán en función del mercado al que se destine. La historia reciente de la mejora genética del tomate ha pasado por tres fases: aumento del rendimiento en los años 70's, aumento de la vida post-cosecha en los 80's y mejora de las características organolépticas en los 90's (Bai y Lindhout, 2007; Bauchet y Causse, 2012; Foolad, 2007). Más recientemente, sin dejar de lado todos los objetivos comentados hasta el momento, se ha añadido como objetivo de mejora el desarrollo de cultivares que aporten al consumidor un fruto con características deseables en términos de sabor, textura, color y un mayor contenido en sustancias con elevado valor nutricional (vitaminas, antioxidantes...). Actualmente hay en el mercado un gran número de cultivares adaptados a condiciones específicas de crecimiento (invernadero, malla sombra, campo abierto), para diferentes usos comerciales (mercado en fresco o tomate procesado) y para todo tipo de consumidores gracias a la gran diversidad de tamaños, colores y formas (Figura 2). Sin embargo, los objetivos de la mejora genética



Figura 2. Diversidad fenotípica en el fruto de tomate. Fuente: VitaGardens. Recuperado de <https://www.vitagardens.com/heirloom-vegetables-for-the-next-ten-years>.

están limitados por la variabilidad genética disponible, ya que durante la expansión del tomate por todo el mundo y los procesos de selección locales se han producido diversos cuellos de botella que han reducido dicha variabilidad para algunos caracteres.

La mejora tradicional se ha basado en el cruce sexual entre líneas élite de cultivares adaptados, o entre una línea élite y una especie silvestre, 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 de sus parientes silvestres (Miller y Tanksley, 1990). Si bien, se debe tener en cuenta que la producción de un nuevo cultivar proveniente de cruces entre dos líneas élite puede tomar entre cinco y siete años, y la incorporación de nuevos genes a partir de una especie silvestre puede tomar hasta 20 años (Causse *et al.*, 2007), ya 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. Es por eso que resulta muy importante la elección de las líneas parentales y tener un buen conocimiento del germoplasma disponible.

Actualmente, los avances en biotecnología y biología molecular han permitido llevar a cabo estos procesos de mejora tradicional de manera más eficiente gracias al 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 necesaria la espera para observar el fenotipo buscado, agilizando, de este modo, la introgresión de genes en los cultivares élite (Bauchet y Causse, 2012). Sin embargo, a pesar de que se ha reducido el tiempo necesario para lograr los objetivos, este sigue siendo una limitación a la que debemos añadir el hecho de que este proceso de mejora solo es aplicable entre especies sexualmente compatibles. Es aquí donde cobra importancia el cultivo *in vitro*, que ha permitido contribuciones significativas en el avance de la ciencia, convirtiéndose en una herramienta indispensable en la agricultura moderna (García-Gonzales *et al.*, 2010).

El cultivo de tejidos de plantas engloba un conjunto de técnicas cuya finalidad es la multiplicación de plantas (micropropagación), el saneamiento (cultivo de meristemas y microinjerto) o la mejora genética. Entre las técnicas de cultivo *in vitro* que permiten la mejora genética destaca el aprovechamiento de la variación somaclonal, esto es, la

variación genética que aparece como consecuencia del propio cultivo *in vitro*. Este fenómeno es más probable cuando el material de partida son explantes diferenciados en lugar de explantes con meristemas preexistentes (Duncan, 1997), cuanto más viejos son estos, 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, lo que supone una buena alternativa, rápida y sin ser necesario el uso de complejas tecnologías para la mejora genética de los mismos (Krishna *et al.*, 2016). Otras aplicaciones del cultivo *in vitro* dirigidas a la mejora genética son el método haplo-diploide, el rescate de embriones y la fusión de protoplastos. El primero, enfocado a la obtención de líneas puras de manera más rápida que los programas de mejora clásica que emplean autofecundaciones repetidas (Germanà, 2011), mientras que los dos últimos permiten superar las barreras de incompatibilidad sexual presente en los procesos de mejora tradicional (Bai y Lindhout, 2007).

No obstante, la transformación genética de plantas es la técnica más potente en la mejora genética, ya que permite la introducción de genes en la especie de interés, superando cualquier barrera interespecífica. 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) y a partir de ese momento, 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). Finalmente, en los últimos años la edición génica ha adquirido especial importancia en la mejora de cultivos, ya que mediante técnicas como TALENs o, especialmente, CRISPR-Cas9, se permite el control preciso de la modificación de un gen y, por lo tanto, la obtención de plantas con los caracteres deseados (Gascuel *et al.*, 2017).

El conocimiento de los genes que controlan los caracteres agronómicos de interés en una especie nos puede ayudar a conseguir grandes resultados en su mejora. Si bien existen varios métodos para poder identificar esos genes, el estudio de mutaciones es

uno de los métodos más eficientes. Se pueden identificar mutantes espontáneos, pero lo más habitual es crear poblaciones mutagenizadas mediante la exposición a distintos agentes químicos y físicos. No obstante, la principal desventaja que presentan este tipo de mutaciones es la dificultad para identificar el gen mutado, pues se requiere de estrategias de clonaje posicional y/o de mapeo por secuenciación (Schneeberger *et al.*, 2009). Para resolver esto, se utiliza la mutagénesis insercional.

1.2.- Mutagénesis insercional

La mutagénesis insercional es una herramienta biotecnológica en la que se asocian el análisis genético tradicional y las técnicas modernas de genética molecular con el objetivo de identificar, clonar y caracterizar funcionalmente el gen mutado. Esta estrategia se basa en el hecho de que un inserto de ADN, ya sea un T-DNA, un transposón o un retrotransposón, puede provocar la disrupción o la alteración de la expresión de un gen endógeno (Tani *et al.*, 2004; Jung *et al.*, 2008; Mathieu *et al.*, 2009; Thole *et al.*, 2009). La gran ventaja de esta estrategia frente a otras formas de producir mutantes es el conocimiento de la secuencia insertada y, por tanto, la mayor facilidad a la hora de clonar el gen en el que se ha producido la inserción mediante técnicas basadas en la PCR, tales como Anchor-PCR.

En tomate, se han obtenido resultados muy interesantes mediante mutagénesis insercional con transposones, tanto con el sistema *Ac/Dc* de maíz (Schneeberger *et al.*, 2009) como con otros parecidos, si bien el mayor éxito se ha conseguido con la utilización de T-DNA. Esto ha sido debido a las ventajas que presenta este sistema: el número de copias de T-DNA que se insertan es bajo y la inserción presenta una naturaleza aleatoria (al menos hasta cierto punto), ya que no existen preferencias de integración (Franzmann *et al.*, 1995). Sin embargo, se ha recalado desde hace tiempo que el T-DNA suele integrarse en regiones del genoma que son transcripcionalmente activas (André *et al.*, 1986; Koncz *et al.*, 1989; Herman *et al.*, 1990) lo cual sería una ventaja en el contexto de un programa de mutagénesis insercional. Además de lo anterior, la mutagénesis con T-DNA presenta la ventaja, frente a los transposones, de que las inserciones de T-DNA dentro de una región concreta son química y físicamente

estables a lo largo de generaciones (Radhamony *et al.*, 2005) y no requieren pasos adicionales para estabilizar el inserto (Tzfira *et al.*, 2004).

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 reguladores), 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, Gidoni *et al.*, 2003, Carter *et al.*, 2013, Pérez-Martín *et al.*, 2017).

Para llevar a cabo un programa de mutagénesis insercional se puede emplear cualquier T-DNA, pero lo habitual es utilizar construcciones que aporten un valor añadido a las plantas transgénicas obtenidas, como pueden ser las trampas génicas.

1.3.- Trampas génicas

Las trampas génicas (*trapping*), son elementos insercionales modificados en los cuales el T-DNA porta, además de un gen marcador, un gen delator con un promotor mínimo, sin promotor o unido a un sitio aceptor de *splicing*. Se pueden diferenciar, pues, tres tipos de trampas génicas: trampas de intensificadores, trampas de promotores y trampas de genes (Springer, 2000). Como cualquier otro T-DNA, estas trampas actúan como mutágenos insercionales. Además, cuando se integran en la orientación apropiada, el gen delator se sitúa bajo el control de elementos reguladores 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 (*promoter trap*) 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 3A). 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 (*gene trap*) contiene una o más secuencias aceptoras de *splicing* inmediatamente aguas arriba del gen delator sin promotor y del gen marcador (Figura 3B). En este caso, se produce la expresión del gen delator si la inserción tiene lugar en un intrón.
- La trampa de intensificadores (*enhancer trap*) 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 3C). 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.

Todas estas trampas (Figura 3), 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).

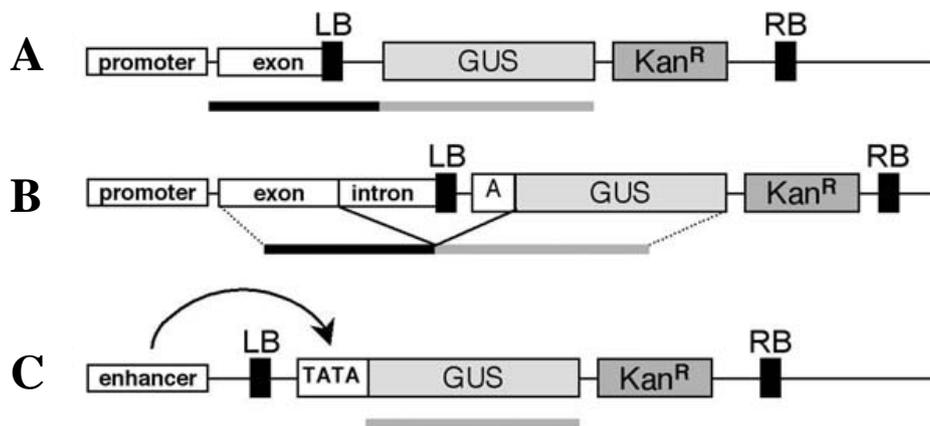


Figura 3. Representación esquemática de las construcciones utilizadas como trampas génicas. (A) Trampa de promotores. (B) Trampa de genes. (C) Trampa de intensificadores. GUS: Gen delator *uidA*, KanR: Gen marcador *nptII*, A: sitio aceptor de splicing, TATA: promotor mínimo (caja TATA), LB (*left border*): borde izquierdo del T-DNA y RB (*right border*): borde derecho del T-DNA. Fuente: Acosta-García *et al.*, (2004).

En este trabajo se empleó la trampa de intensificadores, pues presenta la ventaja de que no es necesaria su inserción dentro de la secuencia codificante de un gen, basta con que se inserte en el área de acción de un intensificador. Sin embargo, el inconveniente estriba en que, como el intensificador puede activar la expresión del gen delator a una distancia considerable, el esfuerzo a la hora de clonar el gen endógeno puede ser mayor (Springer, 2000).

1.4.- Evaluación de mutantes afectados en caracteres del desarrollo temprano: alteraciones en la parte aérea

El período que transcurre desde que emerge la radícula hasta que se forman las primeras hojas verdaderas es lo que se conoce como desarrollo temprano de una planta. El estudio de este período es fundamental, pues permite la detección de alteraciones que a la larga pueden dar lugar a consecuencias importantes en el desarrollo completo de la planta y que posteriormente serían difíciles de identificar. Un aspecto muy importante es el desarrollo inicial de la parte aérea, los procesos que acontecen en la formación del tallo, incluyendo el desarrollo y arquitectura de las hojas. También se pueden observar anomalías en la síntesis de clorofila que podría afectar a la eficacia fotosintética de la planta y, por tanto, en su supervivencia. Además, se pueden ver alteraciones en el desarrollo del SAM (*Shoot Apical Meristem*), el meristemo a partir del cual se van a formar el tallo y las hojas de la planta.

El cultivo *in vitro* constituye una herramienta esencial para llevar a cabo la evaluación de estos caracteres, pues permite analizar las plantas en condiciones ambientales controladas, en un periodo corto de tiempo y en una pequeña superficie de cultivo.

1.4.1.- Desarrollo de la parte aérea

En las plantas, la mayoría del desarrollo ocurre de manera post-embriónica a partir de la actividad del meristemo radicular y apical. Los meristemos apicales se forman durante la embriogénesis y tienen la capacidad de renovarse continuamente. A partir de ellos se forman células hijas que se diferencian en distintos tejidos dando lugar a la formación de hojas, tallo y flores (Steeves y Sussex, 1989). En angiospermas, el SAM consiste en un pequeño grupo de células organizado en tres capas: L1, L2 y L3 (Satina *et al.*, 1940; Poething, 1987). Los derivados de la capa L1 dan lugar a la epidermis de los ápices, hojas y flores, mientras que la capa L2 provee el mesodermo y las células gaméticas. Por último, la capa L3 provee los tejidos vasculares (Poething y Sussex, 1985). También se pueden definir diferentes dominios del meristemo basándose en el nivel de división y crecimiento celular. En la zona central (CZ) las células se dividen y crecen poco. En la zona periférica (PZ) que rodea la CZ las células se dividen y crecen con mayor intensidad dando lugar a la formación de las hojas y los meristemos florales de inflorescencia. En el centro de organización (OC) las células se dividen en orientación aleatoria, proveyendo

de células madre promovedoras de señales y del mantenimiento de la pluripotencia de las células madre suprayacentes localizadas en la ZC (Mayer *et al.*, 1998; Rieu y Laux, 2009). Finalmente se encuentra la zona de costilla (RZ), debajo de las regiones anteriormente descritas, donde las células darán lugar al tejido interno del tallo de la planta (Figura 4).

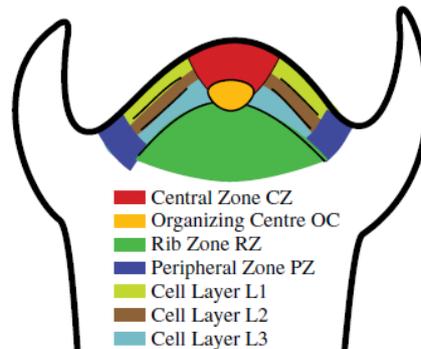


Figura 4. Representación esquemática de capas celulares y dominios del SAM. Zona central (CZ), centro de organización (OC), zona de costilla (RZ), zona periférica (PZ), capa celular L1, capa celular L2 y capa celular L3. Fuente: Risopatron *et al.* (2010).

En general, el crecimiento y el desarrollo del ápice continúa a medida que las células madre en el vértice de la zona central se dividen simétricamente, produciendo células hijas que eventualmente se desplazan hacia las zonas periféricas lejos de los factores que inhiben la diferenciación y hacia aquellos que promueven destinos celulares específicos (Risopatron *et al.*, 2010).

Estudios genéticos y moleculares realizados en *Arabidopsis* han contribuido al entendimiento del complejo proceso de formación de ápices meristemáticos en plantas. El gen *STM* (*SHOOT MERISTEMLESS*) de *Arabidopsis* es necesario para la formación embrionaria del SAM (Barton y Poething, 1993). Se ha demostrado que la función redundante de *CUC1* y *CUC2* (*CUP-SHAPED COTYLEDONS1* y *2*) es necesaria para la expresión de *STM*. La ausencia de expresión de *STM* puede justificar el fenotipo sin ápice de las plantas (Aida *et al.*, 1997, 1999).

Otro gen clave en la formación del SAM es el gen *WUS* (*WUSCHEL*). La expresión de *WUS* se limita a un grupo de células del centro organizador. En los mutantes *wus* el meristemo se forma, pero no se renueva la población de células indiferenciadas, de modo que disminuye el tamaño del meristemo hasta desaparecer (Mayer *et al.*, 1998). La expresión de este gen está controlada por la retroalimentación negativa de la vía de señalización formada por los genes *CLAVATA* (*CLV1*, *CLV2*, *CLV3*) (Carles y Fletcher, 2001) (Figura 5).

El tamaño del meristemo se mantiene mediante un ciclo regulatorio entre las células madre y el centro organizador mediado principalmente por los genes *WUS* y *CLV* (Clark *et al.*, 1993, Schoof *et al.*, 2000; Dodsworth, 2009)

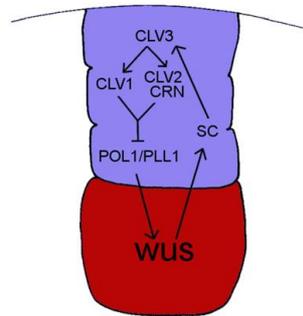


Figura 5. Componentes del ciclo de retroalimentación central entre *CLAVATA* (*CLV*) y *WUSCHEL* (*WUS*). Fuente: Dodsworth (2009).

Por lo que respecta al control hormonal del desarrollo de la parte aérea, las auxinas han sido las mejor caracterizadas (Davies, 1995). Estas fitohormonas regulan un amplio rango de procesos del desarrollo. Se han encontrado sistemas de percepción que median la acción de las auxinas en el desarrollo del ápice meristemático. En la capa L1, la acumulación de auxinas induce la formación de primordios de órganos. Las auxinas acumuladas en esta capa posteriormente son transportadas a los tejidos de las capas L2 y L3 y su patrón de distribución es determinante para la filotaxis de la planta y para el patrón de venación (Benková *et al.*, 2003; Reinhardt *et al.*, 2003; Heisler *et al.*, 2005; Hay *et al.*, 2006; Scarpella *et al.*, 2006; Barkoulas *et al.*, 2008; Bayer *et al.*, 2009).

Las citoquininas también son fitohormonas que juegan un papel muy importante en la actividad del ápice meristemático y la formación de órganos. De hecho, los dos factores de transcripción principales en la regulación del meristemo apical, *STM* y *WUS*, controlan la señalización y homeostasis de las citoquininas, enfatizando la importancia de esta hormona en los procesos de regulación (Yanai *et al.*, 2005; Gordon *et al.*, 2009). Estas hormonas intervienen en la filotaxis (Giulini *et al.*, 2004), la iniciación de órganos laterales (Yoshida *et al.*, 2011), la morfogénesis de los márgenes de las hojas (Greenboim-Wainberg *et al.*, 2005; Shani *et al.*, 2010; Efroni *et al.*, 2013) y el patrón de venación de las hojas (Werner *et al.*, 2003).

1.4.2.- Mutantes de tomate con alteraciones en el desarrollo apical

En tomate también se han descrito mutantes que presentan alteraciones en el desarrollo del meristemo apical.

El gen *DEM*, cuyo mutante *dem* (*defective embryo and meristem*) no presenta ápice meristemático (Keddie *et al.*, 1998), se expresa en el meristemo apical a niveles altos. Aún se desconoce la función de la proteína que codifica, pero se ha concluido que es muy importante en el desarrollo del SAM en tomate. El mutante *goblet* (*gob*) también presenta un severo fenotipo: carece de ápice y además, es incapaz de formar primordios foliares (Brand *et al.*, 2007; Berger *et al.*, 2009). Otro mutante, *expelled shoot* (*exp*), es capaz de producir cuatro o cinco hojas y posteriormente el crecimiento del meristemo apical se detiene (Brand *et al.*, 2007). Por último, se han descrito otros dos mutantes (*spde2²* y *spde2⁵*) en los cuales el ápice aborta después de formar un par de hojas verdaderas (Brand *et al.*, 2007).

El mantenimiento y desarrollo del meristemo influye en el proceso de formación de las hojas en tomate. El mutante *w* (*wiry*) causa un defecto en la expansión de la superficie foliar y restringe la división de la hoja en folíolos. Los mutantes *Me* (*Mouse ears*), *Cu* (*Curl*), *clau* (*clausa*) y *com* (*complicata*) causan una complejidad excesiva de la hoja al promover el inicio de los folíolos laterales. Por último, la descripción de los mutantes *sf* (*solanifolia*), *tf2* (*trifoliolate2*), y *c* (*potato leaf*) muestra una disminución del lóbulo y de la complejidad de la hoja (Dengler, 1984). Más recientemente, se ha descrito el mutante espontáneo *lyr* (*lyrate*), caracterizado por un menor número de folíolos y diversas alteraciones morfológicas (David-Schwartz *et al.*, 2009). Este gen *LYR* se encuentra relacionado con el gen *LeT6* (ortólogo de *STM*), mostrando que el desarrollo del SAM y la formación de las hojas comparten mecanismos genéticos (Brand *et al.* 2007).

Finalmente, alteraciones en el meristemo apical pueden dar lugar a un retraso del crecimiento o una arquitectura más compacta. En algunos casos, suele tratarse de genes responsables de la síntesis o respuesta a fitohormonas (Koka *et al.*, 2003; Multani, 2003). En tomate, el cultivar Micro-Tom, es un ejemplo de ello. Este cultivar presenta varios genes mutados como son el gen *SELFPRUNNING* o el gen *DWARF* (implicado en la síntesis de brasinoesteroides). Además, también se han visto alteraciones en los niveles de giberelinas, pudiendo ser, en conjunto, la razón de su fenotipo tan compacto (Martí *et al.* 2006).

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. pennellii* y *S. galapagense*) para identificar mutantes insercionales y poder así 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. A partir de estos mutantes ya se han clonado más de 30 genes responsables de estos caracteres.

En base a estos antecedentes, el objetivo general de este trabajo es el estudio de diversos mutantes, previamente identificados en nuestro grupo, afectados en caracteres del desarrollo temprano, en concreto en el desarrollo de la parte aérea, a partir de líneas T-DNA de tomate (cultivar Money Maker).

En este marco general, los objetivos concretos son los siguientes:

1. Caracterizar fenotípica y genéticamente los mutantes, tanto *in vitro* como *in vivo*.
2. Analizar el modo de herencia del fenotipo mutante.
3. Analizar el número de insertos de T-DNA con el gen *nptII* funcional.
4. Analizar la cosegregación del fenotipo mutante con el inserto de T-DNA.

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.- Material vegetal

Las líneas T-DNA analizadas en el presente trabajo provienen de una colección que se ha generado en trabajos previos del grupo de investigación y que se enmarcan en un proyecto conjunto de mutagénesis insercional 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 tomate (*Solanum lycopersicum*, cultivar Money Maker) con una trampa de intensificadores incluida en el plásmido pD991 (Figura 6) cedido amablemente por el Dr. Thomas Jack de la Universidad de Darmouth.

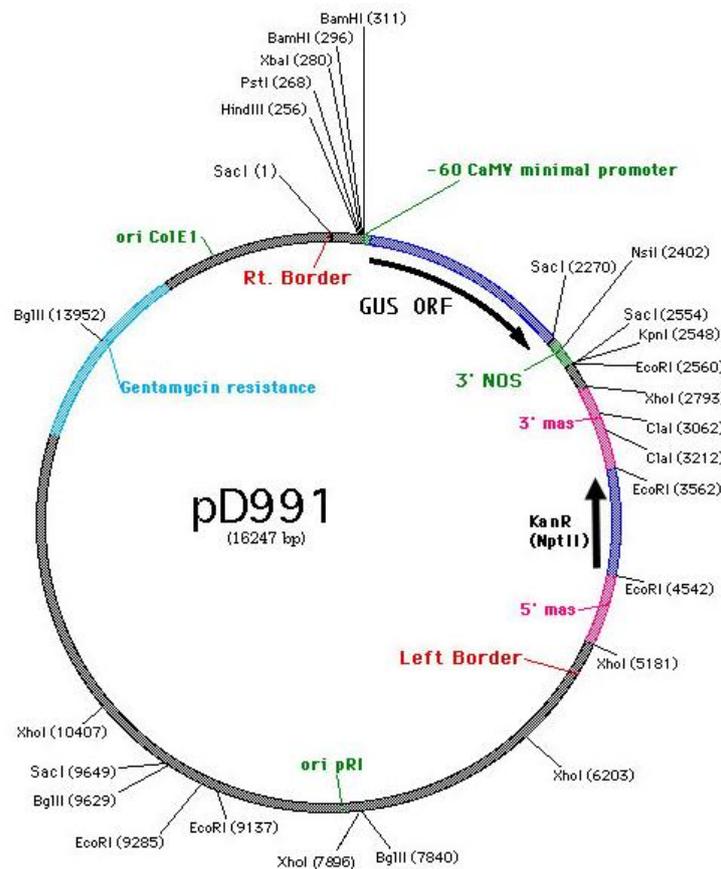


Figura 6. Representación esquemática del plásmido pD991

Estas líneas T-DNA se denominaron con un número que representa la planta transgénica de la cual procede, seguido del acrónimo ET MM, por la construcción utilizada (i.e. Enhancer Trapping) y el genotipo transformado, Money Maker. Así mismo, para la primera generación de plantas transformadas se empleó la nomenclatura de TG1,

siendo éstas hemigóticas para el T-DNA. En consecuencia, la descendencia obtenida por autofecundación se denominó TG2, pudiendo encontrarse en este caso plantas homocigotas, hemigóticas o acigóticas para cada T-DNA integrado. La descendencia de estas plantas se denominó TG3 y así sucesivamente.

Concretamente, se realizó el análisis de plantas TG2 y/o TG3 de 4 líneas candidatas, en las cuales el grupo ya había observado la mutación previamente, pero no habían sido caracterizadas en profundidad.

3.2.- Caracterización y estudio de mutantes en líneas T-DNA de tomate

La metodología estándar empleada para analizar todas las líneas T-DNA y avanzar en su caracterización es la descrita en los siguientes puntos.

3.2.1.- Esterilización de semillas

El cultivo *in vitro* en condiciones axénicas requiere de una esterilización superficial de semillas. Para llevarlo a cabo, se sumergieron durante 30 minutos 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. Pasado este tiempo, 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 7). Este procedimiento se repitió pasadas 24 horas, lo que constituye una doble esterilización, facilitando una germinación homogénea de las semillas.

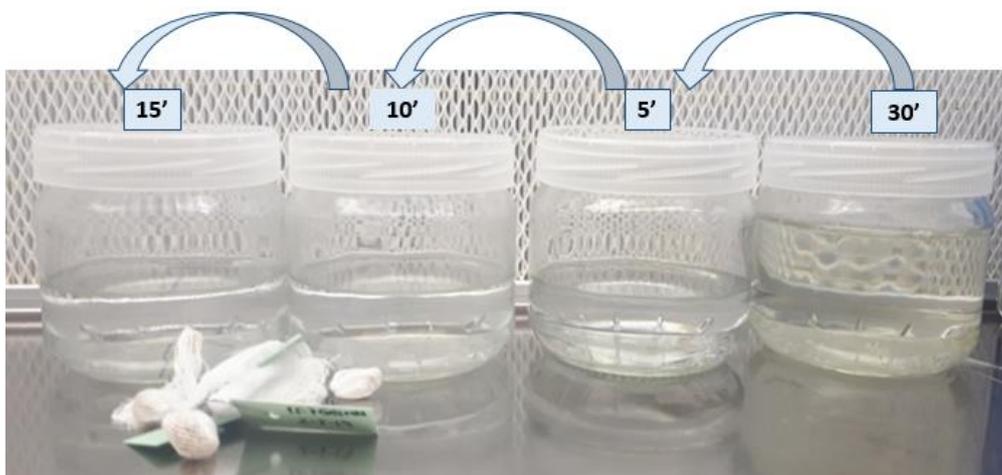


Figura 7. Proceso de esterilización de las semillas de tomate. De derecha a izquierda: bote con lejía comercial diluida al 50% con unas gotas de Tween 20, tres botes con agua destilada estéril y paquetes de semillas.

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 el autoclave.

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo empleados.

	MG	MB3	α	β	IK	IKZ	ϵ
Sales minerales ^a	MS/2	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Azúcar (g·L ⁻¹)	10,0	30,0	20,0	20,0	30,0	30,0	30,0
Inositol (g·L ⁻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
Ácido indolacético (mg·L ⁻¹)			0,1	0,1	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

Las semillas esterilizadas se pasaron a placas Petri con dos discos de papel de filtro y 7 mL de agua destilada estéril y se incubaron en oscuridad en una estufa a 28°C. Al cabo de aproximadamente 3 días la radícula comenzó a emerger (Figura 8A). En ese momento se sembraron en botes con medio de germinación MG para continuar su crecimiento (Figura 8B). Los botes se mantuvieron 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 7 días, las semillas dieron lugar a plántulas (Figura 8C), donde se pudo evaluar el desarrollo, tanto radicular como aéreo.

A partir de las plántulas se obtuvieron explantes de ápice meristemático y cotiledón llevando a cabo los cortes necesarios (Figura 8D). Los explantes de cotiledón se subcultivaron en placas Petri con medio de regeneración IKZ para el análisis de la

regeneración adventicia (Figura 8E), mientras que 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 8F). Tanto los botes como las placas se incubaron en cámaras de cultivo en las mismas condiciones descritas anteriormente.

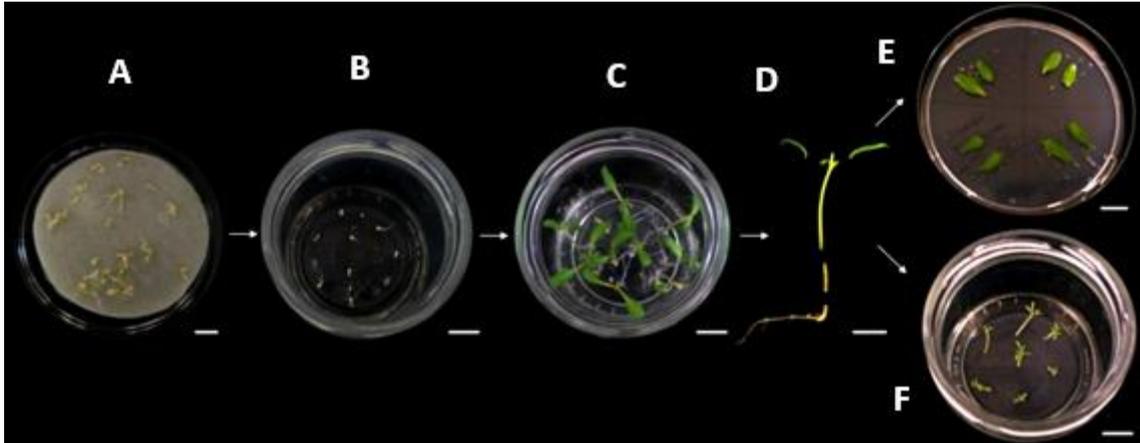


Figura 8. Obtención de plántulas y plantas axénicas de tomate. (A) Germinación de semillas en placa sobre papel de filtro y agua. (B) Semillas germinadas en medio MG. (C) Plántulas a los 7 días de cultivo en medio MG. (D) Cortes en plántulas para la obtención de explantes de cotiledón y ápice. (E) Explantes de cotiledón en placa. (F) Explantes de ápice en bote. Escala: 1 cm.

3.2.2.3.- Clonación de plantas

Las líneas mutantes se mantuvieron en condiciones axénicas para poder llevar a cabo un estudio exhaustivo de las mismas. Para ello, se clonaron tanto las plantas con fenotipo mutante como aquellas con fenotipo silvestre (WT) a través del cultivo de ápices meristemáticos o de yemas axilares, bien en medio MB3 o bien en medio α y se cultivaron en condiciones de fotoperiodo.

3.2.3.- Fenotipado *in vivo*

El análisis del fenotipo mutante *in vivo* es tan importante como su análisis *in vitro* para la caracterización de las líneas T-DNA. 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, que disponen de control de temperatura e iluminación de apoyo. Las plantas se regaban mediante sistema de goteo con una solución de fertirrigación que aporta los nutrientes necesarios (Tabla 2). Además, se llevaban a cabo

los tratamientos fitosanitarios necesarios para mantener unas condiciones de crecimiento adecuadas hasta la producción de flores y frutos.

Tabla 2. Composición de la solución de fertirrigación del invernadero.

Ca(NO₃)₂·4H₂O	2,360 g·L ⁻¹	ZnSO₄·5H₂O	14,00 mg·L ⁻¹
KNO₃	1,012 g·L ⁻¹	MnO₄·5H₂O	32,20 mg·L ⁻¹
MgSO₄·7H₂O	0,980 g·L ⁻¹	CuSO₄·5H₂O	2,60 mg·L ⁻¹
KH₂PO₄	0,272 g·L ⁻¹	H₃BO₃	38,00 mg·L ⁻¹
g FE (quelato)	0,056 g·L ⁻¹	(NH₄)₆Mo₇·H₂O	1,76 mg·L ⁻¹

3.2.3.1.- Aclimatación de plantas

La aclimatación de las plantas es un proceso necesario que pretende disminuir, en la medida de lo posible, el estrés producido a la planta por el cambio 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*.

Para llevar a cabo este proceso, en primer lugar, se seleccionaron plantas, tanto mutantes como WT, las cuales se extrajeron con extremo cuidado del bote de cultivo para evitar dañar tanto la parte aérea como la parte radicular. Tras eliminar completamente el medio adherido a las raíces, las plantas se cultivaron en macetas con sustrato (100% fibra de coco) humedecido con agua. Para evitar la deshidratación, las plantas se mantuvieron cubiertas por un vaso de plástico transparente durante los días que duraba la aclimatación (Figura 9). Tras quince días se trasplantaban a una maceta de mayor tamaño y se retiraba el vaso de plástico, dándose por concluida la etapa de aclimatación.



Figura 9. Plantas de tomate recién aclimatadas. Escala: 3 cm.

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 con sustrato humedecido con agua. Éstos 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 plántulas crecían, se trasplantaron a macetas de mayor tamaño 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 dirigidos).

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.

El proceso se comenzó con la esterilización de las semillas y su siembra directa en macetas con sustrato. Tras diez días del cultivo en el invernadero las plántulas ya estaban listas para ser injertadas. Para ello se realizaron los siguientes pasos (Figura 10):

- I. En las plántulas se eliminaron los cotiledones y las primeras hojas verdaderas expandidas desde el ápice.
- II. Se realizó un corte en bisel por debajo de los cotiledones en dos plántulas. De esta manera, la parte superior del corte era la parte aérea del injerto y la parte inferior, el patrón.
- III. Por último, se unieron ambas partes con una pinza de silicona, cubriéndolo con un vaso de plástico para favorecer la unión y la supervivencia de la planta.

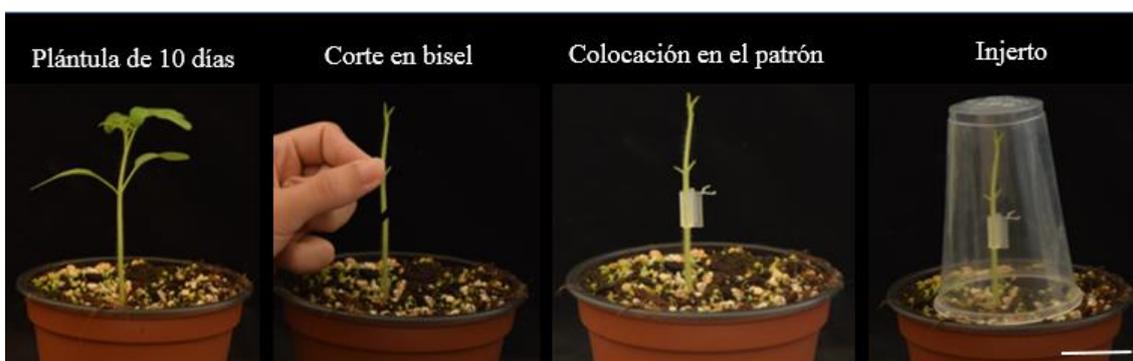


Figura 10. Procedimiento para la realización de injertos en plántulas de tomate. Escala: 3 cm.

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. Esta generación es necesaria para encontrar el gen causante

de la mutación en aquellas líneas mutantes en las que no se observa cosegregación entre el fenotipo mutante y el inserto de T-DNA ya que hay que abordar su clonación mediante técnicas de mapeo por secuenciación.

Para lograr este cruce 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 preantesis 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 y se etiquetó.

3.3.- Análisis genético

3.3.1.- Análisis del modo de herencia de la mutación

Por lo general, el material empleado en este trabajo eran 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 para la mutación. Además del fenotipo de la planta TG1 que podría no ser concluyente, se puede saber, en función del número de plantas observadas en TG2 con fenotipo WT y mutante, la naturaleza de la mutación:

- 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 las familias TG3, su segregación fenotípica dependía de la naturaleza de la planta TG2 de la que provenía: si la planta TG2 era acigótica, todas las plantas TG3 eran WT; si la planta TG2 era homocigótica, todas las plantas TG3 eran mutantes; si la planta TG2 era hemicigótica, en esa TG3 se observaba la misma segregación que en la TG2.

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

homocigóticas como hemicigóticas. Para analizar esta resistencia fue necesario cultivar distintos explantes en medios en los que estaba presente el antibiótico, concretamente, cultivo de ápices en medio β o cultivo de explantes de cotiledón en medio ϵ . Para cada uno de los casos, los ápices sensibles no enraizaron y los explantes de cotiledón sensibles no fueron capaces de regenerar y, además, sufrieron un cambio de color perceptible a simple vista (Figura 11).

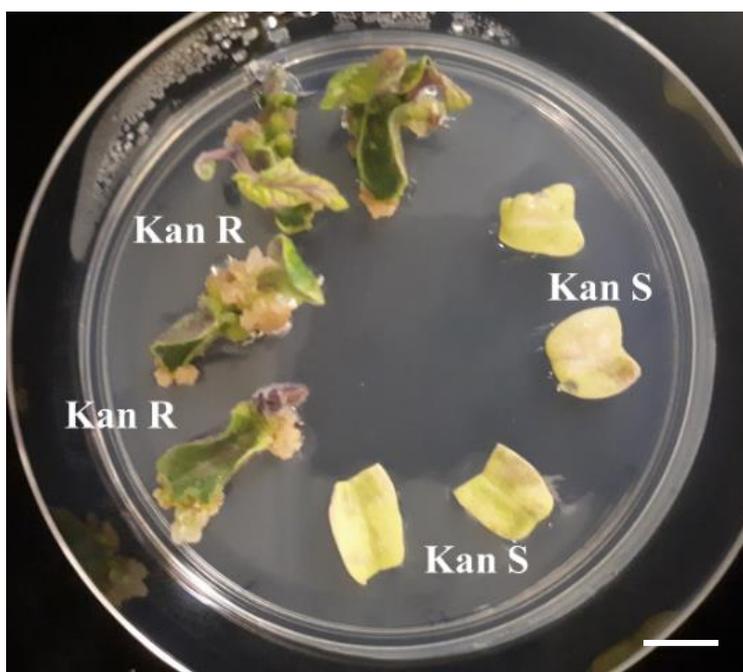


Figura 11. Evaluación de la resistencia a la kanamicina en cotiledones de tomate. Escala: 1cm.

A partir de las segregaciones observadas, fundamentalmente en TG2, se pudo conocer el número de plantas acigóticas para un inserto de T-DNA con el gen *nptII* funcional, pues fueron sensibles a la kanamicina. A partir de esa información se podía inferir el número de insertos de T-DNA con el gen *nptII* funcional que había integrado cada línea:

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

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

La existencia de cosegregación entre un inserto de T-DNA con el gen *nptII* funcional y el fenotipo mutante se abordó relacionando el fenotipo con la resistencia a la kanamicina en las plantas analizadas. En este análisis se descartó la presencia de cosegregación

cuando apareció una planta mutante sensible a la kanamicina. En ese caso quedaba claro que ningún inserto de T-DNA con el gen *nptII* funcional podía ser el responsable del fenotipo mutante ya que no estaban presentes en la planta mutante. En esos casos se aborda el clonaje del gen mutado por técnicas de mapeo por secuenciación. Sin embargo, cuando todas las plantas mutantes eran resistentes a la kanamicina, se analizaba la probabilidad de fallo que tenía la hipótesis de existencia de cosegregación. Normalmente, con una probabilidad de fallo menor del 5% se asume dicha cosegregación y se aborda la clonación del gen mutado por técnicas como el Anchor-PCR que permite llegar a conocer cuál es este gen de forma mucho más rápida y sencilla que mediante el mapeo por secuenciación.

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, el número de insertos de T-DNA y el análisis de la existencia de cosegregación, pues permite evaluar el ajuste de los datos observados a los datos esperados para cada una de las segregaciones e hipótesis planteadas, asumiendo que el modelo es adecuado cuando 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.

4.- RESULTADOS

En el presente trabajo se realizó el estudio de diversas líneas mutantes previamente identificadas en el grupo, ampliando la caracterización de cada una de ellas, tanto a nivel fenotípico (*in vitro* e *in vivo*) como genético. A continuación, se muestran los resultados obtenidos con cuatro líneas T-DNA afectadas todas ellas en el desarrollo del ápice meristemático.

4.1.- 1302 ET MM

Este mutante se identificó en trabajos previos del grupo y se caracterizó por un desarrollo anómalo del SAM en las primeras etapas de desarrollo. Aunque el mutante crecía a partir de las yemas axilares no se producía un crecimiento normal. En este trabajo se profundizó en su caracterización fenotípica, para lo cual se utilizó progenie TG2 de reciente cosecha. El fenotipo mutante se detectó en planta axénica en medio de clonación MB3. Se observó un colapso o detención del desarrollo del meristemo apical. Después de un mes de cultivo la planta desarrolló yemas axilares, sin embargo, no reactivaron el crecimiento de la parte aérea. Se apreció también una morfología foliar alterada, aunque no se observaron cambios destacables en el sistema radicular (Figura 12).

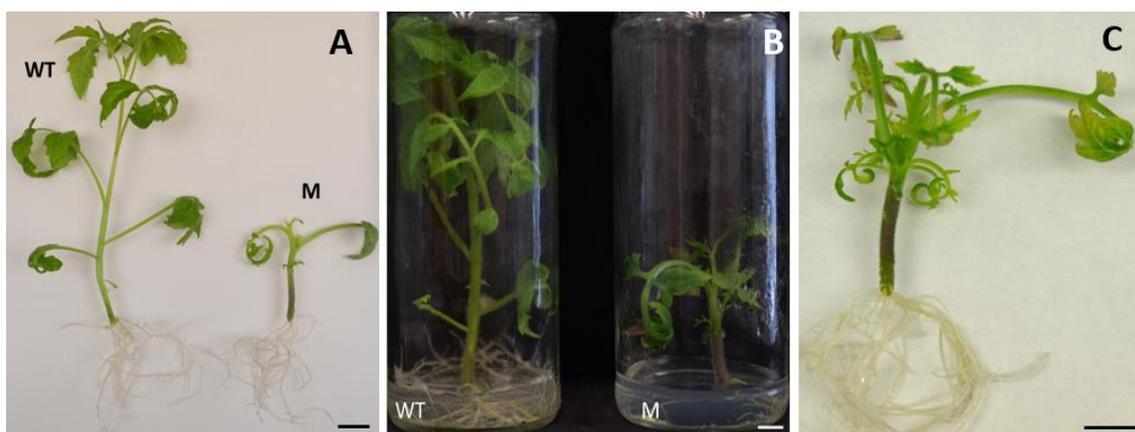


Figura 12. Fenotipo de plantas axénicas de la línea 1302 ET MM en las primeras etapas de crecimiento. (A) 20 días de cultivo en medio MB3. (B y C) 45 días de cultivo en medio MB3. Escala: 1 cm

A medida que pasaba el tiempo de cultivo el fenotipo mutante se hacía más exacerbado, siendo capaz de desarrollar una gran cantidad de yemas axilares que, tras iniciar su crecimiento y formar un brote con varias hojas y entrenudos muy cortos, dejaba de elongar constituyendo una estructura vegetal muy característica (Figura 13). Finalmente, tras dos meses de cultivo, se observó que la planta detenía el desarrollo y empezaba a morir.



Figura 13. Fenotipo de plantas axénicas de la línea 1302 ET MM tras 60 días de cultivo en medio MB3. Escala: 1 cm.

Para estudiar el fenotipo en condiciones *in vivo* se aclimataron plantas WT y mutantes. Al igual que ocurría *in vitro*, las plantas formaban gran cantidad de brotes axilares que no elongaban y al final la planta colapsaba y moría en etapas muy tempranas. Para ver el fenotipo a partir de plantas obtenidas directamente en condiciones de invernadero se sembraron semillas TG2 pregerminadas en macetas. El fenotipo mutante se observó claramente a los 30 días de cultivo. Las plantas mutantes presentaron un desarrollo más lento respecto de plantas WT. Además, se observó la presencia de una ligera clorosis en las hojas. Conforme avanzaba el periodo de cultivo, la diferencia de tamaño entre las plantas WT y las mutantes se hacía mayor, así como el estado de clorosis. Tras 60 días de cultivo el mutante había detenido por completo su crecimiento y era incapaz de

desarrollar flores ni frutos. Además, la clorosis de las hojas era evidente, y aparecían zonas con presencia de antocianos antes de su muerte (Figura 14).

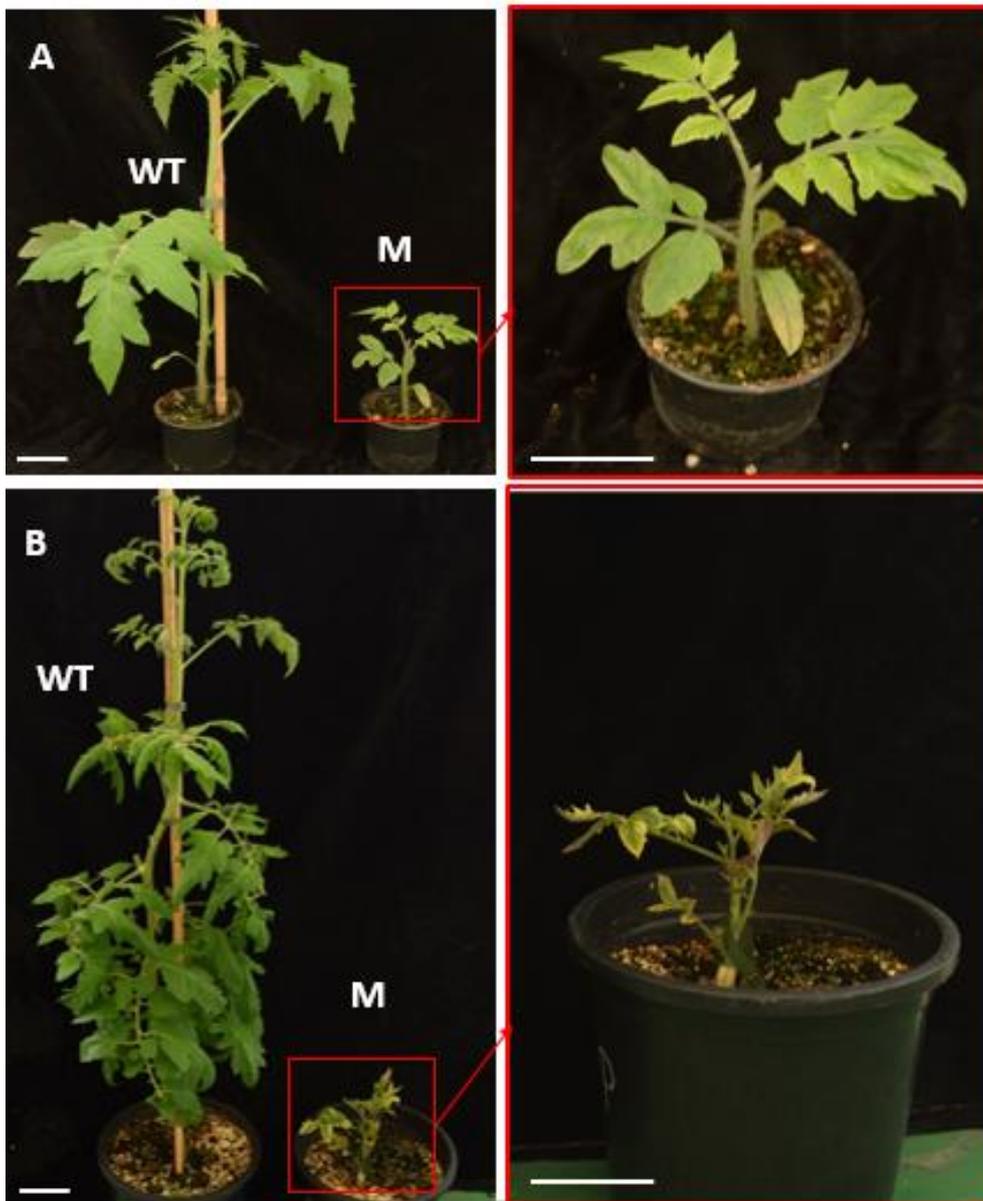


Figura 14. Fenotipo de plantas procedentes de semilla de la línea 1302 ET MM cultivadas en el invernadero. (A) 30 días de cultivo. Escala: 5 cm. (B) 60 días de cultivo. Escala: 15 cm.

4.1.1.- Ensayo de regeneración adventicia

En el grupo llevamos mucho tiempo intentando discernir los genes que participan en el proceso de regeneración adventicia, clave para la aplicación de múltiples herramientas biotecnológicas (transformación genética, edición génica, etc.). Por tanto, además de los experimentos de caracterización fenotípica llevados a cabo *in vitro* e *in vivo*, se realizó un ensayo de regeneración adventicia en condiciones *in vitro* a partir de

cotiledones con el objetivo de evaluar la capacidad de regeneración del mutante. Los resultados obtenidos de este experimento fueron que el fenotipo mutante tiene alterada la capacidad de regeneración ya que solo formaba un callo desorganizado, pero no daba lugar a nuevas yemas por lo que fue imposible obtener una planta completa en condiciones donde el WT regenera sin problemas (Figura 15).

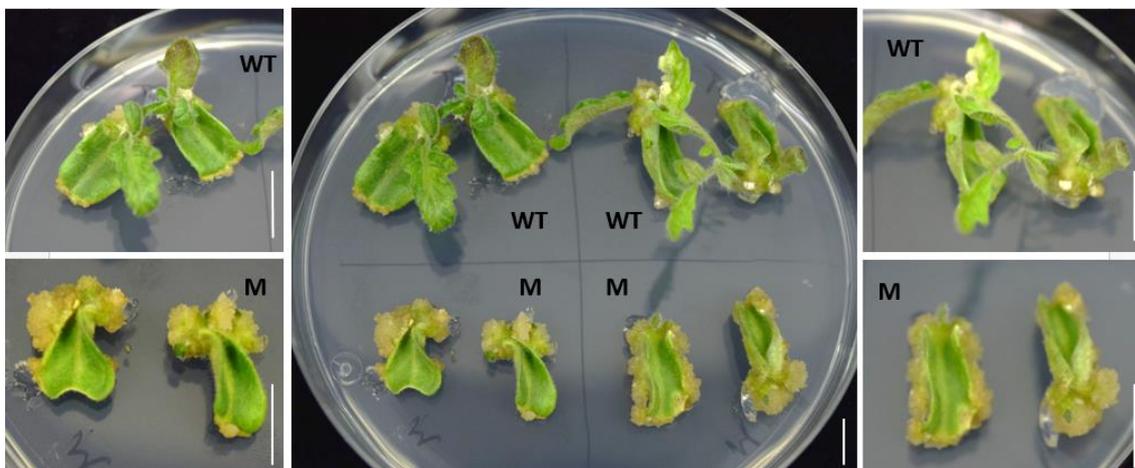


Figura 15. Fenotipo de cotiledones de la línea 1302 ET MM tras 30 días de cultivo en medio de regeneración IKZ. Escala: 1 cm.

4.1.2.- Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante

El fenotipo mutante se detectó en 26 de las 119 plantas analizadas en los 4 experimentos realizados en condiciones de cultivo *in vitro* e invernadero. El análisis de homogeneidad indicó que las muestras eran homogéneas y el análisis de los datos acumulados (χ^2 datos acumulados) indicó que en la línea 1302 ET MM no había motivos para dudar de un modelo de herencia monogénica recesiva para la mutación observada (Tabla 3).

Tabla 3. Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante en la línea 1302 ET MM.

	Segregación	WT	M	Total	χ^2
Experimento 1	Observada	13	5	18	0,07
	Esperada (3:1)	13,5	4,5		
Experimento 2	Observada	34	6	40	2,13
	Esperada (3:1)	30,0	10,0		
Experimento 3	Observada	17	7	24	0,22
	Esperada (3:1)	18,0	6,0		
Experimento 4	Observada	29	8	37	0,22
	Esperada (3:1)	27,75	9,25		
Datos acumulados*	Observada	93	26	119	0,63
	Esperada (3:1)	89,25	29,75		

* Análisis χ^2 homogeneidad ($\chi^2_H = 2,01$) indica que las muestras son homogéneas ($P > 0,05$; $\chi^2_{3\text{ gl.}} = 7,82$)

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

En cuanto al número de insertos, de las 82 plantas TG2 cultivadas *in vitro* se observaron 77 plantas resistentes y 5 sensibles. Al realizar la prueba χ^2 se concluyó que la línea 1302 ET MM porta dos insertos con el gen *nptII* funcional (Tabla 4).

Tabla 4. Análisis del número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional en la línea 1302 ET MM

	Segregación	KAN ^R	kan ^S	Total	χ^2
Experimento 1	Observada	18	0	18	1,20
	Esperada (15:1)	16,9	1,1		
Experimento 2	Observada	36	4	40	0,96
	Esperada (15:1)	37,5	2,5		
Experimento 3	Observada	23	1	24	0,18
	Esperada (15:1)	22,5	1,5		
Datos acumulados*	Observada	77	5	82	0,003
	Esperada (15:1)	76,87	5,13		

* Análisis χ^2 homogeneidad ($\chi^2_H = 2,33$) indica que las muestras son homogéneas ($P > 0,05$; $\chi^2_{2\text{ gl.}} = 5,99$)

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

Para llevar a cabo el análisis de cosegregación entre un inserto de T-DNA con el gen *nptII* funcional y el fenotipo mutante se analizó la resistencia a la kanamicina de la progenie TG2. A la vista de los resultados se pudo concluir que no existía cosegregación en la línea 1302 ET MM con ninguno de los dos insertos de T-DNA con el gen *nptII* funcional ya que se observaron un total de 3 plantas mutantes sensibles a la kanamicina (Tabla 5).

Tabla 5. Análisis de cosegregación del fenotipo mutante con algún inserto de T-DNA en la línea 1302 ET MM.

	WT		M		Total
	KAN ^R	kan ^S	KAN ^R	kan ^S	
Experimento 1	33	2	3	2	40
Experimento 2	18	0	5	1	24

Al comprobar que no existía cosegregación, se realizaron cruces entre plantas WT, puesto que en la mutante no era posible, y plantas de *S. pimpinellifolium*, para obtener la F2 y poder llevar a cabo la identificación del gen por técnicas de mapeo por secuenciación.

4.2.- 1461 ET MM

La mutación de la línea 1461 ET MM se identificó en trabajos previos del grupo. El mutante se caracterizaba por una ralentización del crecimiento apical en las primeras etapas de desarrollo. En este trabajo se profundizó en la caracterización fenotípica de este mutante.

El fenotipo *in vitro* del mutante se observó en plantas axénicas de 20 días en medio de cultivo MB3. Se apreciaba una clara diferencia de tamaño respecto a la planta WT, lo que confirmaba que el crecimiento del mutante era más lento. Además, las plantas mutantes eran ligeramente cloróticas. Pese a estas alteraciones, no se observaron cambios destacables en el sistema radicular (Figura 16).



Figura 16. Fenotipo de planta axénica de la línea 1461 ET MM tras 20 días de cultivo en medio MB3. Escala: 1 cm.

El fenotipo *in vivo* se evaluó sembrando semillas TG2 en el invernadero. Se detectaron plantas de menor tamaño y con clorosis a partir de los 15 días de cultivo. Este fenotipo se hizo más evidente con el paso de los días en el invernadero (Figura 17). Además de los cambios antes descritos, se apreció que la morfología foliar también estaba alterada, pues las plantas mutantes presentaban folíolos algo más estrechos que el WT (Figura 17D).

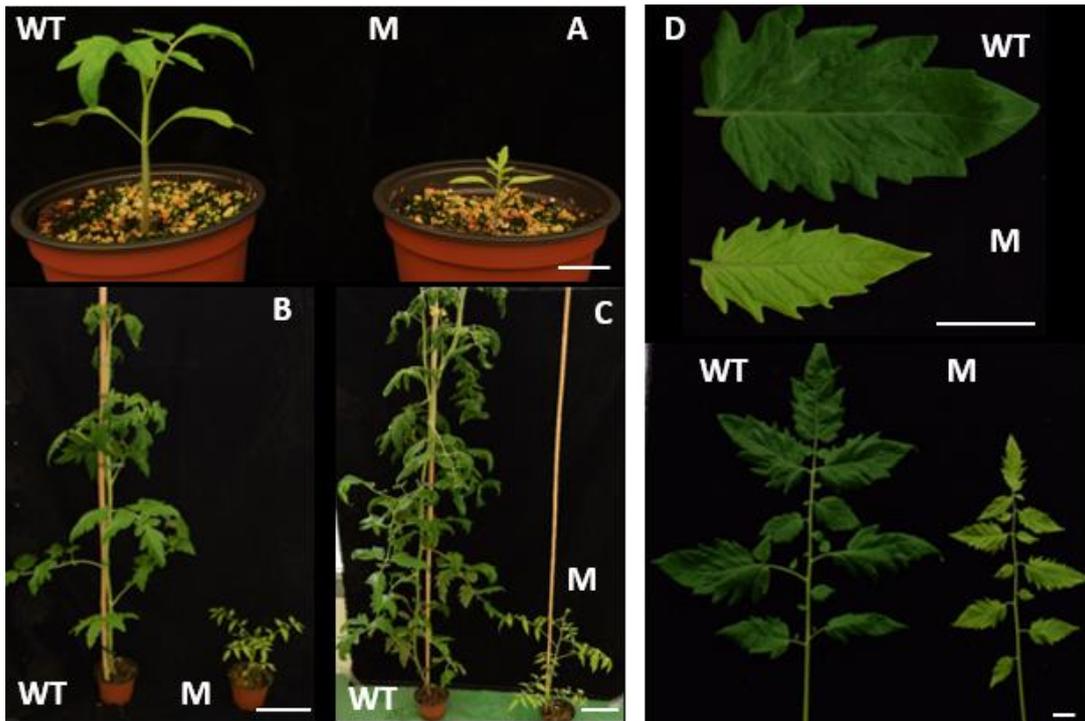


Figura 17. Fenotipo de plantas procedentes de semilla de la línea 1461 ET MM cultivadas en el invernadero. (A) 15 días de cultivo. (B) 30 días de cultivo. (C y D) 50 días de cultivo. Escala A y D: 1 cm. Escala B y C: 10 cm.

Una vez identificadas las plantas mutantes y las WT se realizaron injertos con todas las combinaciones posibles con el objetivo de conocer la influencia de la parte aérea y el sistema radicular en el fenotipo mutante. Pasados 30 días de la realización de los injertos, se observó que en aquellos cuya parte aérea era mutante se conservaba el fenotipo mutante, mientras que en los que tenían la parte aérea WT, ésta permanecía sin alteraciones. Por tanto, estos resultados nos permitieron concluir que en esta línea el fenotipo mutante de la parte aérea no está influido por el genotipo de la raíz (Figura 18).



Figura 18. Fenotipo de injertos de la línea 1461 ET MM tras 30 días de cultivo en el invernadero. Escala: 5 cm.

Después de 50 días de cultivo las observaciones anteriores se mantuvieron. Las plantas con parte área WT mostraban un buen desarrollo, mientras que las que tenían parte área mutante apenas crecieron en ese periodo, aunque su raíz fuera WT (Figura 19).

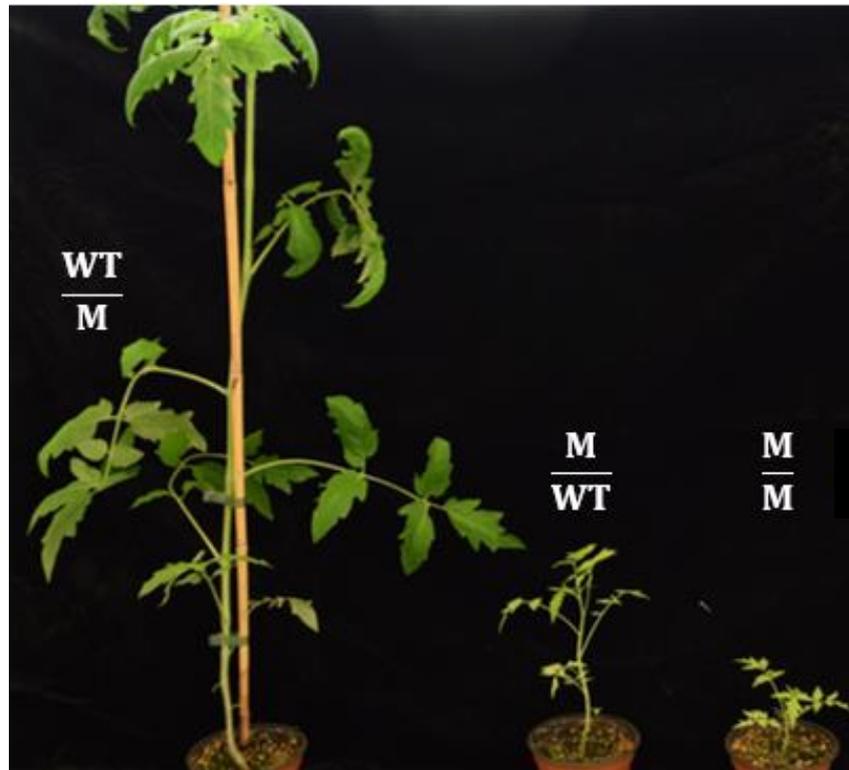


Figura 19. Fenotipo de injertos de la línea 1461 ET MM tras 50 días de cultivo en el invernadero. Escala: 5 cm.

4.2.1.- Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante

En varios experimentos independientes se analizaron un total de 96 plantas TG2 de las cuales 70 tenían fenotipo WT y 26 fenotipo mutante. Tras comprobar que los experimentos se podían analizar de forma conjunta, se vio que los datos acumulados se ajustaban a un modo de herencia monogénico recesivo (Tabla 6).

Tabla 6. Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante en la línea 1461 ET MM.

	Segregación	WT	M	Total	χ^2
Experimento 1	Observada	18	7	25	0,12
	Esperada (3:1)	18,75	6,25		
Experimento 2	Observada	19	5	24	0,22
	Esperada (3:1)	18,0	6,0		
Experimento 3	Observada	33	14	47	0,57
	Esperada (3:1)	35,25	11,75		
Datos acumulados*	Observada	70	26	96	0,21
	Esperada (3:1)	72,0	24		

* Análisis χ^2 homogeneidad ($\chi^2_H = 0,70$) indica que las muestras son homogéneas ($P > 0,05$; $\chi^2_{2\text{ gl.}} = 5,99$)

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

Se realizó un ensayo en el que se evaluó la resistencia a la kanamicina de 24 plantas TG2 cultivadas *in vitro*. Entre estas, se observaron 23 plantas resistentes y 1 sensible (Tabla 7).

Tabla 7. Análisis del número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional en la línea 1461 ET MM.

	Segregación	Kan ^R	Kan ^S	Total	χ^2
Experimento 1	Observada	23	1	24	0,17
	Esperada (15:1)	22,5	1,5		

Los resultados de la prueba χ^2 ($P > 0,05$, $\chi^2_{1 g.l} = 3,84$) nos permiten concluir que la línea 1461 ET MM porta, al menos, dos insertos con el gen *nptII* funcional.

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

Para determinar la existencia o ausencia de cosegregación entre un inserto de T-DNA con el gen *nptII* funcional y el fenotipo mutante se analizó la resistencia a la kanamicina de la progenie TG2. A la vista del resultado obtenido en el experimento no se pudo descartar la existencia de cosegregación en la línea 1461 ET MM con alguno de los dos insertos de T-DNA con el gen *nptII* funcional ya que no se han observado plantas mutantes sensibles a la kanamicina (Tabla 8).

Tabla 8. Análisis de cosegregación del fenotipo mutante con algún inserto de T-DNA en la línea 1461 ET MM.

	WT		M		Total
	KAN ^R	kan ^S	KAN ^R	kan ^S	
Experimento 1	18	1	5	0	24

En este caso se debe seguir cultivando plantas para ampliar la muestra analizada y tener una menor probabilidad de fallo de la hipótesis de existencia de cosegregación. Si en este proceso apareciera una planta mutante sensible a la kanamicina se descartaría la hipótesis y se pasaría a una estrategia de clonación mediante mapeo por secuenciación como ya se ha comentado previamente.

4.3.- 1656 ET MM

La mutación de la línea 1656 ET MM se caracteriza por el desarrollo anómalo del meristemo apical. En el grupo se había descrito en experimentos anteriores que las plantas mutantes presentaban, en el lugar del meristemo apical, una protuberancia, o bien desarrollaban una pequeña hoja. Este fenotipo se observó tanto *in vitro* como *in vivo* (Figura 20). Se comprobó que el modo de herencia se ajustaba a una mutación monogénica recesiva. Además, en algunas plantas este fenotipo revertía y acababan mostrando un fenotipo WT. Para seguir analizando esta línea, se obtuvieron semillas TG3 procedentes de una planta mutante, 1656-6 ET MM. En este trabajo se continuó la caracterización fenotípica del mutante tras corroborar la naturaleza genética de la mutación analizando esa línea TG3.

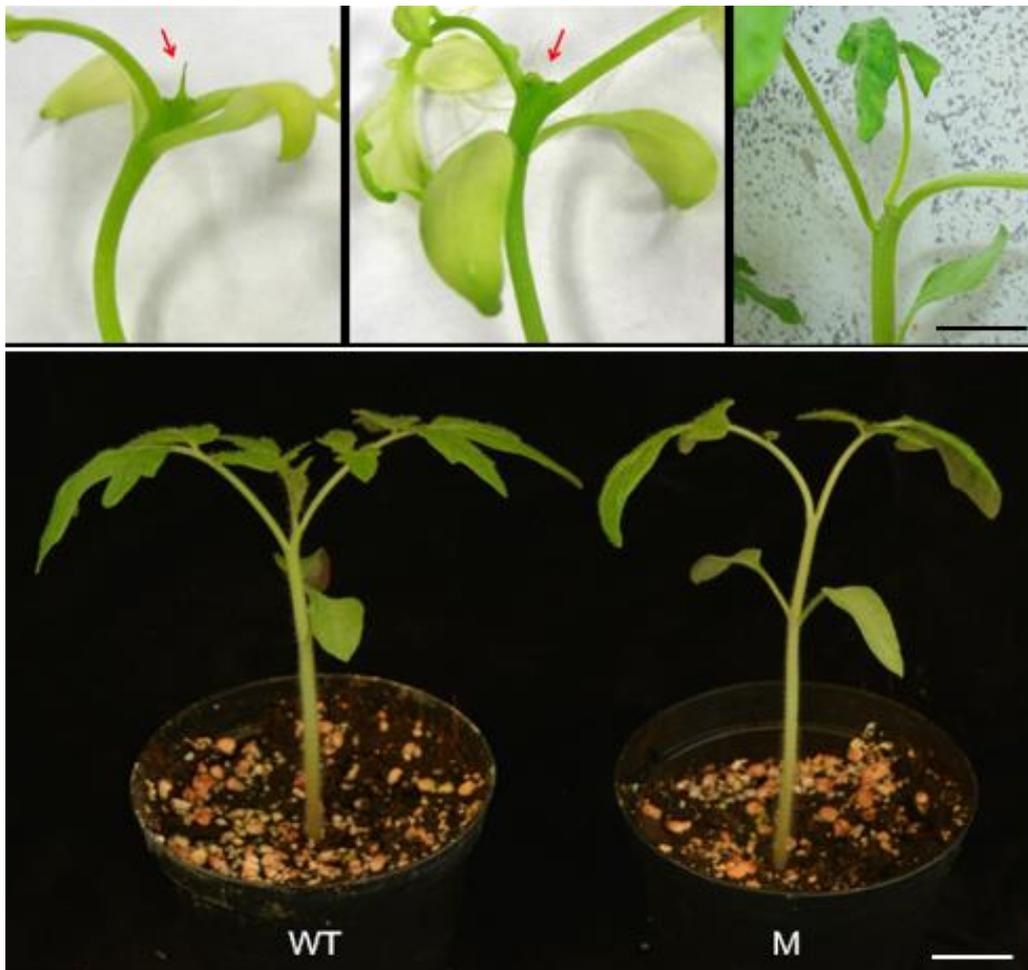


Figura 20. Fenotipo de plántulas procedentes de semilla de la línea 1656 ET MM. Arriba: tras de 15 días en medio básico MG. Escala: 1 cm (las flechas señalan las alteraciones del meristemo apical). Abajo: tras 20 días de cultivo en el invernadero. Escala: 3 cm.

En las plantas de la línea 1656-6 ET MM, cultivadas en medio de germinación MG, se observó un desarrollo anómalo del meristemo apical, aunque no se observó un fenotipo tan exacerbado como el visto en TG2 (Figura 21). Esto nos indicaba que la mutación se transmitía a la descendencia y que, por tanto, era causada por la alteración de un gen.

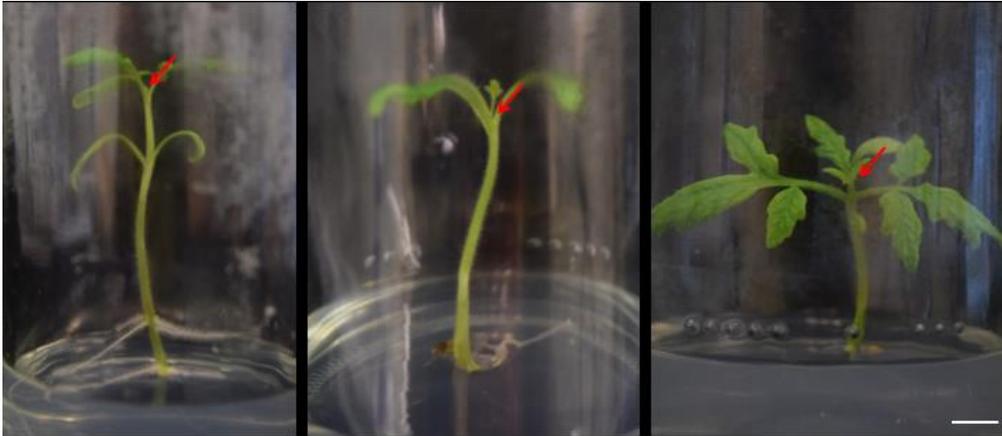


Figura 21. Fenotipo de plántulas de la línea 1656-6 ET MM tras 15 días de cultivo en MG. Las flechas señalan las alteraciones en el meristemo apical. Escala: 1 cm.

Para ver la evolución del fenotipo alterado se cultivaron algunas plántulas mutantes en medio de germinación durante dos meses. Tras este tiempo se apreció que, tras el desarrollo de unas pocas hojas, el meristemo apical dejaba de crecer. Entonces alguna de las yemas axilares formadas adquiriría la función del meristemo apical y, a partir de ella, se iniciaba el desarrollo de un brote de morfología totalmente WT (Figura 22).

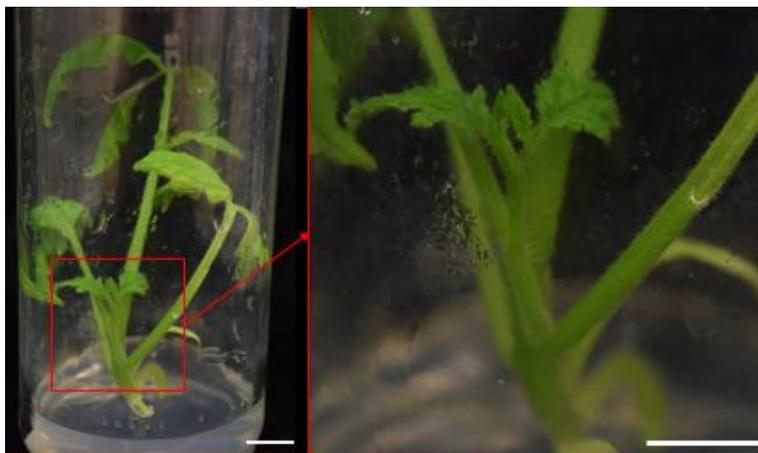


Figura 22. Fenotipo de una plántula mutante de la línea 1656-6 ET MM tras 60 días de cultivo en MG. Escala: 1 cm

Paralelamente a la realización de este experimento, algunas de las plántulas se utilizaron para cultivar los ápices meristemáticos en α . El resultado observado fue

similar al caso anterior, el meristemo apical dejaba de crecer y otros meristemos presentes en la planta adquirirían su identidad formando una planta WT (Figura 23).

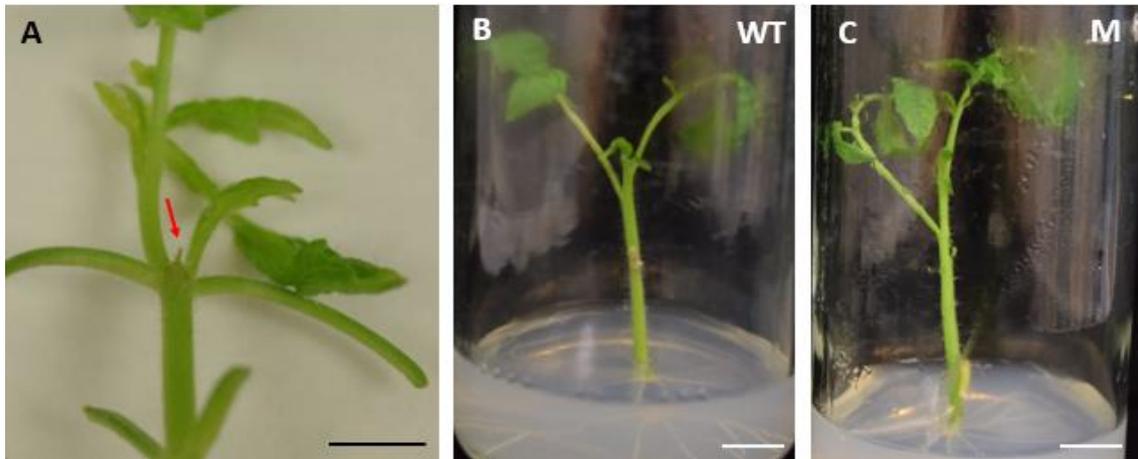


Figura 23. Fenotipo de plantas axénicas de la línea 1656-6 ET MM. (A) Formación de un nuevo brote tras el aborto del meristemo apical (flecha). (B) Planta WT después de tres subcultivos a medio α . (C) Planta mutante después de tres subcultivos a medio α . Escala: 1 cm.

4.3.1.- Ensayo de regeneración adventicia

Al ver que en este mutante estaba afectado el desarrollo de los meristemos, se decidió evaluar la regeneración a partir de explantes de cotiledón (Figura 24).



Figura 24. Fenotipo de cotiledones cultivados en medio de regeneración IKZ (arriba) y callos organogénicos en medio de elongación IK (abajo) de la línea 1656-6M ET MM. Escala: 1 cm.

Se observó que la respuesta organogénica era más lenta en esta línea mutante en comparación al WT. A pesar de esto, una vez que se inicia la organogénesis, el mutante responde igual que el WT, generando yemas (primera etapa de la regeneración adventicia), ápices (estructuras con hojas diferenciadas) y brotes (estructuras con un tallo elongado) a partir de los cuales se pueden obtener nuevas plantas. Además, el fenotipo de éstas era WT.

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

La resistencia a la kanamicina se determinó mediante el subcultivo de ápices en medio β . Se evaluaron dos TG3, la línea 1656-6 ET MM, con la que se había estado trabajando, y la línea 1656-8 ET MM. En ambos casos se observó una segregación irregular de la resistencia a la kanamicina, apareciendo muy pocos individuos que mostraran resistencia al antibiótico (Tabla 9).

Tabla 9. Análisis del número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional en la línea 1656 ET MM

	Segregación	KAN ^R	kan ^S	Total	χ^2
Experimento 1 (1656-6)	Observada	3	13		
	Esperada (3:1)	12	4		27
	Esperada (1:1)	8	8	16	6,25
Experimento 1 (1656-8)	Observada	11	23		
	Esperada (3:1)	25,5	8,5		32,98
	Esperada (1:1)	17	17	34	4,24

A la vista de estos resultados no se pudo determinar el número de insertos de T-DNA que porta la línea 1656 ET MM. La segregación observada no se ajustó ni a una proporción 3 KAN^R: 1 kan^S (1 inserto de T-DNA) ni a una 1 KAN^R: 1 kan^S (un inserto de T-DNA con silenciamiento en homocigosis). Con estos resultados se va a abordar la clonación del gen utilizando técnicas de mapeo por secuenciación.

4.4.- 1440 ET MM

Este mutante se identificó en una tesis doctoral previa de nuestro grupo (Sánchez-López, 2017). La principal característica de esta línea es la detención del crecimiento del meristemo apical (SAM) tras la formación de un par de hojas (Figura 25).

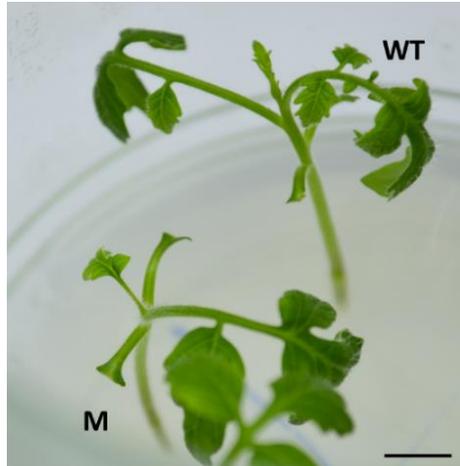


Figura 25. Fenotipo de plantas axénicas de la línea 1440 ET MM tras diez días de cultivo en medio básico. Escala: 1 cm.

Tras un mes de cultivo, las diferencias eran más evidentes, incluso cuando la actividad meristemática se reanudaba y se formaban nuevas hojas. El fenotipo se observó tanto *in vitro* como *in vivo* y, en ambos casos, además de dicha alteración, se observó un cambio en la morfología y el tamaño de las hojas (Figura 26).

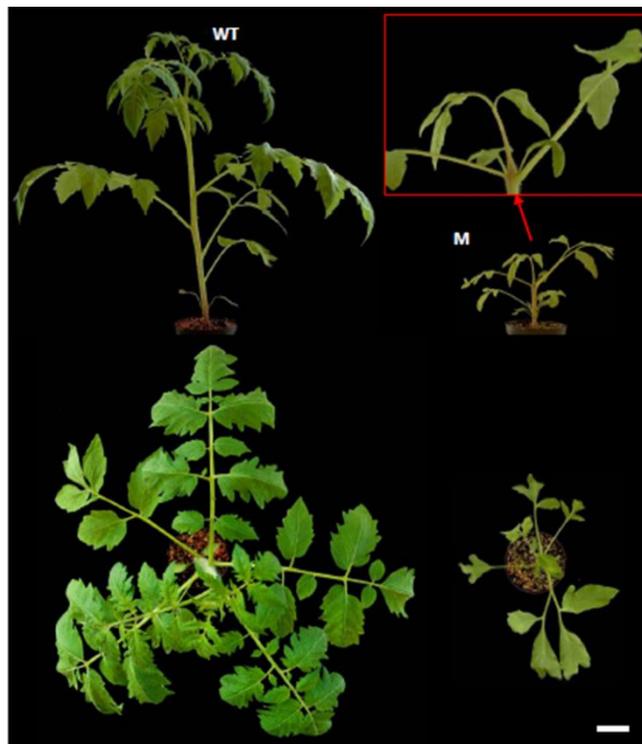


Figura 26. Fenotipo de plantas procedentes de semillas TG2 de la línea 1440 ET MM tras 35 días de cultivo en el invernadero. Escala: 5 cm.

El análisis genético indicó que el fenotipo se debe a una mutación monogénica recesiva. Además, mediante el análisis de segregación de plantas sensibles y resistentes a la kanamicina se determinó que esta línea portaba dos insertos de T-DNA con el gen *nptII* funcional. Al combinar los datos de fenotipo con los de resistencia se comprobó que existía cosegregación entre uno de los dos insertos de T-DNA y el fenotipo mutante con una probabilidad de fallo menor del 5% (Sánchez-López, 2017).

En este trabajo se ha utilizado la línea TG3, 1440-17 ET MM, que se obtuvo a partir de una planta WT resistente a la kanamicina, para profundizar en el fenotipado de esta línea. En concreto, se ha evaluado cómo afecta la mutación a la capacidad de regeneración adventicia mediante organogénesis. Además, se ha comprobado la naturaleza monogénica recesiva de la mutación en esa familia en tres experimentos independientes (Tabla 10).

Tabla 10. Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante en la línea 1440-17 ET MM.

	Segregación	WT	M	Total	χ^2
Experimento 1	Observada	7	5	12	1,77
	Esperada (3:1)	9,0	3,0		
Experimento 2	Observada	9	3	12	0,00
	Esperada (3:1)	9,0	3,0		
Experimento 3	Observada	18	4	22	0,55
	Esperada (3:1)	16,5	5,5		
Datos acumulados*	Observada	34	12	46	0,03
	Esperada (3:1)	34,5	11,5		

* Análisis χ^2 homogeneidad ($\chi^2_H = 2,29$) indica que las muestras son homogéneas ($P > 0,05$; $\chi^2_{2\text{ gl.}} = 5,99$)

4.4.1.- Ensayo de regeneración adventicia

Tras el cultivo de semillas de la familia TG3, 1440-17 ET MM, se llevó a cabo un ensayo de regeneración a partir del cultivo de cotiledones en un medio organogénico (IKZ). Los ápices meristemáticos se cultivaron en medio MB3 para determinar la naturaleza WT o mutante de cada individuo. Los explantes de cotiledón procedentes de plántulas mutantes regeneraron yemas adventicias y ápices como los procedentes de plántulas WT (Figura 27). Sin embargo, cuando se procedió a elongar dichos ápices, se empezaron a apreciar las diferencias.

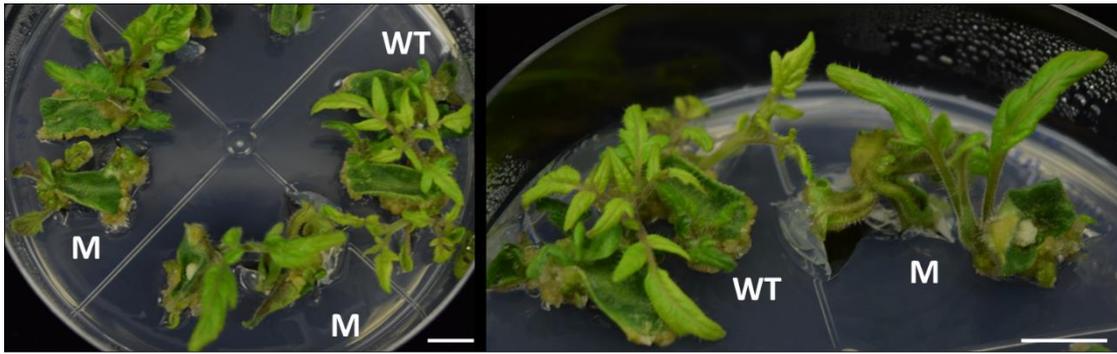


Figura 27. Fenotipo de explantes de cotiledón de la línea 1440-17 ET MM cultivados 30 días en medio de regeneración IKZ. Escala: 1 cm.

Los callos organogénicos se subcultivaron en medio de elongación IK para comprobar si de esos ápices podían obtenerse brotes. Los callos procedentes de plántulas mutantes no generaron brotes elongados, sin embargo, en las mismas condiciones los ápices procedentes de explantes WT dieron promedio de dos brotes explante (Figura 28).

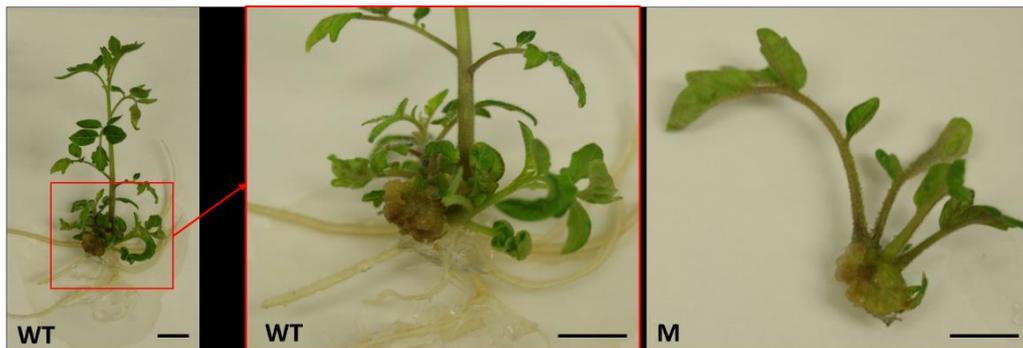


Figura 28. Fenotipo de callos organogénicos de la línea 1440-17 ET MM tras 30 días de cultivo en medio de elongación IK. Escala: 1 cm.

Finalmente, se subcultivaron estas estructuras a medio MB3 y se comprobó que no eran capaces de generar un brote enraizado como sí ocurría con los procedentes de explantes WT (Figura 29).

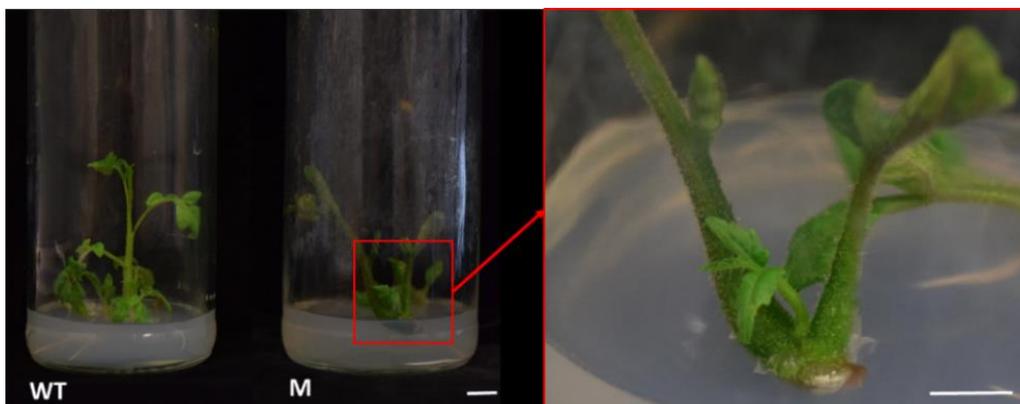


Figura 29. Fenotipo de brotes individualizados a partir de callos organogénicos de la línea 1440-17 ET MM tras 15 días de cultivo en MB3. Escala: 1 cm.

Por tanto, se puede afirmar que la mutación que afecta al SAM de las plántulas procedentes de semilla afectó de forma muy parecida a los meristemos obtenidos por regeneración adventicia a partir de explantes de cotiledón.

4.4.2.- Análisis funcional del gen responsable de la mutación

Como ya se ha comentado, en trabajos previos de nuestro grupo se determinó la existencia de cosegregación entre el fenotipo mutante y un inserto de T-DNA. Gracias a la colaboración con el grupo del Dr. Rafael Lozano de la Universidad de Almería se ha llegado a clonar el gen etiquetado por dicho T-DNA (Rodríguez, 2016) mediante la estrategia anchor-PCR y el posterior análisis bioinformático de las secuencias flanqueantes al Right Border del T-DNA. Se identificó que el inserto T-DNA se localiza en el cromosoma 4 del genoma de tomate, concretamente entre el segundo y tercer exón de un gen que codifica un factor de transcripción de la familia WRKY y que denominamos *DAM1* (*defects in apical shoot meristem*) (Figura 30).

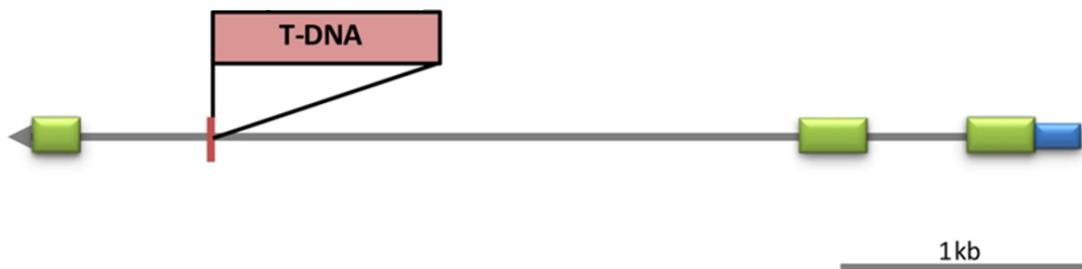


Figura 30. Representación esquemática de la organización genómica del gen etiquetado por el inserto T-DNA en el mutante *dam1*. Las cajas verdes representan los exones, las líneas grises los intrones y la flecha señala el sentido de la transcripción. La caja azul representa la región codificante del primer exón no traducida (5' UTR, del inglés untranslated region). Fuente: Rodríguez, 2016.

En tomate se han identificado 81 genes pertenecientes a la familia de factores de transcripción WRKY que desempeñan funciones en la regulación del crecimiento y desarrollo de la planta, así como en la regulación de la respuesta a estreses bióticos y abióticos. El homólogo del gen *DAM1* en *Arabidopsis* es *AtWRKY13*, el cual actúa como regulador positivo del desarrollo del tallo, de modo que mutaciones en este gen dan lugar a plantas que desarrollan tallos más débiles. Por tanto, los resultados sugieren que *DAM1* y *AtWRKY13* son ortólogos (Rodríguez, 2016).

Para llevar a cabo el análisis funcional de este gen, en el contexto del presente TFM, se ha llevado a cabo la transformación de explantes de cotiledón de tomate Money Maker con una construcción RNAi diseñada para anular la expresión de dicho gen. Para ello se ha utilizado el método de transformación descrito en el trabajo de Atarés y colaboradores (2011). Se han inoculado un total de 172 explantes de cotiledón y se han regenerado 18 plantas TG1 diploides.

El fenotipo observado en la mayoría de estas plantas ha sido WT (Figura 31A y B), salvo en una de ellas que se observó el fenotipo mutante (Figura 31C).

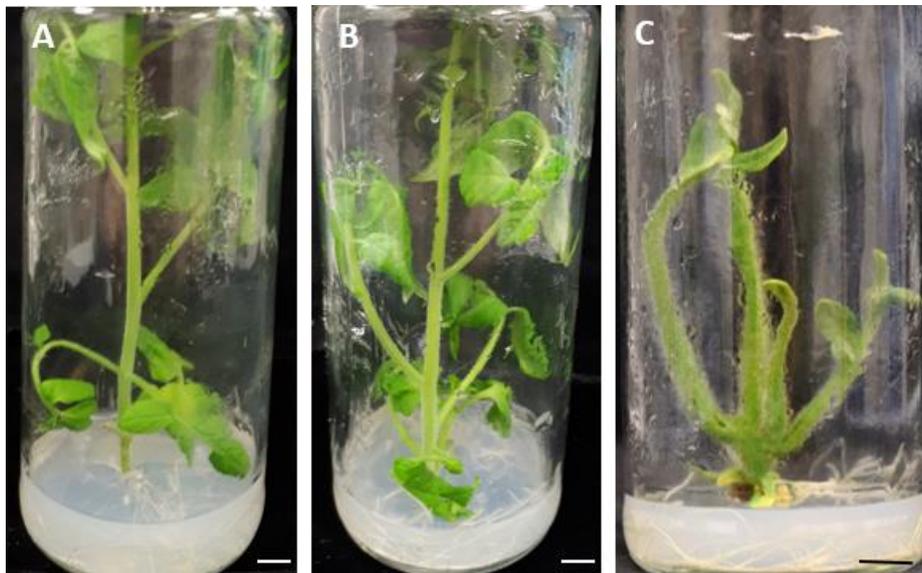


Figura 31. Fenotipo de plantas axénicas de Money Maker obtenidas tras la transformación con la construcción 1440 RNAi y cultivadas en MB3. (A) 10-1440 RNAi con fenotipo WT. (B) 11-1440 RNAi con fenotipo WT. (C) 1-1440 RNAi con fenotipo mutante. Escala: 1 cm.

Algunas de las plantas con fenotipo WT *in vitro* se han aclimatado y se han obtenido progenies TG2 en cinco de ellas. Durante su cultivo en el invernadero no se ha observado ninguna característica que le distinguiera de una planta WT.

En el futuro se va a realizar, con un abordaje similar, la obtención y análisis de plantas transformadas con una construcción que permita la sobreexpresión de este gen y la anulación total de su expresión mediante la edición del gen endógeno en plantas WT con el sistema CRISPR-Cas9. De esta forma, esperamos completar esta parte del estudio y disponer de la información necesaria para profundizar en la función de este gen en el desarrollo de una planta de tomate.

5.- DISCUSIÓN

El estudio de mutantes es una estrategia clásica y probablemente la herramienta genética más valiosa para profundizar en el conocimiento de los genes que son responsables de los procesos biológicos. Además de su gran importancia económica, el tomate (*Solanum lycopersicum*) presenta diversas características que lo hacen una especie interesante para la investigación. Su genoma es relativamente pequeño (950 Mb) y, gracias a esfuerzos de entidades tanto públicas como privadas, se dispone de una gran colección de germoplasma de la propia especie y de especies silvestres relacionadas. Además, se han desarrollado protocolos eficaces (reproducción vegetativa, injertos, hibridación con especies relacionadas, transformación genética, edición génica, etc.) para poder investigar esta especie a múltiples niveles. Por todo ello, el tomate se considera un organismo modelo para el estudio de caracteres de interés agronómico.

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, en colaboración con los grupos de la Dra. Mari Carmen Bolarín del CEBAS (Murcia) y del Dr. Rafael Lozano de la Universidad de Almería, se ha generado una colección de mutantes de T-DNA a partir de los cultivares comerciales Money Maker y P73, y de otras especies silvestres relacionadas, como *S. galapagense*, *S. pimpinellifolium* y *S. pennellii*. 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 Money Maker y superior al 100% en alguna especie silvestre como *S. pennellii* (Atarés *et al.*, 2011; Pérez-Martín *et al.*, 2017).

En base a esto, el objetivo del presente trabajo fue el estudio de algunas líneas T-DNA de tomate (cultivar Money Maker), previamente identificadas en el grupo, para una caracterización más profunda. Concretamente, se eligieron de cuatro mutantes afectados en el desarrollo de su parte área. En este caso las técnicas de cultivo *in vitro* han sido esenciales no sólo para identificar los mutantes sino para caracterizarlos fenotípica y genéticamente. En este sentido hay que destacar que gracias al cultivo *in*

in vitro es posible fenotipar una mayor cantidad de plantas en menos espacio controlando de forma exhaustiva las condiciones ambientales como la iluminación, temperatura, humedad, disponibilidad de agua y nutrientes, etc. Además de poder abordar esta detección de forma más eficiente, se evitan estreses bióticos (plagas y enfermedades) que podrían alterar el fenotipo y, como consecuencia, interferir en la detección correcta de los individuos mutantes. Por otra parte, permite la detección de alteraciones en el desarrollo inicial de la parte aérea de la planta como formación del tallo o el desarrollo de las hojas. Además, también es posible analizar tanto la raíz embrionaria en plántulas como el sistema radicular adventicio en plantas axénicas. Otra ventaja del cultivo *in vitro* es que se puede evaluar la capacidad de regeneración adventicia en diferentes tipos explantes. Por si fuera poco, facilita el análisis del número de insertos, el análisis de cosegregación, e incluso la determinación del modo de herencia en el caso de mutaciones recesivas con un cierto grado de subletalidad.

La desventaja obvia de la evaluación *in vitro* es que no se pueden analizar caracteres del desarrollo vegetativo a largo plazo y, sobre todo, los relacionados con el desarrollo reproductivo. Para esto es necesario cultivar las plantas en el invernadero, lo que implica que las condiciones ya no serán tan controladas como *in vitro* y que la planta estará expuesta al ataque de patógenos, lo que podría alterar el fenotipo. No obstante, la confirmación de algunos fenotipos mutantes en condiciones *in vivo* es necesaria y permite la obtención de progenies necesarias para su estudio.

5.1.- Modo de herencia, número de insertos T-DNA y cosegregación con el fenotipo mutante

El análisis del modo de herencia de las cuatro líneas mutantes analizadas se ajustó a una mutación monogénica recesiva. Por consiguiente, el fenotipo de la planta TG1 era WT y en su descendencia sólo el 25 % de las plantas presentaron el fenotipo mutante. Este resultado está en línea de los obtenidos en trabajos previos del grupo 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 hacen referencia a dos Tesis Doctorales en las que el número de mutantes con los que se pudo trabajar fue limitado. En un trabajo del grupo en el que se exponen

datos sobre el programa de mutagénesis insercional completo, se describen los datos con una muestra de 4189 líneas T-DNA de tomate. En esta muestra se observa que, de los 522 mutantes para caracteres del desarrollo, 274 eran recesivos, 205 eran dominantes y 47 mostraban una herencia compleja (Pérez-Martín *et al.*, 2017).

En cuanto al número de copias de T-DNA insertadas en las líneas evaluadas, en tres de ellas (1302 ET MM, 1440 ET MM y 1461 ET MM) se ha comprobado que son portadoras de dos insertos con el gen *nptII* funcional. Si atendemos a resultados previos del grupo, estos datos están por encima de la media del número de insertos de T-DNA, que se encuentra en torno a 1,7 insertos por línea. Esto quiere decir que 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. En otras especies de interés económico como el arroz también se ha encontrado un bajo número de copias de T-DNA en su genoma, con promedios de 1,4 insertos (Jeon *et al.*, 2000). Asimismo, en la especie modelo, *Arabidopsis thaliana*, se han encontrado promedios de 1,4 y 1,29 insertos (Feldmann, 1991; Ríos *et al.*, 2002). Estos resultados muestran que, en general, el número de copias insertadas en el genoma es bajo, lo que supone una de las grandes ventajas de la mutagénesis insercional con T-DNA (Tzfira *et al.*, 2004). Por otra parte, en la línea 1656 ET MM, no se pudo determinar el número de insertos que portaba. Esta línea presentaba una segregación de resistencia a la kanamicina anómala ya que aparecían mayor número de plantas sensibles que resistentes. Se observaron segregaciones similares en tomate por Deng y colaboradores (2013) quienes estableciendo que podía existir un fenómeno de cosupresión del transgén *nptII*, provocando su silenciamiento en las plantas transformadas. Este hecho suele ser debido a la presencia de múltiples copias, por lo que podemos pensar que la línea 1656 ET MM presenta más de un inserto de T-DNA. Esta circunstancia se podría determinar con pruebas moleculares como un análisis Southern que determine el número de insertos integrados.

Finalmente, respecto a los análisis de cosegregación, los resultados fueron diferentes en las líneas evaluadas en el presente trabajo. En la línea 1302 ET MM no se observó asociación entre el fenotipo mutante y el inserto de T-DNA, ya que en ella se encontraron tres plantas mutantes sensibles a la kanamicina, es decir, sin un inserto del gen *nptII* funcional. Por su parte, en la línea 1440 ET MM ya había sido detectada con

anterioridad la existencia de cosegregación entre uno de los insertos y el fenotipo mutante; mientras que en la línea 1461 ET MM no se pudo descartar la existencia de asociación entre el fenotipo mutante y uno de los insertos de T-DNA, pues no se encontraron plantas mutantes entre los pocos individuos sensibles al antibiótico detectados. Sin embargo, en este último caso, con el número de plantas analizadas todavía no se puede afirmar con una baja probabilidad de fallo que exista cosegregación. El porcentaje de líneas mutantes que presentan cosegregación entre el fenotipo mutante y un inserto de T-DNA con el gen *nptII* funcional está cercano al 15% en las líneas de nuestro grupo. 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).

Sin embargo, el hecho de que no se observe cosegregación con un inserto que haga que la planta portadora sea resistente a la kanamicina no quiere decir que no pueda haberla con otro inserto truncado (i.e. sin un gen *nptII* funcional) o con un inserto de una parte del cuerpo del vector (Miyao *et al.*, 2007). La integración de estos fragmentos de ADN anómalos pueden ser las responsables de la mutación, pero lo más probable es que en estos casos las mutaciones 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 la línea 1302 ET MM para proseguir con la obtención de la F2 y la posterior clonación del gen.

5.2.- Mutantes afectados en el desarrollo del meristemo apical

Todos los mutantes analizados en este trabajo presentaron fenotipos mutantes relacionados con el desarrollo temprano del meristemo apical. Todas las líneas fueron caracterizadas *in vitro*, por la facilidad que presenta el método para detectar el fenotipo mutante. Además, en todos los casos, se ha corroborado dicho fenotipo en condiciones de invernadero.

La línea 1302 ET MM mostró un fenotipo mutante *in vitro* caracterizado por un colapso del SAM y una generación continua de brotes laterales que, sin embargo, no lograban reactivar el crecimiento de la planta. Por su parte, el fenotipo *in vivo* fue similar al observado *in vitro*. Tanto las plantas aclimatadas como las plantas obtenidas mediante germinación de semillas en maceta presentaron alteraciones similares y su desarrollo no pasó de la formación de una planta de unos pocos centímetros de altura, con hojas con morfología y color alterados, probablemente por la presencia de antocianos.

Trabajos recientes han descrito que la sobreexpresión de *AtPAP2*, factor de transcripción MYB de *Arabidopsis*, provoca la disminución del tamaño de las plantas, así como la acumulación de antocianinas en tomate (Li *et al.*, 2018). La sobreexpresión de otro gen de tomate, *SIRBZ*, produce plantas enanas y con cierta clorosis que presentan un aspecto similar al observado en nuestro mutante (Fan *et al.*, 2016). Se han encontrado casos en los que la disminución de clorofila se compensa con la síntesis de otros pigmentos. Por ejemplo, se sabe que en *Tradescantia zebrina*, la antocianina capta la luz que ha pasado a través de la hoja y la refleja de vuelta hacia las regiones que llevan clorofila (Nadakai, 2010). Analizando en profundidad se ha observado que *AtPAP2* regula negativamente los genes *LBD*, que participan en la organogénesis (Li *et al.*, 2018), lo que podría relacionarse con la incapacidad de este mutante para regenerar. Asimismo, se ha comprobado que determinados factores de transcripción MYB son responsables de la formación de los meristemos laterales (Schmitz *et al.*, 2001), por lo que una alteración en los mismos podría ser la responsable de la generación exagerada de brotes laterales en el mutante. En conjunto, esto nos da una idea de los diferentes procesos en los que puede estar implicado el gen afectado ya que provoca efectos pleiotrópicos en el desarrollo de la planta de tomate.

Por otro lado, el fenotipo mutante de la línea 1461 ET MM se caracterizó por una ralentización del crecimiento apical, junto con una clorosis generalizada y alteraciones en la morfología de sus hojas. En tomate, *LANCEOLATE* (*LA*) codifica factores de transcripción TCP, promueve la transición de la morfogénesis primaria a la etapa de histogénesis, definiendo el marco morfogenético dentro del cual se pueden formar las hojas (Mathan y Jenkins, 1962; Ori *et al.*, 2007). Se ha demostrado que varios de estos mecanismos también juegan un papel en la función del SAM. Los factores de transcripción de *HOMEODOMAIN* (*KNOX1*) son esenciales para el mantenimiento del SAM (Hake *et al.*, 2004) y también juegan un papel central en la modulación de las hojas compuestas (Bharathan *et al.*, 2002; Parnis *et al.*, 1997). En algunas especies de leguminosas, como el guisante y *Medicago*, los genes ortólogos *UNIFOLIATA* y *SINGLE LEAFLET*, respectivamente, también están involucrados en el desarrollo de la hoja (Hofer *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2008).

La clorosis puede ser consecuencia de un desarrollo radicular deficiente, sin embargo, los resultados de los injertos realizados nos indican que el fenotipo mutante depende fundamentalmente de la parte aérea. Es probable que la clorosis del mutante 1461 ET MM esté provocando una deficiente capacidad fotosintética. En trabajos previos se han encontrado mutantes de tomate con un aspecto clorótico debido a aspectos relacionados con los pigmentos fotosintéticos. En este sentido 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). El mutante *lutescent* de tomate también presenta hojas de color amarillo debido a una pérdida temprana y progresiva de clorofila (Barry *et al.*, 2012). Fallos en la biosíntesis de clorofila pueden alterar el desarrollo del cloroplasto, lo que resulta también en menor crecimiento de la planta en el tomate (Fan *et al.*, 2016).

La línea 1656 ET MM presentaba un fenotipo mutante caracterizado por la alteración del meristemo apical. Este fenotipo era similar al observado en la línea 1440 ET MM, pero, al contrario que ésta, el fenotipo mutante revertía y las plantas acababan mostrando un fenotipo WT. En nuestro grupo ya se habían observado en más ocasiones plantas con alteraciones en el desarrollo del ápice meristemático que no estaban producidas por una mutación genética, sino que eran debidos a motivos fisiológicos que

se veían modificados, por ejemplo, entre diferentes lotes de semillas. Por tanto, era importante corroborar que se trataba de un fenotipo producido por una mutación genética transmitible a la descendencia. Para ello, se utilizó la progenie de una planta mutante y se comprobó que toda ella presentaba el fenotipo mutante corroborándose así la naturaleza genética de la mutación.

En tomate se ha descrito el mutante *exp*, cuyo SAM está afectado y detiene su desarrollo, aunque en ocasiones recupera su actividad dando lugar a plantas anormales (Brand *et al.*, 2007). En el mutante 1656 ET MM, sin embargo, la actividad meristemática no se recupera, sino que se genera un nuevo ápice a partir de la activación de yemas axilares. En *Arabidopsis*, Lee *et al.* (2014) describieron un doble mutante (*sue slk2*) el cual carecía de meristemo apical. Los autores atribuían esta ausencia de ápice a la expresión reducida de los genes *KNOXI*, *STM*, *BREVIPEDCELLUS* y *KNAT2*. Además, elevar la expresión de *STM* junto con la existencia de *SLK2* restauraba el desarrollo de ápices. Los autores concluyeron que *SEU* (*SEUSS*) y *SLK2* (*SEUSS-LIKE 2*) tenían una función redundante para promover el desarrollo de ápices y probablemente eran responsables de la actividad de *KNOXI*. También se ha descrito la interacción entre miembros de la familia génica YABBY y el complejo represor transcripcional formado por *SEU* y *SKL2* junto con *LEUNIG* (*LUG*) y *LEUNIG_HOMOLOG* (*LUH*) (Sridhar *et al.*, 2004). El llamado complejo LUG-YAB promueve el inicio del meristemo apical embrionario y el mantenimiento del mismo (Stahle *et al.*, 2009). En resumen, los estudios hasta el momento nos sugieren que el control del meristemo apical y el desarrollo de la parte aérea, forman una compleja red génica donde algunos genes son imprescindibles, mientras que otros tienen funciones redundantes y su falta de expresión puede compensarse, logrando la supervivencia de la planta y la continuación de su crecimiento.

En estudios previos al presente trabajo, en la línea 1440 ET MM se identificó al mutante que denominamos *defects in shoot apical meristem 1* (*dam1*). La mutación *dam1* afecta al desarrollo del meristemo apical del tallo, el cual se detiene tras el desarrollo de las dos primeras hojas verdaderas. Las plantas se caracterizan por presentar menor tamaño, porte más débil y alteraciones en la filotaxis. El análisis bioinformático indicó que el inserto de T-DNA se localizaba en el cromosoma 4 del genoma de tomate, concretamente entre el segundo y tercer exón de un gen que codifica un factor de

transcripción de la familia WRKY. Estos factores de transcripción desempeñan un papel importante en la regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas (Ulker y Somssich, 2004; Rushton *et al.*, 2010). La proteína que codifica *DAM1* tiene dos homólogos, *AtWRKY13* de *Arabidopsis* y *OsWRKY79* de arroz. La función del gen *OsWRKY79* no ha sido dilucidada hasta el momento, mientras que la función del gen *AtWRKY13* ha sido descrita por Li y colaboradores (2015). Este gen actúa como regulador positivo del desarrollo del tallo y regula positivamente los niveles de transcritos de algunos genes de las rutas de biosíntesis de lignina y de la pared secundaria del esclerénquima (Li *et al.* 2015). No obstante, a diferencia del fenotipo observado en el mutante *wrky13* de *Arabidopsis*, el cual es capaz de continuar su desarrollo vegetativo, la mutación *dam1* afecta al meristemo apical del tallo, cuyo desarrollo queda detenido. Además, el mutante *dam1* presentó alteraciones en el patrón de filotaxis típico de tomate. Las diferencias entre los fenotipos mutantes observados en *Arabidopsis* y tomate sugieren que *DAM1* juega un papel clave en el mantenimiento de la actividad meristemática del ápice de tomate, mientras que en *Arabidopsis*, el gen *AtWRKY13* debe participar junto con otros genes en dicho proceso, dado que su falta de función no es suficiente para detener el desarrollo del tallo.

Estudios recientes sobre la red génica de control del SAM en *Arabidopsis*, han demostrado que numerosos reguladores transcripcionales del desarrollo (e.g. *AIL7/PLT7*, *TPC3* y *TPC4*) reprimen la expresión del gen *STM*, esencial para el desarrollo y la función continua del SAM (Li, 2015; Scofield *et al.*, 2018) tanto en el desarrollo embrionario como durante la regeneración adventicia (Che *et al.*, 2006). Scofield y colaboradores (2018) encontraron que estos factores de transcripción están asociados con múltiples aspectos de la función del meristemo, incluida la regulación hormonal (biosíntesis y transporte de auxina, señalización de citoquinina, biosíntesis de giberelinas), modificación de la pared celular y biosíntesis de carbohidratos (síntesis y modificación de celulosa, callosa, lignina y xiloglucano), control del crecimiento y diferenciación celular, morfogénesis tisular y desarrollo (principalmente de brotes, órganos reproductivos). En concreto, aquellos que se ha demostrado que reprimen a *STM* están relacionados con la filotaxis, promoviendo la diferenciación de las hojas e inhibiendo el desarrollo de los brotes (Koyama *et al.*, 2007, Prasad *et al.*, 2011, Kareem

et al., 2015). Estos trabajos nos sugieren que el gen *DAM1* podría regular, de igual modo, las funciones del gen *STM*, reprimiendo su expresión, dando lugar a que no se desarrolle el meristemo apical tras la diferenciación de las primeras hojas.

En definitiva, los resultados obtenidos en el presente trabajo nos aportan un valioso material para determinar algunos genes de importancia para el correcto funcionamiento del meristemo apical en las plantas de tomate, así como su relación con la regeneración adventicia. Se espera que en futuros trabajos se vayan conociendo cuáles son los genes alterados y cuál es su lugar dentro de esa compleja red de interacciones génicas que hace posible el desarrollo de la parte aérea de las plantas de tomate, para mejorar tanto el conocimiento básico como su posible utilización en mejora vegetal.

6.- CONCLUSIONES

- Se han analizado fenotípicamente cuatro líneas T-DNA de tomate preseleccionadas. En todas ellas se ha corroborado la presencia de un fenotipo mutante afectado en el desarrollo temprano de la parte aérea. Se ha procedido a su caracterización fenotípica y genética tanto *in vitro* como *in vivo*.

- Se han llevado a cabo los análisis del modo de herencia, del número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional y la existencia o no de cosegregación entre un inserto de T-DNA y el fenotipo mutante. Todas las mutaciones descritas presentaron una naturaleza monogénica recesiva. Además, en una de ellas ya se ha descartado la existencia de cosegregación y en otra se sabe que existe cosegregación. En las otras dos todavía se tienen que realizar más experimentos para concluir con este análisis.

- La línea 1302 ET MM se ha caracterizado por el colapso del SAM acompañado de un desarrollo de yemas axilares tanto *in vitro* como *in vivo*. Además, se observó clorosis en sus hojas, así como una progresiva acumulación de antocianos. Los ensayos de regeneración adventicia indican que esta línea tiene afectado este proceso ya que forma callo desorganizado, pero no yemas adventicias. Esta línea porta dos insertos de T-DNA con el gen *nptII* funcional, pero ninguno de ellos cosegrega con el fenotipo mutante.

- La línea 1461 ET MM se ha caracterizado por una ralentización del crecimiento apical tanto *in vitro* como *in vivo*. Además, se observó una morfología foliar alterada, así como la existencia de clorosis. Los injertos realizados indicaron que el fenotipo mutante de la parte aérea no está influido por el genotipo de la raíz. Al no haber aparecido todavía ninguna planta mutante sensible a la kanamicina no se puede descartar la hipótesis de existencia de cosegregación.

- La línea 1656 ET MM se ha caracterizado por un desarrollo anómalo del meristemo apical. Se ha comprobado que el fenotipo observado está causado por una alteración genética al observarlo en todas las plantas de una TG3 mutante. También se ha visto que el meristemo apical es capaz de reactivarse para dar un brote que se comporta de forma WT. Los ensayos de regeneración adventicia indicaron que esta línea no presenta alteraciones en dicho proceso y que los ápices obtenidos no muestran el fenotipo mutante ya que los brotes elongan normalmente. No se ha podido determinar

ni el número de insertos *nptII* funcionales ni la existencia de cosegregación en esta línea ya que presenta una segregación anómala de resistencia a la kanamicina.

- La línea 1440 ET MM se caracterizó por la detención del crecimiento del meristemo apical tras la formación de un par de hojas. Los ensayos de regeneración adventicia indicaron que esta línea tiene afectado dicho proceso ya que los ápices regenerados expresaron el fenotipo mutante. Tras la clonación del gen responsable de esta mutación mediante técnicas de Anchor-PCR, se ha iniciado el análisis funcional del gen *DAM1* mediante la obtención de plantas transgénicas con una construcción RNAi. Se han regenerado 18 plantas transgénicas, la mayoría de ellas con fenotipo WT, aunque una de ellas mostró un fenotipo similar al mutante. Se han obtenido progenies de varias de estas plantas WT para analizar su fenotipo. Se va a continuar el análisis funcional de dicho gen con la obtención de plantas transformadas con construcciones 35S (sobreeexpresión de gen) y CRISPR-Cas9 (anulación total mediante edición génica).

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), 397-414.
- Aida M., Ishida T., Fukaki H., Fujisawa H. y Tasaka M. (1997).** “Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant”, *Plant Cell*, 9, 841-857.
- Aida M., Ishida T. y Tasaka M. (1999).** “Shoot apical meristem and cotyledon formation during *Arabidopsis* embryogenesis: interaction among the *CUP-SHAPED COTYLEDON* and *SHOOTMERISTEMLESS* genes”, *Development*, 126, 1563-1570.
- André D., Colau D., Schell J., Van Montagu M. y Hernalsteens J. P. (1986).** “Gene tagging in plants T-DNA insertion mutagen that generates *APH* (3') II-plant gene fusions”, *Molecular and General Genetics*, 204 (3), 512-518.
- Atarés, A., Moyano, E., Morales, B., Schleicher, P., García-Abellán, J. O., Antón, T., . . . Pineda, B. (2011).** “An insertional mutagenesis programme with an enhancer trap for the identification and tagging of genes involved in abiotic stress tolerance in the tomato wild-related species *Solanum pennellii*”, *Plant Cell Reports*, 30(10), 1865.
- Bai, Y., 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), 1085–1094.
- Barkoulas M., Hay A., Kougioumoutzi E. y Tsiantis M. (2008).** “A developmental framework for dissected leaf formation in the *Arabidopsis* relative *Cardamine hirsute*”, *Nature Genetics*, 40, 1136–1141.
- 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), 1086-1098.
- Barton M. K. y Poethig R. S. (1993).** “Formation of the shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana*: an analysis of development in the wild type and in the shoot meristemless mutant”, *Development*, 119,823-831.
- Bauchet, G. y Causse, M. (2012).** “Genetic Diversity in tomato (*Solanum lycopersicum*) and its wild relatives”, *Genetic Diversity in Plants*, 199(351), 133-162.
- Bayer E. M., Smith R. S., Mandel T., Nakayama N., Sauer M., Prusinkiewicz P. y Kuhlemeier C. (2009).** “Integration of transport-based models for phyllotaxis and midvein formation”, *Genes Development*, 23, 373–384.
- Benková E., Michniewicz M., Sauer M., Teichmann T., Seifertová D., Jürgens G. y Friml J. (2003).** “Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation”, *Cell*, 115, 591–602.
- Berger Y, Harpaz-Saad S, Brand A, Melnik H, Sirding N, Alvarez JP, Zinder M, Samach A, Eshed Y y Ori N. (2009).** “The NAC-domain transcription factor GOBLET specifies leaflet boundaries in compound tomato leaves”, *Development*, 136, 823–832.

- Bergougnoux, V. (2014).** "The history of tomato: From domestication to biopharming", *Biotechnology Advances. Elsevier Inc.*, 32(1), 170-189.
- Bharathan, G., Goliber, T. E., Moore, C., Kessler, S., Pham, T. y Sinha, N. R. (2002).** "Homologies in leaf form inferred from *KNOX1* gene expression during development", *Science* 296, 1858 - 1860.
- 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), 1-19.
- Brand A., Shirding N., Shleizer S. y Ori N. (2007).** "Meristem maintenance and compound-leaf patterning utilize common genetic mechanisms in tomato". *Planta*, 226, 941-951.
- 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*, 153-192.
- Carles C.C. y Fletcher J.C. (2001).** "Shoot apical meristem maintenance: the art of a dynamic balance", *Trends in Plant Science*, 8, 394-401.
- 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), 145-146.
- Che P., Lall S., Nettleton D. y Howell S.H. (2006).** "Combined *SHOOT MERISTEMLESS* and *WUSCHEL* trigger ectopic organogenesis in *Arabidopsis*" *Plant Physiol*, 141(2), 620-37
- Clark S. E., Running M. P., Meyerowitz E.M. (1993).** "*CLAVATA1*, a regulator of meristem and flower development in *Arabidopsis*", *Development*, 119, 397-418.
- David-Schwartz R., Koenig D. y Sinha N. R (2009).** "*LYRATE* is a key regulator of leaflet initiation and lamina outgrowth in Tomato". *The Plant Cell*, 21, 3093 3104.
- Davies P. J. (1995).** "The plant hormones: their nature, occurrence and functions" in plant Hormones Physiology, Biochemistry and Molecular Biology, ed. P.J. Davies (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers) pp.: 1–12.
- Deng, L., Pan, Y., Chen, X., Chen, G. y Hu, Z. (2013).** "Small RNAs were involved in homozygous state-associated silencing of a marker gene (*Neomycin phosphotransferase II: nptII*) in transgenic tomato plants", *Plant Physiology and Biochemistry*, 68, 8–15.
- Dengler, N. G. (1984).** "Comparison of Leaf Development in *Normal (+/+)*, *Entire (e/e)*, and *Lanceolate (La/+)* Plants of Tomato, *Lycopersicon esculentum* "Ailsa Craig.", *Botanical Gazette*, 145(1), 66–77.
- Dodsworth S. (2009).** "A diverse and intricate signalling network regulates stem cell fate in the shoot apical meristem", *Developmental Biology*, 336, 1–9.
- Duncan, R. R. (1997).** "Tissue culture-induced variation and crop improvement", *Advances in Agronomy*, 58(1), 201-240.
- Efroni I., Han S. K., Kim H. J.; Wu M. F., Steiner E., Birnbaum K. D., Hong J. C., Eshed Y. y Wagner D. (2013).** "Regulation of leaf maturation by chromatin-mediated modulation of cytokinin responses", *Developmental Cell*, 24, 438–445.

- Fan M., Gao S., Ren J., Yang Q., Li H., Yang C. y Ye Z. (2016)** “Overexpression of *SIRBZ* Results in Chlorosis and Dwarfism through Impairing Chlorophyll, Carotenoid, and Gibberellin Biosynthesis in Tomato”, *Front. PlantSci.*7, 907.
- FAO, 2019.** FAOSTAT, Datos sobre alimentación y agricultura. [En línea]. Available at: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>. [Último acceso: 5 de septiembre de 2019].
- Feldmann, K. A. (1991)** “T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: mutational spectrum”, *The Plant Journal*, 1(1), 71-82.
- Franzman L. H., Yoon E. S. y Meinke D. W. (1995).** “Saturating the map of *Arabidopsis thaliana* with embryonic mutations”, *Plant Journal*, 7(2), 341-350.
- Foolad M. R. (2007).** “Genome mapping and molecular breeding of tomato”, *International Journal of Plant Genomics*. 52 pages.
- 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 assesment of genetic and epigenetic stability in regenerated plantlets”, *Journal of Plan Groth Regulation*, 29 (2), 257-267.
- Garcia-Gonzales R., Quiroz K., Carrasco B., Caligari P. (2010).** “Plant tissue culture: Current status, opportunities and challenges”. *Ciencia e Investigación Agraria*. 37(3), 5-30.
- Gascuel, Q., Diretto, 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), 1-24.
- Germanà, M. A. (2011).** “Another culture for haploid and doubled haploid production”, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 104(3), 283-300.
- Gidoni D., Fuss E., Burbidge A., Speckmann G. J., James S., Nijkamp D., Mett A., Feiler J., Smoker M., de Vroomen M. J., Leader D., Liharska T., Groenendijk J., Coppoolse E., Smit J. J. M., Levin I., de Both M., Schuch W., Jones J. D. G., Taylor I. B., Theres K. y van Haaren M. J. J. (2003).** “Multi-functional T-DNA/Ds tomato lines designed for gene cloning and molecular and physical dissection of the tomato genome”, *Plant Molecular Biology*, 51, 83-98.
- Giulini A., Wang J. y Jackson D. (2004).** “Control of phyllotaxy by the cytokinin inducible response regulator homologue *ABPHYL1*”. *Nature*, 430, 1031–1034.
- Gordon S. P., Chickarmane V. S., Ohno C. y Meyerowitz E. M. (2009).** “Multiple feedback loops through cytokinin signaling control stem cell number within the *Arabidopsis* shoot meristem”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 16529–16534.
- Greenboim-Wainberg Y., Maymon I., Borochof R., Alvarez J., Olszewski N., Ori N., Eshed Y. y Weiss D. (2005).** “Crosstalk between gibberellin and cytokinin: the *Arabidopsis* GA response inhibitor SPINDLY plays a positive role in cytokinin signaling”, *Plant Cell*, 17, 92–102.
- Hake, S., Smith, H. M., Holtan, H., Magnani, E., Mele, G. y Ramirez, J. (2004).** “The role of knox genes in plant development” *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 125 -15.

- Hay A., Barkoulas M. y Tsiantis M. (2006).** “ASYMMETRIC LEAVES1 and auxin activities converge to repress *BREVIPEDICELLUS* expression and promote leaf development in *Arabidopsis*”, *Development*, 133, 3955–3961.
- Heisler M. G., Ohno C., Das P., Sieber P., Reddy G. V., Long J. A. y Meyerowitz E. M. (2005).** “Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the *Arabidopsis* inflorescence meristem”, *Current Biology*, 15, 1899–1911
- Herman L., Jacobs A., Montagu M. V. y Depicker A. (1990).** “Plant chromosome/marker gene fusion assay for study of normal and truncated T-DNA integrations event”, *Molecular and General Genetics*, 224 (2), 248-256.
- Hofer J., Turner L., Hellens R., Ambrose M., Matthews P., Michael A. y Ellis N. (1997).** “*UNIFOLIATA* regulates leaf and flower morphogenesis in pea”. *Curr. Biol.* 7, 581-587.
- 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), 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), 561-570.
- Jung K-H., An G. y Ronald P. C. (2008).** “Towards a better bowl of rice: assigning function to tens of thousands of rice genes”, *Nature Reviews Genetics*. 9, 91–101.
- Kareem A, Durgaprasad K, Sugimoto K, Du Y, Pulianmackal AJ, Trivedi ZB, Abhayadev PV, Pinon V, Meyerowitz EM, Scheres B. y Prasad K. (2015)** “*PLETHORA* Genes Control Regeneration by a Two-Step Mechanism” *Curr Biol.*, 25(8),1017-30.
- Keddie J. S., Carroll B. J., Thomas C. M., Reyes M. E. C., Klimyuk V., Holtan H., Grissem W. y Jones J. D. G. (1998).** “Transposon tagging of the *Defective embryo and meristems* gene of tomato”, *The Plant Cell*, 10, 877-887.
- 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, 85-98.
- Koncz C., Martini N., Mayerhofer R., Koncz-Kalman Z., Körber H., Redei G. P. y Schell J. (1989).** “High-frequency T-DNA-mediated gene tagging in plants”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86, 8467–8471.
- Koncz, C., Németh, K., Rédei, G. P. y Schell, J. (1992)** “T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis*”, *Plant Molecular Biology*, 20(5), 963-976.
- Koyama T, Furutani M, Tasaka M y Ohme-Takagi M (2007)** “TCP transcription factors control the morphology of shoot lateral organs via negative regulation of the expression of boundary-specific genes in *Arabidopsis*” *Plant Cell*, 19(2), 473-84.

- 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), 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), 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), 555-562.
- Lee J. E., Lampugnani E. R., Bacic A. y Golz J. F. (2014). "SEUSS and SEUSS-LIKE 2 coordinate auxin distribution and *KNOX1* activity during embryogenesis". *The Plant Journal*, 80,122-135.
- 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), 319-329.
- Li N., Wu H., Ding Q., Li H., Li Z., Ding J. y Li Y. (2018) "The heterologous expression of *Arabidopsis* PAP2 induces anthocyanin accumulation and inhibits plant growth in tomato", *Functional & Integrative Genomics*, 18 (3), 341-353.
- Li S. (2015) "The *Arabidopsis thaliana* TCP transcription factors: a broadening horizon beyond development", *Plant Signal. Behav.*, 10, e1044192.
- Li W., Tian, Z. y Yu, D. (2015). "WRKY13 acts in stem development in *Arabidopsis thaliana*". *Plant Science*, 236, 205-213.
- Martí E., Gisbert C., Bishop G.J., Dixon M.S. y García-Martínez, J. L. (2006). "Genetic and physiological charectization of tomato cv. Micro-Tom", *Journal Of Experimental Botany*, 57 (9), 1689-1703.
- Mathan, D. S. y Jenkins, J. A. (1962). "A morphogenetic study of *Lanceolate*, a leaf shape mutant in the tomato". *Am. J. Bot.* 49,504 -514
- 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), 1689-1703.
- Mathieu M., Winters E., Kong F., Wan J., Wang S., Eckert H., Luth D., Paz M., Donovan C., Zhang Z., Somers D., Wang K., Nguyen H., Shoemaker R. C., Stacey G. y Clemente T. (2009). "Establishment of a soybean (*Glycine max* Merr. L) transposon-based mutagenesis repository". *Planta*, 279–89.
- Mayer. K. F. X., Schoof H., Haecker A., Lenhard M.; Jürgens G. y Laux T. (1998). "Role of *WUSCHEL* in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem", *Cell*, 95, 805-815
- 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), 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), 1465-1472.

- 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), 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), 625-635.
- Multani, D. (2003).** "Loss of an MDR Transporter in Compact Stalks of Maize *br2* and Sorghum *dw3* Mutants", *Science*, 302 (5642), 81-84.
- Murashige T. y Skoog F. (1962).** "A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures", *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- Nadakal A. M. (2010)** "Carotenoids and Chlorophyllic Pigments in the Marine Snail, *Cerithidea Californica* Haldeman, Intermediate Host for Several Avian Trematodes", Marine Biological Laboratory. JSTOR, n.d. Web.
- Ori, N., Cohen, A. R., Etzioni, A., Brand, A., Yanai, O., Shleizer, S., Menda, N., Amsellem, Z., Efroni, I., Pekker, I. et al. (2007).** "Regulation of *LANCEOLATE* by miR319 is required for compound-leaf development in tomato", *Nat. Genet.* 39,787 -791.
- Parnis, A., Cohen, O., Gutfinger, T., Hareven, D., Zamir, D. y Lifschitz, E. (1997).** "The dominant developmental mutants of tomato, *Mouse-ear* and *Curl*, are associated with distinct modes of abnormal transcriptional regulation of a Knotted gene", *Plant Cell* 9, 2143 -2158.
- 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., Castañeza, 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), 1439-1452.
- Poethig R. S. (1987).** "Clonal analysis of cell lineage patterns in plant development". *American Journal of Botany*, 74, 581-594.
- Poethig R. S. y Sussex I. M. (1985).** "The developmental morphology and growth dynamics of the tobacco leaf", *Planta*, 165, 158-169.
- Prasad K, Grigg SP, Barkoulas M, Yadav RK, Sanchez-Perez GF, Pinon V, Blilou I, Hofhuis H, Dhonukshe P, Galinha C, Mähönen AP, Muller WH, Raman S, Verkleij AJ, Snel B, Reddy GV, Tsiantis M y Scheres B (2011)** "Arabidopsis *PLETHORA* transcription factors control phyllotaxis", *Curr Biol*, 21(13), 1123-8.
- Radhamony R. S., Prasad A. M. y Srinivasan R. (2005).** "T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis*. A tool for functional genomics", *Electronic Journal of Biotechnology*, 8(1), 83-106.
- Reinhardt D., Pesce E. R., Stieger P., Mandel T., Baltensperger K. y Bennett M. (2003).** "Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport", *Nature*, 426, 255–260.
- Rieu I. y Laux T. (2009).** "Signaling pathways maintaining stem cells at the plant shoot apex", *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20, 1083–1088.

- 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), 243-253.
- Risopatron J.P.M., Sun Y. y Jones B.J. (2010). "The vascular cambium: molecular control of cellular structure", *Protoplasma*. 247, 145-161.
- Rodríguez, A. (2016). Caracterización de un mutante de inserción de T-DNA de tomate (*Solanum lycopersicum*) alterado en el desarrollo vegetativo. Trabajo final de Máster. Universidad de Almería.
- Rushton, P.J., Somssich, I.E., Ringler, P. y Shen, Q.J. (2010). "WRKY transcription factors". *Trends in Plant Science*, 15 (5), 247-258.
- 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.
- Satina S., Blakeslee A. F. y Avery A. G. (1940). "Demonstration of the three germ layers in the shoot apex of *Datura* by means of induced polyploidy in periclinal chimeras". *American Journal of Botany*, 27, 895-905.
- Scarpella E., Marcos D., Friml J. y Berleth T. (2006). "Control of leaf vascular patterning by polar auxin transport", *Genes Development*, 20, 1015–1027.
- 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), 550-551.
- Schoof H., Lenhard M., Haecker A., Mayer K.F.X., Jürgens G. y Laux T. (2000). "The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes", *Cell*, 100, 635-644.
- Schmitz G., Tillmann E., Carriero F., Fiore C., Cellini F. y Theres K. (2001) "The tomato *Blind* gene encodes a MYB transcription factor that controls the formation of lateral meristems", *PNAS*, 99(2), 1064–1069.
- Scofield S., Murison A., Jones A., Fozard J., Aida M., Band L.R., Bennett M. y Murray J.A.H. (2018) "Coordination of meristem and boundary functions by transcription factors in the *SHOOT MERISTEMLESS* regulatory network", *Development*, 145(9): dev157081.
- Shahin, E. A. (1985). "Totipotency of tomato protoplast", *TAG Theoretican and Applied Genetics*, 69(3), 235-240.
- Shani E., Ben-Gera H., Shleizer-Burko S., Burko Y., Weiss D. y Ori N. (2010). "Cytokinin regulates compound leaf development in tomato", *Plant Cell*, 22, 3206–3217.
- Springer, P. S. (2000). "Gene traps: tools for plant development and genomics", *The Plan Cell*, 12(7), 1007-1020.

- Sridhar V.V., Surendrarao A., Gonzalez D., Conlan R.S. y Liu Z. (2004)** “Transcriptional repression of target genes by *LEUNIG* and *SEUSS*, two interacting regulatory proteins for *Arabidopsis* flower development” *Proc Natl Acad Sci.*, 101(31), 11494-9.
- Steeves T. A. y Sussex I. M. (1989).** “Patterns in Plant Development”, New York: Cambridge University Press.
- Stahle M.I., Kuehlich J., Staron L., von Arnim A.G. y Golz J.F. (2009)** “YABBYs and the Transcriptional Corepressors *LEUNIG* and *LEUNIG_HOMOLOG* Maintain Leaf Polarity and Meristem Activity in *Arabidopsis*”. *Plant Cell*, 21, 3105 - 3118.
- Tani H., Chen X., Nurmberg P., Grant J. J., SantaMaria M., Chini A., Gilroy A., Birch P. R. y Loake G. J. (2004).** “Activation tagging in plants: a tool for gene discovery”, *Functional & Integrative Genomics*. 4, 258–66.
- Terry, M. J. y Kendrick, R. E. (1996)** “The *aurca* and *yellow-green-2* mutants of tomato are deficient in phytochrome chromophore synthesis”, *The Journal of Biological Chemistry*, 271(35), 21681-21686.
- The Tomato Genome Consortium. (2012).** “The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution”, *Nature*, 485 (7400), 635–641.
- Thole V., Alves S. C., Worland B., Bevan M. W. y Vain P. (2009).** “A protocol for efficiently retrieving and characterizing flanking sequence tags (ESTs) in *Brachypodium distachyon* T-DNA insertional mutants”, *Nature Protocols*. 4, 650–661.
- Tzfira, T., Vaidya, M. y Citovsky, V. (2004).** “Involvement of targeted proteolysis in plant genetic transformation by *Agrobacterium*”, *Nature*, 431(7004), 87-92.
- Ulker, B. y Somssich, I.E. (2004).** “WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function”. *Current Opinion in Plant Biology*, 7 (5), 491-498.
- Van Lijsebettens M., Vanderhaeghen R. y Van Montagu M. (1991).** “Insertional mutagenesis in *Arabidopsis thaliana*: isolation of a T-DNA-linked mutation that alters leaf morphology”, *Theoretical and Applied Genetics*, 81 (2), 277–284.
- Wang H., Chen J., Wen J., Tadege M., Li G., Liu Y., Mysore K. S., Ratet P. y Chen R. (2008).** “Control of compound leaf development by *FLORICAULA/LEAFY* ortholog *SINGLE LEAFLET1* in *Medicago truncatula*”. *Plant Physiol.* 146, 1759 -1772.
- Werner T., Motyka V., Laucou V., Smets R., VanOnckelen H. y Schmölling T. (2003).** “Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations in dictating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity”, *Plant Cell*, 15, 2532–2550.
- Yanai O., Shani E., Dolezal K., Tarkowski P., Sablowski R., Sandberg G., Samach A. y Ori N. (2005).** “*Arabidopsis* KNOXI proteins activate cytokinin biosynthesis”, *Current Biology*, 15, 1566–1571.
- Yoshida S., Mandel T. y Kuhlemeier C. (2011).** “Stem cell activation by light guides plant organogenesis”, *Genes Development*, 25, 1439–1450.

Zuriaga E., Blanca J., y Nuez F. (2009). "Classification and phylogenetic relationships in *Solanum* section *Lycopersicon* based on AFLP and two nuclear gene sequences", *Genetic Resources and Crop Evolution*, 56(5), 663–678.

