

Trabajo de Fin de Máster con título:

**Identificación y Caracterización de Mutantes
Afectados en el Desarrollo Temprano en
Líneas T-DNA de Tomate y *Solanum
pimpinellifolium***

Autor

Jesús Praena Tamayo

Directores

Alejandro Atarés Huerta

Benito José Pineda Chaza

**Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas
(IBMCP)**

Universidad Politécnica de Valencia (UPV)

Enero, 2017

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema del vector pD991 (trampa de intensificadores) empleado en la generación de líneas T-DNA.....	13
Figura 2. Comparación fenotípica de plántulas WT y mutante de 8 días de la línea 2642 ETMM.	18
Figura 3. Comparación fenotípica de plantas axénicas WT y mutante en diferentes medios de la línea 2642 ETMM.....	19
Figura 4. Comparación fenotípica de plántulas WT y mutante de 8 días de la línea 207 ETPI..	21
Figura 5. Evaluación de la capacidad de regeneración en cotiledones WT y mutantes de la línea 207 ETPI tras 25 días en medio de regeneración IKZ..	22
Figura 6. Fenotipo de la planta axénica mutante de la línea 207 ETPI tras su cultivo en medio básico MB3..	22
Figura 7. Fenotipo de réplicas clonales de una planta mutante de la línea 207 ETPI.	23
Figura 8. Comparación fenotípica de plántulas WT y mutante de 8 días de la línea 2660 ETMM.	25
Figura 9. Comparación fenotípica de plantas axénicas WT y mutante de la línea 2660 ETMM tras 25 días de cultivo en MB3.....	26
Figura 10. Comparación fenotípica de plántula WT y mutante de la línea 2660 ETMM cultivadas en maceta.....	26
Figura 11. Comparación fenotípica de plantas axénicas WT y mutante de la línea 191 ETPI..	29
Figura 12. Comparación fenotípica de plantas axénicas WT y M de la línea 2059 ETMM obtenidas a partir del cultivo de ápices meristemáticos..	31
Figura 13. Comparación fenotípica de plantas procedentes de semillas WT y M de la línea 2059 ETMM cultivadas en el invernadero durante 70 días.....	32
Figura 14. Diferencias fenotípicas entre plantas WT y mutantes de la línea 2059 ETMM tras 30 días de cultivo en medio IBA.....	33
Figura 15. Diferencias fenotípicas entre plantas WT y mutantes de la línea 2059 ETMM tras 70 días de cultivo en el invernadero.....	33
Figura 16. Comparación fenotípica de plantas axénicas WT y M de la línea 2099 ETMM.....	35
Figura 17. Comparación fenotípica de plantas WT y mutante de la línea 2099 ETMM cultivadas en el invernadero durante 70 días.....	36
Figura 18. Diferencias fenotípicas entre plantas WT y mutantes de la línea 2099 ETMM tras 30 días de cultivo en medio IBA.....	37
Figura 19. Diferencias fenotípicas entre plantas WT y mutantes de la línea 2099 ETMM tras 70 días de cultivo en el invernadero.....	37
Figura 20. Comparación fenotípica de plantas axénicas WT y M de la línea 2659 ETMM procedentes del cultivo de ápices meristemáticos en MB3 durante 30 días.....	39

Figura 21. Comparación fenotípica de plantas axénicas WT y mutante de la línea 2659 ETMM obtenidas tras el cultivo de ápices meristemáticos en IBA durante 30 días.....	40
Figura 22. Comparación fenotípica de plantas WT y mutante de la línea 2659 ETMM cultivadas en el invernadero durante 90 días.....	41
Figura 23. Diferencias fenotípicas entre plantas WT y mutantes de la línea 2659 ETMM tras 30 días de cultivo en medio IBA.....	42
Figura 24. Diferencias fenotípicas entre plantas WT y mutantes de la línea 2659 ETMM tras 30 días de cultivo en el invernadero.....	42
Figura 25. Comparación fenotípica y disección floral de la línea 2659 ETMM.....	43
Figura 26. Comparación fenotípica de frutos verde inmaduros de la línea 2659 ETMM.....	44

Índice de tablas

Tabla 1. Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante de la línea 2642 ETMM.	20
Tabla 2. Análisis de la segregación para resistencia a kanamicina de la línea 2642 ETMM.	20
Tabla 3. Análisis de cosegregación entre el fenotipo mutante y un inserto de T-DNA con el gen nptII funcional en la línea 2642 ETMM.	20
Tabla 4. Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante de la línea 207 ETPI.	24
Tabla 5. Análisis de la segregación para resistencia a kanamicina de la línea 207 ETPI.	24
Tabla 6. Análisis de cosegregación entre el fenotipo mutante y un inserto de T-DNA con el gen nptII funcional en la línea 207 ETPI.	25
Tabla 7. Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante de la línea 2660 ETMM.	27
Tabla 8. Análisis de la segregación para resistencia a kanamicina de la línea 2660 ETMM.	27
Tabla 9. Análisis de cosegregación entre el fenotipo mutante y un inserto de T-DNA con el gen nptII funcional en la línea 2660 ETMM.	28
Tabla 10. Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante de la línea 191 ETPI.	30
Tabla 11. Análisis de la segregación para resistencia a kanamicina de la línea 191 ETPI.	30
Tabla 12. Análisis de cosegregación entre el fenotipo mutante y un inserto de T-DNA con el gen nptII funcional en la línea 191 ETPI.	31
Tabla 13. Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante de la línea 2059 ETMM.	33
Tabla 14. Análisis de la segregación para resistencia a kanamicina de la línea 2059 ETMM.	34
Tabla 15. Análisis de cosegregación entre el fenotipo mutante y un inserto de T-DNA con el gen nptII funcional en la línea 2059 ETPI.	34
Tabla 16. Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante de la línea 2099 ETMM.	37
Tabla 17. Análisis de la segregación para resistencia a kanamicina de la línea 2099 ETMM.	38
Tabla 18. Análisis de cosegregación entre el fenotipo mutante y un inserto de T-DNA con el gen nptII funcional en la línea 2099 ETPI.	38
Tabla 19. Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante de la línea 2659 ETMM.	45
Tabla 20. Análisis de la segregación para resistencia a kanamicina de la línea 2659 ETMM.	45
Tabla 21. Análisis de cosegregación entre el fenotipo mutante y un inserto de T-DNA con el gen nptII funcional en la línea 2659 ETPI.	46

Índice de contenidos

1	Introducción	1
1.1	Origen, domesticación e importancia económica del tomate y sus silvestres.....	1
1.2	Aplicaciones del cultivo <i>in vitro</i>	3
1.3	La respuesta morfogénica <i>in vitro</i>	4
1.4	La mutagénesis insercional como herramienta biotecnológica para la identificación de genes.....	6
1.4.1	Mutagénesis con transposones.....	7
1.4.2	Mutagénesis por T-DNA	8
1.5	Identificación de mutantes insercionales afectados en el desarrollo temprano	10
2	Objetivos	12
3	Material y Métodos	13
3.1	Material vegetal	13
3.2	Identificación de líneas mutantes afectadas en algún carácter del desarrollo temprano	14
3.2.1	Esterilización de semillas	14
3.2.2	Pre-germinación y obtención de plantas axénicas.....	14
3.2.3	Cultivo de explantes y ápices meristemáticos	15
3.2.4	Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante.....	15
3.2.5	Test χ^2	15
3.2.6	Análisis de expresión del gen <i>nptII</i>	16
3.2.7	Análisis del número de insertos T-DNA y de su cosegregación con el fenotipo mutante.....	16
3.2.8	Clonación de las plantas en la cámara de cultivo	17
3.2.9	Aclimatación y cultivo en invernadero.....	17
4	Resultados	18
4.1	Mutantes de enraizamiento	18
4.1.1	2642 ETMM	18
4.2	Mutantes cloróticos.....	21
4.2.1	207 ETPI.....	21

4.2.2	2660 ETMM	25
4.3	Mutantes de parte aérea	28
4.3.1	191 ETPI: mutante con bifurcación apical	28
4.3.2	2059 ETMM: mutante compacto.....	31
4.3.3	2099 ET MM: mutante compacto y subletalidad	35
4.3.4	2659 ETMM: mutante compacto y de desarrollo floral	39
5	Discusión.....	47
5.1	Identificación de líneas T-DNA mutantes en caracteres del desarrollo temprano	47
5.2	Modo de herencia del fenotipo mutante, número de insertos T-DNA y cosegregación con el fenotipo mutante.....	48
5.3	Mutantes de enraizamiento	50
5.4	Mutantes cloróticos.....	50
5.5	Mutantes compactos	51
6	Conclusiones	54
7	Bibliografía.....	55

Resumen

El conocimiento de aquellos genes clave que afectan al desarrollo de las plantas y a la interacción con agentes externos es un aspecto determinante, tanto desde un punto de vista aplicado como básico. Entre las estrategias para identificar estos genes la identificación y caracterización de mutantes para estos caracteres es una de las que mayores éxitos ha reportado. La mutagénesis insercional tiene una ventaja clave respecto de otros agentes mutagénicos ya que el gen mutado queda etiquetado por el T-DNA, que es de secuencia conocida.

En este trabajo se ha utilizado el cultivo *in vitro* como herramienta para la detección de mutantes afectados en el desarrollo temprano de las plantas y para su posterior caracterización. Se ha trabajado con una colección de 110 líneas T-DNA de *Solanum pimpinellifolium* y 13 líneas T-DNA de *Solanum lycopersicum* (variedad *Money Maker*) transformadas con una trampa de intensificadores. Para ello se han empleado tanto los medios y técnicas propias del cultivo *in vitro* como las del cultivo convencional en invernadero como método de corroboración de algunos fenotipos mutantes.

Gracias a este trabajo se han detectado siete líneas T-DNA mutantes, dos de *S. pimpinellifolium* y cinco de tomate afectados en diversos caracteres como: compacidad, desarrollo floral, clorosis, regeneración adventicia y enraizamiento entre otras. En estos mutantes se ha realizado la caracterización fenotípica y el análisis genético así como la presencia de cosegregación entre un inserto de T-DNA y el fenotipo mutante. El objetivo final para cada mutante es lograr la identificación del gen afectado así como conocer los procesos biológicos en los que interviene dicho gen.

Palabras clave

Cultivo *in vitro* - Desarrollo temprano - Mutagénesis insercional - Tomate - *Solanum pimpinellifolium*

Abstract

The Knowledge of key genes that affect the development of plants and interaction with external agents is a determining factor, both from an applied and a basic point of view. Among the strategies to identify these genes, the identification and characterization of mutants for these characters is among those which have most reported success. Insertional mutagenesis has a key advantage compared to other mutagenic agents, as the mutated gene is tagged by the T-DNA, which has a known sequence.

In this work, the plant tissue culture has been used as a tool for the detection of affected mutants in the early development of plants and for their subsequent characterization. We have worked with a collection of 110 T-DNA lines from *Solanum pimpinellifolium* and 13 T-DNA lines from *Solanum lycopersicum* (Money Maker variety) transformed with an intensifier trap. For this purpose, both the medium and the techniques expected from the plant tissue culture and the culture in greenhouses have been used as method of corroboration of some mutant phenotypes.

Thanks to this work seven mutants T-DNA lines have been detected, two of *S. pimpinellifolium* and five of tomato affected in diverse characters as: compactness, floral development, chlorosis, adventitious regeneration and rooting, among others. In these mutants the phenotypic characterization and the genetic analysis as well as the presence of cosegregation between a T-DNA insert and the mutant phenotype have been carried out. The final objective for each mutant is to identify the affected gene as well as to know the biological processes in which that gene intervenes.

Keywords

Plant early development – Plant tissue culture - Insertional mutagenesis - *Solanum pimpinellifolium* - Tomato

1 Introducción

1.1 Origen, domesticación e importancia económica del tomate y sus silvestres

De acuerdo con la Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas (FAOSTAT, 2013), el tomate ocupa entre los cultivos el puesto 10º, con respecto a la producción mundial con más de 160 millones de toneladas al año y el puesto 5º en cuanto al valor de producción agrícola, con más de 96.200 millones de dólares al año, tratándose de la hortaliza cultivada más importante en el mundo. Debido a su amplio crecimiento, se cultiva en prácticamente todo el planeta, siendo el primer productor China (30,7%) seguido de India (11,1%), Estados Unidos (7,6%), Turquía (7,2%), Egipto (5,2%), Irán (3,8%), Italia (3,0), Brasil (2,5), España (2,2) y México (2%). En España, toda la actividad económica derivada del tomate abarca un valor de más de 2.400 millones de euros al año y se cultiva en más de 46.000 hectáreas. Esto nos da una idea de la enorme importancia de este cultivo en la sociedad.

El tomate es una planta diploide con 24 cromosomas. Desde el punto de vista botánico, el tomate pertenece a la familia *Solanaceae*, la cual contiene más de 3.000 especies, incluyendo cultivos de una gran importancia económica como la patata, berenjena, tabaco, petunia y pimiento (Bai y Lindhout, 2007). El tomate y sus parientes silvestres proceden de la región andina de Sudamérica. Esta especie se subdivide en dos variedades botánicas: *Solanum lycopersicum* variedad *cerasiforme* y la variedad *lycopersicum* (Blanca *et al.*, 2015). Se piensa que *S. pimpinellifolium* es el ancestro silvestre más cercano al tomate cultivado (Zuriaga *et al.*, 2009) y sus diferentes accesiones se encuentran en las costas de Perú, Ecuador y las regiones montañosas de ambos países, dividiéndose en 3 principales grupos genéticos en función de las diferencias medioambientales (Blanca *et al.*, 2012).

La variedad *cerasiforme*, que probablemente fue domesticada a partir de la especie silvestre *S. pimpinellifolium*, se considera como el antepasado más probable que dio lugar a las variedades de fruto de mayor tamaño que hoy conocemos (Ranc *et al.*, 2008). Aunque aún se sigue discutiendo sobre muchos detalles de la domesticación del tomate, se proponen dos hipótesis principales al respecto: *S. cerasiforme* es un intermediario evolutivo entre *S. pimpinellifolium* y *S. lycopersicum* (Blanca *et al.*, 2012) y, de forma alternativa, *S. cerasiforme* es una mezcla resultante de la continua hibridación entre *S.*

pimpinellifolium y *S. lycopersicum* (Ranc *et al.*, 2008). Aun así, gracias a un equipo internacional de científicos de más de 14 países, el TGC (*Tomato Genome Consortium*) en 2012 y mediante secuenciación y alineamiento de secuencias del tomate domesticado y *S. pimpinellifolium*, se observó una divergencia de tan solo el 0,6% entre sus secuencias genómicas. Los estudios sobre el proceso de domesticación, no sólo de tomate, sino también en maíz y arroz, muestran una divergencia fenotípica rápida y asociada a la domesticación de un cultivo que es controlada genéticamente por un número relativamente pequeño de *loci* (Koenig *et al.*, 2013), lo cual explica las enormes diferencias morfológicas y fisiológicas que distinguen a *S. pimpinellifolium* como antepasado silvestre, de las variedades domesticadas de tomate (Gerszberg *et al.*, 2015).

Desde la secuenciación del genoma en 2012 por el TGC y la obtención de múltiples marcadores moleculares de tomate, muchos científicos han demostrado su interés por la planta como modelo de investigación básica y aplicada. Esto es debido a que la planta de tomate crece bajo diferentes condiciones de cultivo con un ciclo de vida relativamente corto, tiene alta capacidad de producción de semillas, su genoma es relativamente pequeño (950 Mb), tiene pocos genes duplicados, es una planta autógama con abundancia de líneas puras, es fácil de polinizar e hibridar con otras variedades y especies y tiene gran capacidad de propagación asexual y la capacidad de regenerar plantas enteras a partir de explantes (Gerszberg *et al.*, 2015). Además, en contraste con otros organismos modelo como *Arabidopsis* o arroz, el tomate tiene muchas características interesantes tales como, la producción de frutos carnosos (muy importante para alimentación humana), presenta brotes simpodiales, es la única planta modelo con hojas compuestas y hay disponibles un gran número de mutantes. Este último dato representa un recurso crucial para mejoradores e investigadores cuya pretensión es estudiar y mejorar la calidad y rendimiento de los cultivos de tomate. Sin embargo, se requiere un conocimiento extenso de las bases moleculares subyacentes al origen de una mutación para, a partir de poblaciones complejas, poder aislar e identificar genes clave implicados en el desarrollo y regulación del crecimiento (Gerszberg *et al.*, 2015). Este proceso depende, entre otras cosas, del método de mutagénesis empleado para llegar finalmente al gen o genes implicados a partir de un fenotipo mutante.

Desde la expansión del cultivo por todo el mundo a partir del siglo XVI, la mejora genética del tomate ha tenido como objetivo el incremento de la producción por unidad de área junto a otros caracteres de interés agronómico (tolerancia a estreses abióticos, plagas, enfermedades,...) o relacionados con su comercialización (mayor calidad organoléptica, conservación post-cosecha,...). Esta continua selección ha ido reduciendo la diversidad genética de la especie, acarreando una debilidad del cultivo frente a nuevos patógenos, disminuyendo sus cualidades organolépticas y todo ello, incrementando los riesgos de sufrir grandes pérdidas en su cosecha o comercialización. Para mejorar el rendimiento de las diferentes variedades de tomate que se comercializan (líneas élite), seleccionar caracteres de mayor interés para el consumidor, encontrar resistencias a patógenos y a diferentes estreses ambientales, se ha recurrido a la introgresión de parte del genoma de especies silvestres (Charles M. Rick, 1959). Esto pone de relevancia el enorme valor de las especies silvestres, como *S. pimpinellifolium*, ya que sobre ellas no han actuado los procesos de selección que conlleva la domesticación y representa una enorme oportunidad, junto a los programas de mutagénesis, para la búsqueda de nuevos alelos de interés agronómico.

1.2 Aplicaciones del cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* engloba un conjunto de técnicas con diversas aplicaciones biotecnológicas entre las que destacan la multiplicación del material vegetal, la mejora sanitaria y la mejora genética. La multiplicación de material vegetal en tomate incluye técnicas como la micropropagación de variedades de alto valor comercial (Namitha y Negi, 2013) y la obtención de semillas artificiales a partir de embriones somáticos (Wada *et al.*, 2011). La mejora sanitaria se ha conseguido en tomate a través de microinjertos (Roldan *et al.*, 2005) y otras técnicas de regeneración (Hanus-Fajerska, 2005). La mejora genética incluye técnicas para el incremento de la variabilidad genética, tanto intraespecífica mediante el uso de la variación somaclonal (Collonnier *et al.*, 2001) como extraespecífica mediante el rescate de embriones (Brar y Khush, 1997) y la hibridación somática de protoplastos (Waara y Glimelius, 1995) para ampliar los materiales con los que se pueden hibridar la especie objeto de mejora. Además, aunque para tomate todavía no se han puesto a punto métodos eficaces para ello, el cultivo *in vitro* permite la obtención de plantas haploides y doble-haploides que acortan

enormemente la generación de líneas puras en un programa de mejora (Germanà, 2011). Para terminar con las aplicaciones del cultivo *in vitro* enfocadas a la mejora genética, hay que destacar la enorme importancia de la transformación genética de plantas. Esta técnica que consiste en la transferencia de uno o pocos genes a la especie que se pretende mejorar, permite superar todas las barreras interespecíficas. Este abordaje tiene dos ventajas fundamentales, se pueden introducir genes procedentes de especies filogenéticamente muy alejadas del organismo receptor y esta modificación no altera básicamente el resto de características que tenía la especie transformada. Por tanto, se pueden alcanzar los objetivos deseados de forma más rápida y eficaz que con los métodos de mejora convencional para la introgresión de nuevos caracteres (Jauhar, 2001). Además, en el contexto de este trabajo, cabe mencionar el potencial que tiene la transformación genética para inducir mutagénesis, técnica que se conoce como mutagénesis insercional. El concepto radica en que una cadena de ADN que se introduce en el genoma de una célula receptora puede insertarse dentro o cerca de la secuencia de un gen endógeno y alterar su expresión dando lugar a un fenotipo mutante.

1.3 La respuesta morfogénica *in vitro*

Un aspecto fundamental para poder llevar a cabo las técnicas descritas anteriormente, radica en la capacidad que tienen las células vegetales para regenerar una planta a partir de células diferenciadas bajo determinadas condiciones de cultivo (Skoog y Miller, 1957). Para ello, es necesario disponer de un método de regeneración que permita la generación de un pequeño callo desorganizado y la organización de nuevas estructuras morfogénicas.

Hay dos vías para regenerar plantas *in vitro*: la embriogénesis somática y la organogénesis adventicia. La organogénesis adventicia es un proceso morfogénico de tipo unipolar que permite la formación de brotes (caulogénesis) o raíces (rizogénesis) a partir de explantes sin meristemos preexistentes. Diversos estudios en tomate han demostrado que la regeneración de una planta mediante organogénesis se ve afectada por numerosos factores, como el genotipo, tipo, edad y tamaño de explante, la composición del medio y las condiciones ambientales (Gerszberg *et al.*, 2015).

El factor mejor estudiado en la regeneración adventicia es la combinación más adecuada de los componentes del medio de cultivo: macronutrientes, micronutrientes, azúcar, vitaminas y, sobretodo, el tipo y concentración de reguladores del crecimiento. El balance de auxinas y citoquininas es crucial y la modificación de su balance con la adición exógena de una u otra hormona ha permitido desarrollar medios de regeneración en prácticamente todas las especies de interés agronómico.

Cabe destacar el papel de las citoquininas ya que se trata de una hormona que juega un rol de regulador positivo y negativo de una gran variedad de aspectos en el desarrollo y crecimiento de la planta. Estimula la formación y actividad de los meristemos axilares, es capaz de establecer los tejidos sumideros como en la formación de fruto, retarda la senescencia foliar, inhibe el crecimiento de las raíces y su ramificación, juega un papel importante en la germinación de las semillas y las respuestas a estrés (Riefler *et al.*, 2006). Además, participan en una serie de procesos regulados por luz, como la desetiología y la diferenciación de cloroplastos (Mok, 1994). Algunas funciones de las citoquininas se ejecutan directamente a través del control de la actividad del ciclo celular. El análisis de mutantes deficientes en citoquininas ha aportado información sobre el papel contrario que éstas efectúan regulando el crecimiento de los meristemos apicales del tallo y de la raíz, sugiriendo que la hormona tiene una función esencial en el control cuantitativo del crecimiento de los órganos (Yang *et al.*, 2003).

el conocimiento de los genes que controlan y determinan los caracteres de interés agronómico de una especie nos pueden ayudar a mejorarla de una forma más rápida y eficaz. Entre las alternativas metodológicas que nos permite llegar a conocer cuáles son estos genes, el empleo de mutantes afectados en estos caracteres es una de las más interesantes. Aunque se pueden identificar mutantes espontáneos, lo más habitual para llevar a cabo este tipo de estudios es crear poblaciones mutagenizadas. Para ello se puede recurrir al empleo de mutágenos físicos (radiaciones), químicos (EMS) o a la mutagénesis insercional. En estos casos, lógicamente, se intentan generar amplias poblaciones ya que el proceso de mutagénesis es totalmente aleatorio y no controlamos los genes que van a verse afectados en cada caso.

En tomate se han generado diferentes poblaciones mutagenizadas. La colección obtenida por el Tomato Genetic Resource Center (TGRC, Univ. California, Davis) es una de las más utilizadas e incluye 978 mutantes espontáneos y variantes naturales.

Otros investigadores han generados algunas poblaciones mutagenizadas con EMS (Minoia *et al.*, 2010) o mediante irradiación. Por ejemplo, con ambos métodos Menda y *col.* (2004) consiguieron 13.000 familias mutantes de tomate dentro de las cuales ya se han identificado 3417 mutaciones. En todo caso, al emplear mutantes espontáneos o producidos por agentes físicos o químicos el problema es que la identificación y clonación del gen responsable de la mutación observada puede llevar varios años. En este caso se debe recurrir al empleo de marcadores y otras técnicas para poder llegar a clonar el gen en cuestión. Por este motivo se puso a punto la técnica de mutagénesis insercional, una nueva forma de obtener líneas mutagenizadas que facilita la clonación del gen afectado.

1.4 La mutagénesis insercional como herramienta biotecnológica para la identificación de genes

El conocimiento de los genes que controlan y determinan los caracteres de interés agronómico de una especie nos pueden ayudar a mejorarla de una forma más rápida y eficaz. Entre las alternativas metodológicas que nos permite llegar a conocer cuáles son estos genes, el empleo de mutantes afectados en estos caracteres es una de las más interesantes. Aunque se pueden identificar mutantes espontáneos, lo más habitual para llevar a cabo este tipo de estudios es crear poblaciones mutagenizadas. Para ello se puede recurrir al empleo de mutágenos físicos (radiaciones), químicos (EMS) o a la mutagénesis insercional. En estos casos, lógicamente, se intentan generar amplias poblaciones ya que el proceso de mutagénesis es totalmente aleatorio y no controlamos los genes que van a verse afectados en cada caso.

En tomate se han generado diferentes poblaciones mutagenizadas. La colección obtenida por el Tomato Genetic Resource Center (TGRC, Univ. California, Davis) es una de las más utilizadas e incluye 978 mutantes espontáneos y variantes naturales. Otros investigadores han generados algunas poblaciones mutagenizadas con EMS (Minoia *et al.*, 2010) o mediante irradiación. Por ejemplo, con ambos métodos Menda y *col.* (2004) consiguieron 13.000 familias mutantes de tomate dentro de las cuales ya se han identificado 3417 mutaciones. En todo caso, al emplear mutantes espontáneos o

producidos por agentes físicos o químicos el problema es que la identificación y clonación del gen responsable de la mutación observada puede llevar varios años.

En el caso de emplear agentes mutagénicos físicos o químicos se debe recurrir al empleo de marcadores y otras técnicas para poder llegar a clonar el gen en cuestión. Por este motivo se puso a punto la técnica de mutagénesis insercional, una nueva forma de obtener líneas mutagenizadas que facilita la clonación del gen afectado. Este método de mutagénesis se basa en que la integración del T-DNA o del transposón dentro de la secuencia estructural o de elementos reguladores de un determinado gen endógeno puede producir su disrupción y la consecuente pérdida de función, ganancia de función o alteración de su nivel de expresión.

La principal ventaja frente a otras técnicas de mutagénesis al azar como la física (ultravioleta, gamma, etc) o la química (EMS, MMS, etc), radica en que se pueden identificar fácilmente la secuencias flanqueantes a los sitios de inserción, quedando etiquetadas por el T-DNA o transposón utilizado. De forma que podemos clonar fácilmente dichas secuencias mediante técnicas sencillas derivadas de la PCR como TAIL-PCR o Anchor-PCR. Los enfoques basados en la mutagénesis insercional, tanto utilizando transposones como T-DNA, han sido ampliamente utilizados para análisis de genética funcional y para la generación de colecciones de mutantes en especies como *Arabidopsis*, arroz, soja y maíz entre otros cultivos (Okabe y Ariizumi, 2016). Constituyendo así, una herramienta biotecnológica muy útil para identificar, clonar y caracterizar genes.

1.4.1 Mutagénesis con transposones

Los transposones son elementos genéticos móviles que pueden “saltar” de un lugar a otro del genoma y que se descubrieron a partir de estudios realizados en maíz (Mcclintock, 1950). Esta técnica tiene la ventaja de permitir una producción rápida de muchas líneas mutantes independientemente del número de líneas parentales obtenidas en la transformación (Okabe y Ariizumi, 2016). Es especialmente útil si se quiere implantar un programa de mutagénesis insercional en especies recalcitrantes a la transformación o con escasa regeneración, permitiéndonos multiplicar el número de líneas independientes incluso si partiéramos sólo de una única línea. Además, actualmente existen diferentes versiones del sistema de mutagénesis por transposones

dependiendo del tipo de elementos activadores (Ac) y disociadores (Ds) (Carter *et al.*, 2014).

1.4.2 Mutagénesis por T-DNA

En nuestro grupo se optó por emplear el sistema de T-DNA en lugar del basado en transposones debido a que éstos muestran una tendencia a transponerse preferentemente en determinadas regiones del genoma como se ha observado en maíz (Dooner y Belachew, 1989) y *Arabidopsis* (Keller *et al.*, 1993). Además, cuando se emplean transposones se observa una media de insertos de entre 2- 3 transposones por línea obtenida (Meissner *et al.*, 2000) lo cual conlleva una dificultad añadida a la hora de asociar un fenotipo mutante a uno de los insertos. Aún así, se ha logrado utilizar esta técnica con éxito en un gran número de especies incluyendo tomate (Carter *et al.*, 2013).

La mutagénesis insercional, ya sea por el uso de transposones o de T-DNA, tiene algunas limitaciones, por ejemplo, es difícil identificar la función de los genes redundantes, o de los genes necesarios en la embriogénesis o gametogénesis (Jeong *et al.*, 2002). Por eso, aunque teóricamente cualquier T-DNA resultaría efectivo para llevar a cabo un programa de mutagénesis insercional, se han desarrollado construcciones específicas para este abordaje de forma que se incrementen las posibilidades de identificar genes de interés. En este caso se pueden distinguir así dos tipos de abordajes, *activation tagging* y trampas génicas.

El método conocido como *activation tagging* utiliza un T-DNA que contiene potenciadores del nivel de expresión, como múltiples copias en tándem del promotor 35S del virus del mosaico de coliflor (CaMV) (Hayashi *et al.*, 1992). Debido a que los potenciadores pueden funcionar en cualquier orientación y a una distancia considerable de las regiones codificantes, pueden causar la activación transcripcional de genes cercanos, dando como resultado mutaciones dominantes o de ganancia de función. Este tipo de activaciones génicas pueden producir nuevos fenotipos, a partir de genes importantes que son redundantes debido a que pertenezcan a una gran familia génica o genes esenciales para la supervivencia del organismo (Jeong *et al.*, 2002). Este sistema de etiquetado se ha probado con éxito en *Arabidopsis* (Huang *et al.*, 2001), petunia (Zubko *et al.*, 2002) y en tomate, donde se ha demostrado su utilidad (Mathews *et al.*, 2003). Sin embargo, existen algunos inconvenientes a la hora de utilizar esta

aproximación, como los efectos pleiotrópicos o la dificultad de clonar el gen afectado, ya que la influencia de las señales reguladoras como los factores de transcripción, en ocasiones se encuentran a mucha distancia del gen endógeno por lo que no siempre queda etiquetado por el inserto.

El sistema de trampa génica, implica la creación de una fusión entre los genes marcados por el T-DNA y un gen delator, tales como β -glucuronidasa (GUS) o proteína fluorescente verde (GFP) (Springer, 2000). El éxito de este tipo de abordajes reside en que proporciona mutantes de inserción y a la vez permite identificar nuevos genes basados en sus patrones de expresión, ya que la inserción del delator (sin promotor o con un promotor mínimo) no sólo destruye la función normal del gen, sino que también permite su expresión al utilizar el promotor del propio gen truncado. Por tanto, el empleo de trampas génicas representa una herramienta muy interesante al aplicar un programa de mutagénesis insercional debido a que gracias al estudio del patrón de expresión del gen delator se pueden identificar genes con función redundante, genes que se expresan en múltiples estados de desarrollo y producen efectos pleiotrópicos, genes cuya disrupción provoca letalidad temprana y genes cuya disrupción ocasiona un fenotipo tan sutil que a veces no llegaría a detectarse en el fenotipado de las plantas (Springer, 2000).

Mediante este tipo de abordajes con trampas génicas podemos identificar mutantes a través del fenotipado en TG1 (mutación dominante o semidominante) o TG2 (mutación recesiva), a la vez que estudiamos el patrón de expresión espacio-temporal del gen delator. En *Arabidopsis* se ha utilizado el sistema de trampas génicas a la hora de obtener mutantes y observar la expresión del gen etiquetado en tejidos como raíz, hoja, flores y semillas (Jeon *et al.*, 2000). En tomate, se han logrado grandes avances y se ha demostrado la eficacia de la técnica al lograr clonar el gen *ALQ/TAGLI* a partir de un mutante que presenta una alteración en el desarrollo reproductivo (Pineda *et al.* 2010) y la identificación de genes relacionados con la tolerancia a estreses de tipo abiótico en *Solanum pennellii*, una especie silvestre relacionada con tomate (Atarés *et al.* 2011).

1.5 Identificación de mutantes insercionales afectados en el desarrollo temprano

Se entiende por desarrollo temprano, el periodo que abarca desde la emergencia de la radícula o raíz embrionaria, desarrollo y expansión de los cotiledones, culminando con la aparición de las primeras hojas verdaderas. Durante esta etapa, utilizando el cultivo *in vitro* como herramienta de cribado de una población mutagenizada, se pueden identificar alteraciones en caracteres de gran importancia para el posterior crecimiento de la planta, que pueden resultar más difíciles o imposibles de estudiar si el cribado se realizara en etapas más avanzadas del desarrollo de la planta.

En este caso el cultivo *in vitro* ofrece grandes ventajas respecto de otros métodos de evaluación para la detección de mutantes: el empleo de condiciones ambientales controladas, la posible utilización de diferentes tipos de explante, el análisis de distintos procesos morfogénicos (brotación, enraizamiento, regeneración adventicia,...), la mínima necesidad de espacio y la rapidez en obtener los resultados. Habitualmente, tras una evaluación en condiciones de cultivo *in vitro*, es necesaria la corroboración mediante un fenotipado *in vivo*, pero las ventajas comentadas anteriormente suplen con creces este inconveniente.

Una de las principales características que se pueden estudiar en esta etapa del desarrollo es el crecimiento de la raíz. El crecimiento y arquitectura de las raíces de una planta son determinantes en su interacción con el suelo, la absorción de nutrientes, agua y su capacidad para resistir estreses abióticos como, por ejemplo, la sequía o salinidad. Gracias a las características del medio de cultivo *in vitro* la raíz se puede visualizar en todo momento, lo cual facilita su evaluación respecto del uso de cultivo en maceta. Además, en estas condiciones se puede evaluar tanto el desarrollo de la raíz embrionaria (primaria, secundaria, etc.), si se parte de semilla, como de las raíces adventicias que surgen a partir de tejidos diferenciados como tallo, hipocótilo u hojas.

Otro aspecto muy importante en el posterior crecimiento de las plantas es el desarrollo inicial de la parte aérea. El estudio de las etapas tempranas del desarrollo nos permite estudiar 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 tanto alteraciones en el desarrollo del SAM

(*Shoot Apical Meristem*) que es el meristemo a partir del cual se van a formar el tallo y las hojas de la planta como otras alteraciones que pueden causar la muerte de la plántula recién germinada y que serían difícilmente detectables en un semillero cultivado en condiciones *in vivo*.

Por último, el estudio de las plantas en sus etapas iniciales del desarrollo nos permite la evaluación de la capacidad de regeneración adventicia, un carácter clave para poder llevar a cabo las técnicas de cultivo *in vitro* antes descritas. En este caso se deben cultivar explantes en las condiciones adecuadas para comprobar si son capaces de regenerar plantas completas o ver en qué forma está afectado este proceso.

2 Objetivos

En nuestro grupo se han generado más de 7000 líneas de T-DNA mediante mutagénesis insercional de *S. lycopersicum* y especies silvestres relacionadas, como *S. pimpinellifolium*, *S. pennellii* y *S. galapagense* con el fin de identificar los genes que controlan caracteres de interés agronómico en tomate. Mediante el escrutinio de estas colecciones de líneas T-DNA se han identificado mutantes alterados en caracteres del desarrollo, vegetativo (raíz y parte aérea) y reproductivo (flor y fruto) y en el nivel de tolerancia frente a estreses abióticos (salinidad y sequía) y se han clonado varios genes causantes de estas alteraciones.

Para la generación y el escrutinio de esta gran cantidad de líneas de T-DNA se han puesto a punto diversas metodologías en las que el cultivo *in vitro* es una herramienta muy importante para la rápida y eficiente identificación de las líneas que son mutantes para caracteres de las etapas iniciales del desarrollo.

El objetivo principal de este trabajo es la detección y la caracterización inicial de mutantes de tomate y de *S. pimpinellifolium* con alteraciones en el desarrollo temprano para la posterior identificación y clonación del gen mutado. Para llevarlo a cabo se han analizado 110 líneas T-DNA de *S. pimpinellifolium* y 13 líneas preseleccionadas de tomate mediante un protocolo que permite la identificación de fenotipos mutantes en las etapas iniciales del desarrollo. Para lograr este objetivo se deben abordar las siguientes etapas:

1. Identificación de las líneas T-DNA mutantes.
2. Caracterización fenotípica tanto *in vitro* como *in vivo*.
3. Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante.
4. Determinación del número de insertos T-DNA.
5. Análisis de la cosegregación entre fenotipo mutante – inserto T-DNA.

3 Material y Métodos

3.1 Material vegetal

Las líneas T-DNA analizadas en este trabajo se obtuvieron con una trampa de intensificadores mediante la transformación de los cultivares *Money Maker* y las accesiones P0937 y PI1589 de *S. pimpinellifolium*, con el plásmido pD991 cedido amablemente por el Dr. Thomas Jack de la Universidad de Dartmouth (Figura 1).

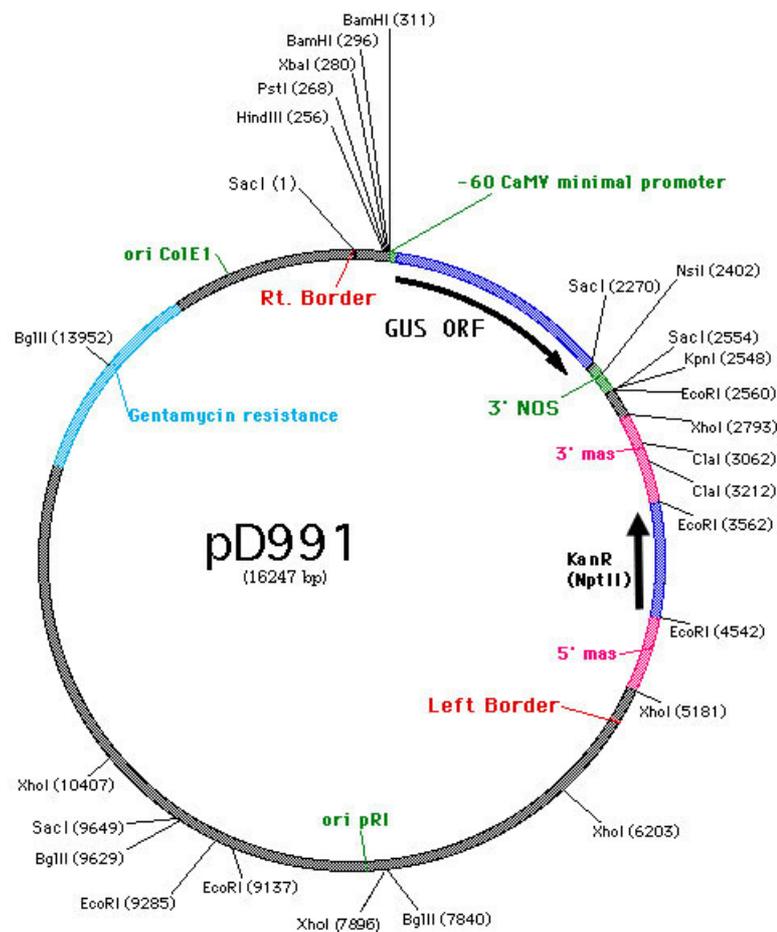


Figura 1. Esquema del vector pD991 (trampa de intensificadores) empleado en la generación de líneas T-DNA. El promotor mínimo utilizado es el -60 del gen 35 S del virus del mosaico de coliflor (CaMV), que contiene una caja TATA que no es capaz de realizar altos niveles de transcripción.

Para la primera parte del trabajo se han seleccionado 110 líneas de *S. pimpinellifolium* de las que se disponía suficiente cantidad de semilla TG2 obtenidas mediante autofecundación de las plantas TG1 regeneradas en la transformación. La mayor parte de las líneas no habían sido evaluadas previamente, sin embargo, otras se habían

evaluado para tratar de identificar mutantes afectados en su tolerancia a la salinidad, pero en ninguna de ellas se vio ningún fenotipo alterado para ese carácter.

Para la segunda parte del trabajo se han seleccionado 13 líneas T-DNA de *Money Maker* en las que se había visto diferentes fenotipos mutantes bien en TG1 (mutación dominante) o en TG2 (mutación recesiva). En cualquier caso, todas ellas eran líneas que no habían sido estudiadas en profundidad (en alguna no se había corroborado la presencia de un fenotipo mutante) o que, al haber sido identificadas recientemente, no había podido ser caracterizadas adecuadamente.

3.2 Identificación de líneas mutantes afectadas en algún carácter del desarrollo temprano

La metodología estándar empleada para analizar todas las líneas T-DNA e identificar fenotipos mutantes así como avanzar en su caracterización, es la descrita en los siguientes epígrafes.

3.2.1 Esterilización de semillas

Las plantas axénicas se obtienen a partir de semillas (TG2) previamente esterilizadas. Para ello se sumergen entre 40-50 semillas para *Money Maker* y entre 50-70 semillas para *S. pimpinellifolium* (debido al bajo porcentaje de germinación observado por la antigüedad de la cosecha) durante 30 minutos en una solución de lejía comercial diluida al 50% con unas gotas del detergente 7X-Omatic (*Flow laboratories*). Después se elimina la solución desinfectante con 3 lavados sucesivos de 5, 10 y 15 minutos de agua desionizada estéril. Este procedimiento se vuelve a realizar pasadas 24 horas.

3.2.2 Pre-germinación y obtención de plantas axénicas

Tras la desinfección, las semillas se colocan en placas de Petri con un disco de papel de filtro y 10 mL de agua desionizada estéril. Posteriormente, se incuban en oscuridad a 28 °C hasta que emerge la radícula. En ese momento las semillas se siembran en botes de vidrio con medio de germinación MG (ver Anexo).

Los botes se colocan en la cámara de cultivo *in vitro* en condiciones de fotoperiodo de 16 horas y 8 de oscuridad, una intensidad lumínica de $45 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y una temperatura constante de 25 °C.

3.2.3 Cultivo de explantes y ápices meristemáticos

A los 7 días de cultivo de las plántulas en medio de germinación (MG) se procede a la extracción de los explantes de cotiledón y ápice. El procedimiento consiste en separar los cotiledones eliminando el extremo distal sin dañar los explantes obtenidos, que son cultivados con el envés en contacto en placas de Petri con medio de regeneración TDZ para *S. pimpinellifolium* e IKZ para *Money Maker* (ver Anexo). Este medio favorece la formación de yemas, ápices y brotes tras un breve paso por callo de forma que nos permite evaluar la capacidad de regeneración de los explantes.

Los ápices meristemáticos se cultivan en botes de vidrio (10,5 cm de altura x 9,8 cm de diámetro) que contienen aproximadamente 40 mL de medio básico MB3 (ver Anexo). Tanto las placas de Petri para cotiledones como los recipientes para ápice, se dividen en 6 secciones numeradas para que haya correlación entre explantes de cotiledón y ápices meristemáticos. Los recipientes se pasan a condiciones de cultivo en fotoperiodo de 20 a 25 días.

3.2.4 Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante

Debido a que todo el material empleado procede de la autofecundación de las TG1 regeneradas, el modo de herencia de las mutaciones dominantes mostrarán un fenotipo mutante en $\frac{3}{4}$ de la descendencia (homocigóticos y hemicigóticos) y $\frac{1}{4}$ será WT (acigóticos). Por el contrario, si la mutación es de carácter recesivo $\frac{1}{4}$ de la descendencia mostrará fenotipo mutante (homocigóticos) y $\frac{3}{4}$ tendrán fenotipo WT (acigóticos y hemicigóticos).

3.2.5 Test χ^2

El análisis de todos los datos obtenidos se realiza con el test χ^2 . Con este test se evalúa 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 %. Para la comprobar si se pueden acumular los datos obtenidos en

diferentes experimentos se realiza el test de χ^2 de homogeneidad para saber si no hay diferencias significativas entre experimentos y, por tanto, se pueden analizar en conjunto como un único experimento.

3.2.6 Análisis de expresión del gen *nptII*

En aquellas líneas donde se identifica un fenotipo mutante se realiza el análisis de expresión del gen *nptII* mediante el test de enraizamiento y/o de regeneración en kanamicina, dependiendo del tipo de mutante y explante de partida. Para ello, en el caso del enraizamiento, a partir de plantas axénicas crecidas en medio básico MB3 (ver Anexo), se cultivan yemas axilares y/o ápices meristemáticos en medio de enraizamiento sin y con kanamicina (100 mg·L⁻¹). Los recipientes se pasan a condiciones de cultivo en fotoperiodo de 16 horas y 8 de oscuridad a temperatura constante de 25 °C. Por otro lado, en el caso del test de regeneración se utilizan como explantes de partida folíolos, cotiledones o hipocótilos y se incuban en las mismas condiciones en el medio de regeneración correspondiente a *S. pimpinellifolium* o *Money Maker* con kanamicina (100 mg·L⁻¹). Tras 15-20 días se puede identificar las plantas que son resistentes y las que son sensibles a la kanamicina.

3.2.7 Análisis del número de insertos T-DNA y de su cosegregación con el fenotipo mutante

A partir de los datos observados en el anterior apartado y teniendo en cuenta que cuando un inserto con el gen *nptII* está en homocigosis o hemicigosis, la planta es resistente al antibiótico, se puede utilizar el test χ^2 para saber si la segregación observada se ajusta a la presencia de un único inserto (segregación 3 Kan^R: 1 Kan^S), dos insertos (15 Kan^R: 1 Kan^S) o más insertos con el gen *nptII* funcional.

Además, los datos obtenidos del análisis de expresión del gen *nptII* junto a los obtenidos del tipo de segregación fenotípica nos permiten establecer si existe cosegregación entre la presencia del inserto del T-DNA con el gen *nptII* funcional y el fenotipo mutante observado. Esto es un aspecto clave en el estudio de estas líneas ya que determina el camino a seguir para estudiar el origen de la mutación y poder llegar a clonar el gen afectado mediante técnicas como el Anchor-PCR o TAIL-PCR. Por tanto, para determinar si existe cosegregación entre un inserto con el gen *nptII* funcional y el

fenotipo mutante hay que comparar las segregaciones observadas del fenotipo y resistencia a kanamicina en las plantas TG2 y TG3 con los valores esperados para un modelo de cosegregación mediante el test χ^2 .

3.2.8 Clonación de las plantas en la cámara de cultivo

En cada línea mutante identificada es necesario mantener *in vitro* las plantas mutantes y las WT observadas en los diferentes experimentos para poder seguir con su estudio. Para ello se van clonando mediante el cultivo de ápices meristemáticos o yemas axilares en medio de enraizamiento distribuido en botes de 155 x 66 mm. Se cultivan en condiciones de fotoperiodo a temperatura constante de 25 °C.

3.2.9 Aclimatación y cultivo en invernadero

El análisis del fenotipo mutante *in vivo* es tan o más importante como su análisis *in vitro*. Para ello se recurre a la aclimatación de las plantas con fenotipo mutante y WT para poder llevar las plantas al invernadero, manteniéndose al menos una copia de las plantas aclimatadas en la cámara de cultivo. Para aclimatar una planta debe tener unas raíces bien desarrolladas, con un tamaño de la parte aérea de al menos 5 cm. Se elimina el agar adherido a las raíces con cuidado de no dañarlas y se trasplanta a sustrato (mezcla de turba y vermiculita) humedecido. Para evitar la deshidratación las plantas se mantienen cubiertas por un vaso de plástico transparente durante los días que dure la aclimatación. Tras ese periodo de transición las plantas se pueden trasplantar a una maceta de mayor tamaño para que pueda completar todo su ciclo de cultivo.

En el caso que sea necesario cultivar plantas *in vivo* a partir de semillas, se prepara en el invernadero una bandeja con macetas llenas de sustrato humedecido con solución nutritiva (ver Anexo). En cada maceta se coloca una semilla pregerminada y se riega con solución nutritiva mientras completa su ciclo de cultivo.

4 Resultados

Tras el escrutinio de las 110 líneas T-DNA de *S. pimpinellifolium* se han identificado dos líneas con un fenotipo mutante interesante. Además, tras la evaluación de los presuntos mutantes identificados previamente en 13 líneas T-DNA de tomate se han seleccionado cinco mutantes como los más interesantes. A continuación se muestran los resultados obtenidos con estas siete líneas T-DNA afectadas en diversos caracteres que se han agrupado en tres categorías: enraizamiento, cloróticos y de desarrollo de la parte aérea.

4.1 Mutantes de enraizamiento

Entre las 123 líneas T-DNA analizadas entre *S. pimpinellifolium* y *S. lycopersicum*, se han detectado un mutante 2642 ETMM de tomate que tiene afectado su enraizamiento y presenta además otras alteraciones.

4.1.1 2642 ETMM

Este fenotipo mostraba múltiples caracteres afectados *in vitro* a lo largo de su desarrollo. En medio MG se observó un fenotipo diferencial en el estado de plántula, con un menor porte de la planta mutante con respecto al WT, los cotiledones presentaron un menor tamaño y las primeras hojas tardaron más en desarrollarse lo cual es indicativo de un crecimiento ralentizado. Además, la raíz embrionaria del mutante es más corta que la WT y no presentó raíces secundarias (Figura 2).

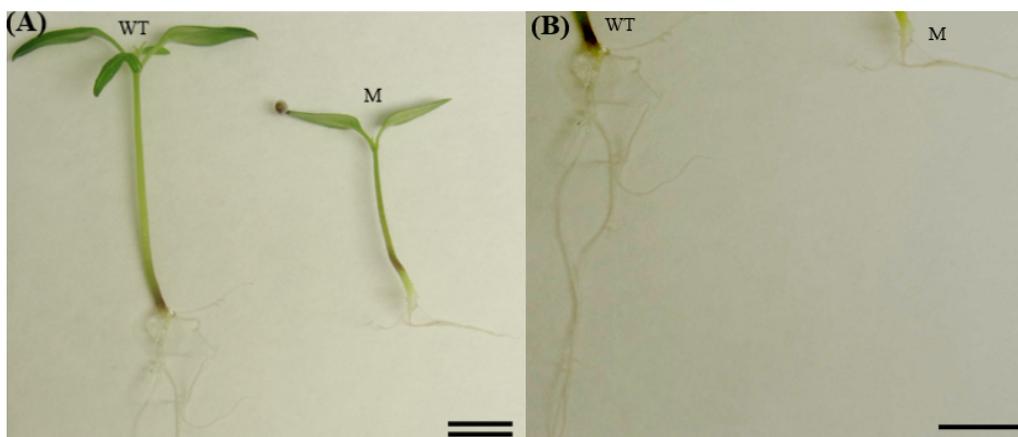


Figura 2. Comparación fenotípica de plántulas WT y mutante de 8 días de la línea 2642 ETMM. (A) plántulas WT y M tras germinación en medio MG. (B) detalle de la raíz embrionaria WT y mutante. La barra representa 1 cm.

Cuando se subcultiva el ápice meristemático a medio básico MB3 se mantiene el fenotipo de menor velocidad de crecimiento y de ausencia de formación de raíces secundarias, en este caso, a partir de las raíces adventicias que se forman sin ningún problema a partir del hipocótilo. A medida que la planta mutante empieza a crecer se observa un fenotipo de clorosis internervial en las hojas de las plantas axénicas (Figura 3).

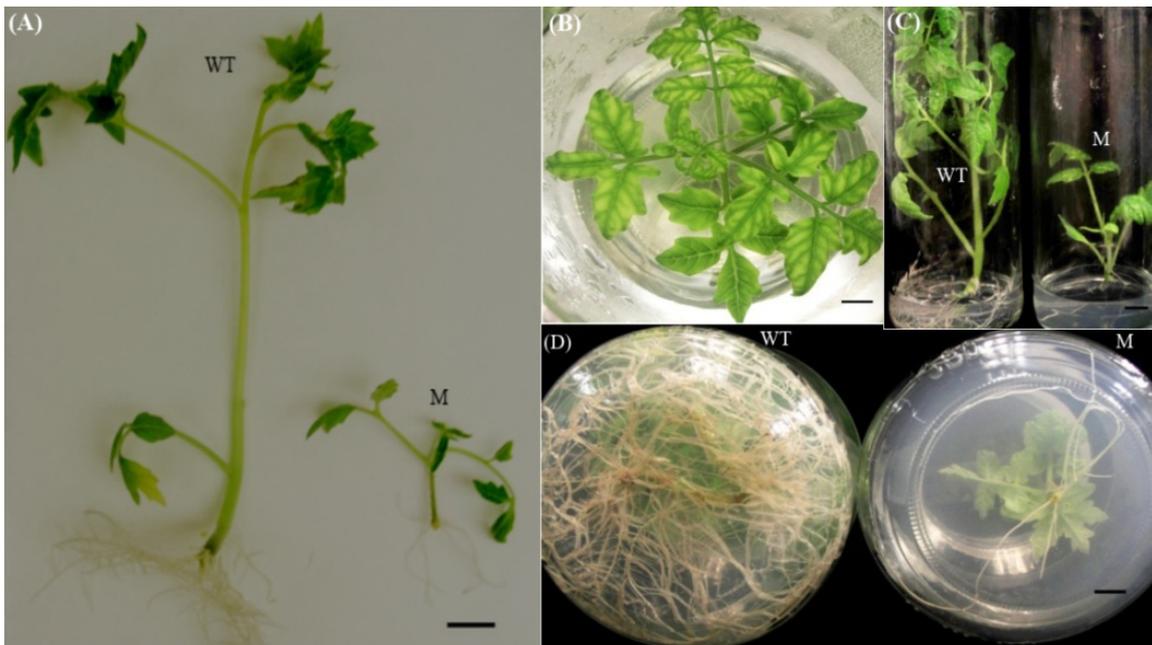


Figura 3. Comparación fenotípica de plantas axénicas WT y mutante en diferentes medios de la línea 2642 ETMM. (A) planta WT y mutante tras 15 días en medio básico MB3. (B) planta mutante con clorosis internervial tras 60 días en medio MB3+IBA 0,1 mg·L⁻¹ (C) planta WT y mutante tras 30 días de cultivo en MB3+IBA 0,1 mg·L⁻¹ (D) desarrollo radicular de plantas WT y mutante tras 40 días de cultivo en MB3. La barra representa 1 cm.

4.1.1.1 Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante

Se analizaron 79 individuos TG2 en condiciones de cultivo *in vitro* en un total de dos experimentos para llevar a cabo el análisis de herencia (Tabla 1). El análisis de homogeneidad mostró que los resultados de ambos experimentos no tienen diferencias significativas y los datos acumulados indicaron que no hay motivo para dudar que la naturaleza de esta mutación sea monogénica recesiva.

Tabla 1. Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante de la línea 2642 ETMM.

	Segregación	WT	M	Total	χ^2
Experimento 1	Observada	33	11	44	0,00
	Esperada (3:1)	33	11		
Experimento 2	Observada	31	4	35	3,44
	Esperada (3:1)	26	9		
Datos acumulados^a	Observada	64	15	79	1,52
	Esperada (3:1)	59	20		

^a Análisis χ^2 homogeneidad ($\chi^2_H = 1,91$) indica que las muestras son homogéneas ($P > 0,05$; $\chi^2_{1 g.l.} = 3,84$)

4.1.1.2 Análisis genético del número de insertos de T-DNA

El análisis de la resistencia a kanamicina en una población segregante nos permite calcular el número de insertos T-DNA. Para ello se cultivaron explantes de folíolos en medio ϵ (ver Anexo) y se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 2).

Tabla 2. Análisis de la segregación para resistencia a kanamicina de la línea 2642 ETMM.

	Segregación	Kan ^R	Kan ^S	Total	χ^2
Experimento 1	Observada	30	13	43	0,63
	Esperada (3:1)	32	11		
Experimento 2	Observada	24	12	36	1,33
	Esperada (3:1)	27	9		
Datos acumulados^a	Observada	54	25	79	1,86
	Esperada (3:1)	59	20		

^a Análisis χ^2 homogeneidad ($\chi^2_H = 0,10$) indica que las muestras son homogéneas ($P > 0,05$; $\chi^2_{1 g.l.} = 3,84$)

Los análisis de homogeneidad mostraron que los resultados de ambos experimentos no tienen diferencias significativas y los datos acumulados mostraron que no hay motivo para dudar que la línea 2642 ETMM tiene un único inserto *nptII* funcional.

4.1.1.3 Análisis de cosegregación fenotipo – inserto de T-DNA

Se comprobó que no hay cosegregación entre el fenotipo mutante y el inserto de T-DNA, al aparecer cuatro plantas mutantes sensibles a la kanamicina (Tabla 3).

Tabla 3. Análisis de cosegregación entre el fenotipo mutante y un inserto de T-DNA con el gen *nptII* funcional en la línea 2642 ETMM.

Fenotipo	Kan ^R		Kan ^S	
	WT	M	WT	M
Segregación acumulada	43	10	21	4

4.2 Mutantes cloróticos

Entre las 123 líneas T-DNA analizadas entre *S. pimpinellifolium* y *S. lycopersicum*, se han detectado dos mutantes que presentan fenotipo clorótico extremo y tienen un crecimiento significativamente más lento que los individuos WT llegando incluso a afectar su viabilidad: 207 ETPI de *S. pimpinellifolium* y 2660 ETMM de tomate.

4.2.1 207 ETPI

En esta línea la clorosis se observa en las plántulas y puede verse por primera vez en los cotiledones (Figura 4 A) o en las primeras hojas que emergen del ápice meristemático (Figura 4 B). Tanto los cotiledones como las hojas de las plántulas mutantes presentan cierta curvatura (Figura 4 C).

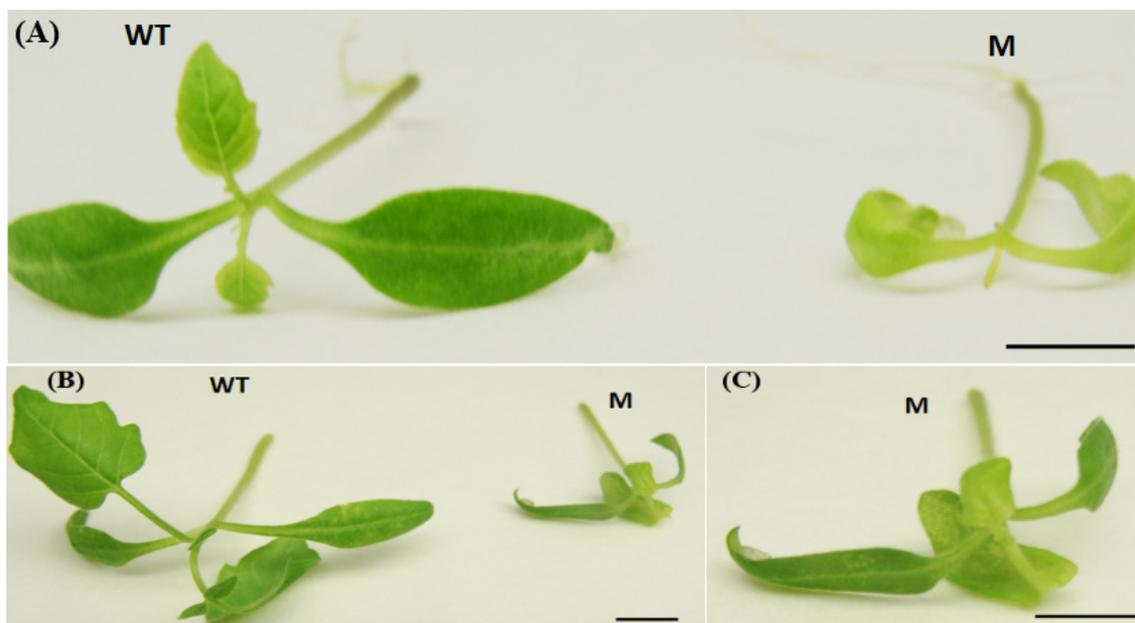


Figura 4. Comparación fenotípica de plántulas WT y mutante de 8 días de la línea 207 ETPI.(A) plántula WT a la izquierda y plántula mutante completamente clorótica a la derecha. (B) plántula WT a la izquierda y plántula con clorosis en hojas y curvatura hacia el interior, a la derecha. (C) detalle de la plántula con clorosis y curvatura en las primeras hojas. La barra representa 1 cm.

La capacidad de regeneración de los cotiledones mutantes se ve afectada seriamente, de forma que no se es capaz de regenerar ningún brote ni producir callo desorganizado en ningún explante cultivado en medio de regeneración (Figura 5).

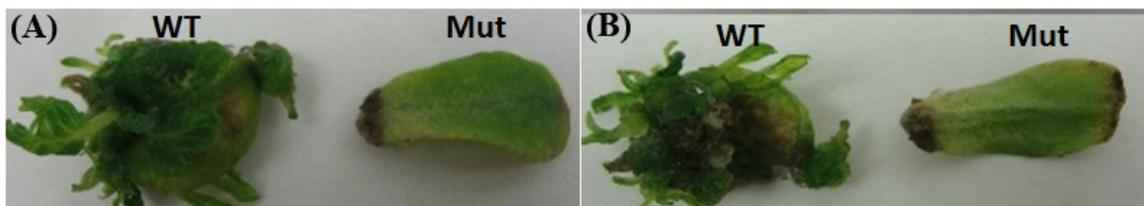


Figura 5. Evaluación de la capacidad de regeneración en cotiledones WT y mutantes de la línea 207 ETPI tras 25 días en medio de regeneración IKZ. (A) haz y (B) envés de los explantes. La barra representa 1 cm.

De todos los mutantes obtenidos tan solo se pudo mantener *in vitro* uno de ellos debido a la alta letalidad que presentaban. A partir de esta planta se obtuvieron varias copias clonales en las que se observó pérdida de la dominancia apical con la consecuente activación de las yemas axilares, curvatura del tallo y las hojas hacia el interior y caída prematura de las mismas (Figura 6).

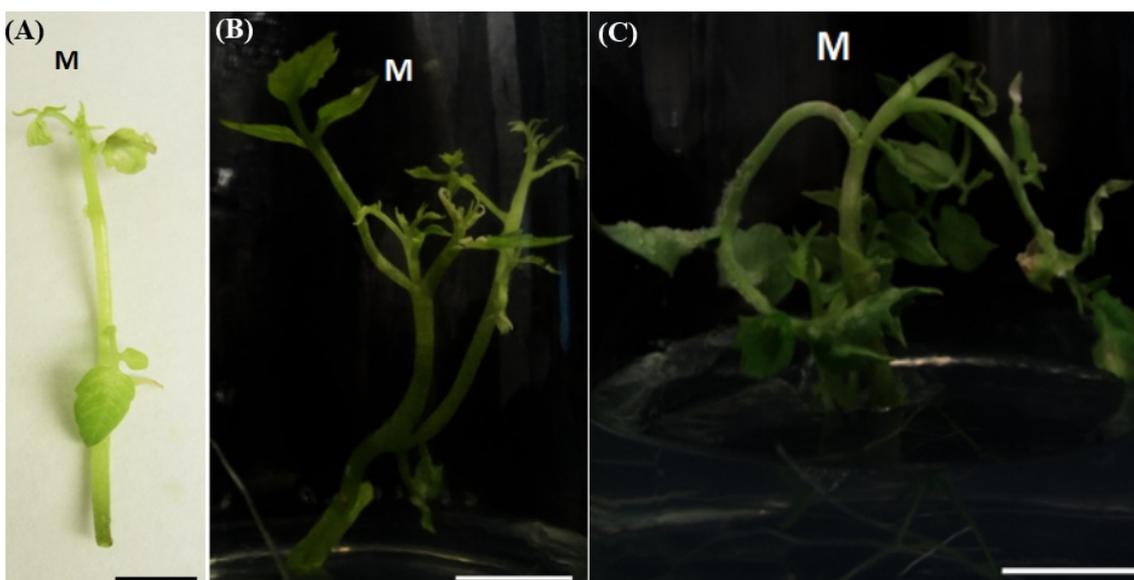


Figura 6. Fenotipo de la planta axénica mutante de la línea 207 ETPI tras su cultivo en medio básico MB3. (A) brote obtenido de una planta axénica mutante cultivada en medio MB3 durante 20 días. (B) y (C) copias clonales del mutante observado en (A). La barra representa 1 cm.

Todos los intentos de aclimatar estas plantas mutantes para obtener semillas TG3 o cruzar con *Money Maker* fracasaron y las plantas murieron. Sin embargo, se observó como algunas de las réplicas clonales obtenidas a partir del cultivo de yemas axilares de esta planta revertían su fenotipo y pasaban a comportarse como una planta WT (Figura 7).

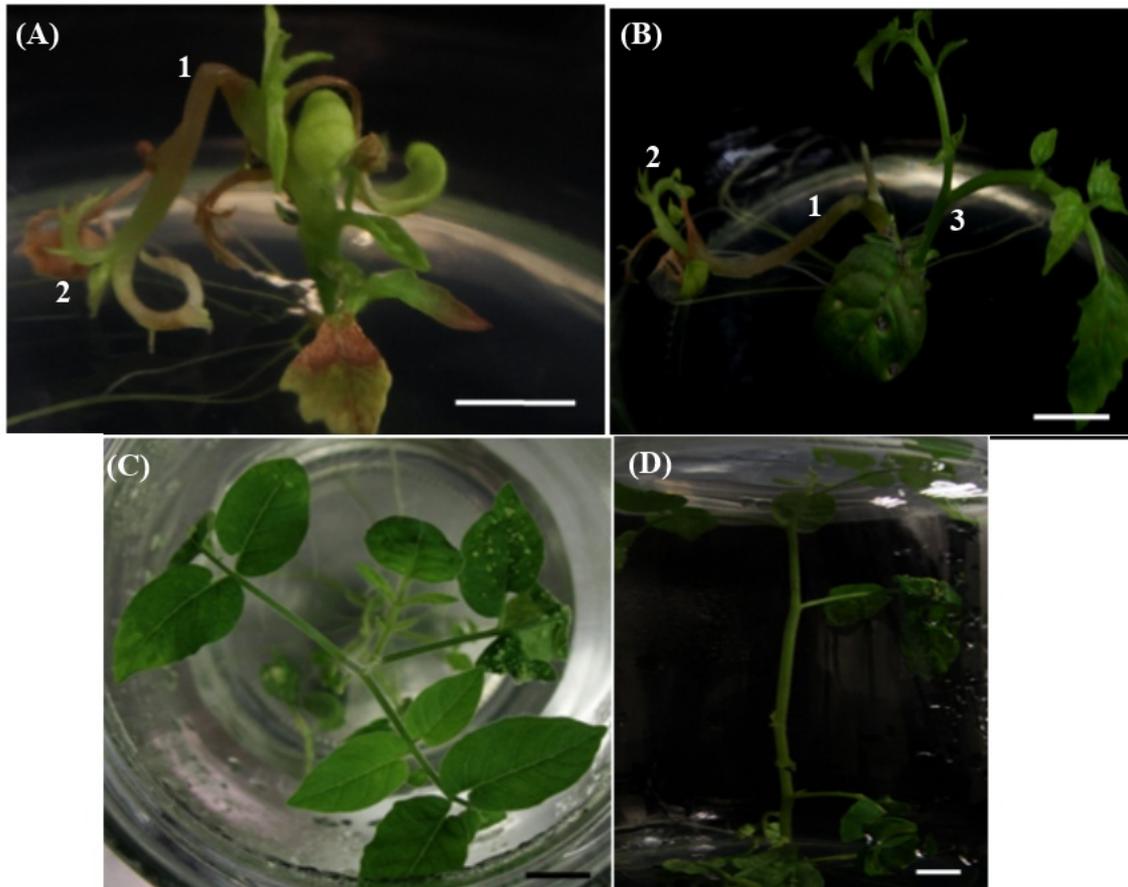


Figura 7. Fenotipo de réplicas clonales de una planta mutante de la línea 207 ETPI. (A) planta con fenotipo mutante tras 15 días de cultivo en MB3 (1.- tallo principal; 2.- ápice meristemático). (B) misma planta que (A) tras 25 días de cultivo en MB3 (3.- activación de una yema axilar que da una planta con fenotipo WT). (C) y (D) planta con fenotipo WT obtenida a partir de (3). Las barras representan 1 cm.

Se van a utilizar estas plantas para intentar obtener la descendencia TG3 y poder corroborar el fenotipo observado en semillas homocigóticas. Además, se está analizando este fenómeno de reversión del fenotipo representado en la Figura 7. Tras clonaciones sucesivas de este material se ha comprobado que al cultivar el ápice meristemático de una planta mutante el fenotipo de la planta sigue siendo mutante. Sin embargo, se ha visto en varias ocasiones la producción de una nueva planta con fenotipo WT a partir del desarrollo de una yema axilar de una planta con fenotipo mutante. Se van a realizar más experimentos para determinar la naturaleza de este fenómeno tanto mediante subcultivos sucesivos de este material como analizando la descendencia de estas plantas.

4.2.1.1 Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante

Se analizaron 77 individuos TG2 en condiciones de cultivo *in vitro* en un total de dos experimentos para llevar a cabo el análisis del modo de herencia (Tabla 4).

Tabla 4. Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante de la línea 207 ETPI

	Segregación	WT	M	Total	χ^2
Experimento 1	Observada	32	5	37	2,60
	Esperada (3:1)	28	9		
Experimento 2	Observada	39	1	40	10,80
	Esperada (3:1)	30	10		
Datos acumulados ^a	Observada	71	6	77	12,16
	Esperada (3:1)	58	19		

^a Análisis χ^2 homogeneidad ($\chi^2_H = 1,24$) indica que las muestras son homogéneas ($P > 0,05$; $\chi^2_{1 g.l.} = 3,84$)

Los análisis de homogeneidad mostraron que los resultados de ambos experimentos no tienen diferencias significativas por lo que podemos agregar los resultados obtenidos. Sin embargo, al contrastar la hipótesis de una mutación monogénica de naturaleza recesiva el análisis χ^2 mostró un valor muy por encima del máximo establecido ($12,16 > 3,84$). Este desajuste de los datos es debido a que el número de mutantes encontrados es menor del esperado. Esto ha ocurrido en ambos experimentos (5 vs 9 y 1 vs 10). Por el fenotipo detectado lo más probable es que exista cierta subletalidad asociada a las plantas con fenotipo mutante que alterare las segregaciones esperadas.

4.2.1.2 Análisis genético del número de insertos de T-DNA

El análisis de la resistencia a kanamicina en una población segregante nos permite calcular el número de insertos T-DNA. Para ello se subcultivaron ápices y yemas axilares en medio β (ver Anexo) y se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 5).

Tabla 5. Análisis de la segregación para resistencia a kanamicina de la línea 207 ETPI

	Segregación	Kan ^R	Kan ^S	Total	χ^2
Experimento 1	Observada	23	13	36	2,37
	Esperada (3:1)	27	9		
Experimento 2	Observada	28	12	40	0,53
	Esperada (3:1)	30	10		
Datos acumulados ^a	Observada	51	25	76	2,53
	Esperada (3:1)	57	19		

^a Análisis χ^2 homogeneidad ($\chi^2_H = 0,38$) indica que las muestras son homogéneas ($P > 0,05$; $\chi^2_{1 g.l.} = 3,84$)

Los análisis de homogeneidad así como los datos acumulados mostraron que no hay motivo para dudar que la línea 207 ETPI cuenta con un único inserto con el gen *nptII* funcional que confiere resistencia a la kanamicina.

4.2.1.3 Análisis de cosegregación fenotipo – inserto de T-DNA

Con los datos de resistencia de la población analizada se comprobó que no hay cosegregación entre el fenotipo mutante y el inserto de T-DNA con el gen *nptII* funcional, al aparecer tres plantas mutantes que presentaban sensibilidad a kanamicina (Tabla 6).

Tabla 6. Análisis de cosegregación entre el fenotipo mutante y un inserto de T-DNA con el gen *nptII* funcional en la línea 207 ETPI

Fenotipo	Kan ^R		Kan ^S	
	WT	M	WT	M
Segregación acumulada	48	3	22	3

4.2.2 2660 ETMM

En esta línea los cotiledones presentaron un color amarillo desde el inicio de su desarrollo en medio MG. Sin embargo no se observó ninguna alteración en la raíz embrionaria de las plántulas mutantes (Figura 8).



Figura 8. Comparación fenotípica de plántulas WT y mutante de 8 días de la línea 2660 ETMM. (A) plantas mutantes (M) y WT observadas en plántulas cultivadas en medio MG durante 8 días. (B) comparación de parte aérea y raíz. (C) detalle de plántula mutante. La barra representa 1 cm.

Al cultivar los ápices meristemáticos en medio básico (MB3), las plantas axénicas de fenotipo mutante presentaron un menor desarrollo radicular en la generación de raíces adventicias y la clorosis se observaba de forma evidente en cotiledones, ápice meristemático, tallo y hojas. Con respecto a las hojas, éstas tienen alterado su desarrollo ya que forman folíolos mucho más pequeños y a las pocas semanas se vuelven prácticamente albinas (Figura 9).

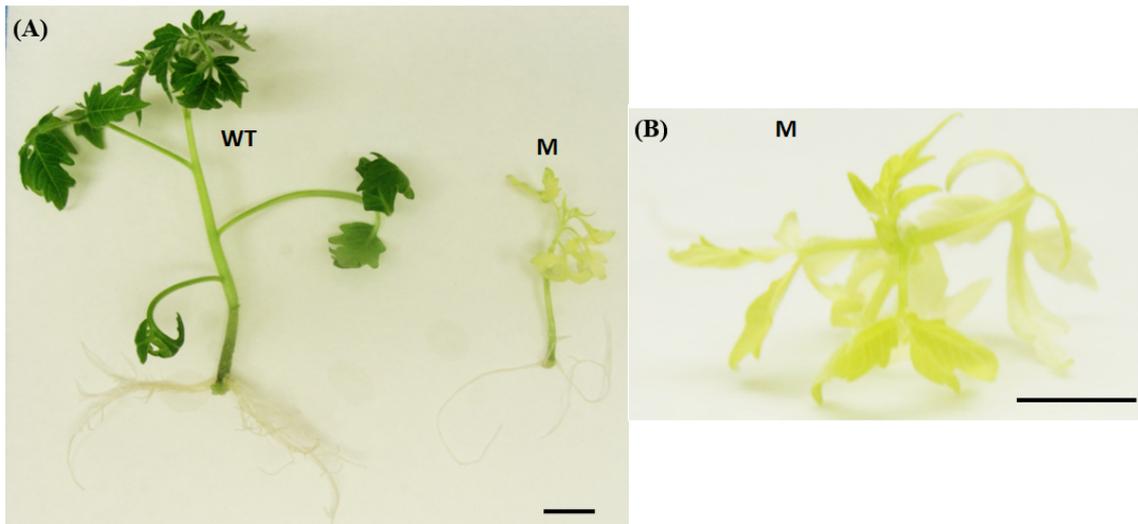


Figura 9. Comparación fenotípica de plantas axénicas WT y mutante de la línea 2660 ETMM tras 25 días de cultivo en MB3. (A) comparación entre planta WT y M. (B) detalle ampliado de hojas y ápice mutante. La barra representa 1 cm.

Se cultivaron 24 semillas previamente esterilizadas y pregerminadas en un semillero y se comprobó que el fenotipo observado *in vitro* se reproduce *in vivo* pero la plántula obtenida era incapaz de generar las primeras hojas y moría a los pocos días (Figura 10).

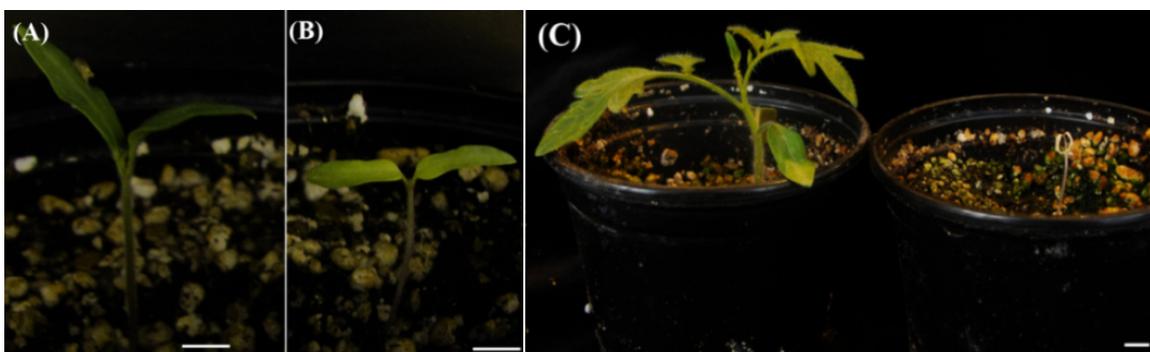


Figura 10. Comparación fenotípica de plántula WT y mutante de la línea 2660 ETMM cultivadas en maceta. (A) y (B) plántulas de 6 días. (C) plántulas de 20 días. La barra representa 1 cm.

4.2.2.1 Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante

Se analizaron 53 individuos TG2 obtenidos en condiciones de cultivo *in vitro* junto a 24 de cultivo *in vivo* en un total de tres experimentos (Tabla 7).

Tabla 7. Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante de la línea 2660 ETMM

	Segregación	WT	M	Total	χ^2
Experimento 1	Observada	14	4	18	0,07
	Esperada (3:1)	13	5		
Experimento 2	Observada	26	9	35	0,01
	Esperada (3:1)	26	9		
Experimento 3	Observada	19	5	24	0,22
	Esperada (3:1)	18	6		
Datos acumulados^a	Observada	59	18	77	0,11
	Esperada (3:1)	58	19		

^a Análisis χ^2 homogeneidad ($\chi^2_H = 0,20$) indica que las muestras son homogéneas ($P > 0,05$; $\chi^2_{2.g.l.} = 5,99$)

Los análisis de homogeneidad así como los datos acumulados mostraron que no hay motivo para dudar que la naturaleza de esta mutación sea monogénica recesiva.

4.2.2.2 Análisis genético del número de insertos de T-DNA

Mediante el cultivo de ápices meristemáticos y yemas axilares en medio β (ver Anexo) se observó que la línea 2660 ETMM no es portadora de un único inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional ($\chi^2_{DA (3:1)} = 17,63 > 3,84_{1.g.l. (5\%)}$). Por lo cual, se realiza un ajuste de la χ^2 para la hipótesis de que la línea porta dos insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional. En este caso se observaría una segregación de 15 plantas resistentes a la kanamicina por cada planta sensible. Los análisis de homogeneidad así como los datos acumulados mostraron que no hay motivo para dudar que la línea 2660 ETMM cuenta con dos insertos T-DNA del gen *nptII* funcional aunque tampoco es descartable que porte tres o más (Tabla 8).

Tabla 8. Análisis de la segregación para resistencia a kanamicina de la línea 2660 ETMM

	Segregación	Kan ^R	Kan ^S	Total	χ^2
Experimento 1	Observada	18	0	18	6,00
	Esperada (3:1)	13	5		
	Esperada (15:1)	17	1		
Experimento 2	Observada	35	0	35	11,67
	Esperada (3:1)	26	9		
	Esperada (15:1)	33	2		
Datos acumulados (DA)^a	Observada	53	0	53	17,67
	Esperada (3:1)	40	13		
	Esperada (15:1)	50	3		

^a Análisis χ^2 homogeneidad indica que las muestras son homogéneas, para una segregación 3:1 ($\chi^2_H = 0,00$) y para una 15:1 ($\chi^2_H = 0,00$) ($P > 0,05$; $\chi^2_{1.g.l.} = 3,84$)

4.2.2.3 Análisis de cosegregación fenotipo – inserto de T-DNA

Con los datos de resistencia a la kanamicina obtenidos, todas las plantas analizadas son resistentes. Por tanto, aún no se puede saber si existe cosegregación entre el fenotipo mutante y un inserto con el gen *nptII* funcional (Tabla 9).

Tabla 9. Análisis de cosegregación entre el fenotipo mutante y un inserto de T-DNA con el gen *nptII* funcional en la línea 2660 ETMM

Fenotipo	Kan ^R		Kan ^S	
	WT	M	WT	M
Segregación acumulada	59	18	0	0

La estrategia que se sigue en estos casos es aclimatar plantas TG2 de fenotipo WT, ya que las de fenotipo mutante no son viables, para obtener las correspondientes semillas TG3. Entre esas descendencias TG3 buscamos en cuáles de ellas se vuelve a observar la mutación (1/4 de las plantas tendrán fenotipo mutante) y, además, la resistencia a la kanamicina indica que porta uno o dos insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional. En esas TG3 donde ya no están presentes algunos de los insertos que no son responsables de la mutación es más sencillo llegar a saber si hay cosegregación.

4.3 Mutantes de parte aérea

Entre las 123 líneas T-DNA analizadas entre *S. pimpinellifolium* y *S. lycopersicum*, se ha detectado un mutante que tiene afectada la actividad del meristemo apical del tallo (191 ETPI) y tres mutantes que presentan distintas alteraciones que dan como resultado, entre otras características, una planta más compacta (2059 ETMM, 2099 ETMM y 2659 ETMM). Aunque las tres líneas presentan un fenotipo de compacidad existen diferencias entre ellas en cuanto al comportamiento *in vitro* e *in vivo*, en el número de hojas que desarrollan y, en el caso de la línea 2659 ETMM, la alteración en un carácter como el desarrollo floral.

4.3.1 191 ETPI: mutante con bifurcación apical

En esta línea el fenotipo mutante se observó por primera vez en plantas axénicas al subcultivar el ápice meristemático a medio MB3. El fenotipo consiste en una

bifurcación del tallo principal por el crecimiento de dos yemas axilares que asumen el papel de meristemo dominante y que producen dos brotes de igual tamaño a partir del punto en que el meristemo apical detuvo su crecimiento. En este mutante también se observó como en algunos nudos del tallo había dos yemas axilares, una de cada una de las hojas que se insertaban a la misma altura del tallo. Esta circunstancia podría estar relacionada con la emergencia de dos brotes iguales a partir de la parada del meristemo terminal en lugar de uno solo (Figura 11).

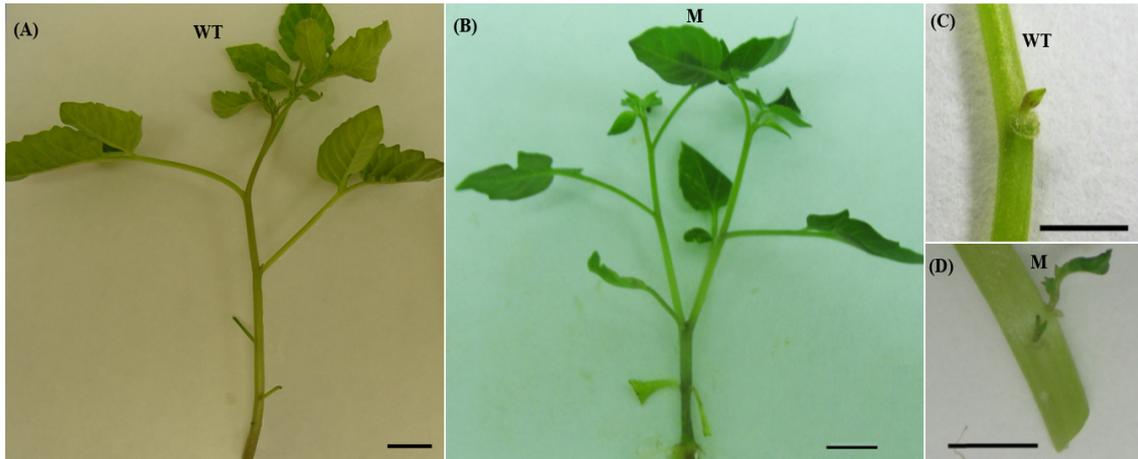


Figura 11. Comparación fenotípica de plantas axénicas WT y mutante de la línea 191 ETPI. (A) plantas WT y (B) mutante obtenidas tras el cultivo de ápices meristemáticos durante 15 días en MB3. (C) yema axilar WT. (D) detalle de la formación de la cercanía de dos yemas axilares en la planta mutante. Las barras representan 1 cm.

En este caso el fenotipo sólo se observó en momentos puntuales del desarrollo de las plantas mutantes y, habitualmente, tras varios subcultivos en medio de clonación. De hecho, inicialmente sólo se detectaron dos plantas mutantes, sin embargo, al seguir subcultivando toda la población TG2 se identificaron plantas con fenotipo mutante que hasta ese momento presentaban un fenotipo totalmente WT. El fenotipo de bifurcación del ápice también se ha observado *in vivo* a partir de plantas aclimatadas y cultivadas en el invernadero. En este caso el fenotipo mutante también se observa exclusivamente en algunos de los nudos de las plantas careciendo, en el resto de caracteres, de ninguna alteración apreciable.

4.3.1.1 Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante

Se analizaron 37 individuos TG2 en condiciones de cultivo *in vitro* en un total de dos experimentos para llevar a cabo el análisis del modo de herencia (Tabla 10).

Tabla 10. Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante de la línea 191 ETPI

	Segregación	WT	M	Total	χ^2
Experimento 1	Observada	15	6	21	0,14
	Esperada (3:1)	16	5		
Experimento 2	Observada	14	2	16	1,33
	Esperada (3:1)	12	4		
Datos acumulados ^a	Observada	29	8	37	0,23
	Esperada (3:1)	28	9		

^a Análisis χ^2 homogeneidad ($\chi^2_H = 0,23$) indica que las muestras son homogéneas ($P > 0,05$; $\chi^2_{1 g.l.} = 3,84$)

Los análisis de homogeneidad así como los datos acumulados mostraron que no hay motivo para dudar que la naturaleza de esta mutación sea monogénica recesiva.

4.3.1.2 Análisis genético del número de insertos de T-DNA

A partir del cultivo de ápices meristemáticos y yemas axilares en medio β (ver Anexo) se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 11).

Tabla 11. Análisis de la segregación para resistencia a kanamicina de la línea 191 ETPI

	Segregación	Kan ^R	Kan ^S	Total	χ^2
Experimento 1	Observada	16	5	21	0,02
	Esperada (3:1)	16	5		
Experimento 2	Observada	10	6	16	1,33
	Esperada (3:1)	12	4		
Datos acumulados ^a	Observada	26	11	37	0,44
	Esperada (3:1)	28	9		

^a Análisis χ^2 homogeneidad ($\chi^2_H = 0,00$) indica que las muestras son homogéneas ($P > 0,05$; $\chi^2_{1 g.l.} = 3,84$)

Los análisis de homogeneidad así como los datos acumulados mostraron que no hay motivo para dudar que la línea 191 ETPI cuenta con un único inserto *nptII* funcional que confiere resistencia a la kanamicina.

4.3.1.3 Análisis de cosegregación fenotipo – inserto de T-DNA

Al aparecer plantas mutantes que presentaban sensibilidad a la kanamicina se comprobó que no hay cosegregación entre el fenotipo mutante y un inserto de T-DNA con el gen *nptII* funcional (Tabla 12).

Tabla 12. Análisis de cosegregación entre el fenotipo mutante y un inserto de T-DNA con el gen nptII funcional en la línea 191 ETPI

Fenotipo	Kan ^R		Kan ^S	
	WT	M	WT	M
Segregación acumulada	19	5	10	2

4.3.2 2059 ETMM: mutante compacto

El fenotipo mutante se detectó en el cultivo de explantes de ápice meristemático en medio básico MB3. El mutante mostró un menor tamaño que las plantas WT. Aparentemente este fenotipo se debía a la presencia de un número similar de hojas con una separación entre ellas menor que la del WT (entrenudos más cortos). Esto le confería una apariencia de planta más compacta (Figura 12).

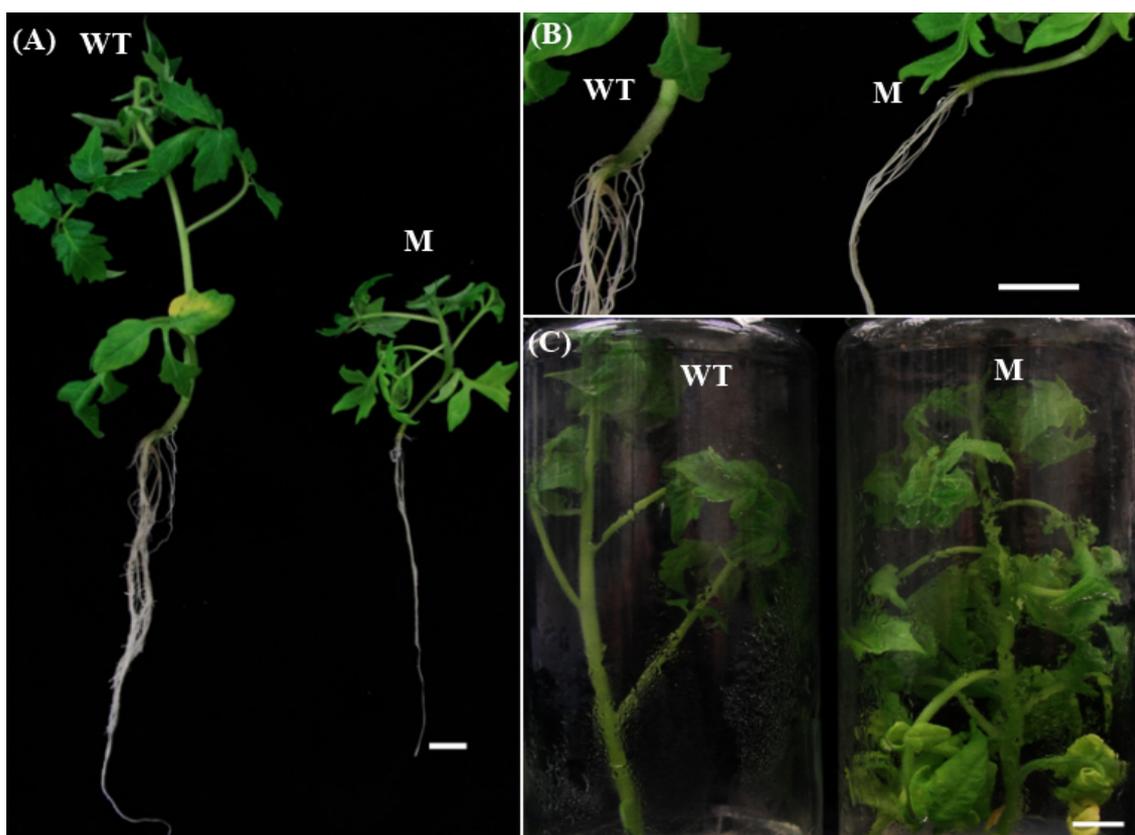


Figura 12. Comparación fenotípica de plantas axénicas WT y M de la línea 2059 ETMM obtenidas a partir del cultivo de ápices meristemáticos. (A) plantas axénicas WT y mutante obtenidas tras 25 días de cultivo en medio MB3. (B) detalle de la raíz obtenida en (A). (C) planta WT obtenida tras 40 días de cultivo en IBA y planta mutante obtenida tras 60 días de cultivo en IBA. Las barras representan 1 cm.

Por otra parte se cultivaron 24 semillas previamente esterilizadas y pregerminadas en un semillero y se comprobó que el fenotipo observado *in vitro* se reproducía también *in vivo* dando lugar a plantas de porte más pequeño con un número ligeramente superior de hojas (Figura 13).



Figura 13. Comparación fenotípica de plantas procedentes de semillas WT y M de la línea 2059 ETMM cultivadas en el invernadero durante 70 días. La barra representa 5 cm.

Para mejorar la caracterización de esta línea se realizaron mediciones de la longitud del tallo, el número de hojas y la longitud media de los entrenudos de las plantas obtenidas *in vitro* y de las cultivadas en el invernadero. Los resultados mostraron una diferencia de comportamiento en el mutante en cuanto al número de hojas, ya que desarrollaron más hojas que las plantas WT a largo plazo. Además, con el paso del tiempo, aunque la altura total de la planta tiende a igualarse entre WT y mutante, la diferencia en la longitud de los entrenudos se mantiene en valores cercanos al 50% respecto de las plantas WT (Figuras 14 y 15).

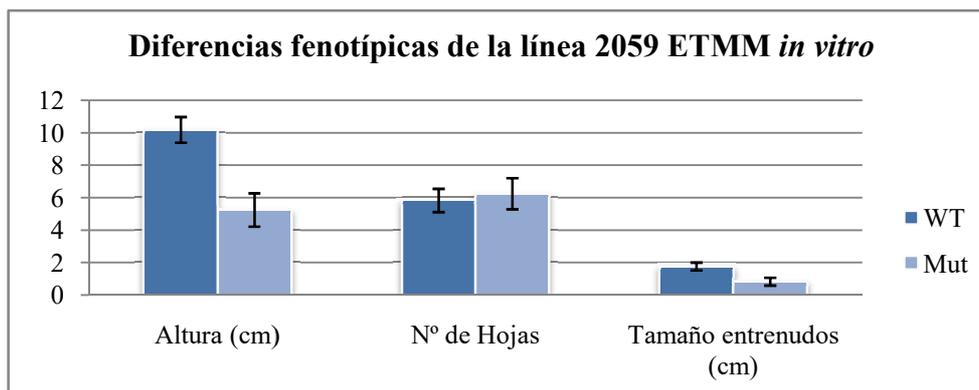


Figura 14. Diferencias fenotípicas entre plantas WT y mutantes de la línea 2059 ETMM tras 30 días de cultivo en medio IBA. Las barras representan la desviación típica de la media.

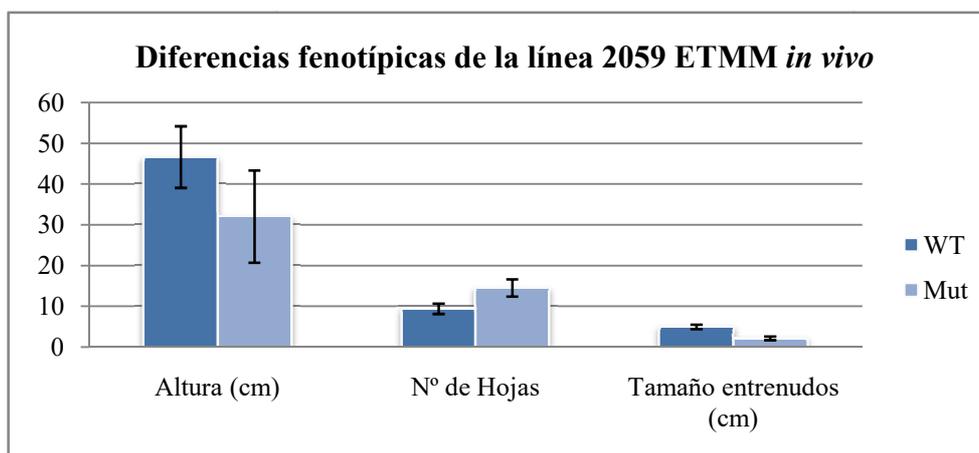


Figura 15. Diferencias fenotípicas entre plantas WT y mutantes de la línea 2059 ETMM tras 70 días de cultivo en el invernadero. Las barras representan la desviación típica de la media.

4.3.2.1 Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante

Se analizaron 71 individuos TG2 obtenidos en condiciones de cultivo *in vitro* en dos experimentos y 12 plantas TG2 procedentes del cultivo en invernadero (Tabla 13).

Tabla 13. Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante de la línea 2059 ETMM

	Segregación	WT	M	Total	χ^2
Experimento 1	Observada	33	4	37	3,97
	Esperada (3:1)	28	9		
Experimento 2	Observada	23	11	34	0,98
	Esperada (3:1)	25	9		
Experimento 3	Observada	10	2	12	0,44
	Esperada (3:1)	9	3		
Datos acumulados ^a	Observada	65	18	83	0,90
	Esperada (3:1)	62	21		

^a Análisis χ^2 homogeneidad ($\chi^2_H = 4,49$) indica que las muestras son homogéneas ($P > 0,05$; $\chi^2_{2 \text{ g.l.}} = 5,99$)

Los análisis de homogeneidad así como los datos acumulados mostraron que no hay motivo para dudar que la naturaleza de esta mutación sea monogénica recesiva.

4.3.2.2 Análisis genético del número de insertos de T-DNA

El análisis de la resistencia a kanamicina en una población segregante nos permite calcular el número de insertos T-DNA. Para ello se cultivaron explantes de folíolos en medio ε (ver Anexo) y se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 14).

Tabla 14. Análisis de la segregación para resistencia a kanamicina de la línea 2059 ETMM

	Segregación	Kan ^R	Kan ^S	Total	χ^2
Experimento 1	Observada	25	12	37	1,09
	Esperada (3:1)	28	9		
Experimento 2	Observada	27	7	34	0,35
	Esperada (3:1)	26	8		
Datos acumulados ^a	Observada	52	19	71	0,12
	Esperada (3:1)	53	18		

^a Análisis χ^2 homogeneidad ($\chi^2_H = 1,33$) indica que las muestras son homogéneas ($P > 0,05$; $\chi^2_{1 \text{ g.l.}} = 3,84$)

Los análisis de homogeneidad así como los datos acumulados mostraron que no hay motivo para dudar que la línea 2059 ETMM cuenta con un único inserto con el gen *nptII* funcional que confiere resistencia a la kanamicina.

4.3.2.3 Análisis de cosegregación fenotipo – inserto de T-DNA

Con los datos de resistencia de la población analizada se comprobó que no hay cosegregación entre el fenotipo mutante y el inserto de T-DNA con el gen *nptII* funcional, al aparecer dos plantas mutantes que presentaban sensibilidad a kanamicina (Tabla 15).

Tabla 15. Análisis de cosegregación entre el fenotipo mutante y un inserto de T-DNA con el gen *nptII* funcional en la línea 2059 ETPI.

Fenotipo	Kan ^R		Kan ^S	
	WT	M	WT	M
Segregación acumulada	39	13	17	2

4.3.3 2099 ET MM: mutante compacto y subletalidad

La primera vez que se detectó este mutante fue al observar las plantas axénicas cultivadas *in vitro* ya que en estado de plántulas no se apreció ninguna alteración. Las plantas de fenotipo mutante de esta línea T-DNA mostraron un tamaño significativamente menor que el de las plantas WT, con un mayor número de hojas y entrenudos más cortos (Figura 16 A). Además, el fenotipo mutante se observa tanto si la planta se obtiene de un ápice meristemático como si se obtiene de una yema axilar (Figura 16 B). Sin embargo, al contrario de lo que ocurría en el mutante anterior, en este caso no se aprecia ninguna alteración en el enraizamiento embrionario ni en el adventicio.

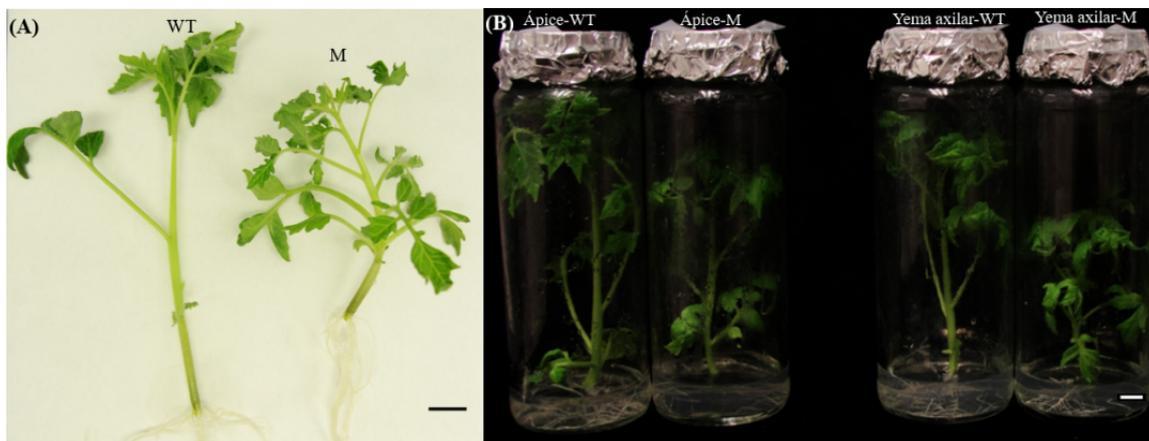


Figura 16. Comparación fenotípica de plantas axénicas WT y M de la línea 2099 ETMM. (A) plantas WT y mutante tras el cultivo de ápices meristemáticos durante 18 días en MB3. (B) plantas cultivadas en medio IBA durante 30 días a partir de ápices meristemáticos (izquierda) y de yemas axilares (derecha). La barra representa 1 cm.

Para mejorar la caracterización fenotípica del mutante se cultivaron 48 semillas previamente esterilizadas y pregerminadas en un semillero y se comprobó que el fenotipo observado *in vitro* se reproduce *in vivo*, dando lugar a plantas de porte más pequeño con un número mayor de hojas (Figura 17).



Figura 17. Comparación fenotípica de plantas WT y mutante de la línea 2099 ETMM cultivadas en el invernadero durante 70 días. La barra representa 5 cm.

Para continuar con la caracterización fenotípica del mutante y describir su comportamiento en condiciones de cultivo *in vitro* e *in vivo* se tomaron mediciones de la longitud del tallo, el número de hojas y la distancia media de entrenudos. Los resultados mostraron que las plantas mutantes alcanzan la mitad del tamaño de las plantas WT aunque tienen el doble de hojas. Con respecto a los entrenudos, esta diferencia está mucho más acentuada en condiciones de *in vitro*, con valores de tamaño medio de 2,1 cm para el WT y 0,55 cm para el mutante, frente a las condiciones de *in vivo* con 5,25 cm para el WT y 2,06 cm para el mutante (Figuras 18 y 19).

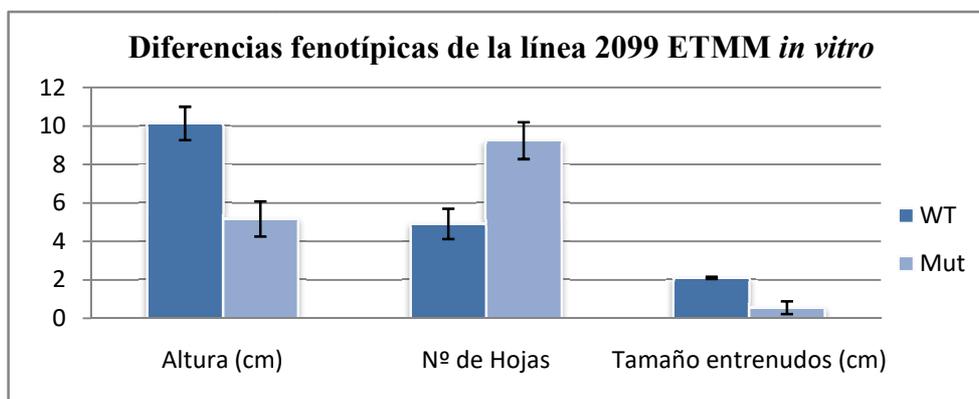


Figura 18. Diferencias fenotípicas entre plantas WT y mutantes de la línea 2099 ETMM tras 30 días de cultivo en medio IBA. Las barras representan la desviación típica de la media.

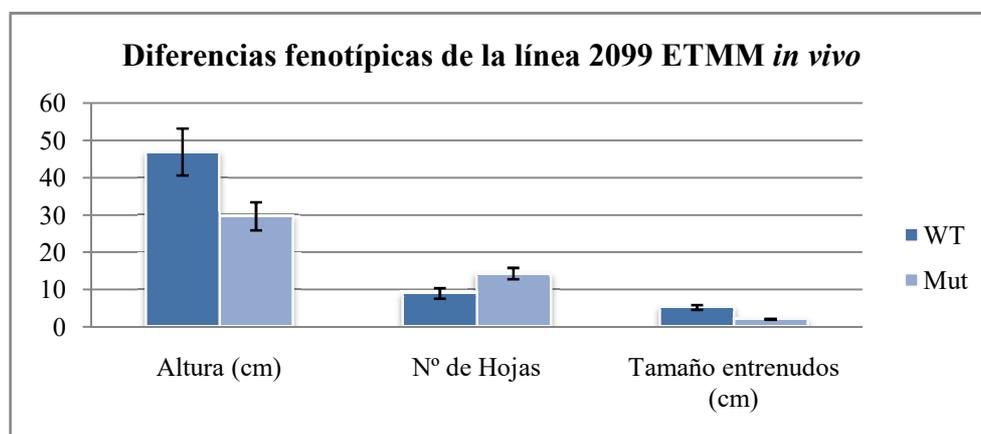


Figura 19. Diferencias fenotípicas entre plantas WT y mutantes de la línea 2099 ETMM tras 70 días de cultivo en el invernadero. Las barras representan la desviación típica de la media.

4.3.3.1 Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante

Se analizaron 53 individuos TG2 obtenidos en condiciones de cultivo *in vitro* junto a 24 de cultivo *in vivo* en un total de tres experimentos para conocer el modo de herencia del fenotipo mutante (Tabla 16).

Tabla 16. Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante de la línea 2099 ETMM

	Segregación	WT	M	Total	χ^2
Experimento 1	Observada	23	1	24	5,56
	Esperada (3:1)	18	6		
Experimento 2	Observada	28	2	30	5,38
	Esperada (3:1)	22	8		
Experimento 3	Observada	44	4	48	7,11
	Esperada (3:1)	36	12		
Datos acumulados ^a	Observada	95	7	102	17,90
	Esperada (3:1)	76	26		

^a Análisis χ^2 homogeneidad ($\chi^2_H = 0,15$) indica que las muestras son homogéneas ($P > 0,05$; $\chi^2_{2 \text{ g.l.}} = 5,99$)

Los análisis de homogeneidad mostraron que podemos agregar los resultados de los tres experimentos. Sin embargo, el análisis de los datos acumulados ($\chi^2 = 17,90$) mostró una clara discrepancia entre los datos observados y los esperados para una mutación monogénica recesiva. Este desajuste de los datos es debido a que el número de mutantes encontrados está muy por debajo de los esperados. En este caso, la hipótesis que se plantea para explicar este resultado es que existe cierta subletalidad asociada a las plantas de fenotipo mutante que altera las segregaciones esperadas.

4.3.3.2 Análisis genético del número de insertos de T-DNA

El análisis de la resistencia a kanamicina en una población segregante nos permite calcular el número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional. Para ello se cultivaron explantes de folíolos en medio ϵ (ver Anexo) y se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 17).

Tabla 17. Análisis de la segregación para resistencia a kanamicina de la línea 2099 ETMM

	Segregación	Kan ^R	Kan ^S	Total	χ^2
Experimento 1	Observada	20	4	24	0,89
	Esperada (3:1)	18	6		
Experimento 2	Observada	23	7	30	0,04
	Esperada (3:1)	23	7		
Datos acumulados^a	Observada	43	11	44	0,62
	Esperada (3:1)	41	13		

^a Análisis χ^2 homogeneidad ($\chi^2_H = 0,32$) indica que las muestras son homogéneas ($P > 0,05$; $\chi^2_{1 \text{ g.l.}} = 3,84$)

Los análisis de homogeneidad así como los datos acumulados mostraron que no hay motivo para dudar que la línea 2099 ETMM cuenta con un único inserto con el gen *nptII* funcional, es decir, que confiere resistencia a la kanamicina.

4.3.3.3 Análisis de cosegregación fenotipo – inserto de T-DNA

Los datos de resistencia de la población analizada no han permitido establecer si existe cosegregación entre el fenotipo mutante y un inserto de T-DNA con el gen *nptII* funcional debido a que al existir subletalidad se han podido evaluar muy pocas plantas mutantes (Tabla 18).

Tabla 18. Análisis de cosegregación entre el fenotipo mutante y un inserto de T-DNA con el gen *nptII* funcional en la línea 2099 ETPI.

Fenotipo	Kan ^R		Kan ^S	
	WT	M	WT	M

Segregación acumulada	40	3	11	0
-----------------------	----	---	----	---

De momento no se puede descartar que exista cosegregación pero, para poder establecer esta circunstancia con una probabilidad de fallo menor del 5% necesitaríamos al menos 12 plantas mutantes y que todas ellas fueran resistentes a la kanamicina. Como no disponemos de más semillas TG2 de esta línea, la estrategia que estamos empleando es obtener TG3 de las tres plantas mutantes y de otras tantas plantas WT-Kan^S para así poder determinar si existe cosegregación con nuevos ensayos.

4.3.4 2659 ETMM: mutante compacto y de desarrollo floral

Este mutante se detectó *in vitro* al cultivar explantes de ápice meristemático en medio básico MB3. El fenotipo se caracterizó por presentar menor altura de las plantas y mayor número de hojas que, además, tienen un menor tamaño que las de las plantas WT. En este caso no se ha detectado ninguna alteración en el sistema radicular embrionario ni en las raíces adventicias (Figura 20).



Figura 20. Comparación fenotípica de plantas axénicas WT y M de la línea 2659 ETMM procedentes del cultivo de ápices meristemáticos en MB3 durante 30 días. La barra representa 1 cm.

Además, en todas las plantas mutantes se observó cierta activación del crecimiento de las yemas axilares sin que el ápice meristemático presentara ninguna alteración aparente (Figura 21)

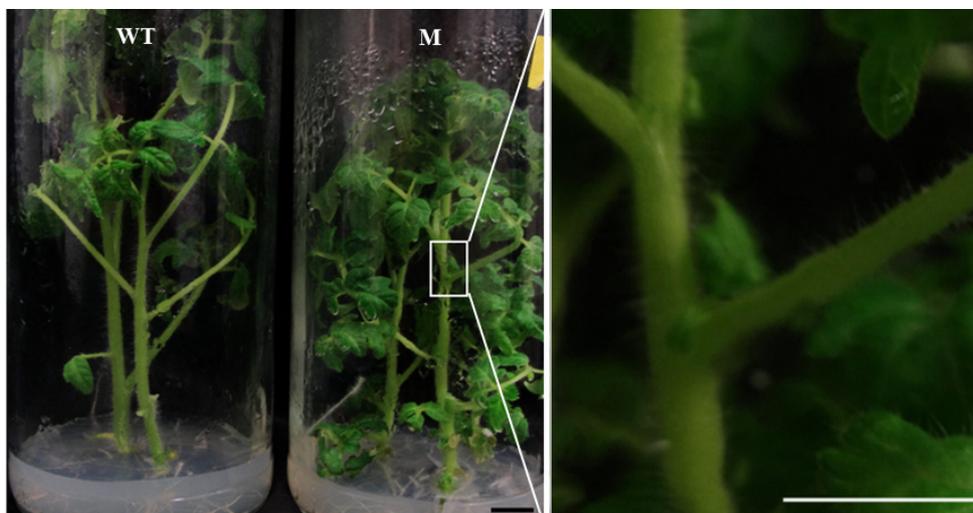


Figura 21. Comparación fenotípica de plantas axénicas WT y mutante de la línea 2659 ETMM obtenidas tras el cultivo de ápices meristemáticos en IBA durante 30 días. La barra representa 1 cm.

Para mejorar la caracterización fenotípica del mutante se cultivaron 24 semillas previamente esterilizadas y pregerminadas en un semillero y se comprobó que el fenotipo de compacidad observado *in vitro* también se vio en las plantas cultivadas *in vivo*, dando lugar a plantas de porte más pequeño con un número mayor de hojas (Figura 22 A). También se observaron alteraciones en el tamaño y el desarrollo foliar (Figura 22 B). Además se observó una característica que no se había visto *in vitro*, la formación de nuevas estructuras organogénicas en la zona de inserción del foliolo con el raquis (Figura 22 C y D).



Figura 22. Comparación fenotípica de plantas WT y mutante de la línea 2659 ETMM cultivadas en el invernadero durante 90 días. (A) plantas WT y mutante. (B) hojas WT y mutante. (C-D) detalle de la formación de estructuras organogénicas en el raquis de la hoja. Si no se indica otra medida la barra representa 1 cm.

Para mejorar la caracterización del mutante se analizaron diversos parámetros de su desarrollo vegetativo en plantas cultivadas en condiciones *in vitro* e *in vivo*. Los resultados mostraron una diferencia notable en el número de hojas, en ambas condiciones, aunque ésta parece estar algo más acentuada entre las plantas cultivadas *in vitro* (Figuras 23 y 24)

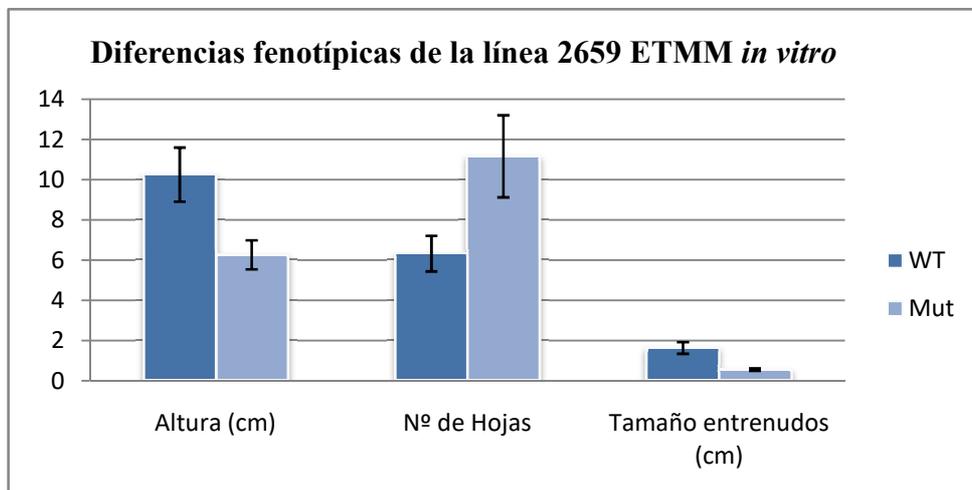


Figura 23. Diferencias fenotípicas entre plantas WT y mutantes de la línea 2659 ETMM tras 30 días de cultivo en medio IBA. Las barras representan la desviación típica de la media.

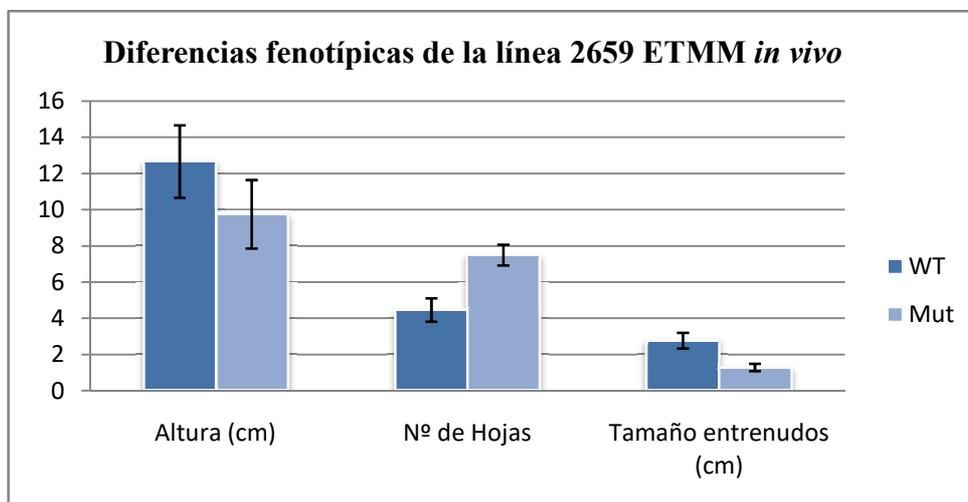


Figura 24. Diferencias fenotípicas entre plantas WT y mutantes de la línea 2659 ETMM tras 30 días de cultivo en el invernadero. Las barras representan la desviación típica de la media.

Un aspecto diferencial de esta línea respecto de los otros dos mutantes compactos es el fenotipo observado en sus flores. Éste consistía en una alteración de prácticamente todos los verticilos de la flor (Figura 25).



Figura 25. Comparación fenotípica y disección floral de la línea 2659 ETMM. (A, C, E y G) flor de planta WT. (B, D, F y H) flor de planta mutante. (A-B) flor completa. (C-D) como estaminal. (E-F) pistilo. (G-H) ovario. Las barras de (A-C) representan 1cm, el resto representan 1 mm.

Los sépalos de la mayor parte de las flores no presentaron cambios significativos más allá de una pequeña reducción en su tamaño. Sin embargo, los pétalos son más estrechos que los de las flores WT (Figura 25 A-B). Donde se observan las mayores diferencias es en el cono estaminal y en el pistilo. En las flores mutantes los estambres se acortan y se curvan hacia el interior de la flor (Figura 25 C-D). En cuanto al pistilo se puede ver como el número de carpelos es claramente superior al de las flores WT (Figura 25 E-H).

Recientemente se han obtenido los primeros frutos procedentes de las plantas mutantes. No se aprecian diferencias significativas en el tamaño aunque los frutos mutantes presentan un marcado acostillamiento como consecuencia del mayor número de carpelos presentes en el ovario (Figura 26 A-B). Además se ha comprobado que los frutos mutantes en estado verde inmaduro no tienen diferencias significativas y presentan semillas inmaduras como los frutos WT (Figura 26 C-D).

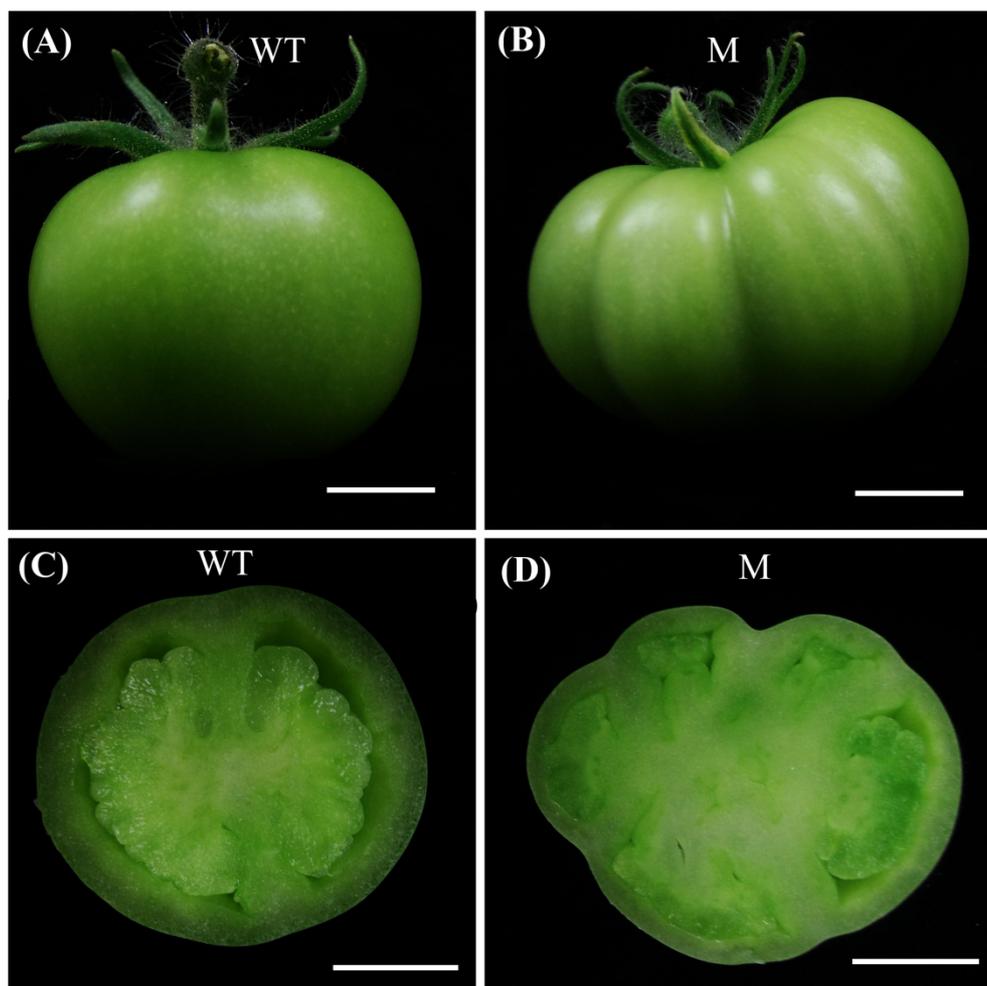


Figura 26. Comparación fenotípica de frutos verde inmaduros de la línea 2659 ETMM. (A-B) fruto entero. (C-D) sección ecuatorial del fruto. La barra representa 1 cm.

4.3.4.1 Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante

Se analizaron 53 individuos TG2 obtenidos en condiciones de cultivo *in vitro* junto a 19 de cultivo *in vivo* en un total de tres experimentos (Tabla 19).

Tabla 19. Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante de la línea 2659 ETMM

	Segregación	WT	M	Total	χ^2
Experimento 1	Observada	14	2	16	1,33
	Esperada (3:1)	12	4		
Experimento 2	Observada	33	9	42	0,29
	Esperada (3:1)	32	10		
Experimento 3	Observada	15	4	19	0,16
	Esperada (3:1)	14	5		
Datos acumulados ^a	Observada	62	15	77	1,25
	Esperada (3:1)	58	19		

^a Análisis χ^2 homogeneidad ($\chi^2_H = 0,53$) indica que las muestras son homogéneas ($P > 0,05$; $\chi^2_{2 \text{ g.l.}} = 5,99$).

Los análisis de homogeneidad así como los datos acumulados mostraron que no hay motivo para dudar que la naturaleza de esta mutación sea monogénica recesiva.

4.3.4.2 Análisis genético del número de insertos de T-DNA

El análisis de la resistencia a kanamicina en una población segregante nos permite calcular el número de insertos T-DNA. Para ello se cultivaron explantes de hipocótilo en medio ϵ (ver Anexo) y se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 20).

Tabla 20. Análisis de la segregación para resistencia a kanamicina de la línea 2659 ETMM

	Segregación	Kan ^R	Kan ^S	Total	χ^2
Experimento 1	Observada	11	5	16	0,33
	Esperada (3:1)	12	4		
Experimento 2	Observada	32	9	41	0,20
	Esperada (3:1)	31	10		
Datos acumulados ^a	Observada	43	14	57	0,01
	Esperada (3:1)	43	14		

^a Análisis χ^2 homogeneidad ($\chi^2_H = 0,32$) indica que las muestras son homogéneas ($P > 0,05$; $\chi^2_{1 \text{ g.l.}} = 3,84$).

Los análisis de homogeneidad así como los datos acumulados mostraron que no hay motivo para dudar que la línea 2659 ETMM cuenta con un único inserto con el gen *nptIII* funcional que confiere resistencia a kanamicina.

4.3.4.3 Análisis de cosegregación fenotipo – inserto de T-DNA

Con los datos de resistencia de la población analizada se comprobó que no hay cosegregación entre el fenotipo mutante y el inserto de T-DNA con el gen *nptII* funcional al aparecer plantas mutantes que presentaban sensibilidad a kanamicina (Tabla 21).

Tabla 21. Análisis de cosegregación entre el fenotipo mutante y un inserto de T-DNA con el gen *nptII* funcional en la línea 2659 ETPI.

Fenotipo	Kan ^R		Kan ^S	
	WT	M	WT	M
Segregación acumulada	31	12	12	3

5 Discusión

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

En nuestro grupo, se ha utilizado la mutagénesis insercional con T-DNA como herramienta para la generación de mutantes que afecten a diversos caracteres de tomate y especies silvestres relacionadas. A partir del estudio de estos mutantes se puede lograr identificar y clonar los genes afectados que quedan etiquetados por el T-DNA. Este proyecto se está llevando a cabo gracias a la puesta a punto de métodos de transformación genética en estas especies con una elevada eficacia, es decir, que permiten obtener un elevado número de plantas diploides procedentes de eventos de transformación independientes. Por ejemplo, nuestro grupo ha alcanzado una eficacia útil de transformación en tomate del 20 - 25 %, lo cual quiere decir que por cada 100 explantes se obtienen entre 20 - 25 plantas transgénicas diploides. En alguna especie silvestre como *S. pennellii* esta eficacia se puede incrementar hasta valores superiores a los de tomate. Gracias a esta metodología se han generado más de 3000 líneas T-DNA de tomate, 2500 de *S. pennellii*, 405 de *S. pimpinellifolium* y 550 de *S. galapagense* para su posterior evaluación.

El primer cuello de botella a la hora de trabajar con este tipo de estrategias es la gran cantidad de material vegetal que hay que manejar para poder detectar las líneas mutantes de naturaleza recesiva, ya que los fenotipos mutantes tan solo representan el 25% de las plantas evaluadas, en el mejor de los casos. Con esta frecuencia de aparición de un fenotipo mutante es necesario cultivar 12 plantas de cada TG2 si queremos tener una probabilidad de fallo menor del 5% en la detección de una línea mutante. Por este motivo, se hace imprescindible la puesta a punto de una metodología de trabajo que permita llevar a cabo esta tarea reduciendo el gasto de tiempo, espacio y recursos al mínimo posible. En este sentido, el cultivo *in vitro* ofrece una oportunidad idónea para la identificación de mutantes, permitiéndonos el manejo de una gran cantidad de material vegetal en poco espacio y, a la vez, controlar perfectamente las condiciones de cultivo como medio, temperatura y humedad. Además, una gran ventaja frente al uso de técnicas de cultivo en invernadero radica en la posibilidad de aplicar la multiplicación del material vegetal y su mantenimiento en la cámara a partir del cultivo de ápices meristemáticos y yemas axilares. Así, podemos mantener indefinidamente fenotipos

mutantes de interés y multiplicar las plantas a partir de las cuales se van a llevar a cabo nuevos experimentos. Esto, junto a la posibilidad de mantener *in vitro* mutantes que no podrían crecer bien en condiciones de cultivo *in vivo* (e.g.: cloróticos, albinos,...) representa un valor añadido a la hora de elegir una metodología basada en el cultivo *in vitro*. Además, el empleo de técnicas de cultivo *in vitro* permite la evaluación de caracteres difícilmente detectables (i.e. alteraciones en el enraizamiento) o, directamente imposibles de detectar (i.e. alteraciones en la capacidad de regeneración adventicia).

En este contexto, el principal objetivo de este trabajo es la evaluación de líneas T-DNA de *S. pimpinellifolium* y tomate para identificar mutantes en caracteres del desarrollo temprano, con vistas a clonar los genes afectados en estos mutantes. Para ello se han evaluado 110 líneas T-DNA de *S. pimpinellifolium*, de las que se han identificado dos líneas mutantes suponiendo un 1,8 % de las líneas evaluadas. En otros trabajos del grupo en los que se ha seguido una metodología similar, pero en tomate *Money Maker*, este porcentaje alcanzó el 5% del total de líneas evaluadas (Molero, 2016). El porcentaje obtenido en *S. pimpinellifolium* es comparable al obtenido en tomate ya que en el caso de la especie silvestre hubo alguna dificultad adicional como la mala germinación de las semillas (los porcentajes de germinación rara vez superaban el 60 % por la antigüedad de la cosecha de la que disponíamos suficiente semilla) y la aparición de plantas con desarrollo anómalo incluso entre las plantas WT. Hay que tener en cuenta que esta metodología no se había probado previamente en *S. pimpinellifolium* y que esta especie en otras técnicas de cultivo *in vitro* también se maneja con mayor dificultad que tomate. Por último, con respecto a las trece líneas evaluadas de tomate se ha logrado identificar cinco mutantes. En este caso hay que tener en cuenta que las líneas evaluadas fueron previamente seleccionadas por haber visto algún fenotipo que no había podido ser corroborado hasta el actual trabajo.

5.2 Modo de herencia del fenotipo mutante, número de insertos T-DNA y cosegregación con el fenotipo mutante

Todos los mutantes identificados en este trabajo se ajustan a un modo de herencia monogénica recesiva y dos de ellos presentan cierta subletalidad. En este caso el fenotipo de la planta TG1 es WT y sólo se observa el fenotipo mutante en $\frac{1}{4}$ parte de las plantas TG2. Este resultado no nos sorprende ya que entre los mutantes identificados en todo el proyecto el número de mutantes recesivos encontrados es muy superior al de

mutantes dominantes. Además, con alguno de los caracteres que se ha identificado en este trabajo, aún es más improbable la identificación de mutantes dominantes ya que habría sido más difícil que hubieran superado todas las etapas del proceso de obtención de plantas TG1. Así, por ejemplo, una planta TG1 que presentara una mutación dominante de fenotipo clorótico daría como resultado un brote de color verde claro o amarillento que probablemente crecería con dificultad o podría haberse eliminado al pensar que se trataba de un brote sensible a la kanamicina.

En cuanto al número de copias del T-DNA insertadas en las líneas evaluadas, en seis de ellas se ha comprobado que tienen un único inserto y en la otra al menos tiene dos copias de T-DNA. Con el vector pD991 que se ha utilizado en la gran parte de las líneas T-DNA generadas por nuestro grupo el número medio de copias insertadas en las líneas evaluadas es de 1,7, una cifra algo superior a la obtenida en este trabajo. Este número de copias por línea transgénica es adecuado ya que un número de insertos muy elevado dificultaría la clonación del gen afectado mediante *Anchor-PCR* ya que este método se basa en la amplificación de fragmentos de ADN genómico a partir de los RB (*right border*) y LB (*left border*) del T-DNA. Por tanto, si en una línea se hubieran insertado muchas copias aumentarían las probabilidades de amplificar regiones que no son candidatas del albergar el gen que provoca el fenotipo.

De las siete líneas T-DNA identificadas como mutantes, en cinco de ellas se ha podido comprobar la ausencia de cosegregación del fenotipo y un inserto de T-DNA con el gen *nptII* funcional por haber identificado alguna planta mutante sensible a la kanamicina. En trabajos de otros grupos se ha visto que, tras evaluar múltiples líneas T-DNA y analizar la presencia de cosegregación inserto-fenotipo, alrededor del 35% de las mutaciones son debidas a un inserto (Azpiroz-Leehan y Feldmann, 1997). El resto de las mutaciones pueden estar ocasionadas por inserciones de secuencias del ADN de *Agrobacterium* o del cuerpo del vector (Peterhans *et al.*, 1990) o por eventos de variación somaclonal (variación genética debida al cultivo *in vitro*). En estos casos lo que se hace es una serie de 19 PCR's cuyos cebadores abarcan toda la secuencia del vector, tanto el T-DNA como el cuerpo del mismo. De esta forma se puede detectar si el fenotipo mutante está causado por un fragmento truncado de T-DNA o por la inserción de un fragmento del cuerpo del vector. En el caso de que esa prueba resulte también negativa la ausencia de cosegregación del fenotipo mutante con un fragmento de ADN de secuencia conocida dificulta la futura clonación del gen afectado. Por tanto, si se

quisiera seguir con el clonaje génico en estas líneas, habría que recurrir a técnicas de clonaje por secuenciación. Para ello primero habría que cruzar las plantas mutantes de tomate con *S. pimpinellifolium* (o los mutantes de *S. pimpinellifolium* con plantas de *Money Maker*) para obtener la generación F1. Después se debe autofecundar esa F1 para obtener semillas F2. Finalmente, en la generación F2, se deben identificar plantas WT y plantas mutantes para secuenciar el genoma de esas plantas e identificar los cambios genéticos que comparten exclusivamente todas las plantas F2 mutantes. En la región genómica donde ocurra esto es donde debe estar localizado el gen afectado en esa línea T-DNA.

5.3 Mutantes de enraizamiento

La línea 2649 ETMM se ha catalogado como mutante afectado en su enraizamiento. Gracias al empleo del cultivo *in vitro* en nuestro grupo hemos identificado, además de éste, diversos mutantes afectados en el desarrollo radicular. Aunque en este trabajo sólo se ha podido llevar a cabo la identificación del mutante y alguna evaluación adicional, en este tipo de mutantes se realizan las siguientes pruebas. Se lleva a cabo la evaluación de su fenotipo cuando se cultivan ápices meristemáticos en medios con diferentes tipos y concentraciones de auxinas. También se analiza su concentración endógena de hormonas para determinar si varía de forma significativa respecto del WT. Además, se llevan a cabo injertos de todas las combinaciones posibles (parte aérea y raíz vs WT y M). Por último, se hacen los cortes histológicos que permitan conocer mejor cual es el proceso celular que pueda estar afectado en cada mutante.

5.4 Mutantes cloróticos

En este trabajo se han identificado como mutantes cloróticos varias líneas que deben tener alterada su capacidad fotosintética y presentan otras alteraciones en su crecimiento vegetativo. Estas líneas mutantes generan un enorme interés porque permiten conocer genes o procesos relacionados con la fotosíntesis. En este trabajo se ha determinado que la mutación causada en la línea 207 ETPI presenta cierta subletalidad lo que provoca que aparezcan menos plantas mutantes de las esperadas. Esta subletalidad puede estar causada por distintos fenómenos: problemas en el desarrollo del polen o los óvulos que portan el alelo mutado, aborto de semillas, pérdida de viabilidad diferencial de la semilla mutante con el paso del tiempo o letalidad en los estadios iniciales del desarrollo

del embrión entre otros casos. Para descartar alguna de estas hipótesis se va a obtener nueva semilla para volver a determinar la segregación fenotípica. Además, si se quiere saber si existe algún problema en la formación de los gametos una posibilidad es estudiar la segregación tras la producción de semillas de retrocruce en ambos sentidos.

En nuestro grupo se han identificado cerca de ocho líneas T-DNA de mutantes de tomate afectadas en la coloración de la planta. De todas ellas, en una ya se ha confirmado que el fenotipo está ocasionado por la inserción de un T-DNA. En este trabajo la línea 2660 ETMM ha despertado un gran interés por su fenotipo aunque no se ha podido determinar todavía la existencia de cosegregación debido a que posee dos o más insertos de T-DNA. Como los intentos de aclimatar la planta mutante han fracasado debido a la letalidad asociada a la clorosis, se ha procedido a aclimatar un grupo de plantas TG2 de fenotipo WT para analizar la descendencia de cada una de ellas, en busca de una población TG3 que presente un solo inserto T-DNA y en la que se observe la mutación. Todo ello a fin de confirmar o descartar la posible cosegregación del fenotipo mutante con un inserto de T-DNA. Debido al tiempo necesario para obtener las citadas descendencias y su posterior evaluación, los resultados de esta tarea no han podido incluirse en este trabajo.

5.5 Mutantes compactos

En este trabajo se han detectado tres mutantes de *Money Maker* que, entre otros caracteres, presentaban un fenotipo compacto, es decir, un menor tamaño de los entrenudos. Esta coincidencia en el fenotipo principal observado no nos extraña ya que algunos de los genotipos de tomate se seleccionaron por presentar una alteración similar en las plantas TG1. La línea 2059 ETMM fue caracterizada inicialmente como mutante enana debido al pequeño porte que alcanzaba en comparación con el WT junto a un menor desarrollo radicular. Sin embargo, al analizar el comportamiento de este fenotipo *in vitro* en los sucesivos subcultivos, se observó que las plantas mutantes acababan mostrando un desarrollo radicular similar al WT. El fenotipo que se mantenía de forma constante en todos los estadios de desarrollo era el de menor longitud de los entrenudos.

Los otros mutantes con fenotipo compacto encontrados en este trabajo son las líneas 2099 ETMM y 2659 ETMM. Aunque los dos presentan diferentes comportamientos en cuanto a su desarrollo, existe una característica común en ambas, un mayor número de

hojas con entrenudos más cortos en comparación con el WT, tanto en condiciones de *in vitro* como *in vivo*. Con respecto a la línea 2099 ETMM cabe destacar la particularidad de que hay subletalidad asociada al fenotipo mutante. De forma que, tal como se describió para el mutante 207 ETPI, podemos plantear el escenario de que el gen mutado que confiere fenotipo de compacidad, también participa en otros procesos como la formación o maduración de gametos, polinización y maduración del embrión o la germinación de la semilla. En este caso podemos descartar que sea un problema de pérdida de viabilidad de semilla, al realizarse los experimentos con semillas de una cosecha relativamente reciente.

Por último, el mutante 2659 ETMM presenta múltiples alteraciones morfológicas asociadas a una mutación de naturaleza recesiva y no cosegrega con el inserto T-DNA. Esta línea ha despertado un enorme interés en el grupo debido a la gran variedad de caracteres que presenta alterados. En este caso el gen mutado parece estar implicado en la arquitectura de la planta, la morfología de las hojas, la formación de estructuras organogénicas en el raquis de hojas, el desarrollo de las flores y la activación de la brotación axilar. En relación a este último carácter, en plantas transgénicas de tabaco en las que se sobreexpresa la producción de citoquininas, se observa una pérdida de la dormancia de las yemas axilares dando lugar a brotes axilares (Faiss *et al.*, 1997). Esta activación axilar de los brotes es debida al efecto de las citoquininas en el ciclo celular, acelerando el crecimiento del SAM y dando lugar a fenotipos con un mayor número de hojas de forma indirecta (Müller y Leyser, 2011). En este mutante también cabe destacar la alteración observada en el desarrollo de las flores que repercute en el desarrollo y morfología del fruto. El futuro estudio más detallado del desarrollo floral, analizando diferentes etapas, la fertilidad de las flores, el proceso de cuajado, crecimiento y maduración del fruto, etc. nos ayudarán a mejorar el conocimiento de los procesos biológicos afectados en este mutante. Por último, con relación a la formación de estructuras organogénicas en hojas de plantas de invernadero, se ha descrito por otros autores este fenómeno en tabaco y *Arabidopsis*, estando asociado en esos casos a genes de síntesis de citoquininas (Estruch *et al.*, 1991; Faure *et al.*, 1998). Aunque en un experimento inicial no se observó un efecto claro, se va a comprobar si este mutante tiene afectada su capacidad de regeneración adventicia.

Finalmente, para caracterizar mejor estos tres mutantes se propone realizar un análisis del contenido endógeno de hormonas para ver si hay alguna relación entre el fenotipo

compacto y la alteración en los balances hormonales. Además, también se pueden cultivar ápices meristemáticos en medios con distintos contenidos hormonales para ver cómo se ve afectado su desarrollo. Por último, también aportará una valiosa información la realización de injertos que discriminen el efecto que produce la raíz y la parte aérea en el fenotipo mutante.

6 Conclusiones

- Se ha analizado la presencia de fenotipos mutantes en el desarrollo temprano de la planta en 110 líneas T-DNA de *S. pimpinellifolium* y 13 líneas de tomate (*Money Maker*) preseleccionadas. Se han encontrado siete líneas T-DNA mutantes, dos de *S. pimpinellifolium* y cinco de tomate para diferentes caracteres: desarrollo radicular, clorosis, compacidad y otras características del desarrollo vegetativo y reproductivo. Se ha procedido a su evaluación fenotípica tanto *in vitro* como *in vivo*. En el invernadero se han corroborado la presencia de los mismos fenotipos singulares que se vieron en las plantas cultivadas *in vitro*. Además, también se ha analizado el modo de herencia de la mutación, el número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional y si existe cosegregación entre un inserto T-DNA y el fenotipo mutante.
- Se ha identificado una línea, 2642 ETMM, con alteraciones en el desarrollo de raíces secundarias, tanto en el enraizamiento embrionario como en el adventicio. Además presenta una clorosis internervial cuando su desarrollo avanza y un crecimiento muy ralentizado. En esta línea se ha integrado un único inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional que no cosegrega con la mutación.
- Se han identificado dos líneas, 207 ETPI y 2660 ETMM, que presentan un fenotipo clorótico. La línea 207 ETPI presenta clorosis extrema con cierta subletalidad de las plantas mutantes aunque se ha visto que algunas yemas axilares de plantas mutantes revierten este fenotipo. En esta línea se ha integrado un único inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional que no cosegrega con la mutación. En cambio, la línea 2660 ETMM presenta una clorosis extrema desde el inicio de su desarrollo. La línea cuenta con 2 o más insertos de T-DNA y todavía no sabemos si alguna de esos insertos es el responsable del fenotipo mutante.
- Se han identificado cuatro líneas con alteraciones en diversos caracteres del desarrollo vegetativo. La línea 191 ETPI presenta un fenotipo de bifurcación del tallo tanto *in vitro* como *in vivo*. La mutación es de naturaleza recesiva y no cosegrega con el único inserto de T-DNA con el gen *nptII* funcional que ha integrado esta línea.

- Por último, se han identificado tres líneas con fenotipo compacto. La línea 2059 ETMM presenta un fenotipo compacto pero no tiene un mayor número de hojas que las plantas WT. La mutación es de naturaleza recesiva y no cosegrega con el único inserto de T-DNA con el gen *nptII* funcional que ha integrado esta línea. La línea 2099 ETMM presenta un fenotipo compacto con un mayor número de hojas tanto en condiciones de cultivo *in vitro* como *in vivo*. Esta línea presenta un único inserto con el gen *nptII* funcional y no se puede confirmar ni descartar la hipótesis de la cosegregación ya que no se han detectado suficientes plantas mutantes por presentar un fenómeno de subletalidad. La línea 2659 ETMM presenta un fenotipo compacto con un mayor número de hojas tanto en condiciones de *in vitro* como *in vivo*. Además, en las plantas mutantes cultivadas en el invernadero se han detectado estructuras organogénicas en el raquis de las hojas y alteraciones en el desarrollo floral, fundamentalmente en los estambres y el ovario que tiene un mayor número de carpelos. La mutación es de naturaleza recesiva y no cosegrega con el único inserto de T-DNA con el gen *nptII* funcional que ha integrado esta línea.

7 Bibliografía

Azpiroz-Leehan, R. and K. A. Feldmann, 1997: T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis* going back and forth. *Trends in Genetics*, **13**, 152-156.

Bai, 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.

Blanca, J., Cañizares, J., Cordero, L., Pascual, L., Diez, M. J., & Nuez, F. (2012). Variation Revealed by SNP Genotyping and Morphology Provides Insight into the Origin of the Tomato. *PLoS ONE*, *7*(10).

Blanca, J., Montero-Pau, J., Sauvage, C., Bauchet, G., Illa, E., Díez, M. J., ... Cañizares, J. (2015). Genomic variation in tomato, from wild ancestors to contemporary breeding accessions. *BMC Genomics*, *16*(1), 257. Brar, D. S., & Khush, G. S. (1997). Alien introgression in rice. *Plant Molecular Biology*, *35*, 35–47.

Collonnier, C., Fock, I., Kashyap, V., Rotino, G. L., Daunay, M. C., Lian, Y., ... Sihachakr, D. (2001). Applications of biotechnology in eggplant. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*.

Dooner, H. K., & Belachew, A. (1989). Transposition Pattern of the Maize Element Ac from the Bz-M2(ac) Allele. *Genetics*, *122*(2), 447–457.

Estruch, J. J., Prinsen, E., Van Onckelen, H., Schell, J., & Spena, A. (1991). Viviparous leaves produced by somatic activation of an inactive cytokinin-synthesizing gene. *Science*, *254*(5036), 1364-1367.

Faiss, M., Zalubilová, J., Strnad, M., & Schmülling, T. (1997). Conditional transgenic expression of the ipt gene indicates a function for cytokinins in paracrine signaling in whole tobacco plants. *Plant Journal*.

Faure, J. D., Vittorioso, P., Santoni, V., Fraisier, V., Prinsen, E., Barlier, I., ... Bellini, C. (1998). The PASTICCINO genes of *Arabidopsis thaliana* are involved in the control of cell division and differentiation. *Development*, *125*(5), 909–918.

Germanà, M. A. (2011). Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *104*(3), 283–300.

Gerszberg, A., Katarzyna, @bullet, @bullet, H.-K., Kowalczyk, T., & Kononowicz, A. K. (2014). Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the service of biotechnology.

Hanus-Fajerska, E. (2008). Variation in tomato plants regenerated from Cucumber mosaic virus infected tissue. In *Acta Horticulturae*.

Hayashi, H., Czaja, I., Lubenow, H., Schell, J., & Walden, R. (1992). Activation of a plant gene by T-DNA tagging: auxin-independent growth *in vitro*. *Science (New York, NY)*, *258*(5086), 1350–1353.

Huang, S., Cerny, R. E., Bhat, D. S., & Brown, S. M. (2001). Cloning of an Arabidopsis patatin-like gene, STURDY, by activation T-DNA tagging. *Plant Physiology*, 125(February), 573–584.

Jauhar, P. P. (2001). Genetic engineering and accelerated plant improvement: Opportunities and challenges. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 64(2–3), 87–91. <http://doi.org/10.1023/A:1010645813427>

Jeon, J. S., Lee, S., Jung, K. H., Jun, S. H., Jeong, D. H., Lee, J.,... An, G. (2000). T-DNA insertional mutagenesis for functional genomics in rice. *Plant Journal*, 22(6), 561–570.

Jeong, D.-H. (2002). T-DNA Insertional Mutagenesis for Activation Tagging in Rice. *Plant Physiology*, 130(4), 1636–1644.

Keller, J., Lim, E., & Dooner, H. K. (1993). Preferential transposition of Ac to linked sites in Arabidopsis. *Theoretical and Applied Genetics*, 86(5), 585–588.

Koenig, D., Jiménez-Gómez, J. M., Kimura, S., Fulop, D., Chitwood, D. H., Headland, L. R., ... Maloof, J. N. (2013). Comparative transcriptomics reveals patterns of selection in domesticated and wild tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(28), E2655-62.

Lu, N., Carter, J. D., Boluarte Medina, T., Holt, S. H., Manrique-Carpintero, N. C., Upham, K. T., ... Veilleux, R. E. (2014). Transposon based activation tagging in diploid strawberry and monoploid derivatives of potato. *Plant Cell Reports*, 33(7), 1203–1216.

Mathews, H., Clendennen, S. K., Caldwell, C. G., Liu, X. L., Connors, K., Matheis, N., ... Wagner, D. R. (2003). Activation Tagging in Tomato Identifies a Transcriptional Regulator of Anthocyanin Biosynthesis, Modification, and Transport. *The Plant Cell Online*, 15(8), 1689–1703.

McClintock, B. (1950). the Origin and Behavior of Mutable Loci in Maize. *These PROCEEDINGS Am. J. Botany J. Genetics Nature Nature PROCEEDINGS*, 36(6), 344–355.

- Meissner, R., Chague, V., Zhu, Q., Emmanuel, E., Elkind, Y., & Levy, A. A. (2000). A high throughput system for transposon tagging and promoter trapping in tomato. *Plant Journal*, 22(3), 265–274.
- Menda, N., Y. Semel, D. Peled, Y. Eshed and D. Zamir, 2004: In silico screening of a saturated mutation library of tomato. *Plant Journal*, 38, 861-872.
- Miller, D., & Leyser, O. (2011). Auxin, cytokinin and the control of shoot branching. *Annals of Botany*, 107(7), 1203–1212.
- Minoia, S., A. Petrozza, O. D'Onofrio, F. Piron, G. Mosca, G. Sozio, F. Cellini, A. Bendahmane and F. Carriero, 2010: A new mutant genetic resource for tomato crop improvement by TILLING technology. *BMC Research Notes*, 3, 69.
- Mok, M. C. (1994). Cytokinins and plant development. *Cytokinins: chemistry, activity, and function*. CRC Press, Boca Raton, 155-166.
- Molero, V. (2016). Identificación y caracterización fenotípica de mutantes insercionales de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) con alteraciones en caracteres del desarrollo temprano. Trabajo Fin de Máster en Mejora Genética Vegetal.
- Namitha, K. K., & Negi, P. S. (2013). Morphogenetic Potential of Tomato (*Lycopersicon esculentum*) cv. “Arka Ahuti” to Plant Growth Regulators. *Not Sci Biol*, 5(2), 220–225.
- Peterhans, A., H. Schlüpmann, C. Basse and J. Paszowski, 1990: Intrachromosomal recombination in plants *EMBO Journal*, 9, 3437-3445.
- Pineda, B., Giménez-Caminero, E., García-Sogo, B., Antón, M. T., Atarés, A., Capel, J., ... Moreno, V. (2010). Genetic and physiological characterization of the arlequin insertional mutant reveals a key regulator of reproductive development in Tomato. *Plant and Cell Physiology*, 51(3), 435–447.
- Ranc, N., Muños, S., Santoni, S., & Causse, M. (2008). A clarified position for *Solanum lycopersicum* var. cerasiforme in the evolutionary history of tomatoes (solanaceae). *BMC Plant Biology*, 8, 130.

- Rick, C. (1960). Hybridization Between *Lycopersicon Esculentum* and *Solanum Pennellii*: Phylogenetic and Cytogenetic Significance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 46(1), 78–82.
- Riefler, M., Novak, O., Strnad, M., & Schmu, T. (2006). Arabidopsis Cytokinin Receptor Mutants Reveal Functions in Shoot Growth , Leaf Senescence , Seed Size , Germination , Root Development , and Cytokinin Metabolism, 18(January), 40–54.
- Roldán, J. J., Alvarez, M. C., Pérez, R., Pina, J. A., Duran-Vila, N., Vives, M. C., ... & Rozalén, P. A. N. (2005). El programa de mejora sanitaria de variedades de cítricos en España: 30 años de historia. *Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal*, (170), 66-79.
- Sato, S., Tabata, S., Hirakawa, H., Asamizu, E., Shirasawa, K., Isobe, S., ... Gianese, G. (2012). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, 485(7400), 635–641.
- Skoog, F., & Miller, C. O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured. *In vitro. Symp. Soc. Exp. Biol.*, v. 11, p. 118-131.
- Springer, P. S. (2000). Gene traps: tools for plant development and genomics. *The Plant Cell*, 12(7), 1007–1020.
- Vogler, H., & Kuhlemeier, C. (2003). Simple hormones but complex signalling. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(1), 51–56.
- Waara, S., & Glimelius, K. (1995). The potential of somatic hybridization in crop breeding. *Euphytica*.
- Wada, N., Kajiyama, ichiro, Khemkladngoen, N., & Fukui, K. (2010). 4 A Novel Gene Delivery System in Plants with Calcium Alginate Micro-Beads.
- Yang, S. H., Yu, H., & Goh, C. J. (2003). Functional characterisation of a cytokinin oxidase gene DSCX1 in *Dendrobium* orchid. *Plant Molecular Biology*, 51(2), 237–248.
- Yarra, R., He, S. J., Abbagani, S., Ma, B., Bulle, M., & Zhang, W. K. (2012). Overexpression of a wheat Na⁺/H⁺ antiporter gene (TaNHX2) enhances tolerance to

salt stress in transgenic tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 111(1), 49–57.

Zubko, E., Adams, C. J., Macháèková, I., Malbeck, J., Scollan, C., & Meyer, P. (2002). Activation tagging identifies a gene from *Petunia hybrida* responsible for the production of active cytokinins in plants. *Plant Journal*, 29(6), 797–808.

Zuriaga, E., Blanca, J., & 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.

Zuriaga, E., Blanca, J., & 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.

