

# Índice general

---

<b>Índice</b> .....	I
<b>Índice de figuras</b> .....	IX
<b>Índice de tablas</b> .....	XI
<b>Resúmenes</b> .....	XVII

## Índice

<b>1. Introducción</b> .....	1
1.1. Origen del tomate.....	1
1.2. Taxonomía.....	3
1.3. Descripción botánica.....	6
1.4. Importancia económica del tomate.....	7
1.5. La salinidad.....	9
1.5.1. Problemática de la salinidad y limitación de las áreas de cultivo....	9
1.5.2. Efectos del estrés salino en plantas.....	12
1.5.3. Mecanismos que determinan tolerancia a la salinidad.....	13
1.5.3.1. El ajuste osmótico.....	14
1.5.3.2. Homeostasis iónica.....	16
1.5.3.2.1 Regulación de la homeostasis iónica a través de la ruta SOS.....	19
1.5.3.3. Defensa frente al estrés oxidativo.....	25
1.5.4. Mejora de la tolerancia a la salinidad mediante transformación genética.....	27
1.5.5. Especies silvestres afines al tomate como fuente de variabilidad genética para la mejora de la tolerancia a la salinidad.....	33

1.5.6. El empleo de mutantes para la identificación de determinantes de la tolerancia a la salinidad.....	37
<b>2. Antecedentes y objetivos.....</b>	<b>43</b>
<b>3. Materiales y Métodos.....</b>	<b>49</b>
3.1. Material vegetal.....	49
3.2. Técnicas básicas de cultivo <i>in vitro</i> .....	49
3.2.1. Esterilización de semillas.....	49
3.2.2. Germinación y obtención de plántulas axénicas.....	50
3.2.3. Cultivo de explantes primarios.....	50
3.2.4. Regeneración de plantas a partir de explantes primarios.....	50
3.2.5. Determinación del nivel de ploidía de las plantas regeneradas mediante citometría de flujo.....	51
3.3. Transformación genética.....	52
3.3.1. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> : cepa bacteriana, plásmido y genes incluidos en el T-DNA.....	52
3.3.2. Cultivo de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	52
3.3.3. Método de transformación: selección y regeneración de plantas transgénicas.....	53
3.3.4. Enraizamiento de los brotes transgénicos.....	54
3.3.5. Aclimatación y trasplante.....	54
3.4. Escrutinio <i>in vitro</i> de la colección de líneas T-DNA para la identificación de mutantes afectados en el grado de tolerancia a la salinidad.....	55
3.4.1. Esterilización, germinación y siembra de las semillas.....	55
3.4.2. Diseño experimental.....	55
3.4.3. Análisis genético de un mutante identificado <i>in vitro</i> en condiciones salinas.....	55
3.4.4. Metodologías para realizar los análisis de cosegregación.....	61
3.5. Evaluación <i>in vivo</i> del fenotipo mutante.....	63
3.5.1. Esterilización de semillas, germinación y obtención de plántulas axénicas.....	63
3.5.2. Sistema de cultivo.....	63
3.6. Análisis funcional del gen PMS.....	64
3.6.1. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	64

3.6.2. Método de transformación: selección y regeneración de plantas transgénicas.....	64
3.6.3. Enraizamiento de los brotes transgénicos.....	64
3.6.4. Aclimatación y trasplante.....	64
3.6.5. Evaluación del fenotipo mutante.....	64
<b>4. Resultados.....</b>	
4.1. Generación de líneas T-DNA de tomate, <i>Solanum pimpinellifolium</i> y <i>S. cheesmaniae</i> .....	65
4.2. Identificación de mutantes en condiciones de cultivo <i>in vitro</i> .....	71
4.3. Mutantes de tomate alterados en caracteres del desarrollo (mutantes Vitro-Dev).....	75
4.3.1. Mutantes que exhiben albinismo: <i>tom2158</i> , <i>tom2297</i> y <i>tom2372</i> .....	75
4.3.1.1 <i>tom2158</i> .....	75
4.3.1.1.1. Análisis genético del mutante en cultivo <i>in vitro</i> .....	75
4.3.1.1.2. Determinación del número de insertos con nptII funcional.....	76
4.3.1.1.3. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto con nptII funcional.....	76
4.3.1.2. <i>tom2297</i> .....	77
4.3.1.2.1. Análisis genético del mutante en cultivo <i>in vitro</i> .....	77
4.3.1.2.2. Determinación del número de insertos con nptII funcional.....	78
4.3.1.2.3. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto con nptII funcional.....	78
4.3.1.3. <i>tom2372</i> .....	79
4.3.1.3.1. Análisis genético del mutante en cultivo <i>in vitro</i> .....	79
4.3.1.3.2. Determinación del número de insertos con nptII funcional.....	80
4.3.1.3.3. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto con nptII funcional.....	80
4.3.2. Mutantes alterados en el color o la morfología de la hoja: <i>tom1284</i> .....	83
4.3.2.1. Análisis genético del mutante en cultivo <i>in vitro</i> .....	83

4.3.2.2. Determinación del número de insertos con nptII funcional.....	84
4.3.2.3. Visualización de los fenotipos mutantes en invernadero.....	85
4.3.2.4. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto con nptII funcional.....	86
4.3.3. Mutantes afectados en la síntesis de clorofila: <i>tom1914</i> .....	88
4.3.3.1. Análisis genético del mutante en cultivo <i>in vitro</i> .....	88
4.3.3.2. Determinación del número de insertos con nptII funcional.....	89
4.3.3.3. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto con nptII funcional.....	89
4.3.3.4. Obtención de líneas para el mapeo del gen mutado.....	90
4.3.4. Mutantes que mueren en estadio de plántula (seedling lethal).....	93
4.3.4.1. <i>tom338</i> .....	93
4.3.4.1.1. Análisis genético del mutante en cultivo <i>in vitro</i> .....	93
4.3.4.1.2. Determinación del número de insertos con nptII funcional.....	94
4.3.4.1.3. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto con nptII funcional.....	94
4.3.4.2. <i>tom1738</i> .....	95
4.3.4.2.1. Análisis genético del mutante en cultivo <i>in vitro</i> .....	95
4.3.4.2.2. Determinación del número de insertos con nptII funcional.....	96
4.3.4.2.3. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto en la progenie TG2.....	96
4.3.4.2.4. Análisis de cosegregación con progenies de retrocruzamiento.....	98
4.3.5. Mutantes con alteración en el sistema radicular.....	101
4.3.5.1. <i>tom1608</i> .....	101
4.3.5.1.1. Análisis genético del mutante en cultivo <i>in vitro</i> .....	101
4.3.5.1.2. Determinación del número de insertos con nptII funcional.....	102
4.3.5.1.3. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto con nptII funcional.....	102
4.3.5.2. <i>tom1456</i> .....	104

4.3.5.2.1. Análisis genético del mutante en cultivo <i>in vitro</i> .....	104
4.3.5.2.2. Determinación del número de insertos con nptII funcional.....	105
4.3.5.2.3. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto con nptII funcional.....	106
4.3.6. Mutantes con alteraciones en el desarrollo vegetativo: <i>tom1425</i> ..	110
4.3.6.1. Análisis genético del mutante en cultivo <i>in vitro</i> .....	110
4.3.6.2. Determinación del número de insertos con nptII funcional.....	111
4.3.6.3. Visualización del fenotipo mutante en invernadero.....	111
4.3.6.4. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto con nptII funcional.....	112
4.3.7. Mutantes con alteraciones en el ápice meristemático: <i>tom1310</i> ...	115
4.3.7.1. Análisis genético del mutante en cultivo <i>in vitro</i> .....	115
4.3.7.2. Determinación del número de insertos con nptII funcional.....	116
4.3.7.3. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto con nptII funcional.....	117
4.3.7.4. Visualización del fenotipo mutante en invernadero.....	117
4.3.7.5. Obtención de líneas para el mapeo del gen mutado.....	119
4.3.8. Mutantes que exhiben manchas foliares. <i>tom2142</i> .....	120
4.3.8.1. Análisis genético del mutante en cultivo <i>in vitro</i> .....	120
4.3.8.2. Determinación del número de insertos con nptII funcional.....	121
4.3.8.3. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto con nptII funcional.....	121
4.4. Mutantes Vitro-Dev de <i>Solanum pimpinellifolium</i> .....	125
4.4.1. Mutante de <i>S. pimpinellifolium</i> alterado en el desarrollo vegetativo.....	125
4.4.1.1. Análisis genético del mutante en cultivo <i>in vitro</i> .....	125
4.4.1.2. Determinación del número de insertos con nptII funcional.....	126
4.4.1.3. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto con nptII funcional.....	126
4.4.1.4. Visualización del fenotipo mutante en invernadero.....	127
4.4.2. Mutante de <i>S. pimpinellifolium</i> con alteraciones en el sistema radicular.....	129
4.4.2.1. Análisis genético del mutante en cultivo <i>in vitro</i> .....	129

4.4.2.2. Determinación del número de insertos con nptII funcional.....	130
4.4.2.3. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto con nptII funcional.....	130
4.4.2.4. Visualización del fenotipo mutante en invernadero.....	131
4.5. Mutantes Vitro-Dev de <i>Solanum cheesmaniae</i> .....	133
4.5.1. Mutante de <i>S. cheesmaniae</i> alterado en el desarrollo vegetativo...	133
4.5.1.1. Análisis genético del mutante en cultivo <i>in vitro</i> .....	133
4.5.1.2. Determinación del número de insertos con nptII funcional.....	134
4.5.1.3. Visualización de los fenotipos mutantes en invernadero.....	134
4.5.1.4. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto con nptII funcional.....	135
4.5.2. Mutantes de <i>S. cheesmaniae</i> afectados en la síntesis de clorofila.	137
4.5.2.1. Análisis genético de los mutantes <i>ch14</i> , <i>ch27</i> y <i>ch29</i> en cultivo <i>in vitro</i> .....	137
4.5.2.2. Determinación del número de insertos con nptII funcional.....	138
4.5.2.3. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto con nptII funcional.....	139
4.6. Mutantes afectados en el nivel de tolerancia a la salinidad.....	143
4.6.1. <i>tom1560</i> .....	143
4.6.1.1. Análisis genético del mutante en cultivo <i>in vitro</i> .....	143
4.6.1.2. Recuperación del fenotipo silvestre en plantas con fenotipo mutante.....	145
4.6.1.3. Determinación del número de insertos con nptII funcional.....	146
4.6.1.4. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto con nptII funcional.....	146
4.6.1.5. Corroboración de la respuesta hipersensible en invernadero.	147
4.6.2. <i>tom1303</i> .....	150
4.6.2.1. Análisis genético del mutante en cultivo <i>in vitro</i> .....	150
4.6.2.2. Determinación del número de insertos con nptII funcional.....	151
4.6.2.3. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto con nptII funcional.....	152
4.6.2.4. Recuperación del fenotipo silvestre en plantas con fenotipo mutante.....	152
4.6.2.5. Corroboración de la respuesta hipersensible en invernadero.	153

4.6.3. <i>pms-916</i> .....	155
4.6.3.1. Análisis genético del mutante en cultivo <i>in vitro</i> .....	155
4.6.3.2. Corroboración de la respuesta hipersensible en invernadero.	156
4.6.3.3. Determinación del número de insertos con nptII funcional.....	157
4.6.3.4. Segregación del inserto responsable del fenotipo mutante....	159
4.6.3.5. Análisis de cosegregación fenotipo-inserto con nptII funcional.....	161
4.6.3.6. Caracterización fenotípica de la respuesta hipersensible en <i>pms-916</i> .....	163
4.6.3.7. Análisis funcional del gen etiquetado en tomate: caracterización del fenotipo en líneas silenciadas.....	165
<b>5. Discusión</b> .....	
5.1. Generación de líneas T-DNA de tomate cultivado y silvestre.....	169
5.2. Cribado de la colección de líneas de T-DNA para la identificación de mutantes alterados en el grado de tolerancia a la salinidad.....	173
5.3. Detección <i>in vitro</i> de mutaciones que afectan a caracteres del desarrollo.....	178
5.4. Detección <i>in vitro</i> de mutaciones que promueven mayor sensibilidad a salinidad.....	198
<b>6. Conclusiones</b> .....	207
<b>7. Bibliografía</b> .....	209