



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

**Departamento de Biotecnología**

**Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas**

**Generación de líneas T-DNA de tomate  
(*Solanum lycopersicum*) para la identificación  
de mutantes de inserción alterados en la  
morfogénesis y el desarrollo vegetal**

**TESIS DOCTORAL**

**Jorge Sánchez López**

**Dirigido por:**

**Dr. Vicente Moreno Ferrero**

**Dr. Alejandro Atarés Huerta**

**ENERO 2017**

D. Vicente Moreno Ferrero, Doctor en Ciencias Biológicas y Catedrático de Genética del Departamento de Biotecnología, de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural de la Universidad Politécnica de Valencia y

D. Alejandro Atarés Huerta, Doctor Ingeniero Agrónomo y Profesor Contratado Doctor del Departamento de Biotecnología, de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural de la Universidad Politécnica de Valencia

Hacen constar que:

D. Jorge Sánchez López, Licenciado en Ingeniería Agronómica, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo que presenta para optar al grado de Doctor por la Universidad Politécnica de Valencia y que lleva por título: "Generación de líneas T-DNA de tomate (*Solanum lycopersicum*) para la identificación de mutantes de inserción alterados en la morfogénesis y el desarrollo vegetal".

Para que así conste a los efectos académicos oportunos, firma el presente certificado en Valencia a 16 de enero de 2017.

D. Vicente Moreno Ferrero

D. Alejandro Atarés Huerta

# Agradecimientos

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a Vicente Moreno por haber concedido la oportunidad de integrarme a su grupo de investigación para realizar mi trabajo de tesis. Por el valioso aprendizaje que me ha transmitido durante los años de trabajo, por ser un ejemplo de liderazgo y por el apoyo en cada momento que fue necesario.

De manera muy especial me gustaría agradecer a Alex, por haber sido el mejor jefe que he tenido. Por sus consejos en cada una de las etapas de mi trabajo de tesis, al igual que fuera. Por los incontables buenos momentos en el laboratorio y en las salidas de trabajo a Almería. Finalmente, por haber hecho que el trabajo para la realización de esta Tesis Doctoral haya sido una excelente experiencia bajo su supervisión. Gracias Alex!

A Marybel, por haber sido una buena compañera de trabajo y saber que siempre pude contar con su apoyo y ayuda.

Estoy completamente agradecido con todas las personas que integran y han integrado el grupo de investigación ya que pude compartir muy buenas experiencias, a Sibilla, Peter, Geraldine y Carlos. A Teresa Antón por haber sido la primera persona con la que compartí mis primeras etapas de trabajo en el grupo y sus enseñanzas, además, por los muy divertidos momentos dentro y fuera del laboratorio. Muchas gracias "boss". A Begoña, por haberme compartido su experiencia en el mundo del cultivo *in vitro*, su apoyo en las dudas que tuve a lo largo de mi trabajo de tesis y por compartir todos esos buenos momentos en la hora de la comida. Muchas gracias Begoña. A Benito, por su apoyo en temas de trabajo, todas las risas, diversión, bromas y sus buenos temas de conversación a la hora de la comida. Gracias Benito.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y a la Universidad Autónoma de Sinaloa por haberme otorgado la beca que hizo posible mi estancia en España

A mi familia. Mi padre, Jorge Sánchez Peña, madre, María del Carmen López Gaxiola y mis hermanas, Pamela, Tania y Mary.

A la Universidad Autónoma de Sinaloa

A mi patria, México

A mis grandes amigos

# Índice general

<b>Índice</b>	i
<b>Índice de figuras</b>	iv
<b>Índice de Tablas</b>	xi
<b>Resúmenes</b>	xiv
<b>1. Introducción</b>	1
1.- El tomate	2
1.1.1.- Origen, historia y clasificación taxonómica	2
1.1.2.- Importancia económica	3
1.1.3.- Mejoramiento genético del tomate	5
1.1.4.- Retos del mejoramiento genético del tomate	6
1.1.5.- Límites del mejoramiento clásico del tomate	7
1.1.6.- Mejoramiento asistido con marcadores moleculares	9
1.1.7.- Mejoramiento biotecnológico del tomate	10
1.2.- El cultivo <i>in vitro</i> de plantas	11
1.2.1.- La respuesta morfogénica en cultivo <i>in vitro</i> de plantas	13
1.2.2.- La regeneración <i>in vitro</i> en tomate	15
1.2.3.- Otras aplicaciones del cultivo <i>in vitro</i>	17
1.3.- Herramientas biotecnológicas para la identificación de genes	18
1.3.1.- La mutagénesis insercional	18
1.3.2.- Mutagénesis con T-DNA	20
1.3.3.- Etiquetado de genes mediante “ <i>trapping</i> ”	23
1.4.- Identificación de genes implicados en caracteres del desarrollo temprano de la planta de tomate	26
1.4.1.- Desarrollo de la parte aérea	26
1.4.2.- Desarrollo de la raíz	30
1.4.3.- Necrosis y muerte celular programada	37
1.4.4.- Respuesta morfogénica	38
<b>2. Objetivos</b>	41
<b>3. Materiales y métodos</b>	44
3.1.- Material vegetal	45
3.2.- Escrutinio de la colección de líneas T-DNA para la identificación de mutantes en fases tempranas del desarrollo	46
3.2.1.- Esterilización de semillas	46
3.2.2.- Pre-germinación y obtención de plantas axénicas	46
3.2.3.- Cultivo de explantes de cotiledón y ápices meristemáticos	47
3.2.4.- Medios de cultivo	47
3.3.- Aclimatación y cultivo en invernadero	49
3.4.- Técnicas de microscopía	49
3.4.1.- Fijación de las muestras e inclusión en parafina	49
3.4.2.- Eliminación de la parafina y tinción con azul de toulidina	50

3.5.- Cuantificación de hormonas vegetales endógenas	50
3.6.- Injertos	51
3.7.- Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante	52
3.8.- Análisis genético del número de insertos T-DNA	53
3.9.- Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante	53
3.9.1.- Análisis de cosegregación mediante técnicas de cultivo <i>in vitro</i>	54
3.9.2.- Análisis de cosegregación mediante PCR de un fragmento del T-DNA o del cuerpo del vector y el fenotipo mutante	55
3.10.- Identificación del gen etiquetado mediante Anchor-PCR	56
3.10.1.- Análisis de cosegregación mediante PCR del gen identificado por Anchor-PCR y el fenotipo mutante	58
3.11.- Evaluación de la expresión del gen delator	58
<b>4. Resultados</b>	60
4.1.- Escrutinio de la colección de líneas T-DNA para la identificación de mutantes en fases tempranas del desarrollo	61
4.1.1.- Identificación y caracterización de líneas mutantes con alteraciones en la parte aérea	62
4.1.1.1.- Mutante 1440 ET MM	63
4.1.1.2.- Mutante 1405 ET MM	71
4.1.1.3.- Mutante 2489 ET MM	75
4.1.1.4.- Mutante 2733 ET MM	84
4.1.1.5.- Mutante 2635 ET MM	88
4.1.1.6.- Mutante 1381 ET MM	93
4.1.2.- Identificación y caracterización de líneas mutantes afectadas en el desarrollo radicular	104
4.1.2.1.- Mutante 2666 ET MM	106
4.1.2.2.- Mutante 1662 ET MM	117
4.1.2.3.- Mutante 1608 ET MM	122
4.1.2.4.- Mutante 1317 ET MM	130
4.1.2.5.- Mutante 1862 ET MM	137
4.1.3.- Identificación y caracterización de líneas mutantes con fenotipo de muerte celular y necrosis	149
4.1.3.1.- Mutante 1421 ET MM	151
4.1.3.2.- Mutante 2142 ET MM	160
4.1.3.3.- Mutante 1512 ET MM	164
4.1.3.4.- Mutante 2477 ET MM	170
4.1.4.- Identificación y caracterización de líneas mutantes con alteraciones en la respuesta morfogénica <i>in vitro</i>	178
4.1.4.1.- Mutante 1524 ET MM	180
4.1.4.2.- Mutante 1920 ET MM	186
4.1.4.3.- Mutante 1801 ET MM	190
4.1.4.4.- Mutante 1311 ET MM	196
4.1.4.5.- Mutante 2225 ET MM	206
<b>5. Discusión</b>	217
5.1.- Identificación de líneas T-DNA mutantes en tomate mediante la utilización del cultivo <i>in vitro</i>	218
5.2.- Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante	223
5.3.- Análisis genético del número de insertos T-DNA	225
5.4.- Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante	228

5.5.- Identificación y caracterización de líneas mutantes con alteraciones en la parte aérea	231
5.6.- Identificación y caracterización de líneas mutantes afectadas en el desarrollo radicular	235
5.7.- Identificación y caracterización de líneas mutantes con fenotipo de muerte celular y necrosis	240
5.8.- Identificación y caracterización de líneas mutantes con alteraciones en la respuesta morfogénica <i>in vitro</i>	242
<b>6. Conclusiones</b>	<b>248</b>
<b>7. Bibliografía</b>	<b>251</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribución de la superficie cultivada de tomate de los principales países productores en el año 2013	4
<b>Figura 2.</b> Distribución de la producción de tomate entre los principales países productores en el año 2013	5
<b>Figura 3.</b> Esquema de las construcciones utilizadas para obtener colecciones de plantas transgénicas con trampas génicas.	25
<b>Figura 4.</b> Representación esquemática de una sección longitudinal de meristemo apical mostrando los diferentes dominios funcionales	28
<b>Figura 5.</b> Representación esquemática del plásmido pD991 que incluye la trampa de intensificadores	45
<b>Figura 6.</b> Representación esquemática de los cebadores empleados para rastrear la presencia de fragmentos de T-DNA y/o del cuerpo del vector en plantas mutantes	55
<b>Figura 7.</b> Representación esquemática de las PCRs solapantes utilizadas para la clonación del gen etiquetado mediante Anchor-PCR	56
<b>Figura 8.</b> Fenotipo de plantas axénicas procedentes de ápices meristemáticos de la línea 1440 ET MM tras 10 días de cultivo en medio básico. La flecha muestra la formación de un pequeño callo	63
<b>Figura 9.</b> Fenotipo de plantas axénicas procedentes de ápices meristemáticos de la línea 1440 ET MM tras 30 días de cultivo en medio básico	64
<b>Figura 10.</b> Fenotipo de plántulas procedentes de semillas TG2 de la línea 1440 ET MM 15 días después de su siembra en el invernadero	64
<b>Figura 11.</b> Fenotipo de plántulas procedentes de semillas TG2 de la línea 1440 ET MM 35 días después de su siembra en el invernadero	66
<b>Figura 12.</b> Expresión del gen delator <i>uidA</i> en la zona apical de plantas axénicas de la línea 1440 ET MM	70
<b>Figura 13.</b> Fenotipo de plantas axénicas procedentes de ápices meristemáticos de la línea 1405 ET MM tras 20 días de cultivo en medio básico	71
<b>Figura 14.</b> Fenotipo de plantas axénicas procedentes de ápices meristemáticos mutantes de la línea 1405 ET MM tras 30 días de cultivo en medio básico	72
<b>Figura 15.</b> Fenotipo de explantes de cotiledón de la línea 1405 ET MM tras 25 días de cultivo en medio organogénico	72
<b>Figura 16.</b> Fenotipo de plántulas procedentes de semillas de la línea 2489 ET MM tras 15 días de cultivo en medio de germinación	75
<b>Figura 17.</b> Fenotipo de plantas axénicas procedentes de ápices meristemáticos de la línea 2489 ET MM tras 30 días de cultivo en medio de enraizamiento	76
<b>Figura 18.</b> Cortes histológicos de la línea 2489 ET MM. Corte transversal del tallo, corte transversal de la parte central de un foliolo de hoja y corte longitudinal de un meristemo apical.	77
<b>Figura 19.</b> Fenotipo de plantas cultivadas en el invernadero durante 120 días y 270 días y de sus órganos reproductivos de la línea 2489 ET MM	78

<b>Figura 20.</b> Fenotipo de una planta cultivada en el invernadero durante 300 días y de un fruto maduro de la línea 2489 ET MM	79
<b>Figura 21.</b> Contenido hormonal endógeno en las hojas de plantas mutantes de la línea 2489 ET MM	80
<b>Figura 22.</b> Fenotipo de plantas cultivadas en el invernadero durante 150 días de la línea 2489 ET MM. A la planta de la derecha se le ha aplicado un tratamiento con brasinosteroides	81
<b>Figura 23.</b> Fenotipo de plantas axénicas procedentes de ápices meristemáticos de la línea 2733 ET MM tras 20 días de cultivo en medio básico	84
<b>Figura 24.</b> Fenotipo de plantas cultivadas en el invernadero durante 90 días y frutos maduros de la línea 2733 ET MM	85
<b>Figura 25.</b> Fenotipo de hojas de plantas cultivadas en el invernadero de la línea 2635 ET MM	88
<b>Figura 26.</b> Fenotipo de plantas cultivadas en el invernadero de la línea 2635 ET MM	89
<b>Figura 27.</b> Fenotipo de plantas axénicas procedentes de ápices meristemáticos de la línea 1381 ET MM tras 10 días de cultivo en medio básico	93
<b>Figura 28.</b> Fenotipo de plantas axénicas procedentes de ápices meristemáticos de la línea 1381 ET MM tras 30 días de cultivo en medio básico	94
<b>Figura 29.</b> Fenotipo de plántulas procedentes de semillas de la línea 1381 ET MM tras 15 días y 30 días de cultivo en el invernadero	95
<b>Figura 30.</b> Fenotipo de plantas cultivadas en el invernadero durante 50 días de la línea 1381 ET MM	96
<b>Figura 31.</b> Fenotipo de flores en distintos estados del desarrollo de la línea 1381 ET MM. Detalle de los verticilos de flores en anthesis	97
<b>Figura 32.</b> Fenotipo de frutos maduros de la línea 1381 ET MM	98
<b>Figura 33.</b> Contenido hormonal endógeno en las hojas de plantas mutantes de la línea 1381 ET MM	99
<b>Figura 34.</b> Localización genómica del inserto T-DNA de la línea 1381 ET MM	102
<b>Figura 35.</b> Detección mediante PCR del alelo WT o el alelo mutante en 3 plantas WT Kan <sup>R</sup> y 3 plantas M Kan <sup>R</sup> de la línea 1381 ET MM	103
<b>Figura 36.</b> Fenotipo de plántulas procedentes de semillas de la línea 2666 ET MM tras 10 días de cultivo en medio de germinación	106
<b>Figura 37.</b> Fenotipo de plántulas procedentes de semillas tras 30 días de cultivo en medio de germinación y plantas axénicas procedentes de ápices meristemáticos tras 25 días de cultivo en medio básico de la línea 2666 ET MM	107
<b>Figura 38.</b> Fenotipo de las raíces de plántulas procedentes de semillas de la línea 2666 ET MM tras 30 días de cultivo en medio de germinación	108
<b>Figura 39.</b> Fenotipo de plantas axénicas procedentes del cultivo de ápices meristemáticos de la línea 2666 ET MM tras 30 días de cultivo en medios con diferentes concentraciones de ácido indolacético	109

<b>Figura 40.</b> Fenotipo de plantas axénicas procedentes del cultivo de ápices meristemáticos de la línea 2666 ET MM tras 30 días de cultivo en medios con diferentes concentraciones de ácido indolbutírico	110
<b>Figura 41.</b> Fenotipo de plantas procedentes del cultivo de semillas en macetas de la línea 2666 ET MM tras 15 días y 30 días de cultivo en invernadero	111
<b>Figura 42.</b> Fenotipo de hojas de plantas procedentes del cultivo de semillas en macetas de la línea 2666 ET MM tras 30 días de cultivo en invernadero	112
<b>Figura 43.</b> Fenotipo de plantas procedentes del cultivo de semillas en macetas de la línea 2666 ET MM tras tres meses de cultivo en invernadero	113
<b>Figura 44.</b> Fenotipo de plántulas procedentes de semillas de la línea 1662 ET MM tras 7 días de cultivo en medio de germinación	117
<b>Figura 45.</b> Fenotipo de plantas axénicas procedentes de ápices meristemáticos de la línea 1662 ET MM tras 25 días de cultivo en medio básico	118
<b>Figura 46.</b> Fenotipo de las raíces adventicias de plantas axénicas procedentes de ápices meristemáticos de la línea 1662 ET MM tras 30 días de cultivo en medio de enraizamiento	118
<b>Figura 47.</b> Fenotipo de plantas procedentes de semillas de la línea 1662 ET MM cultivadas en invernadero durante tres meses. Detalle de tallo con necrosis apical y brote lateral	119
<b>Figura 48.</b> Fenotipo de plántulas procedentes de semillas de la línea 1608 ET MM tras 7 días de cultivo en medio de germinación	122
<b>Figura 49.</b> Fenotipo de plantas axénicas procedentes de ápices meristemáticos de la línea 1608 ET MM tras 15 días de cultivo en medio básico	123
<b>Figura 50.</b> Fenotipo de una planta axénica procedente de un ápice meristemático mutante de la línea 1608 ET MM tras 50 días de cultivo en medio de enraizamiento	123
<b>Figura 51.</b> Fenotipo de plantas axénicas procedentes del cultivo de ápices meristemáticos de la línea 1608 ET MM tras 30 días de cultivo en medios con diferentes concentraciones de ácido indolacético	124
<b>Figura 52.</b> . Fenotipo de plantas axénicas procedentes del cultivo de ápices meristemáticos de la línea 1608 ET MM tras 30 días de cultivo en medios con diferentes concentraciones de ácido indolbutírico	125
<b>Figura 53.</b> Fenotipo de plántulas procedentes de semillas de la línea 1608 ET MM tras 15 días de cultivo el invernadero	126
<b>Figura 54.</b> Fenotipo de las raíces de plántulas procedentes de semillas de la línea 1608 ET MM tras 15 días de cultivo el invernadero	126
<b>Figura 55.</b> Fenotipo de una plántula procedente de una semilla mutante de la línea 1608 ET MM tras 50 días de cultivo en el invernadero	121
<b>Figura 56.</b> Fenotipo de plantas axénicas procedentes de ápices meristemáticos de la línea 1317 ET MM tras 18 días de cultivo en medio básico	130

<b>Figura 57.</b> Fenotipo de plantas axénicas procedentes del cultivo de ápices meristemáticos de la línea 1317 ET MM en medio de enraizamiento suplementado con ácido indolacético después de 30 días de cultivo	131
<b>Figura 58.</b> Fenotipo de plantas axénicas procedentes del cultivo de ápices meristemáticos de la línea 1317 ET MM en medio de enraizamiento suplementado con ácido indolbutírico después de 30 días de cultivo	132
<b>Figura 59.</b> Fenotipo de plántulas cultivadas en invernadero durante 20 días de la línea 1317 ET MM. Detalle del envés de los cotiledones	133
<b>Figura 60.</b> Fenotipo de las raíces de plántulas procedentes de semillas de la línea 1317 ET MM tras 20 días de cultivo en el invernadero. La barra representa 1 cm.	134
<b>Figura 61.</b> Fenotipo de frutos maduros de la línea 1317 ET MM	134
<b>Figura 62.</b> Fenotipo de plántulas procedentes de semillas de la línea 1862 ET MM tras 7 días de cultivo en medio de germinación	137
<b>Figura 63.</b> Fenotipo de plantas axénicas procedentes del cultivo de ápices meristemáticos de la línea 1862 ET MM tras 15 días de cultivo en medio básico	138
<b>Figura 64.</b> Fenotipo de plántulas procedentes de semillas de la línea 1381 ET MM tras 15 días y 30 días de cultivo en el invernadero	139
<b>Figura 65.</b> Fenotipo de plantas axénicas procedentes del cultivo de ápices meristemáticos de la línea 1862 ET MM tras 30 días de cultivo en medios con diferentes concentraciones de ácido indolbutírico	140
<b>Figura 66.</b> Fenotipo de plantas axénicas procedentes del cultivo de ápices meristemáticos de la línea 1862 ET MM tras 30 días de cultivo en medios con distintos tipo de auxinas	141
<b>Figura 67.</b> Fenotipo de plántulas procedentes de semillas de la línea 1862 ET MM tras 7 días de cultivo en el invernadero	142
<b>Figura 68.</b> Fenotipo de plántulas procedentes de semillas de la línea 1862 ET MM tras 15 días de cultivo en el invernadero	143
<b>Figura 69.</b> Contenido hormonal endógeno en las hojas de plantas mutantes de la línea 1862 ET MM	144
<b>Figura 70.</b> Fenotipo de plantas injertadas y cultivadas en el invernadero durante 45 días de la línea 1862 ET MM. El injerto se representa como un cociente en el que el numerador es el genotipo de la parte aérea y el denominador el genotipo de la parte radicular	145
<b>Figura 71.</b> Fenotipo de plántulas procedentes de semillas de la línea 1421 ET MM tras 7 días de cultivo en medio de germinación	151
<b>Figura 72.</b> Fenotipo de plántulas procedentes de semillas de la línea 1421 ET MM tras 10 días de cultivo en medio de germinación	152
<b>Figura 73.</b> Fenotipo de ápices meristemáticos tras 5 días de cultivo en medio de enraizamiento y de explantes de cotiledón cultivados en medio organogénico de la línea 1421 ET MM	152
<b>Figura 74.</b> Fenotipo de plántulas procedentes de semillas de la línea 1421 ET MM tras la siembra en medio de enraizamiento	153
<b>Figura 75.</b> Fenotipo de explantes de hoja de la línea 1421 ET MM tras su cultivo en medio organogénico	154

<b>Figura 76.</b> Fenotipo de una planta axénica de la línea 1421 ET MM con fenotipo necrótico tras su aclimatación	154
<b>Figura 77.</b> Fenotipo de plántulas procedentes de semillas de la línea 1421 ET MM tras 25 días de cultivo en el invernadero	155
<b>Figura 78.</b> Contenido hormonal endógeno en las hojas de plantas mutantes de la línea 1421 ET MM	156
<b>Figura 79.</b> Fenotipo de plántulas procedentes de semillas de la línea 2142 ET MM tras 10 días de cultivo en medio de germinación	160
<b>Figura 80.</b> Fenotipo de plantas axénicas procedentes de ápices meristemáticos de la línea 2142 ET MM tras 25 días de cultivo en medio básico	161
<b>Figura 81.</b> Fenotipo de plántulas procedentes de semillas de la línea 2142 ET MM tras 10 días y 30 días de cultivo en el invernadero	162
<b>Figura 82.</b> Fenotipo de plantas axénicas procedentes de ápices meristemáticos de la línea 1512 ET MM tras 25 días de cultivo en medio básico	165
<b>Figura 83.</b> Fenotipo de plantas procedentes de semillas de la línea 1512 ET MM tras 30 días de cultivo en el invernadero	165
<b>Figura 84.</b> Fenotipo de flores en anthesis y verticilos florales de plantas cultivadas durante ocho meses en el invernadero de la línea 1512 ET MM	160
<b>Figura 85.</b> Fenotipo de un fruto maduro de una planta cultivada durante nueve meses en el invernadero de la línea 1512 ET MM	166
<b>Figura 86.</b> Fenotipo de explantes de cotiledón tras 25 días de cultivo en medio organogénico y de plantas axénicas procedentes de ápices meristemáticos tras 15 días de cultivo en medio básico de la línea 2477 ET MM	170
<b>Figura 87.</b> Fenotipo de plantas axénicas procedentes del subcultivo de ápices meristemáticos tras 25 días de cultivo en medio básico de la línea 2477 ET MM	171
<b>Figura 88.</b> Fenotipo de plantas procedentes de semillas de la línea 2477 ET MM tras 25 días y 50 días de cultivo en el invernadero	172
<b>Figura 89.</b> Localización genómica del inserto T-DNA de la línea 2477 ET MM. Se muestra la organización genómica del gen <i>Solyc11g011960.1</i> que consiste en 21 exones y 20 intrones	175
<b>Figura 90.</b> Detección mediante PCR del alelo WT o el alelo mutante en 5 plantas WT Kan <sup>S</sup> , 9 plantas WT Kan <sup>R</sup> y 5 plantas M Kan <sup>R</sup> de la línea 2477 ET MM	177
<b>Figura 91.</b> Fenotipo de explantes de cotiledón de la línea 1524 ET MM tras 25 días de cultivo en medio organogénico	180
<b>Figura 92.</b> Fenotipo de plantas axénicas procedentes de ápices meristemáticos de la línea 1524 ET MM tras 25 días de cultivo en medio básico	181
<b>Figura 93.</b> Fenotipo de las raíces embrionarias de plántulas procedentes de semilla tras 10 días de cultivo en medio de germinación y de las raíces adventicias procedentes de explantes de hipocótilo tras 25 días de cultivo en medio I 4.0 de la línea 1524 ET MM	181
<b>Figura 94.</b> Fenotipo de plántulas procedentes de semillas de la línea 1524 ET MM tras 30 días y 60 días de cultivo en el invernadero	182

<b>Figura 95.</b> Fenotipo de plántulas procedentes de semillas tras 10 días de cultivo en medio de germinación suplementado con 100 mg·L <sup>-1</sup> de kanamicina y explantes de cotiledón tras 25 días de cultivo en medio organogénico de la línea 1524 ET MM	185
<b>Figura 96.</b> Fenotipo de explantes de cotiledón de la línea 1920 ET MM tras 25 días de cultivo en medio organogénico	186
<b>Figura 97.</b> Fenotipo de plantas axénicas procedentes de ápices meristemáticos de la línea 1920 ET MM tras 25 días de cultivo en medio básico	187
<b>Figura 98.</b> Fenotipo de las raíces embrionarias de plántulas procedentes de semillas tras 10 días de cultivo en medio de germinación y de las raíces adventicias procedentes del hipocótilo tras 25 días de cultivo de ápices meristemáticos en medio de enraizamiento de la línea 1920 ET MM	187
<b>Figura 99.</b> Fenotipo de explantes de cotiledón de la línea 1801 ET MM tras 25 días de cultivo en medio organogénico	190
<b>Figura 100.</b> Fenotipo de plantas axénicas procedentes de ápices meristemáticos de la línea 1801 ET MM tras 25 días de cultivo en medio básico	191
<b>Figura 101.</b> Fenotipo de hojas, frutos verdes y frutos maduros procedentes de plantas cultivadas en el invernadero de la línea 1801 ET MM	192
<b>Figura 102.</b> Contenido hormonal endógeno en las hojas de plantas mutantes de la línea 1801 ET MM	193
<b>Figura 103.</b> Expresión del gen delator <i>uidA</i> en explantes de cotiledón y explantes de tallo, raquis y limbo de hoja de plantas acigotas para el T-DNA y portadoras del T-DNA de la línea 1801 ET MM	195
<b>Figura 104.</b> Fenotipo de explantes de cotiledón de la línea 1311 ET MM tras 25 días de cultivo en medio organogénico	196
<b>Figura 105.</b> Fenotipo de explantes de cotiledón de la línea 1311 ET MM tras 0, 7 y 30 días de cultivo en medio organogénico	196
<b>Figura 106.</b> Cortes histológicos de la línea 1311 ET MM. Corte transversal de callos organogénicos de explantes de cotiledón cultivados 25 días en medio de regeneración	197
<b>Figura 107.</b> Fenotipo de explantes de cotiledón de la línea 1311 ET MM cultivados en un medio organogénico durante 25 días y después subcultivados a un medio de elongación durante 20 días más	198
<b>Figura 108.</b> Fenotipo de explantes de hipocótilo de la línea 1311 ET MM cultivados durante 25 días en medio de regeneración	200
<b>Figura 109.</b> Fenotipo de explantes de hipocótilo cultivados durante 25 días en medio de regeneración y otros 25 en medio de elongación y de los brotes cultivados en medio de enraizamiento de la línea 1311 ET MM	201
<b>Figura 110.</b> Fenotipo de plantas axénicas procedentes de ápices meristemáticos de la línea 1311 ET MM tras 30 días de cultivo en medio básico	202
<b>Figura 111.</b> Contenido hormonal endógeno en las hojas de plantas mutantes de la línea 1311 ET MM	203

<b>Figura 112.</b> Fenotipo de explantes de cotiledón de la línea 2225 ET MM tras 25 días de cultivo en medio organogénico	206
<b>Figura 113.</b> Fenotipo de plantas axénicas procedentes de ápices meristemáticos de la línea 2225 ET MM tras 15 días de cultivo en medio básico	206
<b>Figura 114.</b> Fenotipo de las raíces embrionarias de plántulas procedentes de semillas tras 10 días de cultivo en medio de germinación y de las raíces adventicias procedentes del hipocótilo tras 25 días de cultivo de ápices meristemáticos en medio de enraizamiento de la línea 2225 ET MM	207
<b>Figura 115.</b> Fenotipo de explantes de cotiledón de la línea 2225 ET MM en diferentes momentos de su desarrollo tras ser cultivados en medio organogénico	208
<b>Figura 116.</b> Fenotipo de explantes de foliolo de la línea 2225 ET MM a los 25 días de cultivo en medio organogénico	209
<b>Figura 117.</b> Fenotipo de explantes de cotiledón de la línea 2225 ET MM a los 25 días de cultivo en medio organogénico con distintas concentraciones de citoquininas	209
<b>Figura 118.</b> Fenotipo de explantes de cotiledón y hoja de la línea 2225 ET MM a los 25 días de cultivo en medio de inducción de callo desorganizado	210
<b>Figura 119.</b> Fenotipo de las flores, frutos maduros y semillas de la línea 2225 ET MM procedentes de plantas cultivadas en el invernadero	212
<b>Figura 120.</b> Fenotipo de frutos verde-maduros y semillas extraídas de esos frutos de la línea 2225 ET MM y cultivadas en medio de germinación	213
<b>Figura 121.</b> Fenotipo de frutos verde-inmaduros y semillas extraídas de esos frutos de la línea 2225 ET MM y cultivadas en medio de germinación	214

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Análisis del modo de herencia del mutante 1440 ET MM	67
<b>Tabla 2.</b> Análisis del número de insertos T-DNA con el gen <i>nptII</i> funcional de la línea 1440 ET MM	67
<b>Tabla 3.</b> Análisis del modo de herencia del mutante 1440-17 ET MM	68
<b>Tabla 4.</b> Análisis del número de insertos T-DNA con el gen <i>nptII</i> funcional de la línea 1440-17 ET MM	69
<b>Tabla 5.</b> Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 1440-17 ET MM	69
<b>Tabla 6.</b> Análisis del modo de herencia del mutante 1405 ET MM	73
<b>Tabla 7.</b> Análisis del número de insertos T-DNA con el gen <i>nptII</i> funcional de la línea 1405 ET MM	73
<b>Tabla 8.</b> Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 1405 ET MM	74
<b>Tabla 9.</b> Análisis del modo de herencia del mutante 2489 ET MM	82
<b>Tabla 10.</b> Análisis del número de insertos T-DNA con el gen <i>nptII</i> funcional de la línea 2489 ET MM	82
<b>Tabla 11.</b> Fenotipo y resistencia a la kanamicina de progenies TG4 procedentes de seis plantas TG3 de fenotipo WT de la línea 2489 ET MM	83
<b>Tabla 12.</b> Análisis del modo de herencia del mutante 2733 ET MM	86
<b>Tabla 13.</b> Análisis del número de insertos T-DNA con el gen <i>nptII</i> funcional de la línea 2733 ET MM	86
<b>Tabla 14.</b> Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 2733 ET MM	87
<b>Tabla 15.</b> Análisis del modo de herencia del mutante 2635 ET MM	90
<b>Tabla 16.</b> Análisis del número de insertos T-DNA con el gen <i>nptII</i> funcional de la progenie TG3 de la planta M <sub>(hemicigota)</sub> 2635-3 ET MM	91
<b>Tabla 17.</b> Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 2635 ET MM	91
<b>Tabla 18.</b> Análisis del modo de herencia del mutante 1381 ET MM	99
<b>Tabla 19.</b> Análisis del número de insertos T-DNA con el gen <i>nptII</i> funcional de la línea 1381 ET MM	100
<b>Tabla 20.</b> Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 1381 ET MM	101
<b>Tabla 21.</b> Análisis del modo de herencia del mutante 2666 ET MM	113
<b>Tabla 22.</b> Análisis del número de insertos T-DNA con el gen <i>nptII</i> funcional de la línea 2666 ET MM	114
<b>Tabla 23.</b> Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 2666 ET MM	115
<b>Tabla 24.</b> Análisis del modo de herencia del mutante 1662 ET MM	120
<b>Tabla 25.</b> Análisis del número de insertos T-DNA con el gen <i>nptII</i> funcional de la línea 1662 ET MM	120
<b>Tabla 26.</b> Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 1662 ET MM	121
<b>Tabla 27.</b> Análisis del modo de herencia del mutante 1608 ET MM	128
<b>Tabla 28.</b> Análisis del número de insertos T-DNA con el gen <i>nptII</i> funcional de la línea 1608 ET MM	128

<b>Tabla 29.</b> Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 1608 ET MM	129
<b>Tabla 30.</b> Análisis del modo de herencia del mutante 1317 ET MM	135
<b>Tabla 31.</b> Análisis del número de insertos T-DNA con el gen <i>nptII</i> funcional de la línea 1317 ET MM	136
<b>Tabla 32.</b> Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 1317 ET MM	136
<b>Tabla 33.</b> Análisis del modo de herencia del mutante 1862 ET MM	146
<b>Tabla 34.</b> Análisis del número de insertos T-DNA con el gen <i>nptII</i> funcional de la línea 1862 ET MM	147
<b>Tabla 35.</b> Análisis del modo de herencia del mutante 1421 ET MM	157
<b>Tabla 36.</b> Análisis del número de insertos T-DNA con el gen <i>nptII</i> funcional de la línea 1421 ET MM	158
<b>Tabla 37.</b> Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo clorótico del mutante 1421 ET MM	158
<b>Tabla 38.</b> Fenotipo y resistencia a la kanamicina de 6 progenies TG3 procedentes de plantas TG2 WT Kan <sup>R</sup> de la línea 1421 ET MM	159
<b>Tabla 39.</b> Análisis del modo de herencia del mutante 2142 ET MM	163
<b>Tabla 40.</b> Análisis del número de insertos T-DNA con el gen <i>nptII</i> funcional de la línea 2142 ET MM	163
<b>Tabla 41.</b> Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 2142 ET MM	164
<b>Tabla 42.</b> Análisis del modo de herencia del mutante 1512 ET MM	167
<b>Tabla 43.</b> Análisis del número de insertos T-DNA con el gen <i>nptII</i> funcional de la línea 1512 ET MM	168
<b>Tabla 44.</b> Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 1512 ET MM	169
<b>Tabla 51.</b> Análisis del modo de herencia del mutante 2477 ET MM	173
<b>Tabla 52.</b> Análisis del número de insertos T-DNA con el gen <i>nptII</i> funcional de la línea 2477 ET MM	173
<b>Tabla 53.</b> Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 2477 ET MM	174
<b>Tabla 54.</b> Análisis del modo de herencia del mutante 1524 ET MM	183
<b>Tabla 55.</b> Análisis del número de insertos T-DNA con el gen <i>nptII</i> funcional de la línea 1524 ET MM	184
<b>Tabla 56.</b> Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 1524 ET MM	185
<b>Tabla 57.</b> Análisis del modo de herencia del mutante 1920 ET MM	188
<b>Tabla 58.</b> Análisis del número de insertos T-DNA con el gen <i>nptII</i> funcional de la línea 1920 ET MM	188
<b>Tabla 59.</b> Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 1920 ET MM	189
<b>Tabla 60.</b> Análisis del modo de herencia del mutante 1801 ET MM	193
<b>Tabla 61.</b> Análisis del número de insertos T-DNA con el gen <i>nptII</i> funcional de la línea 1801 ET MM	194
<b>Tabla 62.</b> Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 1801 ET MM	195
<b>Tabla 63.</b> Análisis del modo de herencia del mutante 1311 ET MM	204

<b>Tabla 64.</b> Análisis del número de insertos T-DNA con el gen <i>nptII</i> funcional de la línea 1311 ET MM	204
<b>Tabla 65.</b> Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 1311 ET MM	205
<b>Tabla 66.</b> Análisis del modo de herencia del mutante 2225 ET MM	215
<b>Tabla 67.</b> Análisis del número de insertos T-DNA con el gen <i>nptII</i> funcional de la línea 2225 ET MM	215
<b>Tabla 68.</b> Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 2225 ET MM	216

# Resumen

El conocimiento de los genes clave que afectan al desarrollo de las plantas y su interacción con agentes externos es un aspecto muy importante, tanto desde un punto de vista básico como aplicado. El escrutinio de poblaciones de plantas mutagenizadas permite la identificación de mutantes y, a partir de ellos, los genes responsables de un carácter concreto. Comparada con otras alternativas metodológicas (mutágenos químicos o físicos) la mutagénesis insercional con T-DNA aporta una ventaja adicional, ya que si el gen queda etiquetado por un inserto su identificación es más sencilla ya que se puede conocer de qué gen se trata a partir de la secuencia conocida del T-DNA.

Con el fin de identificar genes que controlan caracteres del desarrollo temprano se ha llevado a cabo el escrutinio de las progenies de 762 líneas T-DNA de tomate mediante la utilización del cultivo *in vitro*. El empleo de esta metodología presenta ciertas ventajas respecto al escrutinio *in vivo*: menor necesidad de tiempo y espacio, mayor homogeneidad en las condiciones ambientales, facilidad para detectar alteraciones en el sistema radicular y posibilidad de detectar mutantes afectados en su capacidad morfogénica.

Se han identificado 23 fenotipos mutantes diferentes que se han distribuido por su fenotipo más significativo en mutantes alterados en el desarrollo radicular, desarrollo de parte aérea, muerte celular y respuesta morfogénica. Se realizó la caracterización fenotípica y genética de todos los mutantes y se lo logró determinar que existía cosegregación entre el fenotipo mutante y un inserto T-DNA en cinco de las líneas mutantes identificadas. Por último se ha logrado identificar los genes responsables del fenotipo en dos de los mutantes detectados.

# Summary

Knowledge of the key genes that affect the development of plants and their interaction with external agents is a very important aspect, both from a basic point of view and applied. Screening of mutagenized populations allows the identification of plants mutants and, from them, genes responsible for a particular character. Compared with other methodological alternatives (chemical or physical mutagens), insertional mutagenesis with T-DNA provides an additional advantage, the gene is tagged by an insert. Its identification is easier because it is possible to clone the mutated gene from the known T-DNA sequence.

In order to identify genes that control early developmental traits, the screening of the progenies of 762 tomato T-DNA lines was carried out by using plant tissue culture techniques. The use of this methodology presents some advantages respect to *in vivo* scrutiny: less need of time and space, greater homogeneity in the environmental conditions, facility to detect alterations in the root system and possibility of detecting affected mutants in their morphogenetic capacity.

We have identified 23 different mutant phenotypes that have been distributed by their most significant phenotype in altered mutants in root development, shoot development, cell death and morphogenetic response. The phenotypic and genetic characterization of all the mutants was made and it was possible to determine if there was cosegregation between the mutant phenotype and a T-DNA insert in five of the mutant lines identified. Finally, it has been possible to identify the genes responsible for the phenotype in two of the detected mutants.

# Resum

El coneixement dels gens clau que afecten el desenvolupament de les plantes i la seua interacció amb agents externs és un aspecte molt important, tant des d'un punt de vista bàsic com aplicat. L'escrutini de poblacions de plantes mutagenitzades permet la identificació de mutants i, a partir d'ells, els gens responsables d'un caràcter concret. Comparada amb altres alternatives metodològiques (mutàgens químics o físics) la mutagènesi insercional amb T-DNA aporta un avantatge adicional, ja que si el gen queda etiquetat per un inserit la seua identificació és més senzilla ja que es pot conèixer de quin gen es tracta a partir de la seqüència coneguda del T-DNA.

A fi d'identificar gens que controlen caràcters del desenvolupament primerenc s'ha dut a terme l'escrutini de les progènies de 762 línies T-DNA de tomaca per mitjà de la utilització del cultiu *in vitro*. L'ús d'esta metodologia presenta certs avantatges respecte a l'escrutini *in vivo*: menor necessitat de temps i espai, major homogeneïtat en les condicions ambientals, facilitat per a detectar alteracions en el sistema radicular i possibilitat de detectar mutants afectats en la seua capacitat morfogènica.

S'han identificat 23 fenotips mutants diferents que s'han distribuït pel seu fenotip més significatiu en mutants alterats en el desenvolupament radicular, desenvolupament de part aèria, mort cel·lular i resposta morfogènica. Es va realitzar la caracterització fenotípica i genètica de tots els mutants i se va determinar que existia cosegregació entre el fenotip mutant i un inserit T-DNA en cinc de les línies mutants identificades. Finalment s'ha aconseguit identificar els gens responsables del fenotip en dos dels mutants detectats.

# **Introducción**

## 1.1.- El tomate

### 1.1.1.- Origen, historia y clasificación taxonómica

El centro de origen del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) se encuentra en la zona Andina ahora rodeada por Colombia, Perú, Chile, Bolivia y Ecuador. El lugar y tiempo en el cual fue domesticado no se conoce con exactitud (Sims, 1980). Sin embargo, existen dos hipótesis en las cuales se plantea que el tomate tiene como posible centro de domesticación México y Perú. En 1886, Alfonse De Candello, coetáneo de Darwin, usó una evidencia lingüística como los nombres “mala peruviana” o “pommi del Perú” (manzana peruana) para considerar a Perú como centro de domesticación. Por otro lado, Jenkis (1948) postuló a México como centro de domesticación, utilizando como justificación que no había evidencia de cultivos de tomate en épocas pre-colombinas en el Sur de América, a diferencia de México. También usó otra evidencia lingüística, pero no está claro que la planta citada como “tomalt” se refiera a tomate o una especie nativa de *Physalis* (Nesbitt y Tanksley, 2002; Bauchet y Causse, 2007). Recientemente se ha estudiado el genoma de más de mil accesiones de tomate, *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* y *Solanum pimpinellifolium* y se ha llegado a la conclusión de que el tomate se ha domesticado en dos pasos. El primero habría tenido lugar en el norte de Perú y Ecuador y el segundo habría sido en México (Blanca *et al.*, 2015)

En el año 1523 el tomate llegó a Europa. Sin embargo, su consumo fue casi nulo ya que se consideraba una planta tóxica. Los españoles y portugueses lo diseminaron por el resto del mundo gracias a sus colonias ultramarinas. En el siglo XVII el tomate ya se había introducido en la región oriental de Asia y su cultivo a escala comercial comenzó a finales de siglo XIX.

El tomate pertenece a la familia de las *Solanaceae*, la cual contiene más de 3.000 especies, incluyendo plantas de importancia económica, tales como, patata, berenjenas, pimientos, petunias y tabaco. Desde el primer momento en que el tomate cultivado fue introducido a Europa, los botánicos han reconocido su estrecha relación con las especies del genero *Solanum* y en el siglo XVII se

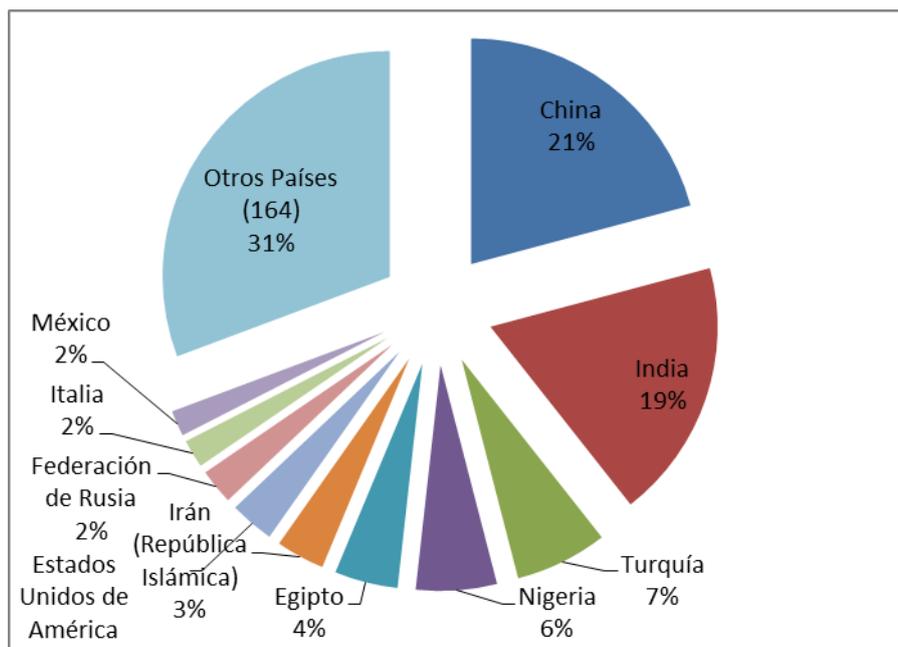
refería al tomate cultivado como *S. pomiferum* (Luckwill, 1943). Tournefort fue el primero en ubicar al tomate cultivado en el género *Lycopersicon*. Este autor clasificaba a las especies que presentaban frutos multiloculares dentro del género *Lycopersicon* y a las especies que presentaban frutos biloculares dentro de género *Solanum*. Sin embargo, en la actualidad sabemos que las variedades de tomate pueden ser de ambos tipos. En 1753, Linnaeus colocó al tomate en el género *Solanum*, junto con la patata, con el nombre específico de *Solanum lycopersicum*. En 1754, Philip Miller los desplazó a otro género, dándole el nombre de *Lycopersicum esculentum* (Peralta y Spooner, 2007).

De acuerdo con el Código Internacional de Nomenclatura Botánica (2000), actualmente al tomate se le ubica dentro del Reino *Plantae*, Subreino *Tracheobionta*, División *Magnoliophyta*, Clase *Magnoliopsida*, Subclase *Asteridae*, Orden *Solanales*, Familia *Solanácea*, Subfamilia *Solanoidea*, Tribu *Solanea*. Sin embargo, en nuestros días existe un debate a nivel de género y especie, donde algunos autores posicionan al tomate en el género *Lycopersicon* y la especie *esculentum* (Rick, 1979; Symon, 1985; Taylor, 1986). De igual manera, hay investigadores que han pretendido ubicar al tomate dentro del género *Solanum* y la especie *lycopersicum* (Child, 1990; Olmsteas *et al.*, 1999; Peralte y Spooner 2001; Spooner *et al.*, 2005).

### **1.1.2.- Importancia económica**

El tomate se encuentra distribuido por todo el mundo y es la segunda hortaliza, después de la patata, con mayor importancia económica a nivel mundial. El tomate no se comercializa únicamente para el mercado en fresco, también se usa en la industria para sopas, concentrados, jugos, ketchup, etc. Es una fuente importante de nutrientes como licopeno,  $\beta$ -caroteno y vitamina C, los cuales tienen un impacto positivo en la salud humana y su producción al igual que su consumo va en incremento a medida que la población mundial aumenta (Bergougoux, 2014). El tomate es una hortaliza de enorme importancia económica, debido a las grandes superficies que se destinan a su cultivo alrededor del mundo. En el año 2013, según datos de la FAO (Food and Agriculture Organization) habían 174 países productores de tomate. En ese

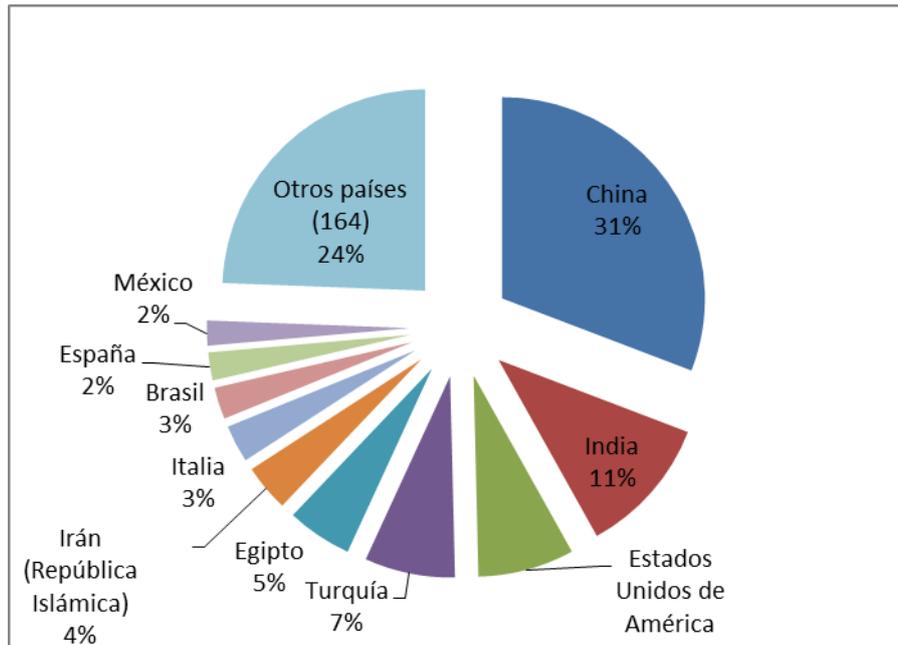
año la superficie cultivada en el mundo fue de 4.729.919 hectáreas. Los países que cosecharon la mayor superficie fueron China (984.603), India (880.000), Turquía (311.000), Nigeria (272.000) y Egipto (212.946), los cuales en conjunto aportan el 57% de la superficie cosechada mundialmente. Ese año México se colocó en la décima posición con una superficie de 87.165 hectáreas y España la vigésimo segunda, con 45.300 hectáreas (Figura 1).



**Figura 1.** Distribución de la superficie cultivada de tomate de los principales países productores en el año 2013 (Fuente: FAO).

La producción mundial para este mismo año fue de 164 millones de toneladas. Los principales países productores de tomate en el mundo son: China (50,5), India (18,2), Estados Unidos (12,6), Turquía (11,8) y Egipto (8,5), en su conjunto contribuyeron al 62% de la producción mundial, lo cual equivale a 101,7 millones de toneladas. España se encuentra en la novena posición con una producción de 3,7 millones de toneladas y México se encuentra en la décima posición con una producción de 3,3 millones de toneladas (Figura 2).

En el contexto Europeo, España se coloca en segundo lugar, después de Italia, tanto en superficie cultivada como en producción obtenida.



**Figura 2.** Distribución de la producción de tomate entre los principales países productores en el año 2013 (Fuente: FAO).

### 1.1.3.- Mejoramiento genético del tomate

El mejoramiento genético del tomate inicialmente se enfocó hacia un aumento del rendimiento aunque este objetivo principal ha ido variando con el paso del tiempo. Actualmente hay en el mercado un gran número de cultivares adaptados a condiciones específicas de crecimiento (invernadero, malla sombra, campo abierto) y para diferentes usos comerciales (mercado en fresco o tomate de procesamiento). Además, continuamente las casas de semillas amplían su catálogo de variedades disponibles para el agricultor. Para ello, los mejoradores utilizan habitualmente métodos clásicos: hibridación y selección con el apoyo de marcadores moleculares. La eficiencia de la mejora mediante esta vía depende mayoritariamente de la disponibilidad de fuentes de variabilidad genética y de la capacidad de aunar en una variedad los caracteres deseables que se pretenden combinar. La biotecnología de plantas ofrece a los mejoradores unas nuevas herramientas para resolver problemas que con los métodos clásicos son difíciles o imposibles de abordar. Estas nuevas herramientas han modificado considerablemente el paradigma en torno al mejoramiento de plantas, permitiendo lograr ciertos objetivos de forma más rápida y el acceso a una variabilidad genética inalcanzable hasta el momento.

#### 1.1.4.- Retos del mejoramiento genético del tomate

En tomate, los programas de mejora están encaminados a producir y distribuir nuevos cultivares con mejores características agronómicas que variarán en función del mercado al que se destine. La historia reciente del mejoramiento genético del tomate ha pasado por cuatro fases: aumento del rendimiento en los años 70's, aumento de la vida post-cosecha en los 80's, mejora de las características organolépticas en los 90's y, más recientemente, incremento del valor nutricional (Bai y Lindhout, 2007; Bauchet y Causse, 2012; Foolad, 2007).

El rendimiento es un reto constante para los mejoradores y toma en cuenta tanto el número de frutos como el peso de éstos por lo que se puede abordar por diferentes vertientes. Por otro lado, unos de los problemas más prominentes en el mejoramiento genético del tomate es la resistencia a los diversos tipos de estrés biótico, como plagas y enfermedades, que pueden causar descensos en la producción y, por tanto, pérdidas muy significativas. El tomate es atacado por más de 200 tipos de plagas y enfermedades. En general, se intentan controlar mediante tratamientos químicos, sin embargo éstos presentan múltiples inconvenientes: desarrollo de resistencias, daño al medio ambiente, posibles efectos a los consumidores, etc. Para limitar el uso de pesticidas, los mejoradores han acudido a las especies silvestres como fuente de variabilidad genética en la mejora de la resistencia a plagas y enfermedades. De hecho en 1934 se produjo la primera introgresión en tomate de genes que controlan un carácter de interés agronómico a partir de especies silvestres. En concreto, mediante el cruce con *S. pimpinellifolium*, se consiguió el desarrollo de una variedad de tomate resistente a *Cladosporium fulvum*, un hongo que causa el moho de la hoja (Walter, 1967). Por otro lado, el tomate cultivado, dependiendo de la variedad, puede ser moderadamente o altamente sensible a muchos estreses abióticos, incluyendo salinidad, sequía, temperaturas extremas, humedad excesiva, desequilibrio nutricional y contaminación ambiental. Sin embargo, dentro del género *Solanum*, hay varias especies silvestres que representan una fuente rica de variación genética disponible (Rick, 1976; 1979). Desafortunadamente, en contraste con la

resistencia a los estreses bióticos, muchos de los cuales tienen un control monogénico, las complejas respuestas genéticas a los estreses abióticos son multigénicas y por lo tanto más difícil de identificar, controlar y manipular (Ben-Ari y Lavi, 2012).

Uno de los retos de la mejora del tomate es el desarrollo de cultivares con maduración retrasada después de la cosecha. Se han empleado diversas estrategias para mejorar este carácter como la manipulación de la biosíntesis del etileno el cual es clave en el inicio de la maduración. Por ejemplo, la identificación de algunas mutaciones que afectan la percepción del etileno han sido utilizadas con éxito para retrasar el ablandamiento de los frutos de tomate (Giovannoni, 2001; Giovannoni, 2007; FAO Worlbank, 2010). Más recientemente, sin dejar de lado todos los objetivos comentados hasta el momento, se han añadido como objetivos de mejora el desarrollo de cultivares que aporten al consumidor un fruto con características deseables en términos de sabor, textura, color, y un mayor contenido en sustancias con elevado valor nutricional (vitaminas, antioxidantes,...).

#### **1.1.5.- Límites del mejoramiento clásico del tomate**

El mejoramiento tradicional usualmente comienza con el cruce entre líneas élite, o entre una línea élite y una especie silvestre. Se debe tener en cuenta que la producción de un nuevo cultivar proveniente de cruces entre dos líneas élite puede tomar entre cinco y siete años, y la incorporación de nuevos genes a partir de una especie silvestre puede tomar hasta 20 años (Causse *et al.*, 2007). La elección de las líneas parentales es crucial y demanda de un buen conocimiento del germoplasma disponible. En el caso del tomate, se encuentran almacenadas en bancos de semillas alrededor del mundo más de 83.000 accesiones, colocando al tomate como la especie vegetal número uno en cuanto a colección y conservación de germoplasma (Bauchet y Causse, 2012). Además, muchas de las especies silvestres relacionadas pueden ser cruzadas mediante hibridación sexual con el tomate cultivado con más o menos eficiencia (Bedinger *et al.*, 2011). Por otra parte, cuando dos especies no se pueden cruzar, se pueden utilizar técnicas de cultivo *in vitro* como el rescate de

embriones o la fusión de protoplastos (Bai y Lindhout, 2007; Rick, 1974). Algunos ejemplos del mejoramiento genético del tomate cultivado mediante la introgresión de genes procedentes de especies silvestres son el uso de *S. hirsutum* para mejorar la tolerancia a las heladas, de *S. chilense* para tolerancia a sequía, de *S. cheesmaniae* para tolerancia a salinidad (Hobson y Grierson, 1993), o el uso de *S. pennellii* para aumentar el contenido de azúcar de los frutos (Fridman *et al.*, 2000; Ikeda *et al.*, 2013).

Para el año 2050, se estima que la población mundial aumente hasta alcanzar los nueve mil millones de habitantes, de los cuales el 62% vivirá en regiones donde una gran proporción de personas sufren de hambre, África y el sureste asiático (FAO; colección de datos 2010-2012). Esto plantea grandes retos en la obtención de suficientes alimentos teniendo en cuenta que para ello se pretende utilizar la menor cantidad de superficie posible. Además, la agricultura necesita buscar soluciones a múltiples problemas como el incremento de la salinidad y la sequía debido a cambios ambientales y de sobreexplotación agrícola o la presencia de nuevas plagas y enfermedades. Aunque gracias a los métodos de mejoramiento tradicional se han alcanzado grandes logros en las especies cultivadas, en este contexto pueden resultar demasiado lentos y laboriosos (Ahmad *et al.*, 2012).

El desarrollo de nuevas herramientas basadas en la biología molecular y celular ofrece a los mejoradores nuevas perspectivas para la mejora genética basada en el uso de marcadores moleculares y en la aplicación de la ingeniería genética (Causse *et al.*, 2007; Bauchet y Causse, 2012). Para poder aplicar estas técnicas es imprescindible disponer de información sobre qué genes son los responsables de la expresión de un carácter. Para conocer el genoma del tomate, se desarrolló en el 2003 el proyecto internacional Red Genómica de las Solanáceas (SOL, Solanaceae Genomcis Network). Este consorcio está compuesto por diversas bases de datos de secuenciación de genes, perfiles de expresión, perfiles de metabolitos, secuenciación y anotación de genomas. La secuencia del genoma de tomate se dio a conocer hace unos años (The Tomato Genome Consortium, 2012), y ahora se está trabajando en sus

anotaciones. Toda esta información está ayudando a entender mejor qué genes controlan el crecimiento y desarrollo de la planta y cómo responden éstas a los estreses a los que se ven sometidas.

#### **1.1.6.- Mejoramiento asistido con marcadores moleculares**

El concepto de selección asistida por marcadores moleculares (MAS) fue sugerida hace ya 30 años por Smith y Simpson (1986). Después del descubrimiento de los RFLP (Botstein *et al.*, 1980) y otro tipo de marcadores moleculares, se asumía que el mejoramiento genético clásico experimentaría un gran cambio ya que la selección de plantas no se llevaría a cabo exclusivamente mediante el fenotipado, sino que la selección también se podría hacer a partir de los marcadores moleculares genéticamente ligados a los genes de interés. Tanksley y colaboradores (1981) publicaron el primer estudio experimental con plantas utilizando MAS y sugirieron que la selección con marcadores moleculares podría preceder a la selección fenotípica en tomate, pero nunca reemplazarla. La ventaja principal de la selección asistida por marcadores es que puede hacerse a una edad temprana de la planta (en estado de plántula o incluso de semilla) sin tener que esperar a que se complete todo su desarrollo por lo que se puede reducir significativamente el número de individuos a cultivar aunque siempre es necesario una evaluación fenotípica para la correcta selección de las plantas (Ben-Ari y Lavi, 2012).

Hoy en día esta técnica está siendo empleada por prácticamente todas las casas de semillas. Por poner algún ejemplo de caracteres que se han introducido a cultivares de tomate mediante esta técnica, cabría mencionar la resistencia a múltiples enfermedades como el cáncer bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*), marchitamiento vascular (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*), virus del mosaico del tabaco (ToMV), la marchitez causada por *Verticillium* y la resistencia a *Alternaria alternata* que provoca el moho negro (Brandwagt *et al.*, 2000). Además, se ha utilizado para la selección de cultivares con la característica de autopoda conocidos como “self-pruning”. También, se emplea para seleccionar mutaciones que provocan retraso en la maduración, como los genes *RIN* y *NOR* o de una mutación en *JOINTLESS-2*

(un gen relacionado con la abscisión), que ha sido clave a la hora de seleccionar variedades adaptadas a la recolección mecanizada (Foolad, 2007).

### **1.1.7.- Mejoramiento biotecnológico del tomate**

El desarrollo de cultivares transgénicos de diferentes especies se está expandiendo por todo el mundo. La superficie dedicada al cultivo de variedades obtenidas mediante ingeniería genética aumenta cada año, con 1,7 millones de hectáreas cultivadas en el mundo en el año 1996 y 181,5 millones de hectáreas cultivadas en el año 2014. Los países que lideran el cultivo de transgénicos en el mundo son Estados Unidos con 73,1 millones de hectáreas, Brasil con 42,2 millones de hectáreas y Argentina con 24,3 millones de hectáreas. En Europa, España es el principal productor de plantas transgénicas con 143.000 hectáreas dedicadas a cultivos de maíz Bt. China es el único país que cultiva tomates transgénicos actualmente (James, 2014). La única variedad de tomate transgénico que se ha comercializado hasta el momento es la variedad FLAVR-SAVR™ (Kramer y Redenbaugh, 1994). La variedad fue introducida en el mercado en 1994 y tuvo un importante, aunque fugaz, éxito debido a los costes de producción y la creciente preocupación por parte de los consumidores hacia los organismos genéticamente modificados (Bruening y Lyons, 2000).

Por otra parte existen múltiples ejemplos de mejoras del tomate mediante la utilización de la transformación genética. Por lo que se refiere a la producción de plantas transgénicas de tomate resistentes enfermedades, el gen *Ep5c* que codifica una peroxidasa de secreción, se vio que se acumulaba a niveles significativos en plantas de tomate sensibles a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Al inhibir la acumulación de la proteína *Ep5c* mediante la estrategia de ARN antisentido se obtuvieron plantas transgénicas de tomate resistentes a *P. syringae* pv. *tomato* (Coego *et al.*, 2005). La sobreexpresión del gen *LeAOX* que codifica una oxidasa mitocondrial en tomate produjo una reducción de la multiplicación del virus del bronceado de tomate (Ma *et al.*, 2011). La introducción de un gen de *Arabidopsis*, *NPR1*, condujo a la obtención de plantas de tomate resistentes a la mancha gris de la hoja (*Stemphylium solani*) y a Fusariosis (Lin *et al.*, 2004).

También se han obtenido algunos resultados en la mejora de la tolerancia frente a estreses abióticos. La obtención de plantas transgénicas de tomate con el gen de *Arabidopsis CBF1* produjo cierto incremento en la tolerancia al frío. La respuesta se asoció a la menor presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) y a una pronunciada tolerancia a daños oxidativos (Hsieh *et al.*, 2002). La expresión del antiportador vacuolar  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  *AtNHX1* de *Arabidopsis* en tomate tuvo como resultado cierto incremento en la tolerancia a la salinidad (Zhang y Blumwald, 2001). Con respecto al desarrollo de cultivos transgénicos de tomate con una mayor calidad del fruto, se utilizó el método de silenciamiento génico mediado por hpARN para inhibir la expresión del gen *ACO1* que codifica una ACC sintasa, una proteína involucrada en la ruta de biosíntesis del etileno, y que permitía un mayor periodo de conservación de los frutos (Behboodian *et al.*, 2012).

La utilización de las técnicas de mejora biotecnológica, entre las que destacan la selección asistida por marcadores y las plantas transgénicas puede no sólo aumentar la rapidez de la transferencia de genes sino alcanzar objetivos inalcanzables por otras vías como, en el caso de la transformación genética, la utilización de fuentes de variabilidad alejadas filogenéticamente de la especie que se pretende mejorar, en este caso, tomate. Esta rápida integración de nuevos alelos o genes a líneas élite de tomate permite el desarrollo de nuevos cultivares con caracteres deseables y poder llegar al mercado en un tiempo más corto en comparación con los cultivares obtenidos mediante la mejora convencional (Di Matteo *et al.*, 2011).

## **1.2.- El cultivo *in vitro* de plantas**

El cultivo de tejidos de plantas engloba un conjunto de técnicas cuya finalidad es la multiplicación de plantas (micropropagación), el saneamiento (cultivo de meristemas y microinjerto) o la mejora genética (por ejemplo, la transformación genética). Como veremos a continuación, el cultivo *in vitro* ha tenido y tiene en los tres campos un gran impacto, permitiendo obtener contribuciones

significativas al avance de la ciencia y siendo una herramienta indispensable en la agricultura moderna (García-González *et al.*, 2010).

El cultivo de tejidos permite la producción y propagación de material vegetal mediante la micropropagación de plantas. En muchas especies de plantas ornamentales esta técnica ha sustituido a otros métodos de multiplicación vegetativa por su eficacia y la calidad de las plantas obtenidas. Como aplicaciones relacionadas con la micropropagación se pueden destacar la conservación de germoplasma y, más específicamente, la conservación y multiplicación de genotipos en peligro de extinción (Sengar *et al.*, 2010).

Las plantas obtenidas mediante el cultivo *in vitro* tienen, en general, un mejor estado sanitario que las obtenidas por métodos de propagación vegetativa tradicionales (injerto, esqueje,...). Además, se han puesto a punto técnicas como el cultivo de meristemas y el microinjerto que han permitido la obtención de material sano a partir de plantas infectadas con diferentes microorganismos, incluidos los virus. Algunos cultivos, especialmente los árboles frutales, se han saneado mediante esta técnica y se han podido obtener plantas sanas a partir de individuos afectados por virosis como la tristeza de los cítricos.

Por otra parte, se han desarrollado diferentes metodologías basadas en el cultivo *in vitro* que han permitido la mejora genética de múltiples especies vegetales. El aumento de la variabilidad genética intraespecífica se puede conseguir mediante el aprovechamiento de la variación somaclonal, la variación genética inducida por el cultivo de tejidos, para obtener nuevos genotipos estables (Marino y Battistini, 1990). El rescate de embriones a partir de cruces interespecíficos nos permite la superación de algunos problemas de incompatibilidad sexual y, como consecuencia, la posibilidad de explotar fuentes de variabilidad extraespecíficas (Ahmadi *et al.*, 2010). La hibridación somática es una herramienta muy importante para el mejoramiento de cultivos a través de la producción de híbridos interespecíficos e intergenéricos. La técnica utiliza la fusión de protoplastos de dos especies diferentes seguido por la selección de las células somáticas híbridas deseadas y la regeneración de las plantas híbridas (Evans y Bravo, 1988). La fusión de

protoplastos también es una estrategia eficiente para transferir partes del genoma de una especie a otra y ha tenido un impacto que va en aumento como estrategia de mejora genética de cultivos (Brown y Thorpe, 1995). Por ejemplo, se han producido híbridos somáticos al fusionar protoplastos de arroz y carrizo común (*Phragmites communis*) como estrategia de mejora a la tolerancia a la salinidad (Mostageer y Elshihy, 2003). Mediante el método haplo-diploide podemos producir líneas puras un periodo de tiempo relativamente corto. La estrategia consiste en un primer paso en el que se obtienen plantas haploides mediante el cultivo de microsporas, anteras, óvulos u ovarios y un segundo paso en el que se duplican las plantas obtenidas. De esta forma se dispone de una metodología alternativa a las autofecundaciones repetidas para conseguir líneas homocigóticas (Morrison y Evans, 1998). Por último, la transformación genética permite la transferencia controlada de uno o pocos genes con características deseables a las plantas huésped. Esta técnica tiene un gran potencial para el mejoramiento genético de cultivares élite ya que se puede introducir una nueva característica a un genotipo previamente mejorado. Entre los múltiples caracteres modificados por esta vía se puede destacar el incremento del rendimiento, la mejora de la calidad y la resistencia a plagas y enfermedades (Sinclair *et al.*, 2004).

### **1.2.1.- La respuesta morfogénica en cultivo *in vitro* de plantas**

La morfogénesis *in vitro* es la base de todas las aplicaciones que se derivan del cultivo *in vitro* de plantas. En efecto, para emplear alternativas biotecnológicas encaminadas a la producción de plantas, como la micropropagación, ciertas técnicas de saneamiento, o diversas metodologías dirigidas a la mejora genética (obtención de plantas haploides, variantes somaclonales, híbridos somáticos, etc.), se necesitan métodos para la regeneración de plantas a partir de explantes o protoplastos. Del mismo modo, salvo en alguna especie modelo como en *Arabidopsis thaliana* donde se han puesto a punto técnicas eficaces de transformación *in planta*, la obtención de plantas transgénicas necesita aplicar métodos que permitan la regeneración *in vitro* de plantas de forma eficaz. En realidad, en este caso se requieren métodos de regeneración mucho

más eficaces porque los tratamientos iniciales (e.g. infección con *Agrobacterium tumefaciens*) conducen a un descenso de capacidad morfogénica del material vegetal con el que se trabaja.

La regeneración *in vitro* se puede conseguir a través de dos vías, la organogénesis (axilar o adventicia) y la embriogénesis somática, siendo ambas influidas por la percepción de las fitohormonas, la división celular y la dediferenciación para adquirir competencia morfogénica, iniciación de órganos y su posterior desarrollo (Sangwan y Harada, 1975; Dhaliwal *et al.*, 2003). La organogénesis adventicia es un proceso morfogénico de tipo unipolar que permite la formación de yemas adventicias y brotes (caulogénesis) a partir de explantes sin meristemos preexistentes. Desde hace más de medio siglo Skoog y Miller (1957) describieron la importancia que tiene el balance de auxinas y citoquininas en los procesos de regeneración. Gautheret (1966) propuso un modelo celular de regeneración basado en la totipotencia de todas las células vegetales y la necesidad de pasar por un proceso de dediferenciación celular para conseguir la regeneración de nuevos órganos. Más recientemente han aparecido algunos trabajos que plantean la necesidad de revisar este modelo celular de regeneración. Sugimoto y colaboradores (2010) afirman que las células que forman los callos en *Arabidopsis* no parecen haber pasado por una fase de dediferenciación, de hecho, comparten bastantes características con las células de los meristemos de las raíces laterales. Por otra parte, Atta y colaboradores (2009) han propuesto que determinados tipos celulares presentes en los explantes de partida (células del periciclo del xilema) son los principales responsables de la regeneración de brotes en ciertas condiciones.

En cualquier caso, para el desarrollo de metodologías que permitan la regeneración de un material concreto se sigue recurriendo a abordajes empíricos en los que se van modificando distintos factores hasta encontrar una combinación que ofrezca el resultado deseado. La elección del tipo de explante es un factor importante para obtener la respuesta morfogénica deseada. Un caso paradigmático es el que se refiere a la obtención de plantas transgénicas

de un gran número de especies de cereales, hasta hace no mucho consideradas como recalcitrantes. El éxito en este caso se basó principalmente en la elección adecuada de un explante de partida, el escutelo, donde se encuentra un tipo celular competente (Hiei *et al.*, 1997). Gracias a este descubrimiento se han podido abordar, por ejemplo, varios programas de mutagénesis en arroz en los que se han producido decenas de miles de plantas transgénicas (Jeon *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2003). Con todo, el factor más ampliamente estudiado es la combinación de los componentes del medio de cultivo: macronutrientes, micronutrientes, azúcar, vitaminas y, sobre todo, el tipo y concentración de los reguladores del crecimiento. Este abordaje, basado en el ensayo y error, aunque a veces ha sido criticado por su falta de elegancia, ha resultado tremendamente efectivo para una gran cantidad de materiales. De hecho, con esta estrategia se han obtenido magníficos resultados en el desarrollo tanto de metodologías como de aplicaciones relacionadas con el cultivo *in vitro* que están siendo utilizadas actualmente por un gran número de grupos de investigación y empresas de todo el mundo.

### **1.2.2.- La regeneración *in vitro* en tomate**

Aunque desde el comienzo del cultivo *in vitro* se vio la gran influencia del genotipo en la respuesta de un material concreto, hasta el momento se conoce muy poco sobre las bases genéticas de la capacidad de regeneración. En el caso del tomate y de especies silvestres relacionadas, se han publicado numerosos estudios sobre regeneración a partir de varios tejidos y órganos. El éxito a la hora de conseguir la regeneración en estas especies se ha visto que está influido por el tipo de explante utilizado, las fitohormonas empleadas, las condiciones ambientales y, de forma clave, el genotipo (Bhatia *et al.*, 2004). De hecho, existen múltiples estudios en los que se han llevado a cabo diferentes experimentos para conocer, de forma empírica, qué combinación de estos factores proporciona las mejores condiciones para conseguir la regeneración (Mamidala y Nanna, 2011; Namitha y Negi, 2013; Sherkar y Chavan, 2014; Wayase y Shitole, 2014).

En el caso de la puesta a punto de un protocolo de transformación genética de tomate, también se han realizado muchos trabajos donde se evalúa la capacidad de regeneración *in vitro* vía organogénesis adventicia de los explantes transformados: cotiledones, hipocótilos, hojas, segmentos de tallos, pedicelos, peciolos e inflorescencias (Khoudi *et al.*, 2009; Yasmeen, 2009; Goel *et al.*, 2011; Koleva Gudeva y Dedejski, 2012; Rai *et al.*, 2013; Namitha y Negi, 2013; Sherkar y Chavan, 2014; Wayase y Shitole, 2014). Además, se ha comprobado que el tipo de explante no sólo influye en la frecuencia de regeneración sino también en el número de plantas regeneradas por explante (Bahurpe *et al.*, 2013; Jehan y Hassanein, 2013). En otros trabajos se describe la imposibilidad de transformar determinados genotipos por la falta de capacidad de regeneración de los explantes utilizados (Fuentes *et al.*, 2008; Mamidala y Nanna, 2011).

Por lo tanto, el estudio de los factores que afectan a la capacidad de regeneración no solamente nos ayudaría a comprender mejor los mecanismos biológicos que actúan en ese proceso. Además, este conocimiento nos abriría nuevas posibilidades para mejorar la eficacia en los experimentos de transformación genética y podría hacer que se obtuvieran plantas transgénicas a partir genotipos concretos calificados hasta el momento como recalcitrantes.

Para conocer los genes que están relacionados con la regeneración *in vitro* se han realizado distintos trabajos en los que se han analizado los perfiles de expresión génica (Che *et al.*, 2006) en materiales que están regenerando. Sin embargo, habitualmente esto conduce a identificar múltiples genes que se expresan en los primeros estadios de la morfogénesis pero no permite saber cuáles son los que verdaderamente determinan la respuesta. También se han realizado trabajos encaminados a la detección de QTL's que permitan emprender programas de selección asistida por marcadores para aumentar la tasa de regeneración en especies como *Arabidopsis*, girasol, chopo y brócoli (revisado por Bolibok y Rakoczy-Trojanowska, 2006), arroz (Nishimura *et al.*, 2005) y tomate (Trujillo-Moya *et al.*, 2011; Arikita *et al.*, 2013). Sin embargo, esta estrategia presenta los inconvenientes de las interacciones de los QTL's

entre sí y con el ambiente y la gran dificultad que conlleva la identificación del gen o genes responsables del fenotipo observado, ya que para ello hay que recurrir a estrategias de mapeo posicional. Desde nuestro punto de vista, la aproximación más adecuada para identificar qué genes controlan la respuesta morfogénica se basa en la detección de mutantes afectados en el carácter.

### **1.2.3.- Otras aplicaciones del cultivo *in vitro***

El cultivo *in vitro* se puede emplear también como herramienta para la detección de otros tipos de mutantes a través del estudio y análisis del fenotipo de las plantas. En nuestro grupo se ha utilizado esta metodología, por ejemplo, para la detección de mutantes afectados en su nivel de tolerancia a la salinidad (Sánchez–Sauceda, 2016). Si comparamos la realización de una evaluación fenotípica mediante cultivo *in vitro* respecto de otros métodos de evaluación *in vivo*, las principales ventajas del cultivo *in vitro* son: el empleo de condiciones ambientales controladas, la 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.

El cultivo *in vitro* también puede ser muy útil para evaluar el fenotipo de plantas en estados tempranos del desarrollo. En este caso, una ventaja adicional a las mencionadas anteriormente sería la posible detección de fenotipos muy difíciles o imposibles de ver en condiciones de cultivo *in vivo*. Por ejemplo, una planta con problemas en el desarrollo del meristemo apical o con problemas de necrosis podría pasar desapercibida en un experimento de cultivo *in vivo* entre las plantas que no germinan correctamente por cuestiones fisiológicas, ambientales, etc. Por otra parte, el cultivo *in vitro* permite ver la parte radicular de las plántulas y detectar alteraciones en el desarrollo del meristemo radicular y de las raíces secundarias que en un experimento de cultivo en sustrato sería prácticamente imposible de identificar. Por último, la evaluación mediante el

cultivo *in vitro* nos brinda la oportunidad de detectar plantas con alteraciones en caracteres que de otra forma serían imposibles de identificar como la capacidad de regeneración *in vitro* de plantas. Si esta caracterización se hiciera en una población de líneas previamente mutagenizadas, se podrían detectar genotipos que presentaran alteraciones en este carácter (por ejemplo, ausencia de regeneración en condiciones morfogénicas) y, a partir de ellas identificar los genes clave en la expresión de este carácter.

### **1.3.- Herramientas biotecnológicas para la identificación de genes**

Desde nuestro punto de vista, la detección de mutantes es la aproximación metodológica más adecuada para conocer cuáles son los genes responsables de un carácter concreto y poder identificar la función de los mismos. Con este objetivo, la información disponible a partir de los trabajos de secuenciación de genomas completos es de gran ayuda para poder llegar a identificar qué gen es el que ha sido afectado en un mutante concreto.

Un aspecto clave en cualquier abordaje mediante mutagénesis es la obtención del mayor número posible de mutantes. En todo caso, cuando esta estrategia se aplica en una especie de interés agronómico, como es nuestro caso, no se pretende etiquetar todos y cada uno de los genes del genoma que afectan al carácter en estudio, sino de llegar a identificar y clonar alguno de estos genes para poder profundizar en el conocimiento de su función o funciones.

#### **1.3.1.- La mutagénesis insercional**

La mutagénesis insercional es una herramienta biotecnológica en la que se asocian el análisis genético tradicional y las técnicas modernas de genética molecular con el objetivo de identificar, clonar y caracterizar funcionalmente el gen mutado. Esta estrategia se basa en el hecho de que un inserto transgénico, bien sea un transposón o un T-DNA, puede provocar la interrupción o la alteración de la expresión de un gen endógeno (Tani *et al.*, 2004; Jung *et*

*al.*, 2008; Mathieu *et al.*, 2009; Thole *et al.*, 2009). Esta técnica ha sido utilizada tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas y sigue siendo una de las estrategias más efectivas para realizar estudios de genética inversa en muchas especies. Para poder llevarla a cabo es necesario generar una población de plantas mediante transformación genética (T-DNA) o mediante la activación de transposones que contenga una o más inserciones de secuencia conocida en un sitio específico del genoma. Las plantas que porten una inserción en un gen clave para un carácter pueden mostrar un fenotipo alterado para ese carácter. La gran ventaja de esta estrategia frente a otras formas de producir mutantes (e.g.: métodos físicos o químicos, variación somaclonal,...) es el conocimiento de la secuencia de la construcción insertada y, por tanto, la mayor facilidad a la hora de clonar las secuencias genómicas en las que se ha producido la inserción.

Esta técnica se puede realizar de dos formas diferentes, mediante el uso de transposones o transformando con T-DNA. Los transposones son elementos genéticos que pueden moverse de un sitio a otro a través del genoma. La utilización de transposones tiene la enorme ventaja de que se pueden generar otras líneas a partir de las existentes haciendo “saltar” el elemento insertado a un lugar diferente con respecto a la localización que ocupaba el inserto original. Mediante el uso de los elementos móviles *Ac/Ds* (*Activator* element / *Dissociation* element) se han podido aislar genes en petunia, tabaco, *Arabidopsis*, tomate y lino (Sundaresan, 1996). En uno de los primeros ensayos se puso de manifiesto la actividad del sistema *Ac* a través de sucesivas generaciones en plantas transgénicas de tabaco (Hehl y Baker, 1990). De igual forma se ha utilizado el sistema heterólogo *Ac* dotado de una transposasa para generar mutaciones insercionales en arroz (Enoki *et al.*, 1999). También resulta interesante la explotación de los elementos *Mu* (*Mutator*) del maíz, ya que se caracterizan por la excepcional frecuencia de inducción de mutaciones germinales así como por la diversa naturaleza de los mutantes aislados. Los elementos *Mu-1* muestran una capacidad de inserción preferencial en regiones ricas en citosinas no metiladas, que coincide con la presencia de secuencias únicas, de bajo número de copias y sobre todo codificantes (Bennetzen *et al.*,

1993). Por ende, este sistema se ha convertido en uno de los preferidos para la obtención de mutantes insercionales de maíz (Cresse *et al.*, 1995).

En tomate, los experimentos de mutagénesis insercional con transposones se ha llevado a cabo principalmente con el sistema *Ac/Ds*, ya que se ha demostrado que en esta especie esos elementos transponibles se encuentran perfectamente activos (Yoder 1990; Carroll *et al.*, 1995). El gen *Cf-9*, relacionado con la resistencia a diferentes especies de *Cladosporium fulvum* fue el primero que se clonó en tomate utilizando esta estrategia (Jones *et al.*, 1994). Otros genes clonados son: *DWARF*, un gen que codifica para un homólogo de citocromo p450 (Bishop *et al.*, 1996), *DCL* (DEFECTIVE CHLOROPLAST AND LEAVES) un gen que controla el desarrollo de los cloroplasto (Kedie *et al.*, 1996) y *FLEEBY*, un gen relacionado con el metabolismo y desarrollo (van der Biezen *et al.*, 1996). Un aspecto negativo al utilizar ciertos transposones (e.g.: elementos *Ac*) es la tendencia a transponerse preferentemente en posiciones del mismo cromosoma. Este hecho se ha observado en maíz (Dooner y Belachew 1989), tabaco (Jones *et al.*, 1990) y *Arabidopsis* (Keller *et al.*, 1993).

### **1.3.2.- Mutagénesis con T-DNA**

Los mutantes insercionales obtenidos con T-DNA se han utilizado frecuentemente para conocer el mecanismo molecular de diferentes procesos biológicos en plantas. Para generar mutantes insercionales, el T-DNA se debe insertar aleatoriamente en el genoma de las plantas mediante transformación genética con *Agrobacterium tumefaciens* o cualquier otro método. La principal ventaja de la mutagénesis con T-DNA es que éste puede ser utilizado como una etiqueta cuando causa la disrupción o activación de un gen endógeno, lo cual permite llegar a el gen mutado mediante métodos moleculares como el TAIL-PCR (Li-Jia y Genji, 2013) o Anchor PCR (Schupp *et al.*, 1999). Por otro lado, el sistema de mutagénesis insercional con respecto al de transposones, presenta la ventaja de que las inserciones del T-DNA dentro de una región concreta son química y físicamente estables a lo largo de las generaciones (Radhamony *et al.*, 2005).

Diversos investigadores han estudiado el mecanismo de transferencia e integración del T-DNA en plantas y se ha demostrado qué factores de las plantas juegan un papel importante en la integración del T-DNA (Zupan *et al.*, 2000; Gelvin, 2000, 2003). La distribución del T-DNA a lo largo del genoma es aleatoria (al menos hasta cierto punto), ya que no existen puntos calientes o preferenciales de integración (Franzaman *et al.*, 1995). Diversos autores (Miyao *et al.*, 2003; Kolesnik *et al.*, 2004) han demostrado que el T-DNA es menos propenso a integrarse en puntos calientes, a diferencia de los patrones de integración de los transposones *Tos17* y *Ds* en arroz. Sin embargo, se ha recalcado desde hace tiempo que el T-DNA suele integrarse en regiones del genoma que son transcripcionalmente activas (André *et al.*, 1986; Koncz *et al.*, 1989; Herman *et al.*, 1990) lo cual sería una ventaja en el contexto de un programa de mutagénesis insercional. Por otra parte, el análisis de varias colecciones de mutantes de inserción con T-DNA en *Arabidopsis* ha indicado una tendencia de éste a integrarse en regiones regulatorias 5' de genes y en regiones ricas en adenina y timina (Brunaud *et al.*, 2002; Szabados *et al.*, 2002). Además, el análisis de más de 140.000 líneas T-DNA de *Arabidopsis* reveló que proporcionalmente había menos inserciones en regiones centroméricas que en regiones ricas en genes de la eucromatina, lo cual sugiere de nuevo que los eventos de inserción del T-DNA tienen preferencia por las zonas del genoma con altas densidades génicas (Alonso *et al.*, 2003). De igual forma, el análisis de mutantes de T-DNA en arroz indica una preferencia del T-DNA a insertarse en regiones ricas en genes, con obvias predisposiciones de integración en regiones regulatorias 5' y 3' (Che *et al.*, 2003; Sallaud *et al.*, 2004). Por otra parte, la caracterización de sitios de inserción del T-DNA de una colección de 108 plantas de fresa (*Fragaria vesca* L.) mediante técnicas de PCR (hiTAIL-PCR) y análisis bioinformático revelaron una preferencia del T-DNA a integrarse en sitios que contienen guanina y citosina (Ruiz-Rojas *et al.*, 2010).

Actualmente existe un número elevado de líneas T-DNA de arroz y *Arabidopsis* y de forma más reducida también se han descrito colecciones de líneas de T-DNA en otras especies como *Lotus japonicus* (Webb *et al.*, 2000), *Medicago*

*truncatula* (Trieu *et al.*, 2000; Scholte *et al.*, 2002), tomate (Mathews *et al.*, 2003; Gidoni *et al.*, 2003), *Salvia miltiorrhiza* (Lee *et al.*, 2008), *Brachyponium distachyon* (Vain *et al.*, 2008), álamo (Harrison *et al.*, 2007), *Brassica rapa* (Lee *et al.*, 2004), *Brassica napus* (Bade *et al.*, 2003), cebada (Zhao *et al.*, 2006), fresa (Oosumi *et al.*, 2006) y *Solanum pennellii* (Atarés *et al.*, 2011).

Aunque cualquier T-DNA sirve para llevar a cabo un programa de mutagénesis insercional, se pueden emplear construcciones que aporten un valor añadido a las plantas transgénicas obtenidas. El primer caso sería el empleo de construcciones que produjeran una activación transcripcional (Activation Tagging) para obtener mutantes de ganancia de función con naturaleza dominante. Para ello se suele utilizar un T-DNA que contiene múltiples promotores 35S (CaMV) (Hayashi *et al.*, 1992; Susuki *et al.*, 2001). Al ocurrir un evento de inserción en la vecindad de un gen endógeno lo suficientemente cerca para ejercer su influencia, provocaría un aumento en el nivel de expresión de dicho gen.

Las principales ventajas al utilizar este tipo de construcciones serían la posibilidad de identificar genes redundantes para una función (Kirik *et al.*, 2004) o que su anulación no produzca fenotipo (Zhao *et al.*, 2001; Van der Graaff *et al.*, 2002; Wen *et al.*, 2004). En tomate, Mathews y colaboradores (2003) generaron una colección de 10.427 líneas transgénicas independientes con una construcción de activación transcripcional que portaba cuatro copias del promotor 35S e identificaron 1.338 líneas transgénicas (12.83%) con alteraciones fenotípicas relacionadas con el desarrollo de la planta. Con este sistema se han clonado varios genes en *Arabidopsis* (Kakimoto, 1996; Kardailaky *et al.*, 1999; Borevitz *et al.*, 2000; Ito y Meyerowitz, 2000; Huang *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2001). Por ejemplo, Weigel y colaboradores (2000) han caracterizado unos 30 mutantes dominantes en *Arabidopsis*, con una frecuencia de uno de cada mil. De igual forma en *Arabidopsis*, Marsch-Martinez y colaboradores (2002), desarrollaron un método de activación transcripcional que incorpora el sistema de transposón *En-1* de maíz y analizaron 2.900 inserciones encontrando 31 mutantes dominantes, una

frecuencia del 1%. En arroz, Shuyan y colaboradores (2008) generaron, durante seis años, una colección de 50.000 plantas transgénicas utilizando el vector pER38 de activación transcripcional y detectaron alrededor de 400 mutantes dominantes. También se ha utilizado este sistema en petunia (Zubko *et al.*, 2002), en Periwinkle de Madagascar (van der Fits *et al.*, 2001) y en *Populus* (Busov *et al.*, 2011).

Sin embargo, se ha visto que la tasa de detección de mutantes con el sistema de activadores transcripcionales es muy baja. En *Arabidopsis* se ha encontrado una correlación determinante entre el número de inserciones de T-DNA, el estado de metilación de la secuencia del intensificador 35S y la actividad del intensificador. Todas las plantas que portaban más de una inserción de T-DNA mostraban metilación del intensificador 35S y un dramático descenso en la actividad del mismo. Estos resultados indican que en una gran proporción de las líneas obtenidas mediante activación transcripcional el intensificador 35S es silenciado debido a la metilación que es inducida por la integración de múltiples insertos T-DNA (Chalfun-Junior *et al.*, 2003). Alternativamente, como lo habitual es poner varios promotores 35S en también en los vectores de activación transcripcional, existe la posibilidad de que la sobreexpresión de un gen conlleve a un mecanismo de silenciamiento postranscripcional, es decir, en lugar de un mutante de ganancia de función, lo que se obtiene es uno de pérdida de función. Otros inconvenientes al utilizar esta aproximación son la alta frecuencia de plantas que muestran efectos pleiotrópicos y la dificultad a la hora de clonar el gen afectado ya que la influencia de las señales reguladoras se puede producir aunque el inserto esté a mucha distancia del gen endógeno, es decir, no siempre este gen queda etiquetado por el inserto.

### **1.3.3.- Etiquetado de genes mediante “trapping”**

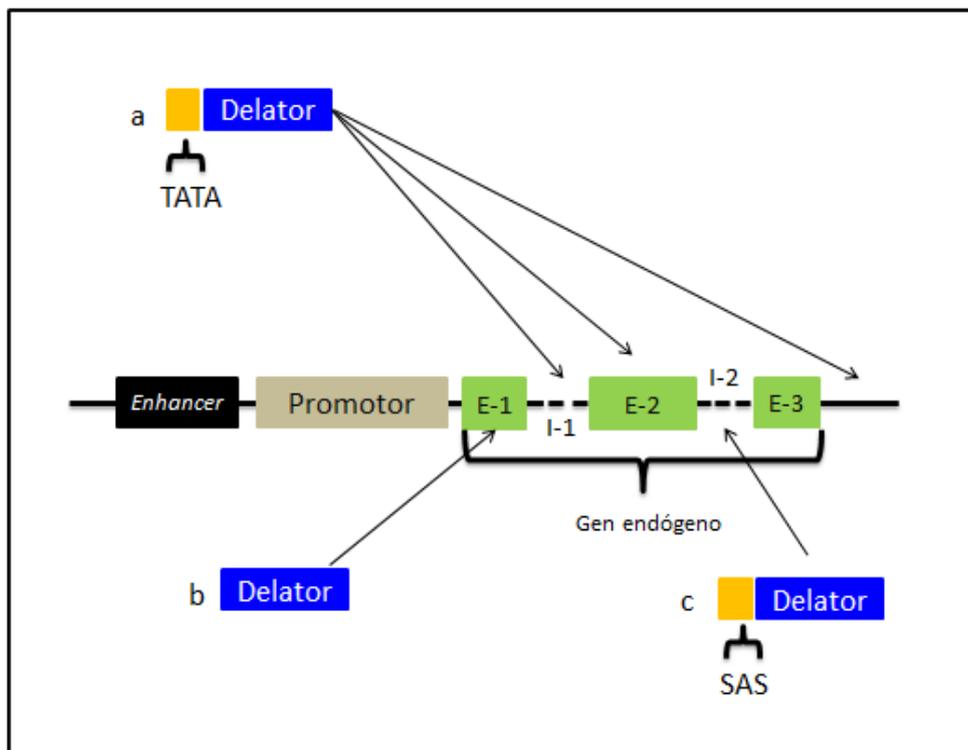
La técnica consiste en introducir en el genoma construcciones que portan, además de un gen marcador, habitualmente un gen de resistencia a un antibiótico, un gen delator con un promotor mínimo, sin promotor o unido a un sitio aceptor de *splicing*. El gen delator más utilizado es el gen bacteriano *uidA* que codifica la proteína GUS. Esto es debido a que la observación

microscópica de la tinción de la proteína GUS es tremendamente más sensible que la de otros genes delatores (e.g.: GFP o Luc) ya que permite su detección en unas pocas células (Topping *et al.*, 1994; Sundaresan *et al.*, 1995, Campisi *et al.*, 1999; He *et al.*, 2001).

El interés de esta estrategia reside en la naturaleza dual de las trampas, ya que por un lado generan mutaciones de inserción de T-DNA y por otro lado, permiten estudiar el patrón de expresión del gen etiquetado. De esta forma, no sólo se pueden hacer inferencias en torno a la función del gen etiquetado en un determinado mutante de inserción a través del fenotipado en TG1 o TG2, sino que también se puede obtener un panorama bastante preciso en torno al patrón de expresión espacio-temporal de dicho gen, ya que por el peculiar diseño de las trampas la expresión del gen delator puede imitar la expresión del gen endógeno etiquetado. Por tanto, el empleo de trampas génicas tiene grandes ventajas sobre la mutagénesis insercional en *sensu* estricto porque 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 llega a detectarse en el fenotipado de las plantas (Springer, 2000). Por último, el empleo de la mutagénesis insercional con trampas de intensificadores (*enhancer trapping*) y promotores (*promoter trapping*) está dando resultados positivos en diversas especies como *Arabidopsis* (Sundaresan *et al.*, 1995; Campisi *et al.*, 1999), arroz (Jeon *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2003), chopo (Groover *et al.*, 2004) y especies silvestres relacionadas con tomate como *Solanum pennellii* (Atarés *et al.*, 2011).

Existen tres tipos de trampas génicas denominadas como trampas de intensificadores, promotores y genes (Springer, 2000). La trampa de intensificadores consiste de un T-DNA que, a parte de un gen marcador (e.g. resistencia a la Kanamicina), contiene un promotor mínimo (caja TATA + inicio de transcripción) al que se encuentra fusionada la región estructural del gen *uidA* justo al lado del borde derecho. El promotor mínimo es incapaz de

promover un nivel de transcripción detectable, pero su inserción en el área de acción de un determinado intensificador, y en la dirección correcta, activa la expresión del delator, imitando el patrón de expresión que dicho intensificador confiere al gen endógeno. Por lo tanto, permite identificar y analizar el patrón de expresión de un gen analizando la expresión del delator (Figura 3a). La trampa de promotores es idéntica a la anterior, pero eliminando el promotor mínimo. Para que funcione, el T-DNA debe insertarse dentro de uno de los exones de un gen (Figura 3b). La trampa de genes tiene un sitio aceptor de *splicing* justo antes de la región estructural del delator, de forma que sólo funciona cuando T-DNA se integra dentro de un intrón (Figura 3c).



**Figura 3.** Esquema de las construcciones utilizadas como trampas génicas. Las flechas indican los sitios de inserción en un hipotético gen endógeno que daría lugar a la activación del gen delator. a) trampa de intensificadores. b) trampa de genes. c) trampa de promotores. TATA: promotor mínimo (caja TATA). SAS: sitio aceptor de “splicing”. E-1, E-2, E-3: Exones. I-1, I-2: Intrones.

Cada tipo de trampa tiene sus ventajas e inconvenientes. En el caso de la trampa de intensificadores, como basta que se inserte en el área de acción de un intensificador para que funcione, el número de eventos donde se observa la expresión del gen delator es mayor. El inconveniente estriba en que, como el intensificador puede activar la expresión del gen delator aunque entre ellos haya una distancia considerable, a la hora de clonar el gen, el esfuerzo puede ser mayor. Por otro lado, el inconveniente principal de las trampas de promotores y de genes, es que para que funcionen deben integrarse dentro de un exón o de un intrón, respectivamente, y, por tanto, el número de genes que van a detectarse es menor. Por el contrario, en este caso el gen queda estrictamente etiquetado por el T-DNA.

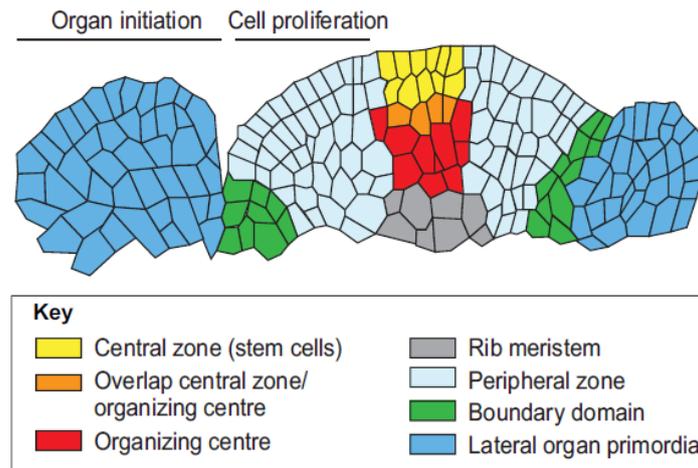
#### **1.4.- Identificación de genes implicados en caracteres del desarrollo temprano de la planta de tomate y en la organogénesis adventicia**

Además de la detección de mutantes relacionados con la respuesta morfogénica, gracias a la metodología empleada en esta tesis, se han podido identificar diferentes mutantes afectados en caracteres del desarrollo temprano de la planta de tomate entre los que hemos destacado: el desarrollo de la parte aérea, el desarrollo de la raíz y la necrosis y muerte celular programada.

##### **1.4.1.- Desarrollo de la parte aérea**

En las plantas, la mayoría del desarrollo ocurre de manera post-embionaria a partir de la actividad del meristemo radicular y apical. Los meristemos apicales se forman durante la embriogénesis y tienen la capacidad de renovarse continuamente. A partir de ellos se forman células hijas que se diferencian en diferentes tejidos dando lugar a la formación de hojas, tallo y flores (Steeves y Sussex, 1989). En angiospermas, el meristemo apical o SAM (Shoot apical meristem) consiste en un pequeño grupo de células organizado en capas (Satina *et al.*, 1940; Poething, 1987). En la mayoría de plantas dicotiledóneas,

la túnica consiste en una capa epidérmica suprayacente conocida como L1 y una capa subepidérmica conocida como L2, con una sola célula de grosor cada una (Tilney-Bassett, 1986). El corpus, o capa L3, se encuentra debajo de la túnica y consiste en células que se dividen en todos los planos. Los derivados de la capa L1 dan lugar a la epidermis de los ápices, hojas y flores, mientras que la capa L2 provee el mesodermo y las células gaméticas. Por último, la capa L3 provee los tejidos vasculares. Estas tres capas participan en la formación de órganos y el crecimiento del tallo (Poething y Sussex, 1985). También se pueden definir diferentes dominios del meristemo basándose en el nivel de división y crecimiento celular. En la zona central (ZC) las células se dividen y crecen poco. En contraste, en la zona periférica (ZP) que rodea la ZC las células se dividen y crecen con mayor intensidad. La zona periférica corresponde al dominio organogénico del ápice meristemático. En cuanto el primordio de un órgano empieza a emerger, como resultado de la proliferación y crecimiento celular de un pequeño grupo de células fundadoras, otro grupo de células en los bordes del órgano en formación detienen su crecimiento. Estas células forman una frontera entre el órgano y el ápice meristemático proporcionando una separación física entre las dos estructuras (Traas y Doonan, 2001). En el centro de organización (CO) las células se dividen en orientación aleatoria, proveyendo de células madre promotoras de señales y del mantenimiento de la pluripotencia de las células madre suprayacentes localizadas en la ZC (Mayer *et al.*, 1998; Rieu y Laux, 2009) (Figura 4).



**Figura 4.** Representación esquemática de una sección longitudinal de meristemo apical mostrando los diferentes dominios funcionales (Gaillochet y Lohmann, 2015).

Estudios genéticos y moleculares realizados en *Arabidopsis* han contribuido al entendimiento del complejo proceso de formación de ápices meristemáticos en plantas. El establecimiento del ápice meristemático en *Arabidopsis* requiere la actividad del gen *STM* (*SHOOT MERISTEMLESS*). En mutantes de pérdida de función *stm*, se observa que las raíces, hipocótilos y cotiledones de las plántulas se desarrollan normalmente pero no se forma el ápice meristemático embrionario (Barton y Poething, 1993). Se ha demostrado que la función redundante de *CUC1* y *CUC2* (*CUP-SHAPED COTYLEDONS1* y *2*) es necesaria para la expresión de *STM*. Los doble mutantes *cuc1* y *cuc2* carecen de ápice meristemático y presentan fusión de los cotiledones. La ausencia de expresión de *STM* en los dobles mutantes puede justificar el fenotipo sin ápice de las plantas (Aida *et al.*, 1997, 1999). La expresión de los factores de transcripción de *CUC* junto con *STM* en la periferia de los meristemos (ZP) determina el destino de las células inmediatamente después de que el primordio del órgano en formación empieza a abultarse y permite la separación con el meristemo (Furutani *et al.*, 2004; Heisler *et al.*, 2010). En esta función se ha visto que también está involucrado el factor de transcripción *AS1* (*ASYMMETRIC LEAVES1*) el cual mantiene reprimidos los factores de identidad de los meristemos (Byrne *et al.*, 2000). Los niveles de expresión de

*LFY* (*LEAFY*) son determinantes para que el órgano adquiriera una identidad de hoja o de flor. Niveles bajos de expresión de *LFY* dan lugar a una hoja, mientras que niveles altos de expresión conducen a la formación de una flor (revisado por Moyroud *et al.*, 2010). Por otra parte, *WUS* (*WUSCHEL*) juega un papel central en el mantenimiento de las células madre del ápice meristemático. En los mutantes *wus* hay un desarrollo defectuoso de los ápices meristemáticos. Se generan ápices adventicios pero éstos terminan prematuramente su desarrollo en estructuras aberrantes planas (Laux *et al.*, 1996). Las proteínas de *WUS*, después de ser sintetizadas en la zona de organización, migran a la zona central donde activan *CLV3* (*CLAVATA 3*) al unirse con sus elementos promotores. *WUS*, no sólo especifica el destino de las células madre en las células suprayacentes localizadas en la zona central, también activa su propio regulador negativo, *CLV3*. De tal modo, el sistema de retroalimentación *WUS-CLV3* forma un mecanismo de corrección para mantener un número constante de células madre y el tamaño de ápice meristemático (Yadav *et al.*, 2011). Esta comunicación requiere la secreción de *CLV3* al espacio intercelular, donde actúa con *CLV1* (*CLAVATA1*) y en la que intervienen también el complejo proteico receptor *CLV2* (*CLAVATA2*) y el *RPK2* (*RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE 2*) (Clark *et al.*, 1997; Rojo *et al.*, 2002; Bleckmann *et al.*, 2009; Kinoshita *et al.*, 2010; Müller *et al.*, 2008; Ogawa *et al.*, 2008).

Dentro de las fitohormonas, las auxinas han sido las mejor caracterizadas en cuanto al desarrollo del ápice (Davies, 1995). Las auxinas regulan un amplio rango de procesos del desarrollo. Se han reportado sistemas de percepción que median la acción de las auxinas en el desarrollo del ápice meristemático. Un grupo de receptores localizados en el núcleo celular codificado por los genes *TR11* (*TRANSPORTER INHIBITOR RESPONSE 1*) y *AFB* (*AUXIN F-BOX*) son los encargados de percibir la presencia de auxinas. Cuando perciben las auxinas, estos receptores activan la familia de factores de transcripción *ARF* (*AUXIN RESPONSE FACTOR*) los cuales se encargan de regular los genes diana (Guilfoyle y Hagen, 2007; Salehim *et al.*, 2015). En la capa L1 del ápice meristemático, la acumulación de auxinas induce la formación de

primordios de órganos. Las auxinas acumuladas en la capa L1, posteriormente son transportadas a los tejidos de las capas L2 y L3 y su patrón de distribución es determinante para la filotaxis de la planta y para el patrón de venación (Benková *et al.*, 2003; Reinhardt *et al.*, 2003; Heisler *et al.*, 2005; Hay *et al.*, 2006; Scarpella *et al.*, 2006; Barkoulas *et al.*, 2008; Bayer *et al.*, 2009).

La auxina natural más importante, el ácido indol-3-acético (AIA), se sintetiza con un patrón espacio-temporal específico y su transporte se facilita gracias a la proteína transportadora PIN1 (PIN-FORMED 1). Alteraciones en la expresión de PIN1 perjudican la acumulación local de auxinas y afecta a procesos como la iniciación de órganos (Okada *et al.*, 1991; Reinhardt *et al.*, 2000), la filotaxis (Guenot *et al.*, 2012), el patrón vascular (Scarpella *et al.*, 2006) y la morfogénesis del margen de las hojas (Hay *et al.*, 2006).

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

#### **1.4.2.- Desarrollo de la raíz**

El desarrollo del sistema radicular afecta de forma significativa a muchos caracteres agronómicos muy importantes y es especialmente importante en cómo la planta afronta determinadas condiciones ambientales como periodos de sequía o déficit de nutrientes (Malamy, 2005). Habitualmente, el sistema radicular se origina de la raíz primaria que se desarrolla a partir del embrión zigótico. Esta raíz primaria produce raíces secundarias que al ramificarse

generan las raíces terciarias y así sucesivamente. Las raíces secundarias, terciarias, cuaternarias y todas las raíces que se siguen formando son referidas como el sistema radicular lateral (Malamy y Benfey, 1997). Las raíces laterales se desarrollan de forma post embrionaria a través de las células del periciclo de la raíz primaria (Zhen-Xing, 2012), lo cual posibilita a la planta modelar el sistema radicular de acuerdo con sus necesidades fisiológicas impuestas por el medio ambiente (Lynch y Brown, 2012). Adicionalmente a las raíces laterales, las plantas pueden desarrollar raíces adventicias, las cuales emergen de tejidos que no son de la raíz primaria, tales como el hipocótilo, tallo u hojas (Geiss *et al.*, 2009). Algunas especies vegetales desarrollan raíces adventicias espontáneamente durante el proceso de reproducción vegetativa. En otras especies las raíces adventicias son órganos especializados con propiedades específicas, por ejemplo el abastecimiento de aire, como es el caso de las raíces aéreas en orquídeas epífitas. Además, las raíces de corona, un tipo de raíces adventicias específicas de plantas monocotiledóneas (e.g., arroz, maíz) constituyen las raíces de anclaje de sus sistemas radiculares (Hochholdinger *et al.*, 2004; Osmont *et al.*, 2007; Bellini *et al.*, 2014). Para desarrollar un sistema radicular bien adaptado es clave percibir las condiciones ambientales (Rymen y Sugimoto, 2012). Dada la importancia que tienen las raíces para asegurar la producción de las especies de interés agronómico, especialmente bajo condiciones de suelos con poca fertilidad o en situaciones de disponibilidad de agua no óptimas, la mejora del sistema radicular es clave para conseguir un buen comportamiento de los cultivos en situaciones adversas (Kell, 2011; Jung y McCouch, 2013). En este contexto, resulta muy interesante profundizar en el conocimiento de los genes que determinan la formación de las raíces y su desarrollo posterior.

A nivel celular, cuando la semilla germina, la raíz principal emerge y crece mediante la división celular que se produce en el meristemo apical y una posterior elongación celular (Beemster y Baskin, 1998). El meristemo apical del extremo de la raíz es de gran importancia para mantener el crecimiento de ésta. Este meristemo actúa como un centro organizador de crecimiento y consiste de células quiescentes (QCs), las cuales permanecen indiferenciadas

y rodeadas por células iniciales. Estas células iniciales se diferencian a tipos celulares específicos mediante una división asimétrica (Sabatini *et al.*, 2003; Garay-Arroyo, 2012). La división coordinada de las células iniciales conduce a un patrón radial con capas celulares concéntricas, cada una con funciones específicas (Scheres *et al.*, 2002). Debido a esa organización radial y a la generación de nuevas células mediante la división de la punta de la raíz, seguido de la elongación celular y diferenciación, se generan mapas transcripcionales espacio-temporal para cada tipo celular (Birnbaum *et al.*, 2003). Algunos reguladores moleculares claves del meristemo de la raíz primaria, tales como PLT1 (PLETHORA1), SCR (SCARECROW) y SHR (SHORT ROOT) también están involucrados en el mantenimiento del nicho de células madre de las raíces laterales y, muy probablemente, también en los meristemos de las raíces adventicias (Lucas *et al.*, 2010; Della Revera *et al.*, 2013; Tian *et al.*, 2014). De hecho, se ha comprobado que mutaciones en algunos de estos genes provocan alteraciones en el desarrollo de raíces embrionarias, primarias y laterales (Wysocka-Diller *et al.*, 2000).

Se ha comprobado que en el desarrollo de los meristemos es muy importante la presencia de determinadas hormonas vegetales. En los extremos de las raíces se acumulan auxinas endógenas que están involucradas en los procesos de división celular, expansión celular y la respuesta gravitropical en la raíz (Petersson *et al.*, 2009; Overvoorde *et al.*, 2010). Los niveles altos de auxinas estimulan la división celular, mientras que los niveles bajos estimulan la elongación (Perrot-Rechenmann, 2010). Además de la concentración de esta hormona, el tipo de auxina también es importante para determinar el desarrollo celular. Por ejemplo, el ácido naftalenacético endógeno estimula la elongación celular, mientras que el ácido 2,4-diclorofenoxiacético, induce la división de las células (Campanoni y Nick, 2005). El crecimiento de la raíz primaria también se ve afectada por la presencia de otras hormonas vegetales. Las citoquininas, por ejemplo, determinan la división celular en el meristemo de la raíz primaria, posiblemente vía una redistribución de auxinas (Dello Ioio *et al.*, 2007; Chapman y Estelle, 2009; Ubeda-Tomás *et al.*, 2009; Della Rovere *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013). Por otra parte, se ha comprobado que el ácido abscísico

(ABA) inhibe el progreso de ciclo celular (Wang *et al.*, 1998) y que las giberelinas controlan la transición de división celular a elongación (Achard *et al.*, 2009; Ubeda Tomás *et al.*, 2009). En este contexto se puede afirmar que la participación de diferentes fitohormonas, dependientes o independientes de señalizaciones por auxinas, convergen en el control de la división y elongación celular en el meristemo y en otras zonas de la raíz primaria afectando al crecimiento de ésta (Ubeda-Tomás *et al.*, 2012).

Las raíces laterales emergen de la raíz principal de forma post-embionaria y esto permite a la planta abarcar un mayor volumen del suelo en el que se encuentra (Nibau *et al.*, 2008). Estas raíces se desarrollan a partir de tres hileras de células del periciclo presentes en el xilema de la parte apical de las raíces, mediante un proceso denominado cebado celular (Casimio *et al.*, 2003). En este grupo de células el ciclo celular se reactiva y el primordio de la raíz lateral (LRP Lateral Root Primordium) se inicia (De Smet, 2012). Las células experimentan dos divisiones asimétricas lo cual conduce a una única capa de primordio de la raíz lateral. Posteriormente, se producen subsiguientes divisiones periclinales lo cual da como resultado un primordio en forma de domo o cúpula, el cual emerge de la raíz principal (Benková y Bielach, 2010; Dastidar *et al.*, 2012; Smith y De Smet, 2012). La emergencia de la raíz lateral está controlada por el balance de auxinas. El transporte de esta hormona afecta tanto el patrón de formación *de novo* del primordio de la raíz lateral como el de la capa de células que cubre el primordio para facilitar su emergencia (Swarup *et al.*, 2008). Por ejemplo, cuando el represor de auxinas *SHY2*, que se expresa en las células de la endodermis que recubren directamente el primordio de la raíz lateral, no se expresa (mutante de pérdida de función *shy2-24*) se provoca el aumento a la respuesta a auxinas en las células de la endodermis lo que conduce a una emergencia acelerada de las raíces laterales en comparación con la WT. Contrariamente, las plantas con sobreexpresión del alelo *shy2-2* que reduce la respuesta a auxinas en las células de la endodermis muestran un retraso en la emergencia de las raíces laterales (Vermeer *et al.*, 2014). Después de la especificación de las células que van a formar las raíces laterales, la expresión del portador de flujo de auxinas

PIN3 se induce en un pequeño grupo de células adyacentes al primordio de la raíz lateral. El mutante *pin3* muestra retraso en la iniciación de las raíces laterales (Marhavý *et al.*, 2013). En su camino a la superficie, la primera capa que cruzan las raíces laterales es la endodermis. Las células de la endodermis se encuentran rodeadas por una estructura hidrofóbica rica en lignina llamada banda de Caspary que configura una barrera de difusión entre el espacio extracelular de la corteza de la raíz, conectada al suelo y el tejido vascular, conectado a todos los órganos de la planta. Debido a su naturaleza química, un polímero de fenol inelástico, la banda de Caspary es resistente a la degradación química y es rígida (Nasser *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2013). Vermeer y colaboradores (2014) observaron que las células de la endodermis sufrían un cambio dramático de forma a medida que los primordios de las raíces laterales crecían. Las células se hacían progresivamente más delgadas, perdían volumen, hasta el punto que algunas membranas plasmáticas se fusionaban. En plantas que expresan *shy2-2* en la endodermis, la activación de las células que dan lugar a las raíces laterales es bloqueada y no se forman raíces laterales. Este bloqueo es revertido mediante tratamiento con auxinas. Por lo tanto, el ajuste de la endodermis al crecimiento del primordio de la raíz lateral involucra, una percepción autónoma de auxinas dependiente de *SHY2* en la endodermis (Vermeer *et al.*, 2014). El péptido de señalización IDA (INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION) y sus receptores, HAESA y HSL2, que son unas quinasas ricas en leucina, forman un modelo de señalización involucrado en la regulación de las enzimas remodeladoras de la pared celular durante la separación de las células y absición en flores (Cai y Lashbrook, 2008). Todos estos elementos de este modelo también se expresan en la endodermis, corteza y las células de la epidermis que recubren al primordio lateral de la raíz que se está formando. Además, en plantas con mutaciones en *IDA*, *HAE* o *HSL2*, el primordio tiene retrasos en cruzar la endodermis ya que ésta no se vuelve más delgada (Kumpf *et al.*, 2013). La expresión de *IDA*, *HAE* y *HSL2* es inducida por auxinas y a su vez estos tres son requeridos para la expresión apropiada en las células de la endodermis encima del primordio lateral de la raíz. Estos resultados sugieren un modelo en

el cual la acumulación de auxinas en la endodermis encima del primordio induce la expresión de *IDA*, el cual envía señales a través de los receptores de *HAE* y *HSL2*, los cuales provocan una mayor expresión de la enzima de remodelización de la pared celular *XTR6* (*XTH23/XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLYCOSYLASE6*) y la expansina *EXP17* que controlan el reblandecimiento de la endodermis (Swarup *et al.*, 2008; Laskowski *et al.*, 2006).

Una vez la raíz lateral atraviesa la endodermis, debe cruzar las capas de la corteza y la epidermis para emerger a la superficie de la raíz primaria. Al observar la raíz lateral emergiendo a través de la epidermis y la corteza mediante un microscopio electrónico de barrido, no se observan cambios significativos en las células, pero éstas son apartadas por la raíz lateral en emergencia. La separación de estas células requiere la degradación de la laminilla media rica en pectina que une a las células (Kumpf *et al.*, 2013; Laskowski *et al.*, 2006). Las pectinas son degradadas por las poligaracturonasas (PG), en concreto, se activa la expresión de *PGAZAT* (PG ABSCISSION ZONE ARABIDOPSIS THALIANA) en las células corticales y epidermales que rodean al primordio en emergencia (González-Carranza, 2007; Kumpf *et al.*, 2013). Los transportadores de auxinas *LAX3* y *PIN3* contribuyen en dirigir el flujo de auxinas a las células de la corteza y la epidermis que se encuentran encima del primordio de la raíz lateral y la inducción local de enzimas remodelizadoras dependientes de auxinas de la pared celular. Además, la expresión coordinada de *LAX3* y *PIN3* sólo permite ablandar un pequeño grupo de células encima del primordio lo cual previene el reblandecimiento general de las células en la zona de emergencia de la raíz lateral para que no se facilite el ataque de patógenos (Swarup *et al.*, 2008; Péret *et al.*, 2013).

En contraste con las auxinas, las citoquininas inhiben el desarrollo de las raíces laterales mediante la alteración del adecuado patrón de formación *de novo* del primordio de la raíz lateral e, indirectamente, afectando el transporte polar de las auxinas (Laplaze *et al.*, 2007; Osmont *et al.*, 2007; Bielach *et al.*, 2012). Por

otra parte, ABA actúa como una antagonista de las auxinas durante la iniciación de las raíces laterales (Signora *et al.*, 2001; De Smet *et al.*, 2003; Fukaki y Tasaka, 2009; Bielah *et al.*, 2012). Además de un efecto directo en la inhibición del desarrollo de la raíz lateral, ABA juega un papel de mediador en el balance entre citoquininas y auxinas, de tal modo que también inhibe la formación de las raíces laterales de forma indirecta (Vandenbussche y Van Der Streten, 2007; Negi *et al.*, 2008, 2010; Lewis *et al.*, 2011; Muday *et al.*, 2012). Otras hormonas como las giberelinas, brasinosteroides y estrigolactonas actúan potencialmente durante la formación de la raíz lateral vía interferencia del transporte y sensibilidad de auxinas (Boa *et al.*, 2004; Koltai *et al.*, 2010; Kapulnik *et al.*, 2011).

Por otra parte, la formación de las raíces adventicias puede compartir similitudes con el desarrollo de las raíces laterales ya que ésta se origina de una capa de células reminiscentes a las células del periciclo encontradas en la raíz primaria (Falasca y Altamura 2003; Falasca *et al.*, 2004; Fattorini *et al.*, 2009). Este tipo de raíces se desarrollan de tejidos que no son radiculares, mayoritariamente partes aéreas de la planta, tales como hipocótilos, hojas y tallos. El primordio de las raíces adventicias en desarrollo emerge a partir de un callo indiferenciado o a partir de células reprogramadas. De ahí que el origen celular de las raíces adventicias no es completamente conocido aunque parece que, en la mayor parte de los casos, son células asociadas a tejidos vasculares o del cambium las que dan origen a una raíz adventicia (Haissig, 1974; Davis y Haissig, 1994; Naija *et al.*, 2008; Bellini *et al.*, 2014). Por otra parte, la formación de raíces adventicias es un proceso muy complejo que está influido por múltiples factores entre los que destacan la presencia de distintas fitohormonas, luz, heridas y estrés. Entre todos estos factores podemos destacar, de nuevo, el papel de las auxinas que son muy importantes en la formación de este tipo de raíces (De Klerk *et al.*, 1999; Po *et al.*, 2011) y el de las citoquininas que actúan como antagonistas de las auxinas (Kuroha y Satoh, 2007; Della Rovera *et al.*, 2013).

### 1.4.3.- Necrosis y muerte celular programada

La muerte celular programada es un proceso activo y genéticamente controlado que conlleva la eliminación selectiva de células dañadas o innecesarias en eucariotas. Este mecanismo es esencial para el desarrollo y crecimiento de organismos multicelulares así como para ofrecer una respuesta apropiada a agentes externos (Lam, 2004; Gechev *et al.*, 2006). La coordinación entre la muerte celular, la proliferación, el crecimiento y la diferenciación es de fundamental importancia para el mantenimiento de tejidos y la homeostasis de órganos (Van Breusegem y Dat, 2006). La muerte celular puede ocurrir de dos formas diferentes, mediante un proceso de necrosis o como muerte celular programada. La necrosis es consecuencia de un trauma persistente y no es considerado como un proceso coordinado genéticamente (Pasqualini *et al.*, 2003). En contraste, la muerte celular programada es controlada genéticamente y se caracteriza por inducir contracción de las células, condensación citoplasmática, condensación de la cromatina y fragmentación del ADN. La muerte celular programada en plantas está asociada a diferentes procesos del desarrollo en los que algunas células mueren para completar su función, por ejemplo, la degradación de la capa de aleurona durante la germinación de las semillas en monocotiledóneas, la diferenciación de elementos traqueales en tejidos del xilema, la degradación del tapétum en anteras, la abscisión floral o la senescencia de hojas (Thomas y Franklin-Tong, 2004; Gechev *et al.*, 2006). La muerte celular programada también es importante para algunos mecanismos, como la respuesta hipersensible (RH), que confieren inmunidad a las plantas que sufren el ataque de ciertos patógenos. La RH causa la formación de lesiones necróticas al activar la ruta de muerte celular programada con el objetivo de restringir el crecimiento del patógeno (Greenberg *et al.*, 1994; Lorrain *et al.*, 2003). Los mutantes *Imm* (*lesion mimic mutants*) tienen alterados estos mecanismos de respuesta a estrés abiótico y fenotípicamente parecen haber disparado la respuesta hipersensible inducida por patógenos aunque no estén siendo atacados por ningún microorganismo. Se han aislado mutantes de muerte celular espontánea en maíz (Hoisington *et al.*, 1982), arroz (Takahashi *et al.*, 1999;

Wang *et al.*, 2005), cebada (Wolter *et al.*, 1993), tomate (Barker *et al.*, 2006) y *Arabidopsis* (Greenberg y Ausuble, 1993; Dietrich *et al.*, 1994; Greenberg *et al.*, 1994; Lorrain *et al.*, 2004; Bouchez *et al.*, 2007). Los mutantes *Imm* muestran diferentes fenotipos con respecto al tiempo y condiciones en la cuales aparecen las lesiones. Los mutantes de iniciación forman puntos necróticos de tamaño determinado, mientras que los mutantes de propagación no son capaces de controlar la tasa o el grado de las lesiones (Lorrain *et al.*, 2003; Moeder y Yoshioka, 2008; Mosher *et al.*, 2010).

En el mutante *sns-D* (*Spontaneous Necrotic Spots*) de *Arabidopsis* se observa necrosis de las hojas en condiciones asépticas y es letal cuando la mutación está en homocigosis. Este mutante fue identificado en una colección de plantas transgénicas obtenidas con una construcción de activación transcripcional (Gaussand *et al.*, 2011). El mutante *ns1* de *Arabidopsis* (*Necrotic Spotted Lesions 1*) proviene de una colección obtenida utilizando elementos transponibles y exhibe un retraso en el crecimiento con el desarrollo de lesiones necróticas moteadas en las hojas. Estos fenotipos ocurren en ausencia de ataques por patógenos lo cual indica que el mutante puede estar expresando una respuesta de defensa de manera constitutiva. El modo de acción de NSL1 se asocia a una respuesta de defensa frente al ataque de patógenos y a una regulación negativa de muerte celular programada (Fedoroff y Smith, 1993; Noutoshi *et al.*, 2006). El mutante de tomate M205, también proveniente de una colección obtenida utilizando elementos transponibles, presenta una mutación que activa constitutivamente rutas de señalización relacionadas con la defensa frente a patógenos. Las plantas mutantes presentan un fenotipo de enanismo, marchitez y una clorosis progresiva en las hojas que conduce a necrosis (Baker *et al.*, 2006).

#### **1.4.4.- Respuesta morfogénica**

En los últimos años, la obtención de mutantes de *Arabidopsis* alterados en las diferentes etapas organogénicas han permitido la detección de genes relacionados con la regeneración adventicia en esta especie modelo (Zhang y Lemaux, 2004; Che *et al.*, 2006; Tamaki *et al.*, 2009; Duclercq *et al.*, 2011;

Perianez-Rodríguez *et al.*, 2014; Motte *et al.*, 2014; Pulianmackal *et al.*, 2014). Estos estudios sugieren que las fitohormonas y múltiples rutas de señalización convergen para regular la generación de ápices adventicios en las etapas tempranas de la organogénesis. Además, recientes estudios moleculares y celulares revelan que en los primeros eventos moleculares de la organogénesis adventicia la expresión de genes inducidos por fitohormonas cambia y los genes de respuesta a auxinas y citoquininas juegan un papel muy importante en las primeras etapas. Por ejemplo, la expresión de genes de auxinas (IAA) aumenta en un medio de cultivo para la inducción de callo desorganizado (CIM Callus-inducing medium), de igual forma, la expresión de genes de respuesta a citoquininas aumenta en un medio suplementado con esta fitohormona para promover la inducción de ápices (Che *et al.*, 2007, Ren *et al.*, 2009; Yadav *et al.*, 2010). De hecho, las rutas de señalización dependientes de auxinas y citoquininas conducen a la regulación de genes requeridos para la adquisición de competencia y/o inducción de ápices meristemáticos (Che *et al.*, 2002; Che *et al.*, 2006; Che *et al.*, 2007; Gordon *et al.*, 2007). Por ejemplo, se ha visto que el gen *AHK4* que codifica para un receptor de citoquininas está implicado en la división celular y la regulación del crecimiento de brotes y raíces (Nishimura *et al.*, 2004). Colectivamente, todos estos estudios sugieren que una cantidad considerable de genes que codifican componentes de señalización y/o de transcripción son altamente inducidos durante la regeneración de ápices, demostrando que puede haber un cambio de actividad sustancial de señalizaciones y genes reguladores en esta primera etapa.

Se han aislado los genes *ESR1* y *ESR2* (ENHANCER OF SHOOT REGENERATION), miembros de la familia AP2/ERF, también conocidos como DORNRÖSCHEN (*DRN*), los cuales confieren la formación de brotes adventicios independiente de citoquininas (Banno *et al.*, 2001; Ikeda *et al.*, 2006; Matsou *et al.*, 2011). *DRN* fue identificado como diana de *MONOPTEROS*, un gen de respuesta a auxinas (Chandler *et al.*, 2007). *ESR1* regula la inducción de ápices después de la adquisición de competencia organogénica (Banno *et al.*, 2001), mientras que *ESR2* juega un papel muy importante en la formación de ápices a través de la regulación de CUP-

SHAPED COTYLEDON 1 (*CUC1*) (Ikeda *et al.*, 2006). Se demostró recientemente que el dominio AP2/ERF de *ESR1* interactúa con el dominio MEKHLA de proteínas HD-ZIP III (Cole *et al.*, 2010) que están involucrados en la proliferación y diferenciación celular (Marsch-Martinez *et al.*, 2006; Passarinho *et al.*, 2008; Ilegems *et al.*, 2010; Iwase *et al.*, 2011).

El mutante *hoc* de *Arabidopsis* tiene una sobreproducción de citoquininas y muestra una alta capacidad de regenerar brotes adventicios e incluso plantas a partir de explantes de raíz cultivados en un medio sin fitohormonas (Duclercq *et al.*, 2011; Catterou *et al.*, 2002). La mutación responsable del fenotipo *hoc* está causada por la sustitución de una adenina por una timina en el dominio MEKHLA de *ATHB15*, un factor de transcripción de HD-ZIP III (Duclercq *et al.*, 2011). Los genes *ESR1* y *HD-ZIP III* afectan la distribución de auxinas (Ilegems *et al.*, 2010). Además, se ha visto que la sobreexpresión de cuatro genes de *Arabidopsis* *LBD* (LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN), que codifican factores de transcripción que actúan aguas abajo de AUXIN RESPONSE FACTOR (ARFs), activa la formación de callo desorganizado cuando se cultivan explantes en un medio de inducción de callo (CIM Callus-inducing medium), también se observó que la supresión de los genes *LDB* (*LDB16*, *LDB17*, *LDB18*, *LDB29*) inhiben la formación de callo desorganizado en este medio de cultivo (Fan *et al.*, 2012).

# Objetivos

En nuestro laboratorio se está abordando un programa de mutagénesis insercional en colaboración con los grupos del Dr. Lozano (Universidad de Almería) y la Dra. Bolarín (CEBAS-Murcia) con la finalidad de identificar genes que controlan caracteres del desarrollo de interés agronómico, al igual que la identificación de genes determinantes de la tolerancia a la salinidad en tomate y especies silvestres. Actualmente disponemos de una amplia colección de líneas T-DNA tanto en cultivares de tomate (alrededor de 4000 líneas) como en distintas accesiones de especies silvestres relacionadas como *Solanum pennellii*, *S. galapagense* y *S. pimpinellifolium* (unas 3000 líneas). El escrutinio de esta colección ha permitido la detección de diversos mutantes con alteraciones en el desarrollo vegetativo, desarrollo reproductivo y tolerancia a estreses abióticos.

El cultivo *in vitro* tienen unas características adecuadas para su uso como método de escrutinio para la detección de mutantes insercionales presentes en una colección de líneas T-DNA. En concreto, la evaluación se puede hacer en un corto periodo de tiempo y con poco espacio. El cultivo se lleva a cabo en condiciones ambientales uniformes lo cual facilita la detección de fenotipos con cambios sutiles. Además, permite la visualización continua de partes de la planta como la raíz. Por último, se pueden analizar caracteres imposibles de evaluar de otra forma como la capacidad de regeneración y, en particular, el desarrollo de brotes adventicios *in vitro*.

Con estos antecedentes se establecen los siguientes objetivos:

1. Escrutinio de una colección de 762 líneas T-DNA de tomate generada con una trampa de intensificadores para la detección de mutantes del desarrollo temprano y/o con alteraciones en la respuesta morfogénica.
2. Caracterización fenotípica de los mutantes de tomate identificados mediante el cultivo de diferentes explantes *in vitro*, así como de plantas *in vivo*, la cuantificación del contenido hormonal endógeno y el análisis de cortes histológicos.
3. Caracterización genética de los mutantes de tomate identificados mediante el análisis del modo de herencia del fenotipo mutante, el

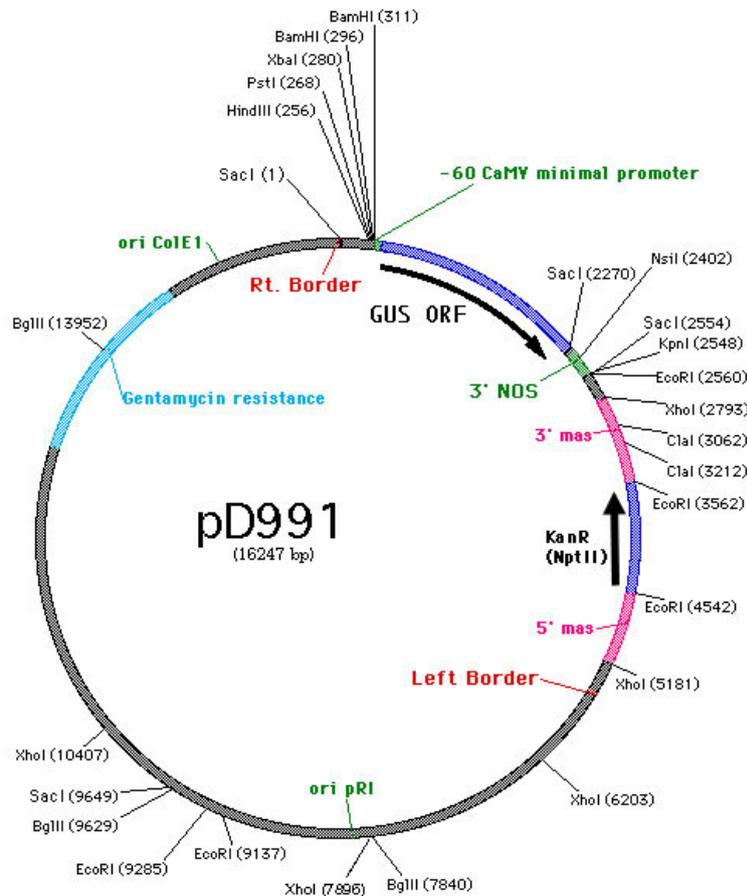
número de insertos T-DNA y la cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante.

4. Identificación y clonación de algunos de los genes alterados en los mutantes seleccionados.

# **Materiales y métodos**

### 3.1.- Material vegetal

Se han empleado líneas T-DNA generadas en nuestro grupo tras la transformación del cultivar Money Maker de tomate (*Solanum lycopersicum*) con una trampa de intensificadores (Atarés *et al.*, 2011), cedida amablemente por el Dr. Thomas Jack de la Universidad de Dartmouth (Figura 5).



**Figura 5.** Representación esquemática del plásmido pD991 que incluye la trampa de intensificadores.

Las líneas se nombran con número consecutivo seguidas del acrónimo ET MM por Enhancer Trapping Money Maker. Para la realización de este trabajo se utilizan semillas TG2 (obtenidas por la autofecundación de plantas transgénicas TG1 diploides). Se parte de 762 líneas T-DNA seleccionadas por tener suficiente cantidad de semilla y, en la mayor parte de los casos, que previamente no hubieran presentado ningún fenotipo mutante.

### **3.2.- Escrutinio de la colección de líneas T-DNA para la identificación de mutantes en fases tempranas del desarrollo**

Se analiza el fenotipo de las plantas TG2 para identificar líneas que presenten alguna mutación en distintos caracteres del desarrollo temprano. Para ello se esterilizan las semillas, germinan y se cultivan los explantes de cotiledón y de ápice meristemático en diferentes medios. Estos explantes se mantienen por un periodo de 25-30 días en una cámara de cultivo con fotoperiodo (16 horas luz – 8 horas de oscuridad), con una intensidad luminosa de  $70 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y una temperatura constante de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . A continuación se describen los pasos necesarios para llevar a cabo este escrutinio.

#### **3.2.1- Esterilización de semillas**

El cultivo *in vitro* en condiciones axénicas requiere de una esterilización superficial del material vegetal antes de su implantación. El método aplicado para la esterilización de las semillas consiste en sumergirlas en una solución de hipoclorito de sodio al 2% m/v (lejía comercial diluida a 50%). Para mejorar el contacto con la solución esterilizante se añaden unas gotas de un agente tensoactivo, 7X-0-matic (Flow Laboratories, Inc, Virginia, EEUU). Después de sumergir las semillas durante 30 minutos en esta solución, se realizan tres lavados consecutivos de 5, 10 y 15 minutos en agua destilada estéril para eliminar los restos del agente esterilizante.

#### **3.2.2.- Pre-germinación y obtención de plantas axénicas**

Las semillas esterilizadas se siembran en placas Petri a las que previamente se han introducido dos hojas de papel de filtro y 7 ml de agua estéril. Las placas se cultivan en una cámara de cultivo a  $25^\circ\text{C}$  y oscuridad hasta que las semillas germinan (la radícula emerge). Estas semillas se transfieren a medio de germinación (ver apartado 3.2.4) y se mantienen en la cámara de cultivo con fotoperiodo hasta que se consigue una plántula con los cotiledones expandidos.

### 3.2.3.- Cultivo de explantes de cotiledón y ápices meristemáticos

A los 7-10 días de cultivo en medio de germinación MG (ver apartado 3.2.4) las plántulas ya han alcanzado el tamaño adecuado y se procede al cultivo de los explantes de cotiledón y ápice meristemático. Se toma una plántula y se separan ambos cotiledones eliminando el extremo distal y con cuidado de no dañar los explantes. Los ápices meristemáticos se obtienen cortando el hipocotilo a 1,5 cm del meristemo. Los explantes de cotiledón se cultivan con el envés en contacto con el medio en placas Petri con medio organogénico IKZ (ver apartado 3.2.4). Por otra parte, los ápices meristemáticos se cultivan en botes de vidrio (105 mm de altura x 95 mm de diámetro) que contienen 50 mL de medio básico MB3 (ver apartado 3.2.4). La base de cada recipiente se divide en seis secciones numeradas para que se sepa de qué plántula proceden los explantes de cotiledón y ápice meristemático. Los recipientes se pasan a condiciones de cultivo en fotoperiodo por un periodo de 25-30 días.

### 3.2.4.- Medios de cultivo

**Solución mineral MS** (Murashige y Skoog, 1962)

Macronutrientes	(mg·L <sup>-1</sup> )
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
KNO <sub>3</sub>	1900
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170

Micronutrientes	(mg·L <sup>-1</sup> )
KI	0,83
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,20
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	22,3
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8,60
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,25
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,025
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,025

FeNa·EDTA	(mg·L <sup>-1</sup> )
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27,8
Na <sub>2</sub> ·EDTA	37,3

### Solución vitaminas SH

Componentes	(mg·L <sup>-1</sup> )
Rivoflavina	0.25
Ácido nicotínico	2.5
Tiamina clorhídica	10
Piridoxina clorhídica	1
Ácido fólico	0.5
Biotina	0.05
D-Pantotenato cálcico	0.5
Colina clorhídica	0.1
Glicina	0.5
L-Cisteína	1
Ácido málico	10
Ácido ascórbico	0.5

Solución preparada a 1000X y guardada a -20 °C

### Medio de germinación MG

Componentes	(g·L <sup>-1</sup> )
Solución mineral	MS
Sacarosa	10
Agar	8

### Medio organogénico IKZ 4.0 4.0 1.0

Componentes	(g·L <sup>-1</sup> )
Solución mineral	MS
Sacarosa	30
Myo-inositol	0.1
Vitaminas	SH
Ácido indolácetico	0.004
Kinetina	0.004
Zeaina	0.001
Agar	8

### Medio básico MB3

Componentes	(g·L <sup>-1</sup> )
Solución mineral	MS
Sacarosa	30
Myo-inositol	0.1
Tiamina clorhídica	1
Agar	8

El pH de los medios se ajusta a 5.7 con KOH y HCl antes de añadir el agar.  
Los medios se esterilizan en autoclave, a 115°C durante 30 minutos.

### **3.3.- Aclimatación y cultivo en invernadero**

Cuando es necesario el cultivo de alguna planta en el invernadero se utilizan explantes de yema axilar y ápice meristemático cultivados en medio básico. A los 15-20 días del cultivo en este medio las plantas se encuentran en el estado adecuado para realizar la aclimatación. Tras extraer la planta del bote de vidrio, se eliminan los restos de agar de la raíz, procurando no dañarla. A continuación, se trasplanta a una maceta que contiene fibra de coco estéril y se cubre con un vaso de plástico para evitar la deshidratación. A los 7-10 días, la planta se puede trasplantar con el cepellón a una maceta que contenga fibra de coco. El vaso de plástico transparente se mantiene durante los primeros 10-15 días de cultivo. Una vez transcurrido este periodo, se elimina el vaso, dándose por concluida la etapa de aclimatación.

Las plantas se cultivan en invernaderos con sistema de refrigeración por aire acondicionado e iluminación artificial. Se utiliza fibra de coco como sustrato y macetas de 25 cm de diámetro y 30 cm de altura con fertirrigación mediante sistemas de goteo. Las plantas se cultivaron entutoradas a una guía, eliminándose periódicamente las yemas laterales.

### **3.4.- Técnicas de microscopía**

En algunos mutantes se realizan diversos estudios histológicos. Se visualizan en un Microscopio óptico (Nikon Eclipse E600) con cámara digital refrigerada DS-Ri. La preparación de las muestras se realiza mediante las siguientes metodologías.

#### **3.4.1.- Fijación de las muestras e inclusión en parafina**

Pequeñas secciones de tejido vegetal se introducen en el fijador FAE y se somete a vacío durante 5 minutos.

## Fijador FAE

Componente	Concentración
<b>Etanol absoluto</b>	50%
<b>Formaldehido 37%</b>	10%
<b>Ácido acético glacial</b>	5%

Posteriormente se cambia el fijador utilizado por fijador fresco y se mantienen las muestras de 4 a 16 horas a 4°C. Transcurrido este tiempo se elimina el fijador y se van haciendo cambios cada media hora a soluciones de etanol con concentraciones crecientes (50%, 70%, 85%, 95% y 100%). Después se pasan las muestras por concentraciones crecientes de Histoclear en etanol absoluto (33%, 50%, 67% y 100%). Tras esto, se pasan las muestras por concentraciones crecientes de Parafina en Histoclear (33%, 50%, 67% y 100%) manteniendo una temperatura de 58°C. Una vez las muestras quedan incluidas en Parafina ya se pueden montar los bloques donde el tejido se puede cortar con un micrótopo para obtener las secciones de 8 µm de grosor y montarlas sobre los portaobjetos con Polysina.

### 3.4.2.- Eliminación de la parafina y tinción con azul de toulidina

Para eliminar la parafina y teñir los tejidos de los cortes se sumergen los portaobjetos en:

1. Histoclear 10'
2. EtOH 100% 10'
3. EtOH 90% 5'
4. EtOH 70% 5'
5. H<sub>2</sub>O 10'

Después de realizar estos pasos se sumergen los portaobjetos en una solución de azul de toulidina 0,02% durante 2 minutos, se lavan con agua para eliminar los restos de colorante, se dejan secar y se montan con un cubre.

### 3.5.- Cuantificación de hormonas vegetales endógenas

En alguno de los mutantes se realiza la cuantificación de diferentes hormonas endógenas. Para ello, se toman muestras de entre 100 y 200 mg de tejido

fresco de las plantas que se desea analizar (3 réplicas biológicas por cada genotipo). Estas muestras se tienen que moler utilizando nitrógeno líquido antes de realizar la cuantificación que se lleva a cabo en el Servicio de Cuantificación de Hormonas del IBMCP. El protocolo utilizado en este análisis incluye la extracción y purificación de las muestras con 2-3 columnas de extracción en fase sólida (SPE; de fase reversa e intercambio iónico), el uso de estándares internos deuterados (excepto para el caso de JA, que se utilizará dihidrojasmonico), y el análisis mediante UPLC-espectrometría de masas (UPLC acoplada a Q-Exactive, Orbitrap). Las hormonas cuantificadas son:

1. Giberelinas (GAs). Incluye dos GAs de las rutas de biosíntesis de GA1 y GA4.
2. Otras hormonas ácidas: incluye el ácido jasmónico (JA), el ácido salicílico (SA) y dos auxinas como el ácido indol-3-acético (IAA) y el ácido abscísico (ABA),
3. Citoquininas (CKs). Incluye: dihidrozeatina (DHZ), isopenteniladenina (iP) y trans-zeatina (tZ).

Se representa la diferencia relativa de cada hormona analizada del mutante respecto del cv. Money Maker ((M-WT)/WT) y si existe diferencia significativa mediante el test t entre la media de la concentración del WT y del mutante para cada hormona analizada.

### **3.6.- Injertos**

En algunas ocasiones puede ser interesante realizar injertos entre líneas mutantes y plantas WT. De esta forma se puede evaluar la influencia que tiene la parte aérea o la parte radicular sobre el fenotipo mutante observado. El injerto también puede ser útil si se comprueba que un mutante tiene afectado el desarrollo radicular y esto no le permite crecer hasta dar frutos. En cualquier caso, primero hay que cultivar las semillas en el invernadero. A los diez días de cultivo, cuando ya han comenzado a aparecer las primeras hojas verdaderas, se eliminan los cotiledones y las hojas ya emergidas dejando solamente el

ápice meristemático. Luego se realiza un corte oblicuo a la altura del hipocótilo y la parte aérea, que queda escindida, se coloca con ayuda de una pinza encima de la planta patrón, a la que también se le ha seccionado la parte aérea. Los injertos se representan como una fracción con el genotipo de la parte aérea en la parte superior y el genotipo de la raíz en la parte inferior.

### **3.7.- Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante**

Mediante el análisis del fenotipo de las plantas transformadas (TG1) y las segregaciones observados en sus descendencias (plantas TG2 obtenidas mediante autofecundación de las TG1 o plantas procedentes de retrocruces) podemos saber qué tipo de mutación se ha producido. El material vegetal empleado en este trabajo son plantas TG2, por tanto, si el modo de herencia de la mutación es dominante, la planta TG1 muestra un fenotipo mutante y en la descendencia TG2 obtenida por autofecundación se espera que  $\frac{3}{4}$  de los individuos sean mutantes (homocigotos y hemicigotos) y  $\frac{1}{4}$  WT (acigotos). Si el modo de herencia de la mutación es recesivo, la TG1 muestra el fenotipo WT y en la descendencia se espera que  $\frac{3}{4}$  tengan fenotipo WT (acigotos y hemicigotos) y  $\frac{1}{4}$  mutantes (homocigotos). Con este análisis además del modo de herencia, se puede comprobar la influencia de la mutación en la viabilidad de las plantas mutantes o en la viabilidad gamética si se completa el análisis con el estudio de los retrocruces correspondientes.

El ajuste de los datos observados a los datos esperados para cada una de las segregaciones posibles se realiza mediante el Test  $\chi^2$  aceptando la hipótesis de partida cuando la probabilidad de fallo es menor del 5%. En el caso de realizar varios experimentos donde se analiza la segregación fenotípica, se lleva a cabo el Test  $\chi^2$  de homogeneidad para asegurarnos de que se pueden unir todos esos datos y tratarlos como si estuvieran obtenidos en un único experimento.

### **3.8.- Análisis genético del número de insertos T-DNA**

Para saber si en una planta hay algún inserto T-DNA se puede analizar si esa planta es resistente a la kanamicina (detectaremos todas aquellas plantas que portan al menos un inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional) o analizarla molecularmente para ver si porta un inserto T-DNA (aunque éste no confiera resistencia a la kanamicina), un fragmento del T-DNA o un fragmento del cuerpo del vector (ver apartado 3.9.2).

En esta Tesis se utiliza el análisis de la resistencia a la kanamicina como método para estimar el número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional. Para saber si una planta es resistente o sensible a la kanamicina se puede cultivar yemas axilares en medio de enraizamiento, semillas en medio de germinación o explantes de cotiledón u hoja en medio organogénico, todos ellos con kanamicina ( $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Así, por ejemplo, en el caso de que haya un único inserto de T-DNA con el gen *nptII* funcional, la segregación observada en TG2 se ajustará a  $3 \text{ Kan}^{\text{R}} : 1 \text{ Kan}^{\text{S}}$ ; mientras que si hay dos insertos de T-DNA con el gen *nptII* funcional, la TG2 se ajustará a una segregación de  $15 \text{ Kan}^{\text{R}} : 1 \text{ Kan}^{\text{S}}$ .

El ajuste de los datos observados a los datos esperados para cada una de las segregaciones posibles se realiza mediante el Test  $\chi^2$  aceptando que el modelo es adecuado cuando la probabilidad de fallo es menor del 5%. En el caso de realizar varios experimentos donde se analiza la segregación de resistencia a la kanamicina se lleva a cabo el Test  $\chi^2$  de homogeneidad para asegurarnos de que se pueden unir todos esos datos y tratarlos como si estuvieran obtenidos en un único experimento.

### **3.9.- Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante**

La determinación de si existe cosegregación del inserto T-DNA (sea completo o parcial) y el fenotipo mutante es un aspecto clave en el estudio de estas líneas.

Cuando se comprueba que existe cosegregación el siguiente paso es la clonación del gen que causa el fenotipo mutante mediante técnicas como el Anchor-PCR. Esto es posible gracias a que en esos casos el gen alterado ha quedado etiquetado por el inserto T-DNA. Sin embargo, cuando no existe cosegregación hay que recurrir a otras técnicas de clonación más costosas en tiempo y esfuerzo.

### **3.9.1.- Análisis de cosegregación mediante técnicas de cultivo *in vitro***

Mediante estas técnicas se puede establecer la cosegregación entre la presencia de un inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional y el fenotipo mutante. Para ello hay que comparar en plantas de poblaciones segregantes (TG2 y TG3 habitualmente) las segregaciones respecto de su fenotipo y de su resistencia a la kanamicina. En estos experimentos se modeliza la segregación esperada para los casos de cosegregación y de ausencia de cosegregación. Por ejemplo, en un mutante recesivo, si se encuentra una plantas mutante (M) sensible a la kanamicina (Kan<sup>S</sup>) se puede establecer que no existe cosegregación de un inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional y el fenotipo mutante.

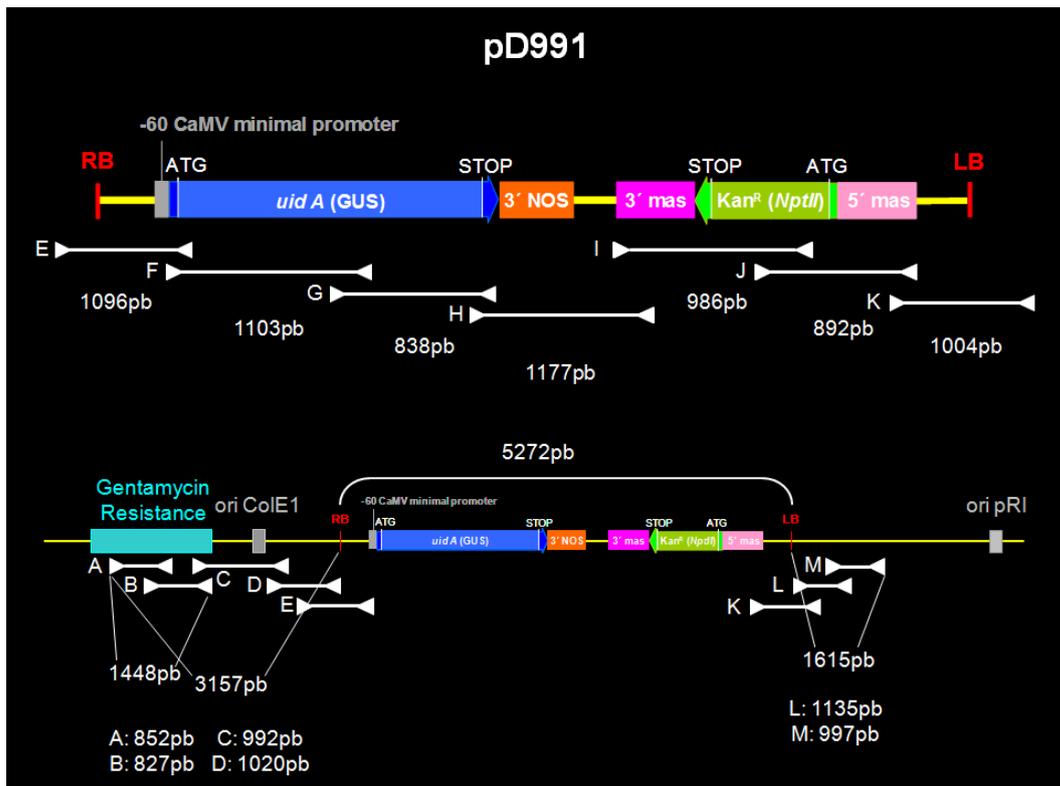
El ajuste de los datos observados a los datos esperados para cada una de las segregaciones posibles se realiza mediante el Test  $\chi^2$  aceptando que el modelo es adecuado cuando la probabilidad de fallo es menor del 5%. En el caso de realizar varios experimentos donde se analiza la segregación fenotípica y de resistencia a la kanamicina se lleva a cabo el Test  $\chi^2$  de homogeneidad para asegurarnos de que se pueden unir todos esos datos y tratarlos como si estuvieran obtenidos en un único experimento.

### **3.9.2.- Análisis de cosegregación mediante PCR de un fragmento del T-DNA o del cuerpo del vector y el fenotipo mutante**

Cuando se evalúa la resistencia a la kanamicina mediante cultivo *in vitro* (ver apartado 3.8) sólo podemos saber si se ha integrado algún inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional. En el caso de los mutantes que presentan alguna planta de fenotipo mutante sensible a la kanamicina (el fenotipo mutante no está

causado por la inserción de un T-DNA con el gen *nptII* funcional), se puede comprobar si la mutación está causada por la inserción de un fragmento parcial del T-DNA o del cuerpo del vector (el mutante sería sensible a la kanamicina pero el gen afectado podría estar etiquetado por un fragmento de ADN de secuencia conocida). Una posible alternativa para evaluar la presencia de estas secuencias es realizar varias reacciones de PCR diseñando diferentes parejas de cebadores para amplificar fragmentos del T-DNA o diferentes regiones del cuerpo del vector del plásmido pD991 (Figura 6).

Las condiciones de la PCR utilizadas son: desnaturalización inicial de 5 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 60°C y 1 min a 72°C, terminando con una extensión final de 5 min a 72°C. Las reacciones de PCR se analizan por electroforesis en gel de azarosa, teñidas con BrEt al 1% y se visualizan con luz U.V.



**Figura 6.** Representación esquemática de los cebadores empleados para rastrear la presencia de fragmentos de T-DNA (arriba) y/o del cuerpo del vector (abajo) en plantas mutantes.

### 3.10.- Identificación del gen etiquetado mediante Anchor-PCR

Para saber la secuencia del genoma en la que se ha insertado el T-DNA se utiliza la estrategia Anchor-PCR (Schupp *et al.*, 1999), con la que se puede determinar las secuencias flanqueantes a ambos extremos del T-DNA (Gidoni *et al.*, 2003). En esta estrategia se realizan digestiones del DNA con endonucleasas de restricción. A los fragmentos generados se ligan adaptadores sintéticos, de tal manera que podemos realizar una serie de PCRs "anidadas" o "solapantes" usando parejas de cebadores uno del T-DNA (Right Border) y otro del adaptador sintético con saltos de tamaño conocidos, lo que facilita la identificación de los fragmentos específicos en un gel de agarosa (Figura 7).



**Figura 7.** Representación esquemática de las PCRs solapantes utilizadas para la clonación del gen etiquetado mediante Anchor-PCR.

En primer lugar se digiere 500 ng del ADN genómico de cada planta a analizar durante 4h a 37°C con una serie de enzimas de restricción, a saber, *EcoRV*, *DraI*, *Scal*, *StuI*, *AluI*, *HincII*, *PvuII* y *SmaI*, en una reacción de 40 µL de volumen final. Se seleccionan estas enzimas porque generan fragmentos de extremos romos, los cuales se ligan al adaptador. El adaptador es una doble cadena parcial de ADN, descrita su preparación en Schupp y colaboradores (1999). El adaptador (5 pmol) se liga durante 3h a 37°C al ADN genómico previamente digerido con una unidad de T4 DNA ligasa (Promega). La digestión-ligación del ADN se utiliza como molde en la amplificación inicial. En esta PCR primaria se usa 1 µL de digestión-ligación, 1 unidad de *REDTaq*® DNA polimerasa (SIGMA-Aldrich) y 0,33 µM de los cebadores RB-1 (5´-ACAGTTTTTCGCGATCCAGAC-3´) y Ad-1 (5´-CTAATACGACTCACTATAGGC-

3') que anillan en el Right Border y en el Adaptador respectivamente. El programa utilizado en el termociclador (Eppendorf *Mastercycler ep gradient S*) comienza con una desnaturalización de 4 min a 94°C, seguido por 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 55°C y 2 min a 72°C y por último, una extensión final de 1 min a 72°C. El producto de PCR se diluye 50 veces y se re-amplifica en la PCR secundaria. Para esta segunda PCR se usan dos cebadores internos, a saber, RB-2 (5'-GGTCTTGCGAAGGATAGTGG) y Ad-2 (5'-CTATAGGGCTCGAGCGGC-3'). Las condiciones de PCR son las mismas que en la primaria, sólo cambia la temperatura de anillamiento a 58°C. Se mejoró el método Anchor-PCR descrito por Schupp y colaboradores (1999) añadiendo una PCR terciaria, con el objeto de incrementar la especificidad de los fragmentos amplificados. Para esta tercera PCR se diluye 100 veces el producto de amplificación de la PCR secundaria, el cual se utiliza como molde y se amplifica con los cebadores RB-3 (5'-CTGGCGTAATAGCGAAGAGG-3') y Ad-3 (5'-AGCGGCGGGGAGGT-3'). Las condiciones de PCR utilizadas son: desnaturalización inicial de 2 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de 15 s a 94°C, 15 s a 60°C y 2 min a 72°C, terminando con una extensión final de 1 min a 72°C.

Se analiza un décimo del volumen de la reacción por electroforesis en gel de azarosa y teñido con BrEt al 1%. El producto de las reacciones de PCR de interés se purifica mediante cromatografía de afinidad utilizando el kit GenElute™ PCR Kit (Sigma-Aldrich) y se reamplifica con el cebador Ad-3 y RB-3 en reacciones independientes de secuenciación utilizando los reactivos *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems). Las secuencias obtenidas se analizan y comparan con las secuencias depositadas en la base de datos SGN (Solanacea Genomics Networks - <http://www.sgn.cornell.edu/tools/blast/>), para conocer tanto la identidad de la región secuenciada, como la posición del T-DNA en el genoma de la planta.

### **3.10.1.- Análisis de cosegregación mediante PCR del gen identificado por Anchor-PCR y el fenotipo mutante**

Tras el clonaje por Anchor-PCR se conocen las secuencias flanqueantes al inserto T-DNA en el mutante en estudio. Por tanto, es posible comprobar en las progenies segregantes si el inserto (alelo mutante) se encuentra en homocigosis, heterocigosis, o acigosis en cada una de las plantas que constituye la población segregante en estudio. El diagnóstico genotípico se realiza mediante PCR, en concreto, mediante dos reacciones de amplificación. En una PCR se utilizan los cebadores específicos del alelo silvestre y en la otra PCR se usa uno de los cebadores del gen y otro cebador del T-DNA. Ambas PCR se usan para cada planta de la familia segregante, de modo que, las plantas que amplifiquen sólo el alelo silvestre serán catalogadas como acigóticas, en las que amplifiquen sólo el alelo mutante serán homocigóticas para el T-DNA y aquellas plantas donde amplifiquen ambas PCRs serán hemicingóticas. De esta manera se puede correlacionar la homocigosis, hemicingosis y acigosis para el alelo mutante con el fenotipo mutante y así confirmar si la mutación responsable del fenotipo detectado está etiquetada por el inserto o no.

### **3.11.- Evaluación de la expresión del gen delator**

En los genotipos en los que se establece que existe cosegregación del inserto T-DNA y el gen mutado se lleva a cabo el análisis histoquímico X-GLUC para detectar la expresión del gen delator *uidA*. Tras recoger las muestras, se les añade solución X-GLUC en cantidad suficiente para que las cubra. Estas muestras se dejan durante 24 horas incubando en oscuridad, a 37°C para que tenga lugar la reacción histoquímica.

## Solución X-GLUC

Componente	Concentración
<b>X-GLUC</b> (Disolver en DMSO 1%)	1.0 mM
<b>Tampón Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	100 mM
<b>Tampón NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	100 mM
<b>EDTA</b>	10 mM
<b>K-Ferricyanide (FeIII)</b>	0.5 mM
<b>K-Ferricyanide (FeII)</b>	0.5 mM
<b>Triton X-100</b>	0.1%
<b>Agua destilada</b>	Hasta volumen final

Tras la incubación, se elimina la solución X-GLUC y se realizan varios lavados con etanol 70% para eliminar la clorofila de los tejidos y poder detectar mejor la tinción azul que produce la expresión del gen *uidA*. Las fotografías de estas muestras se toman con la ayuda de una lupa (MZFLIII; Leica).

# Resultados

#### **4.1.- Escrutinio de la colección de líneas T-DNA para la identificación de mutantes en fases tempranas del desarrollo**

En nuestro grupo disponemos de una amplia colección de líneas T-DNA tanto en cultivares de tomate (alrededor de 4000 líneas) como en distintas accesiones de especies silvestres relacionadas (*Solanum pennellii*, *S. galapagense* y *S. pimpinellifolium*). A partir de las plantas transgénicas obtenidas (TG1), tras su aclimatación y cultivo en el invernadero, se obtienen mediante autofecundación las semillas TG2. Este material está siendo empleado para el estudio de diferentes caracteres de interés agronómico como características del fruto y tolerancia a diversos estreses abióticos en colaboración con los grupos del CEBAS dirigido por la doctora Bolarín y de la Universidad de Almería dirigido por el doctor Lozano.

En esta Tesis se han analizado 762 líneas TG2 obtenidas a partir de la transformación de una variedad de tomate de crecimiento indeterminado, Money Maker, con una trampa de intensificadores. En este material se ha llevado a cabo la identificación de mutantes afectados en procesos de morfogénesis y desarrollo temprano de las plantas. A la hora de llevar a cabo el escrutinio preliminar, se decidió evaluar 24 plantas TG2 de cada línea T-DNA para asegurarnos de que, incluso si la mutación es recesiva, vamos a estar en disposición de identificarla. Esto ha representado el manejo de más de 54.000 explantes, entre cotiledones y ápices meristemáticos, en esta parte inicial del trabajo.

Con esta estrategia se han identificado mutantes alterados en diferentes caracteres del desarrollo temprano así como mutantes alterados en la respuesta morfogénica *in vitro*. Para una mejor organización de este trabajo se han agrupado los mutantes por caracteres en función del fenotipo más aparente y que más destaca. Sin embargo, esta adscripción no indica que sólo esté alterado en ese carácter ya que se han observado efectos pleiotrópicos en varios casos.

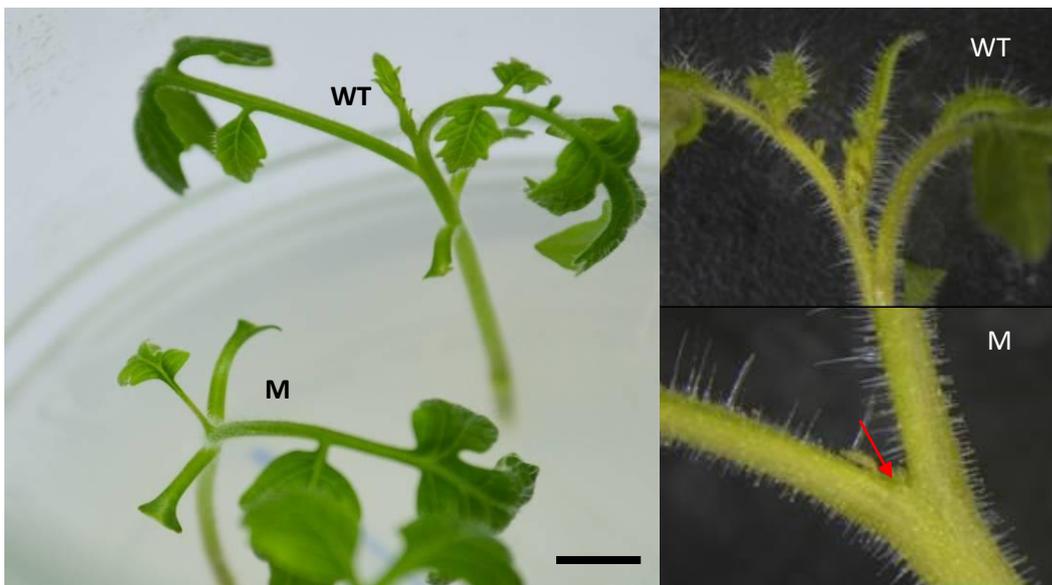
#### **4.1.1.- Identificación y caracterización de mutantes con alteraciones en la parte aérea**

El meristemo apical de una planta es donde se inicia la formación de los órganos aéreos, incluyendo hojas, tallo, meristemos axilares y flores. Un buen balance en el mantenimiento del crecimiento del meristemo apical y la formación de órganos es esencial para el desarrollo apropiado de las plantas. En el presente trabajo de Tesis se han identificado seis mutantes que se han clasificado en la categoría de “alteraciones en el desarrollo de la parte aérea”. Los cambios fenotípicos en estos mutantes afectan al mantenimiento del crecimiento del meristemo apical (1440 ET MM, 1405 ET MM), a la longitud de los entrenudos (2733 ET MM), y a la morfología o arquitectura de las hojas (1381 ET MM, 2635 ET MM). Además, se ha detectado una línea mutante (2489 ET MM) que presenta alteraciones pleiotrópicas en el crecimiento vegetativo, morfología foliar y desarrollo de las flores.

Dentro de los mutantes que se han identificado en cultivo *in vitro*, en cuatro de ellos (1440 ET MM, 2733 ET MM, 1381 ET MM, 2489 ET MM) se comprobó que el fenotipo se reproduce en condiciones de invernadero. Al mismo tiempo que se hizo la caracterización del fenotipo, se estudió el modo de herencia, el número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional y se analizó si existe cosegregación entre un inserto de T-DNA y el fenotipo mutante. Se determinó que tres de las seis líneas presentan una mutación insercional, es decir, la causante de la mutación es un inserto T-DNA. De hecho, en una de ellas ya se ha clonado el gen que causa la mutación y actualmente se está trabajando para clonar los genes de las otras dos líneas. A continuación se va a mostrar cuáles son los resultados obtenidos tras el estudio de estos mutantes con alteraciones en el desarrollo de la parte aérea.

#### 4.1.1.1.- Mutante 1440 ET MM

Esta línea se detectó al cultivar ápices meristemáticos de plántulas en medio básico. En ese momento se observaron algunas plantas axénicas con alteraciones en el crecimiento del meristemo apical (SAM). A los 10 días de cultivo en medio básico, las plantas mutantes desarrollaron dos o tres hojas verdaderas pero el meristemo detenía su crecimiento. Al observar las plantas mutantes de manera más detallada mediante una lupa, se vio la formación de un pequeño callo en la zona donde se detiene el crecimiento del meristemo apical. También se observó, en algunos casos, la emergencia de lo que parece una pequeña hoja (Figura 8).



**Figura 8.** Fenotipo de plantas axénicas procedentes de ápices meristemáticos de la línea 1440 ET MM tras 10 días de cultivo en medio básico. La flecha muestra la formación de un pequeño callo. La barra representa 1 cm.

A los 30 días de cultivo en medio básico, se observó que algunas de las plantas mutantes revertían su fenotipo y seguían creciendo. En ese caso se vio la elongación del ápice y el desarrollo de más hojas. Sin embargo, la altura de las plantas mutantes que reanudaron su crecimiento era menor en comparación con las plantas WT (Figura 9).



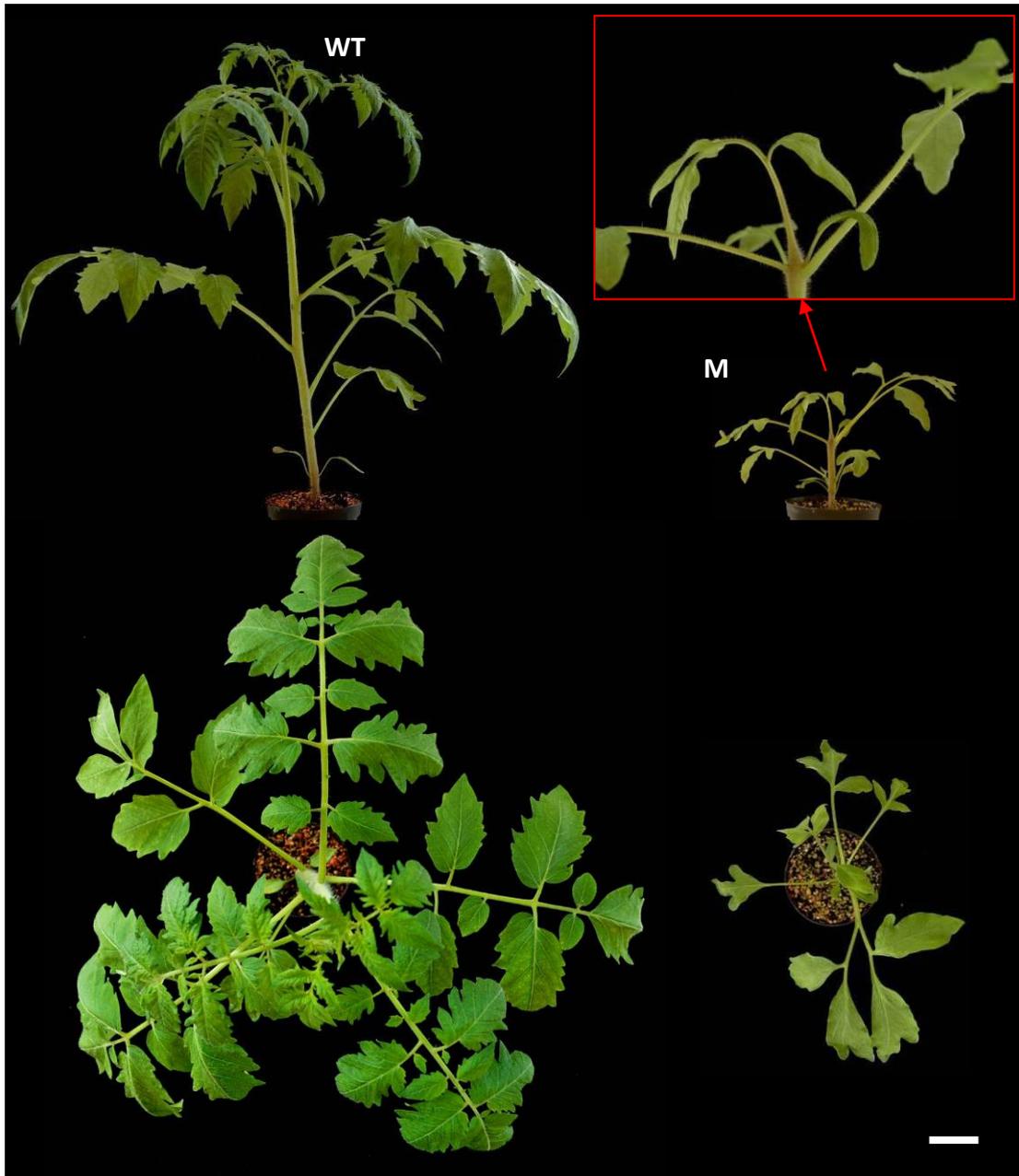
**Figura 9.** Fenotipo de plantas axénicas procedentes de ápices meristemáticos de la línea 1440 ET MM tras 30 días de cultivo en medio básico. La barra representa 1 cm.

Se sembraron más progenies TG2 en el invernadero para ver si la alteración que se observaba en condiciones de cultivo *in vitro* se reproducía en estas condiciones. Después de 15 días se comprobó que la alteración vista en cultivo *in vitro* se observaba también en plántulas procedentes de semillas cultivadas en invernadero (Figura 10).



**Figura 10.** Fenotipo de plántulas procedentes de semillas TG2 de la línea 1440 ET MM 15 días después de su siembra en el invernadero. La barra representa 1 cm.

Se observó cómo las plantas mutantes que estaban en el invernadero no podían continuar creciendo normalmente como ocurría con algunos mutantes cultivados *in vitro*. Las plantas mutantes tenían un menor tamaño y la morfología de las hojas estaba alterada. Las hojas tenían menos folíolos que las plantas WT y los bordes de éstos no eran aserrados (Figura 11).



**Figura 11.** Fenotipo de plántulas procedentes de semillas TG2 de la línea 1440 ET MM 35 días después de su siembra en el invernadero. La barra representa 5 cm.

### **Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante**

Para conocer el tipo de mutación que se había producido, se analizaron 168 individuos de la línea 1440 ET MM en condiciones de cultivo *in vitro* en tres experimentos. La mutación se observó en cada uno de ellos. El análisis de

homogeneidad indicó que las muestras eran homogéneas y el análisis de los datos acumulados ( $\chi^2$  datos acumulados) indicó que no había motivos para dudar de un modelo de herencia monogénica recesiva (Tabla 1).

**Tabla 1.** Análisis del modo de herencia del mutante 1440 ET MM.

	Segregación	WT	M	Total	$\chi^2$
<b>Experimento 1</b>	Observada	12	7	19	1.42
	Esperada (3:1)	14.3	4.7		
<b>Experimento 2</b>	Observada	33	9	42	0.28
	Esperada (3:1)	31.5	10.5		
<b>Experimento 3</b>	Observada	80	27	107	0.00
	Esperada (3:1)	80.3	26.7		
<b>Datos acumulados</b> <sup>a</sup>	Observada	125	43	168	0.03
	Esperada (3:1)	126.0	42.0		

<sup>a</sup> Análisis  $\chi^2$  homogeneidad ( $\chi^2_H = 1.68$ ) indica que la muestras son homogéneas ( $P > 0.05$ ;  $\chi^2_{2 \text{ g.l.}} = 5.99$ )

### Análisis genético del número de insertos T-DNA

En cuanto a la resistencia a la kanamicina, se comprobó que la línea 1440 ET MM no era portadora de un único inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional ( $\chi^2_{DA (3:1)} = 34.57 > 3.84_{1 \text{ g.l. (5\%)}$ ). Por lo tanto, se realizó el análisis para dos hipótesis (2 o 3 insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional (Tabla 2).

**Tabla 2.** Análisis del número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional de la línea 1440 ET MM.

	Segregación	Kan <sup>R</sup>	Kan <sup>S</sup>	Total	$\chi^2$
<b>Experimento 1</b>	Observada	19	0	19	1.26
	Esperada (15:1)	17.8	1.2		
	Esperada (63:1)	18.7	0.3		
<b>Experimento 2</b>	Observada	41	1	42	1.07
	Esperada (15:1)	39.4	2.6		
	Esperada (63:1)	41.3	0.7		
<b>Experimento 3</b>	Observada	99	8	107	0.27
	Esperada (15:1)	100.3	6.7		
	Esperada (63:1)	105.3	1.7		
<b>Datos acumulados</b> <sup>a</sup>	Observada	159	9	168	0.23
	Esperada (15:1)	157.5	10.5		
	Esperada (63:1)	165.4	2.6		

<sup>a</sup> Análisis  $\chi^2$  homogeneidad indica que la muestras son homogéneas para una segregación 15:1 (2.39) pero no para una segregación 63:1 (9.09) ( $P > 0.05$ ;  $\chi^2_{2 \text{ g.l.}} = 5.99$ ).

El análisis de los datos acumulados sugirió que, con una probabilidad de fallo menor del 5%, la línea 1440 ET MM era portadora de dos insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional ( $\chi^2 DA_{(15:1)} = 0.23 < 3.84$  1 g. l. (5%).

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

Para establecer si existía cosegregación de uno de los dos insertos T-DNA y el fenotipo mutante se decidió evaluar las progenies TG3 procedentes de plantas TG2 WT Kan<sup>S</sup>. Si en un número suficiente de estas progenies no se observara el fenotipo mutante quiere decir que existe cosegregación entre uno de los insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional y el fenotipo mutante. Al calcular el número de familias TG3 necesarias para poder asegurar esto con una probabilidad de fallo menor del 5% el resultado es que, al menos, hay que evaluar tres familias TG3 procedentes de TG2 WT Kan<sup>S</sup>. Para disminuir la probabilidad de fallo, se evaluó el fenotipo de las progenies TG3 procedentes de 4 plantas TG2 WT Kan<sup>S</sup> cultivadas y en ninguna de ellas se observó el fenotipo mutante. Este resultado nos permitió afirmar, con una probabilidad de fallo menor del 3.4%, que uno de los insertos T-DNA presentes es la línea 1440 ET MM es el causante del fenotipo mutante.

También, se cultivaron 15 plantas TG2 WT Kan<sup>R</sup> para conseguir separar los dos insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional y ver cuál de ellos era el responsable de la mutación. Tras el análisis de las progenies TG3 de las 15 plantas cultivadas, se detectó una, la línea 1440-17 ET MM, que segregaba para la mutación ( $\chi^2 DA_{(3:1)} = 0.02 < 3.84$  1 g. l. (5%), Tabla 3) y portaba un inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional ( $\chi^2 DA_{(3:1)} = 0.18 < 3.84$  1 g. l. (5%), Tabla 4).

**Tabla 3.** Análisis del modo de herencia del mutante 1440-17 ET MM.

	<b>Segregación</b>	<b>WT</b>	<b>M</b>	<b>Total</b>	$\chi^2$
<b>Experimento 1</b>	Observada	8	4	12	0.44
	Esperada (3:1)	9.0	3.0		
<b>Experimento 2</b>	Observada	42	12	54	0.22
	Esperada (3:1)	40.5	13.5		
<b>Datos acumulados</b> <sup>a</sup>	Observada	50	16	66	0.02
	Esperada (3:1)	49.5	16.5		

<sup>a</sup> Análisis  $\chi^2$  homogeneidad ( $\chi^2_H = 0.65$ ) indica que la muestras son homogéneas ( $P > 0.05$ ;  $\chi^2_{2 \text{ g. l.}} = 5.99$ )

**Tabla 4.** Análisis del número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional de la línea 1440-17 ET MM.

	Segregación	Kan <sup>R</sup>	Kan <sup>S</sup>	Total	$\chi^2$
<b>Experimento 1</b>	Observada	8	4	12	0.44
	Esperada (3:1)	9.0	3.0		
<b>Experimento 2</b>	Observada	40	14	54	0.02
	Esperada (3:1)	40.5	13.5		
<b>Datos acumulados</b> <sup>a</sup>	Observada	48	18	66	0.18
	Esperada (3:1)	49.5	16.5		

<sup>a</sup> Análisis  $\chi^2$  homogeneidad ( $\chi^2_H = 0.29$ ) indica que la muestras son homogéneas ( $P > 0.05$ ;  $\chi^2_{2 \text{ g.l.}} = 5.99$ )

Para corroborar que este inserto que confiere resistencia al antibiótico era el causante de la mutación no deben haber plantas mutantes dentro de la población de plantas sensibles a la kanamicina (18) y, además, se debe observar una distribución 1 WT Kan<sup>S</sup> : 2 WT Kan<sup>R</sup> : 1 M Kan<sup>R</sup> (1:2:1).

**Tabla 5.** Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 1440-17 ET MM.

	Segregación	WT Kan <sup>S</sup>	WT Kan <sup>R</sup>	M Kan <sup>R</sup>	M Kan <sup>S</sup>	Total	$\chi^2$
<b>Experimento 1</b>	Observada	4	4	4	0	12	1.33
	Esperada (1:2:1)	3.0	6.0	3.0	0		
<b>Experimento 2</b>	Observada	14	28	12	0	54	0.22
	Esperada (1:2:1)	13.5	27.0	13.5	0		
<b>Datos acumulados</b> <sup>a</sup>	Observada	18	32	16	0	66	0.18
	Esperada (1:2:1)	16.5	33.0	16.5	0		

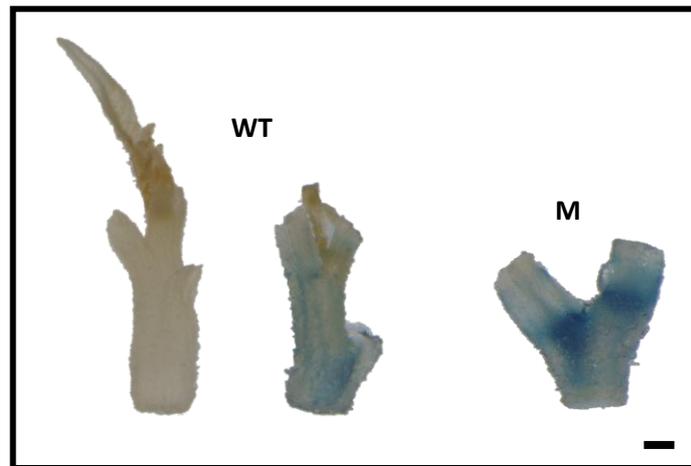
<sup>a</sup> Análisis  $\chi^2$  homogeneidad ( $\chi^2_H = 1.64$ ) indica que la muestras son homogéneas ( $P > 0.05$ ;  $\chi^2_{4 \text{ g.l.}} = 9.48$ )

Tras realizar la prueba de la  $\chi^2$  de datos acumulados se pudo comprobar que la distribución obtenida se ajusta a la hipótesis anterior ( $\chi^2_{DA (1:2:1)} = 0.18 < 5.99_{2 \text{ g. l.}} (5\%)$ ). Por tanto, se pudo concluir, con una probabilidad de fallo menor del 3.6%, que no había motivos para dudar de que el inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional presente en la línea TG2 1440-17 WT Kan<sup>R</sup> era el causante del fenotipo mutante observado (Tabla 5).

## Evaluación de la expresión del gen delator

En el momento actual se están llevando a cabo los trabajos de clonación de las regiones flanqueantes al T-DNA de la familia 1440-17 ET MM para averiguar el gen que ha sido etiquetado. Al ver que existe cosegregación se ha realizado el análisis de expresión del gen delator en explantes de tallo que incluían al meristemo apical. Al haber obtenido esta línea con una trampa de intensificadores cabe la posibilidad de que el patrón de expresión del gen delator esté mimetizando el del gen etiquetado.

Se observó que los explantes procedentes de plantas mutantes presentan una expresión clara del gen delator en las zonas cercanas a donde se localiza el meristemo apical. En cambio, entre los explantes procedentes de plantas WT, hay algunos sin y otros con expresión del gen delator correspondientes a las plantas acigotas y hemicigotas para el inserto respectivamente (Figura 12).



**Figura 12.** Expresión del gen delator *uidA* en la zona apical de plantas axénicas de la línea 1440 ET MM. La barra representa 1 mm.

La colocación de la expresión del gen delator y del origen del fenotipo más relevante de esta línea apoya la hipótesis de que existe cosegregación entre el inserto T-DNA y el fenotipo mutante. Además, un estudio más en profundidad de esta expresión nos puede ayudar a entender la función del gen etiquetado.

#### 4.1.1.2.- 1405 ET MM

Esta línea se detectó al ver que tras el cultivo de ápices meristemáticos en medio básico algunas plantas axénicas detenían el crecimiento de la parte aérea. Las plantas con fenotipo mutante desarrollaban entre una y dos hojas y posteriormente la actividad del meristemo apical se detenía (Figura 13).



**Figura 13.** Fenotipo de plantas axénicas procedentes de ápices meristemáticos de la línea 1405 ET MM tras 20 días de cultivo en medio básico. La barra representa 1 cm.

También se observó que algunas de las plantas mutantes que presentaban la alteración en el crecimiento de la zona apical, tras un tiempo sin ningún cambio, continuaban con el crecimiento de la parte aérea a través de la formación de un meristemo que asumía el papel de meristemo apical y que, a partir de ese momento mantenía un desarrollo igual que el de las plantas WT (Figura 14).



**Figura 14.** Fenotipo de plantas axénicas procedentes de ápices meristemáticos mutantes de la línea 1405 ET MM tras 30 días de cultivo en medio básico. La barra representa 1 cm.

Al ver que estaba afectado el desarrollo de los meristemas, en esta línea se ha evaluado también la morfogénesis adventicia. La respuesta organogénica de los explantes de cotiledón es más lenta en las plantas mutantes. En los cotiledones provenientes de estas plantas, se observó la generación de un callo desorganizado y el crecimiento de pequeñas hojas, mientras que en explantes de cotiledón de plantas WT, en el mismo momento, se vio la formación de yemas y ápices que se encontraban más desarrollados (Figura 15).



**Figura 15.** Fenotipo de explantes de cotiledón de la línea 1405 ET MM tras 25 días de cultivo en medio organogénico. La barra representa 1 mm.

## Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante

Se observó la mutación en los dos experimentos realizados. Tras comprobar que los experimentos eran muestras homogéneas, el resultado del análisis de los datos acumulados ( $\chi^2$  datos acumulados) nos indicó que no había motivos para dudar de que el fenotipo alterado fuera producido por una mutación monogénica recesiva (Tabla 6).

**Tabla 6.** Análisis del modo de herencia del mutante 1405 ET MM.

	Segregación	WT	M	Total	$\chi^2$
<b>Experimento 1</b>	Observada	9	2	11	0.27
	Esperada (3:1)	8.3	2.7		
<b>Experimento 2</b>	Observada	22	9	31	0.27
	Esperada (3:1)	23.3	7.7		
<b>Datos acumulados</b> <sup>a</sup>	Observada	31	11	42	0.03
	Esperada (3:1)	31.5	10.5		

<sup>a</sup> Análisis  $\chi^2$  homogeneidad ( $\chi^2_H = 0.51$ ) indica que la muestras son homogéneas ( $P > 0.05$ ;  $\chi^2_{1 \text{ g.l.}} = 3.84$ )

## Análisis genético del número de insertos T-DNA

Tras analizar 42 plantas TG2 en dos experimentos, los resultados indicaron que no había motivos para dudar de que la línea 1405 ET MM portaba un único inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional (Tabla 7).

**Tabla 7.** Análisis del número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional de la línea 1405 ET MM.

	Segregación	Kan <sup>R</sup>	Kan <sup>S</sup>	Total	$\chi^2_{(3:1)}$
<b>Experimento 1</b>	Observada	8	3	11	0.03
	Esperada (3:1)	8.3	2.7		
<b>Experimento 2</b>	Observada	25	6	31	0.53
	Esperada (3:1)	23.3	7.3		
<b>Datos acumulados</b> <sup>a</sup>	Observada	33	9	42	0.29
	Esperada (3:1)	31.5	10.5		

<sup>a</sup> Análisis  $\chi^2$  homogeneidad ( $\chi^2_H = 0.27$ ) indica que la muestras son homogéneas ( $P > 0.05$ ;  $\chi^2_{1 \text{ g.l.}} = 3.84$ )

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

Tras el análisis se comprobó que no existía cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante en la línea 1405 ET MM, ya que se observaron dos plantas mutantes sensibles a la kanamicina en el segundo experimento realizado (Tabla 8).

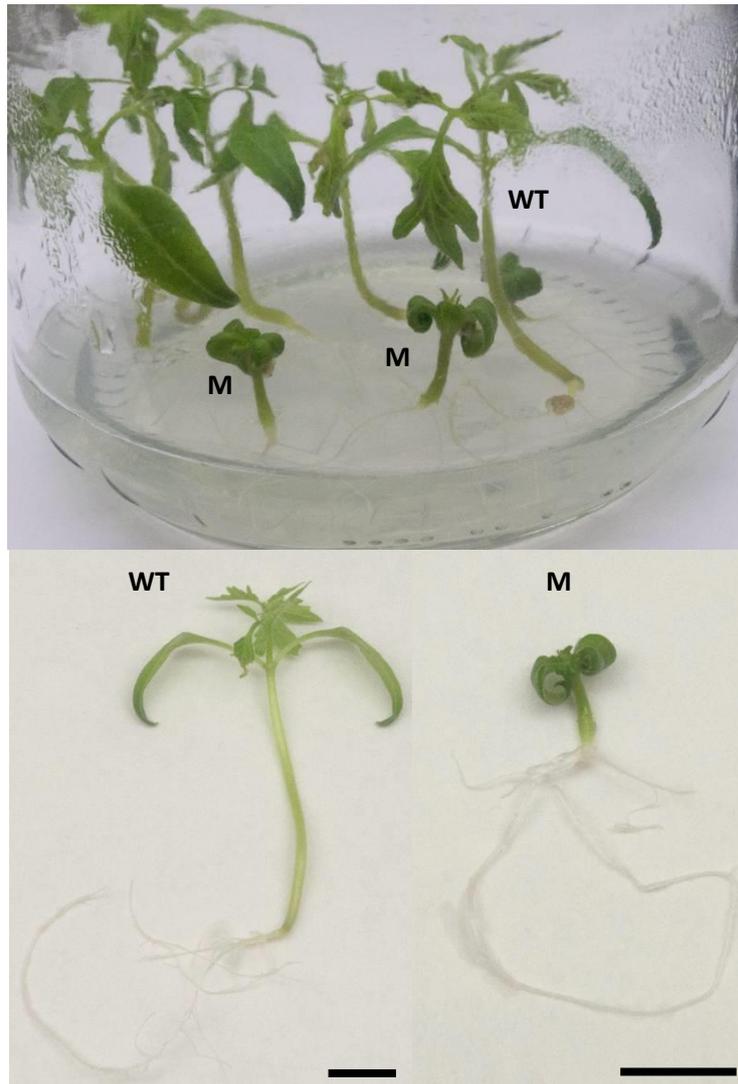
**Tabla 8.** Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 1405 ET MM.

	WT		M		Total
	Kan <sup>R</sup>	Kan <sup>S</sup>	Kan <sup>R</sup>	Kan <sup>S</sup>	
Experimento 1	6	3	2	0	11
Experimento 2	18	4	7	2	31
Datos acumulados	24	7	9	2	42

Se están llevando a cabo los cruces de las plantas mutantes sensibles a la kanamicina con plantas de *S. pimpinellifolium* con el fin de poder llegar a clonar el gen responsable del fenotipo mutante.

#### 4.1.1.3.- 2489 ET MM

Esta línea mutante se detectó tras el cultivo de semillas TG2 en medio de germinación. En esas condiciones se vio que algunas plántulas presentaban un crecimiento menor de la parte aérea y los cotiledones se enrollaban y no se expandían como los cotiledones en plántulas WT. También se vio que el sistema radicular embrionario de las plantas mutantes no presentaba alteraciones graves (Figura 16).



**Figura 16.** Fenotipo de plántulas procedentes de semillas de la línea 2489 ET MM tras 15 días de cultivo en medio de germinación. La barra representa 1 cm.

Treinta días después de realizar el subcultivo de los ápices meristemáticos de plántulas que presentaban el fenotipo mutante a medio de enraizamiento, se

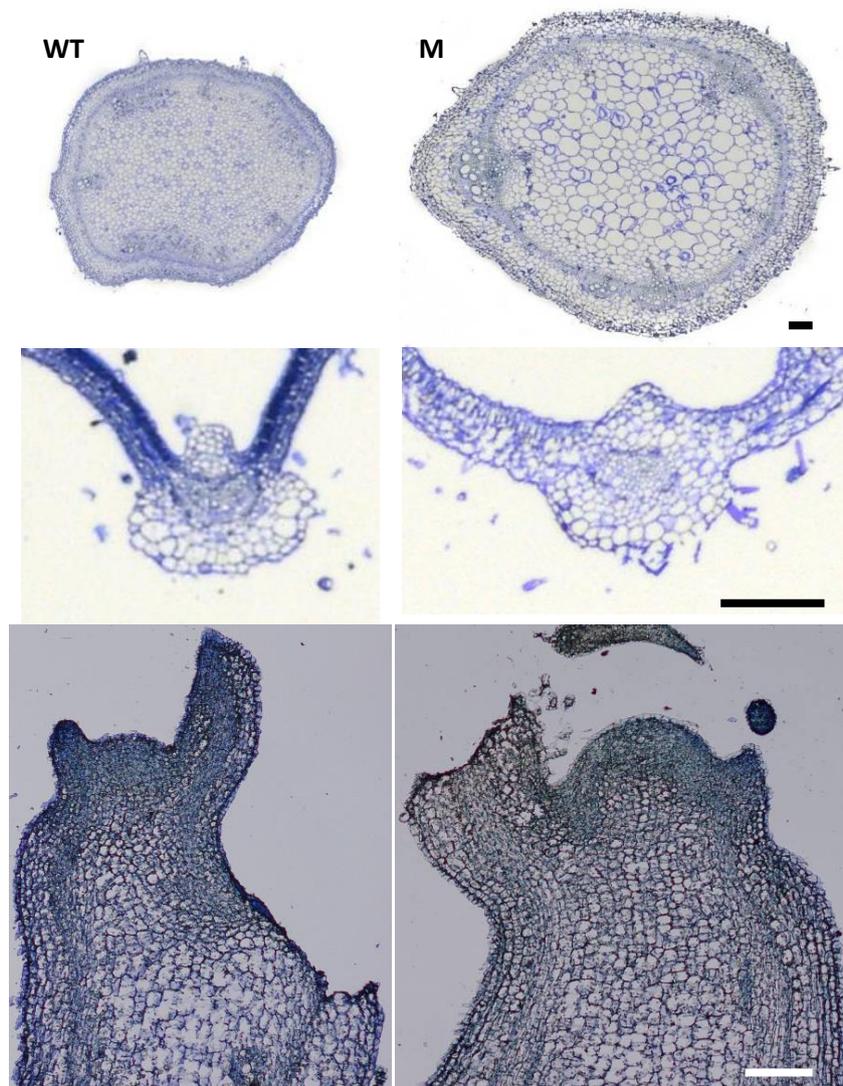
observó que las plantas axénicas mutantes crecían pero de manera más lenta que las plantas WT. Se observó la emergencia de hojas, las cuales eran arrugadas y enrolladas. Además, las plantas axénicas mutantes no presentaban alteraciones en el sistema radicular adventicio, fueron capaces desarrollar raíces adventicias primarias de las cuales emergían las laterales del mismo modo que en plantas axénicas de fenotipo WT (Figura 17).



**Figura 17.** Fenotipo de plantas axénicas procedentes de ápices meristemáticos de la línea 2489 ET MM tras 30 días de cultivo en medio de enraizamiento. La barra representa 1 cm.

Al ver las anomalías antes descritas, se procedió a analizar histológicamente algunos órganos de las plantas mutantes. El tallo de las plantas axénicas mutantes tenía un grosor mayor que el de las plantas WT. En una primera aproximación se observó que las células que formaban algunos de los tejidos del tallo eran más grandes que las mismas células en las plantas WT (e. g.: células epidérmicas). Se observó una distribución más irregular de los haces vasculares en el tallo de plantas mutantes. También se realizaron cortes histológicos de las hojas, en concreto el limbo de sus folíolos. De nuevo se vio que las células que forman los tejidos de los folíolos de las plantas mutantes

eran más grandes que las células en los folíolos de plantas WT. Además, el nervio principal de plantas WT y mutantes no presentaba diferencias considerables en cuanto a su tamaño total aunque sí respecto del tamaño de sus células. En cuanto a la zona meristemática de los mutantes, se observó con un corte longitudinal que el domo que forman las células del ápice de plantas mutantes era de mayor tamaño que el de las plantas WT. También, se vio que las células que forman la capa más externa son más grandes que las que se encuentran en los ápices meristemáticos de plantas WT (Figura 18).



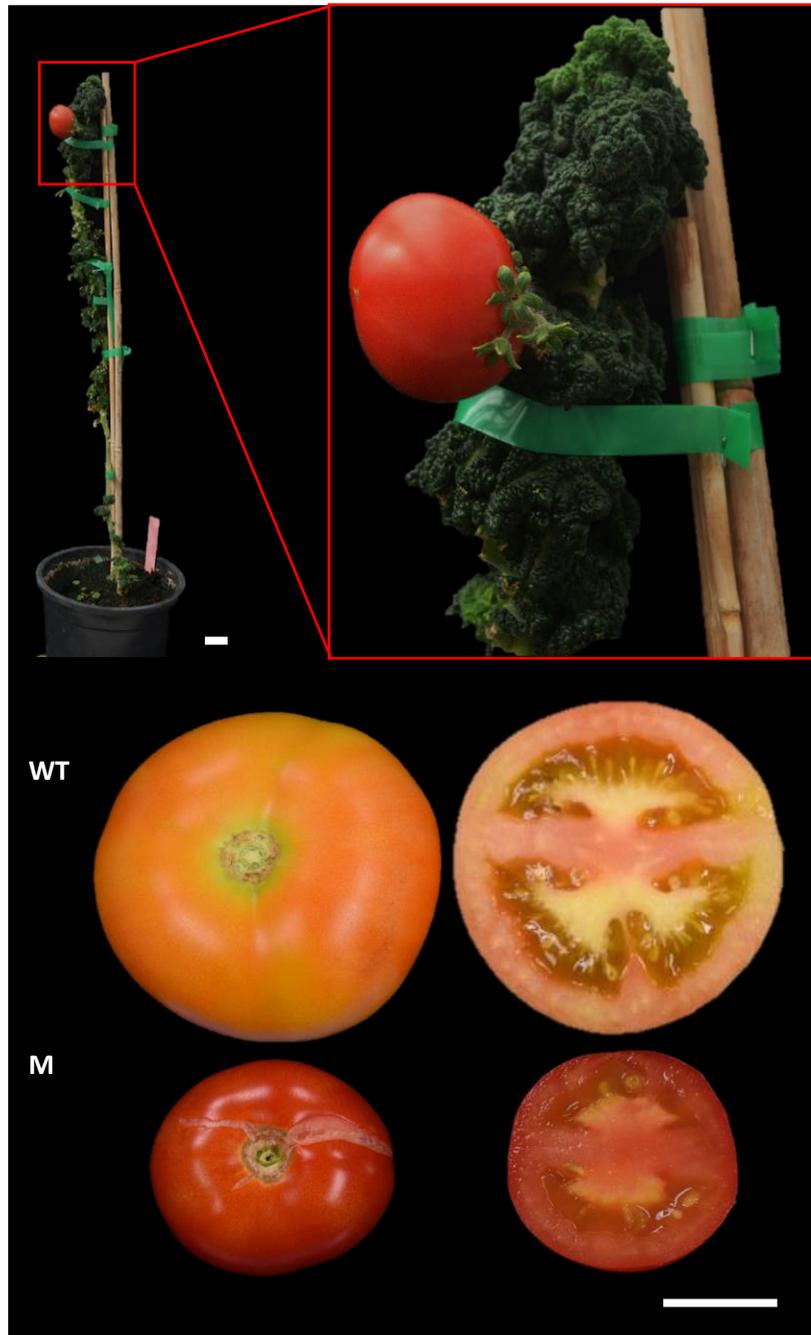
**Figura 18.** Cortes histológicos de la línea 2489 ET MM. Corte transversal del tallo (fotos superiores), corte transversal de la parte central de un foliolo de hoja (fotos medias) y corte longitudinal de un meristemo apical (fotos inferiores). La barra representa 100  $\mu\text{m}$ .

Tras la aclimatación y después de cuatro meses de cultivo en invernadero una de las plantas mutantes formó una inflorescencia con flores pequeñas que no dio ningún fruto. A los nueve meses de cultivo, la plantas continuaron con su crecimiento y se observó la aparición de inflorescencias con varias flores. Los cuatro verticilos de las flores de plantas mutantes no presentaron grandes alteraciones morfológicas, pero el tamaño fue menor en comparación con las flores WT (Figura 19).



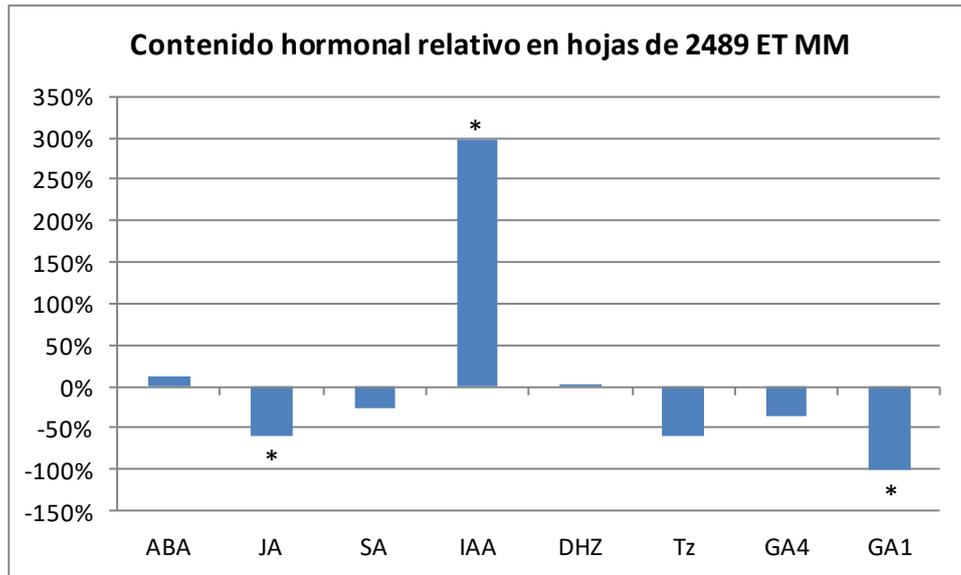
**Figura 19.** Fenotipo de plantas cultivadas en el invernadero durante 120 días (foto superior) y 270 días (foto media) y de sus órganos reproductivos (foto inferior) de la línea 2489 ET MM. La barra representa 1 cm.

En una de las plantas mutantes se observó la formación de un fruto tras 10 meses de cultivo en el invernadero. Este fruto fue de menor tamaño que los frutos de plantas con fenotipo WT pero tuvo varias semillas (Figura 20).



**Figura 20.** Fenotipo de una planta cultivada en el invernadero durante 300 días (foto superior) y de un fruto maduro de la línea 2489 ET MM. La barra representa 5 cm (foto superior) y 1 cm (foto inferior).

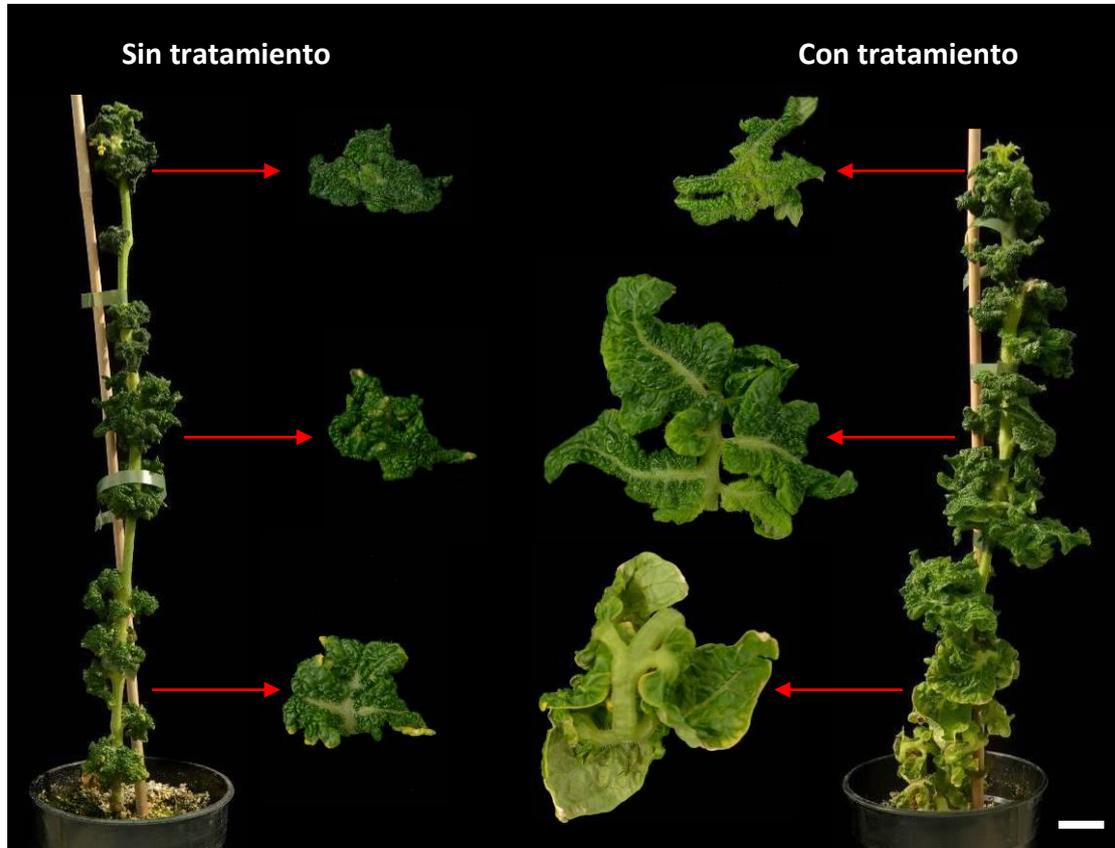
En este mutante se ha analizado el contenido hormonal endógeno. En este caso, la mayor parte de las hormonas presentaban valores relativamente similares a los de las plantas WT, sin embargo, el mutante tenía un mayor contenido de ácido indolacético, más del triple del contenido de las plantas WT y un menor contenido de JA y GA1 (Figura 21).



**Figura 21.** Contenido hormonal endógeno en las hojas de plantas mutantes de la línea 2489 ET MM. Se representa la diferencia relativa de cada hormona analizada del mutante respecto del cv. Money Maker ((M-WT)/WT). El asterisco representa que existe diferencia significativa (test t:  $P < 0,05$ ) entre la media de la concentración del WT y del mutante.

Al comprobar que el fenotipo de estas plantas se asemejaba al de otros mutantes afectados en la producción y/o percepción de los brasinosteroides, se aclimataron más plantas mutantes en el invernadero y se procedió a aplicar un tratamiento de este tipo de sustancia de manera exógena mediante la pulverización de 24-epibrassinolide 1.0  $\mu\text{M}$  cada 48 horas. Se vio que la aplicación de brasinosteroides no afectaba al crecimiento vegetativo general de las plantas. Sin embargo, se observó que las plantas mutantes a las cuales se les aplicó la hormona sí que responden al tratamiento, ya que las hojas de estas plantas se empezaban a expandir y a manifestar una cierta reversión parcial al fenotipo WT. Se observó que las hojas basales, presentaban una reversión mayor que las hojas intermedias o más cercanas a la zona apical,

probablemente debido a que al ser hojas más viejas, habían recibido más tratamientos que las hojas más jóvenes (Figura 22).



**Figura 22.** Fenotipo de plantas cultivadas en el invernadero durante 150 días de la línea 2489 ET MM. A la planta de la derecha se le ha aplicado un tratamiento con brasinosteroides. La barra representa 5 cm.

### **Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante**

La mutación se observó en los dos experimentos realizados. El análisis de homogeneidad indicó que las muestras eran homogéneas y el resultado del análisis de los datos acumulados ( $\chi^2$  datos acumulados) nos indicó que no había motivos para dudar de que el fenotipo alterado esté causado por una mutación monogénica recesiva. (Tabla 9).

**Tabla 9.** Análisis del modo de herencia del mutante 2489 ET MM.

	Segregación	WT	M	Total	$\chi^2$
Experimento 1	Observada	14	4	18	0.07
	Esperada (3:1)	13.5	4.5		
Experimento 2	Observada	31	8	39	0.41
	Esperada (3:1)	29.3	9.7		
Datos acumulados <sup>a</sup>	Observada	45	12	57	0.47
	Esperada (3:1)	42.7	14.3		

<sup>a</sup> Análisis  $\chi^2$  homogeneidad ( $\chi^2_H = 0.02$ ) indica que la muestras son homogéneas ( $P > 0.05$ ;  $\chi^2_{1 \text{ g.l.}} = 3.84$ )

### Análisis genético del número de insertos T-DNA

Tras analizar 57 plantas TG2 en dos experimentos y comprobar que las muestras son homogéneas mediante la prueba de la  $\chi^2$  de homogeneidad, los datos acumulados, (55 plantas Kan<sup>R</sup> y sólo 2 plantas Kan<sup>S</sup>), indicaron que había motivos para dudar de la hipótesis de un inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional ( $\chi^2_{DA (3:1)} = 14.04 > 3.84_{1 \text{ g.l. (5\%)}}$ ). Por lo tanto, se procedió a ajustar la segregación observada a una hipótesis para dos insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional. Los resultados nos indicaron que no había motivos para dudar de que la línea 2489 ET MM portaba dos insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional (Tabla 10).

**Tabla 10.** Análisis del número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional de la línea 2489 ET MM.

	Segregación	Kan <sup>R</sup>	Kan <sup>S</sup>	Total	$\chi^2$
Experimento 1	Observada	16	2	18	0.73
	Esperada (15:1)	16.8	1.2		
Experimento 2	Observada	39	0	39	2.60
	Esperada (15:1)	36.6	2.4		
Datos acumulados <sup>a</sup>	Observada	55	2	57	0.73
	Esperada (15:1)	53.4	3.6		

<sup>a</sup> Análisis  $\chi^2$  homogeneidad ( $\chi^2_H = 2.59$ ) indica que la muestras son homogéneas ( $P > 0.05$ ;  $\chi^2_{1 \text{ g.l.}} = 3.84$ )

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

Para determinar si existía cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante se analizaron las progenies TG4 de seis plantas TG3 de fenotipo WT. Cabe señalar que dentro de esta población TG3 se ha observado previamente

la segregación de 3 planta Kan<sup>R</sup> y 1 planta Kan<sup>S</sup> y también se observó la segregación de la mutación (Tabla 11).

**Tabla 11.** Fenotipo y resistencia a la kanamicina de progenies TG4 procedentes de seis plantas TG3 de fenotipo WT de la línea 2489 ET MM.

	WT		M	
	Kan <sup>R</sup>	Kan <sup>S</sup>	Kan <sup>R</sup>	Kan <sup>S</sup>
2489-57-2	0	9	0	1
2489-57-4	12	3	4	1
2489-57-5	26	0	4	0
2489-57-8	19	5	6	1
2489-57-9	0	24	0	0
2489-57-14	18	6	0	0

Se vio que en la progenie TG4 de dos plantas TG3 (2489-57-9 y 2489-57-14) no aparece el fenotipo mutante porque la planta era acigota para la mutación. También, en dos de ellas (2489-57-5, 2489-57-9) hubo una respuesta homogénea en cuanto a la resistencia o sensibilidad a la kanamicina, ya que la primera era homocigota y la segunda acigota para el T-DNA con el gen *nptII* funcional. Hay varios datos que nos indicaron la ausencia de cosegregación entre el inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional y el fenotipo mutante. En las progenies TG4 de las plantas 2489-57-4 y 2489-57-8 se observó una planta de fenotipo mutante que es sensible al antibiótico. Además, toda la progenie TG4 de la planta TG3 2489-57-2 era sensible a la kanamicina y se observó la mutación, lo cual indica que la planta TG3 2489-57-2 es portadora de la mutación pero no de un inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional.

Una vez que se ha descartado la posible cosegregación de un inserto de T-DNA con el gen *nptII* funcional con el fenotipo mutante se va a analizar si existe algún inserto parcial de T-DNA o del cuerpo del vector que cause esta mutación. De forma simultánea se van a realizar los cruces con *S. pimpinellifolium* para llegar a obtener plantas F2.

#### 4.1.1.4.- Mutante 2733 ET MM

Esta línea mutante se detectó porque tras el cultivo de ápices meristemáticos en medio básico durante 20 días se vio que algunas plantas axénicas tenían una menor altura y con un mayor número de entrenudos que las plantas WT. Además, los folíolos en las plantas axénicas mutantes eran más pequeños y no se observaron alteraciones en el sistema radicular adventicio (Figura 23).



**Figura 23.** Fenotipo de plantas axénicas procedentes de ápices meristemáticos de la línea 2733 ET MM tras 20 días de cultivo en medio básico. La barra representa 1 cm.

Se sembraron más semillas TG2 en el invernadero para ver si la mutación observada en cultivo *in vitro* se reproducía en condiciones de cultivo *in vivo*. Se comprobó que la mutación vista *in vitro* también se manifestaba en condiciones de invernadero. Las plantas mutantes eran ligeramente de menor altura que las plantas WT y se observó un mayor número de entrenudos. Las plantas mutantes no presentaban alteraciones a nivel de arquitectura ni morfología foliar. Los frutos de plantas mutantes tenían semillas y no presentaban diferencias en cuanto a su forma con respecto a los WT, sin embargo, estos frutos eran más pequeños (Figura 24).



**Figura 24.** Fenotipo de plantas cultivadas en el invernadero durante 90 días y frutos maduros de la línea 2733 ET MM. La barra representa 1 cm.

### **Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante**

Se realizaron dos experimentos y se detectó la mutación en cada uno de ellos. Para conocer el modo de herencia de esta mutación se analizaron un total de 45 plantas. Se observó una segregación de 40 plantas con fenotipo WT y 5 plantas con fenotipo mutante. En esta línea la prueba de la  $\chi^2$  de datos acumulados fue significativa para una hipótesis de 3 plantas WT y 1 mutante ( $\chi^2$  DA (3:1) = 4.63 > 3.84 g. l. (5%)), ya que se detectó un número menor de

plantas mutantes de lo esperado (5 observados, 11.3 esperados). Esto puede ser causado por una cierta subletalidad asociada a la mutación, lo cual provocaría que aparezcan un número menor de plantas para esta clase fenotípica (Tabla 12).

**Tabla 12.** Análisis del modo de herencia del mutante 2733 ET MM.

	Segregación	WT	M	Total	$\chi^2$
<b>Experimento 1</b>	Observada	22	2	24	3.56
	Esperada (3:1)	18	6		
<b>Experimento 2</b>	Observada	18	3	21	1.29
	Esperada (3:1)	15.7	5.3		
<b>Datos acumulados</b> <sup>a</sup>	Observada	40	5	45	4.63
	Esperada (3:1)	33.7	11.3		

<sup>a</sup> Análisis  $\chi^2$  homogeneidad ( $\chi^2_H = 0.21$ ) indica que la muestras son homogéneas ( $P > 0.05$ ;  $\chi^2_{1 \text{ g.l.}} = 3.84$ )

El modelo que más se ajusta a los datos observados es la de una mutación con herencia monogénica recesiva y cierto nivel de subletalidad.

### Análisis genético del número de insertos T-DNA

Para conocer el número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional, se realizó la prueba de la resistencia a la kanamicina y se observó una segregación de 33 plantas resistentes y 12 plantas sensibles. De tal modo, tras realizar el test de la  $\chi^2$ , se comprobó que la línea 2733 ET MM portaba un único inserto *nptII* funcional ( $\chi^2_{DA(3:1)} = 0.07 < 3.84_{1 \text{ g.l. (5%)}}$ ) (Tabla 13).

**Tabla 13.** Análisis del número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional de la línea 2733 ET MM.

	Segregación	Kan <sup>R</sup>	Kan <sup>S</sup>	Total	$\chi^2$
<b>Experimento 1</b>	Observada	17	7	24	0.22
	Esperada (3:1)	18	6		
<b>Experimento 2</b>	Observada	16	5	21	0.02
	Esperada (3:1)	15.7	5.3		
<b>Datos acumulados</b> <sup>a</sup>	Observada	33	12	45	0.07
	Esperada (3:1)	33.7	11.3		

<sup>a</sup> Análisis  $\chi^2$  homogeneidad ( $\chi^2_H = 0.17$ ) indica que la muestras son homogéneas ( $P > 0.05$ ;  $\chi^2_{1 \text{ g.l.}} = 3.84$ )

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

Se comprobó que no existía cosegregación del inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional y el fenotipo mutante en la línea 2733 ET MM, ya que se observaron dos plantas mutantes sensibles a la kanamicina a lo largo de los dos experimentos realizados (Tabla 14).

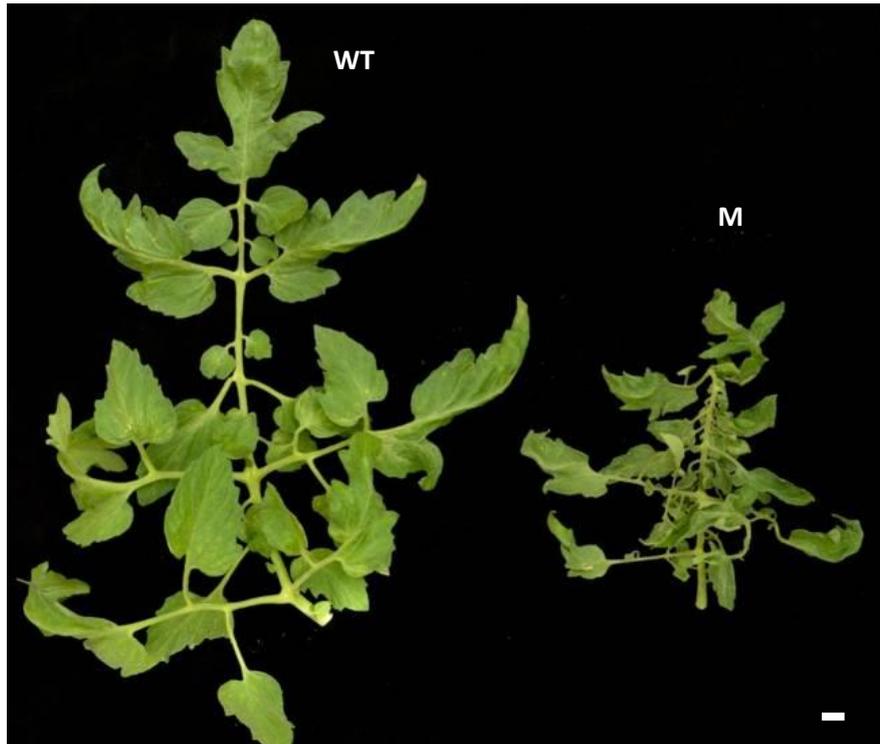
**Tabla 14.** Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 2733 ET MM.

	WT		M		Total
	Kan <sup>R</sup>	Kan <sup>S</sup>	Kan <sup>R</sup>	Kan <sup>S</sup>	
Experimento 1	16	6	1	1	24
Experimento 2	14	4	2	1	21
Datos acumulados	30	10	3	2	45

Una vez que se ha descartado la posible cosegregación de un inserto de T-DNA con el gen *nptII* funcional con el fenotipo mutante se va a analizar si existe algún inserto parcial de T-DNA o del cuerpo del vector que cause esta mutación. De forma simultánea se van a realizar los cruces con *S. pimpinellifolium* para obtener plantas F2 y poder abordar el clonaje del gen afectado mediante la secuenciación de este material.

#### 4.1.1.5.- Mutante 2635 ET MM

Esta línea se detectó durante el cultivo de plantas TG1 en el invernadero. Se observó que esta planta tenía una morfología foliar alterada. Los folíolos presentaban un menor tamaño y no se extendían completamente como lo hacían los folíolos de plantas WT (Figura 25).



**Figura 25.** Fenotipo de hojas de plantas cultivadas en el invernadero de la línea 2635 ET MM. La barra representa 1 cm.

La planta TG1 mutante dio frutos, éstos eran de menor tamaño y muy pocos de ellos contenían semillas. Al haber obtenido semillas TG2 a partir de la planta TG1 mutante, se sembraron en el invernadero para comprobar si el fenotipo mutante visto en TG1 tenía una base genética y se heredaba. Tras el cultivo de 22 plantas TG2 se comprobó que la mutación se heredaba, ya que se vieron plantas con las mismas alteraciones que presenta la planta TG1 (denominamos a estas plantas M1). Además, se detectó otro fenotipo en el que se veían alteraciones en la arquitectura de las hojas, pero más exacerbadas. Los folíolos

de estas plantas también eran más pequeños que los de las hojas en plantas WT. Además, en estas plantas, se observó que las flores abortaban y no cuajaba ningún fruto en ninguna de las inflorescencias (denominamos a estas plantas M2) (Figura 26).



**Figura 26.** Fenotipo de plantas cultivadas en el invernadero de la línea 2635 ET MM. La barra representa 5 cm.

### Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante

Como se observaron dos fenotipos en las plantas TG2 de esta línea mutante (M1 y M2) se planteó la hipótesis de que la línea 2635 ET MM era portadora de una sola mutación de naturaleza semidominante, en la que el fenotipo M1 correspondía a las plantas hemicigotas para la mutación y las M2 las homocigotas. Por lo tanto, se esperaba observar una distribución 1/4 de las plantas con fenotipo WT (acigota), 2/4 M1 (hemicigota) y 1/4 M2 (homocigota). El resultado del análisis para una segregación 1:2:1 con el tamaño de familia utilizado nos indicó que no había motivos para dudar de que el modo de herencia para la mutación observada en la línea 2635 ET MM es de naturaleza semidominante (Tabla 15).

**Tabla 15.** Análisis del modo de herencia del mutante 2635 ET MM.

	Segregación	WT	M <sub>(Hemicigota)</sub>	M <sub>(Homocigota)</sub>	Total	$\chi^2$
Experimento 1 <sup>a</sup>	Observada	8	10	4	22	1.64
	Esperada (1:2:1)	5.5	11	5.5		

<sup>a</sup> Análisis de la  $\chi^2$  ( $P > 0.05$ ;  $\chi^2_{2 \text{ g.l.}} = 5.99$ )

### Análisis genético del número de insertos T-DNA

En este caso se han analizado 11 progenies TG3: ocho procedentes de TG2 WT y tres procedentes de una planta M1. Como las ocho TG3 procedentes de plantas TG2 WT fueron homogéneamente sensibles a la kanamicina, sólo se disponía del dato de las tres poblaciones segregantes para la resistencia a la kanamicina, las TG3 procedentes de plantas TG2 con fenotipo mutante en hemicigosis (M1). Estas familias presentaron una segregación total para la resistencia a la kanamicina de 37 plantas resistentes al antibiótico y 10 plantas sensibles. Con estos datos, se acepta la hipótesis de que la línea 2635 ET MM es portadora de un único inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional (Tabla 16).

**Tabla 16.** Análisis del número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional de la progenie TG3 de la planta M<sub>(hemigota)</sub> 2635-3 ET MM.

	Segregación	Kan <sup>R</sup>	Kan <sup>S</sup>	Total	$\chi^2$
<b>Experimento 1</b>	Observada	10	3	13	0.03
	Esperada (3:1)	9.7	3.3		
<b>Experimento 2</b>	Observada	14	4	18	0.07
	Esperada (3:1)	13.5	4.5		
<b>Experimento 3</b>	Observada	13	3	16	0.33
	Esperada (3:1)	12	4		
<b>Datos acumulados</b> <sup>a</sup>	Observada	37	10	47	0.35
	Esperada (3:1)	35.2	11.8		

<sup>a</sup> Análisis  $\chi^2$  homogeneidad indica que las muestras son homogéneas para una segregación 3:1 (0.09) ( $P > 0.05$ ;  $\chi^2_{1 g.l.} = 3.84$ ).

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

Para determinar si el inserto que confiere resistencia a la kanamicina presente en la línea 2635 ET MM era el responsable de la mutación, se evaluó la resistencia al antibiótico de las progenies TG3 de plantas TG2 WT y TG2 M1 (las plantas TG2 M2 no dieron semillas). Mediante el análisis de dichas progenies se pudo establecer cuál es el genotipo de las plantas TG2 correspondientes (i.e. si una TG3 es homogéneamente sensible a la kanamicina, la planta TG2 de la que procede es acigota para un inserto de T-DNA con el gen *nptII* funcional). De esta forma se ha establecido a qué categoría se adscriben las plantas TG2 evaluadas para fenotipo y resistencia a la kanamicina (Tabla 17).

**Tabla 17.** Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 2635 ET MM.

	WT		M <sub>(hemigota)</sub>		M <sub>(homocigota)</sub>		Total
	Kan <sup>R</sup>	Kan <sup>S</sup>	Kan <sup>R</sup>	Kan <sup>S</sup>	Kan <sup>R</sup>	Kan <sup>S</sup>	
<b>Experimento 1</b>	0	8	3	0	Nd	Nd	11

Nd= No dato

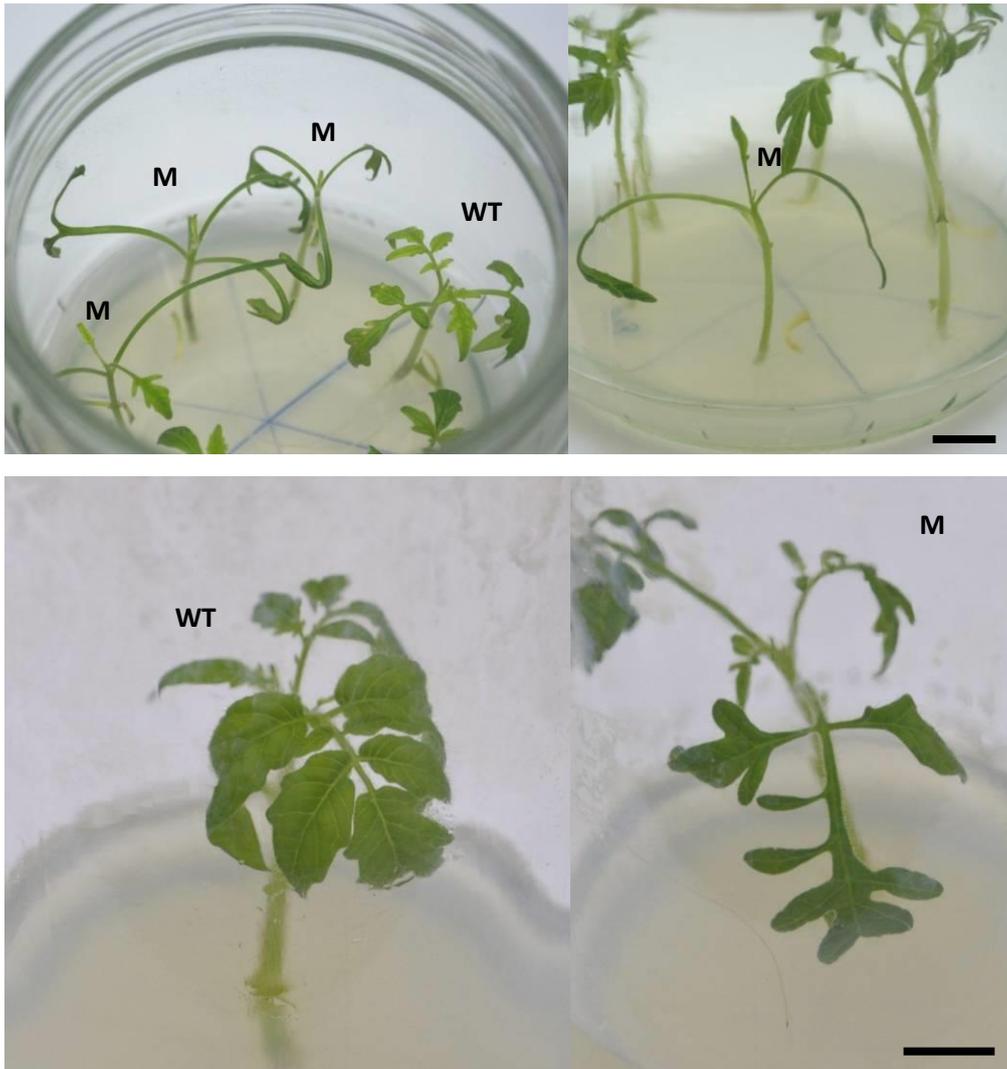
Estos datos indicaron que existía cosegregación entre el inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional y el fenotipo mutante. Todas las plantas acigotas para la

mutación eran sensibles a la kanamicina y, por tanto, acigotas para el inserto de T-DNA. Además, las plantas hemicigotas para la mutación también eran hemicigotas para el inserto de T-DNA ya que se ha visto que sus descendientes segregan 3:1 para resistencia a la kanamicina.

A partir de estos resultados se va a abordar la clonación del gen alterado mediante Anchor –PCR para su posterior caracterización funcional.

#### 4.1.1.6.- Mutante 1381 ET MM

Esta línea se detectó al observar que el desarrollo foliar de algunas plantas procedentes del cultivo de ápices meristemáticos en medio básico estaba alterado. La mutación provocó que las plantas desarrollen un número menor de folíolos y con alteraciones morfológicas (Figura 27).



**Figura 27.** Fenotipo de plantas axénicas procedentes de ápices meristemáticos de la línea 1381 ET MM tras 10 días de cultivo en medio básico. La barra representa 1 cm.

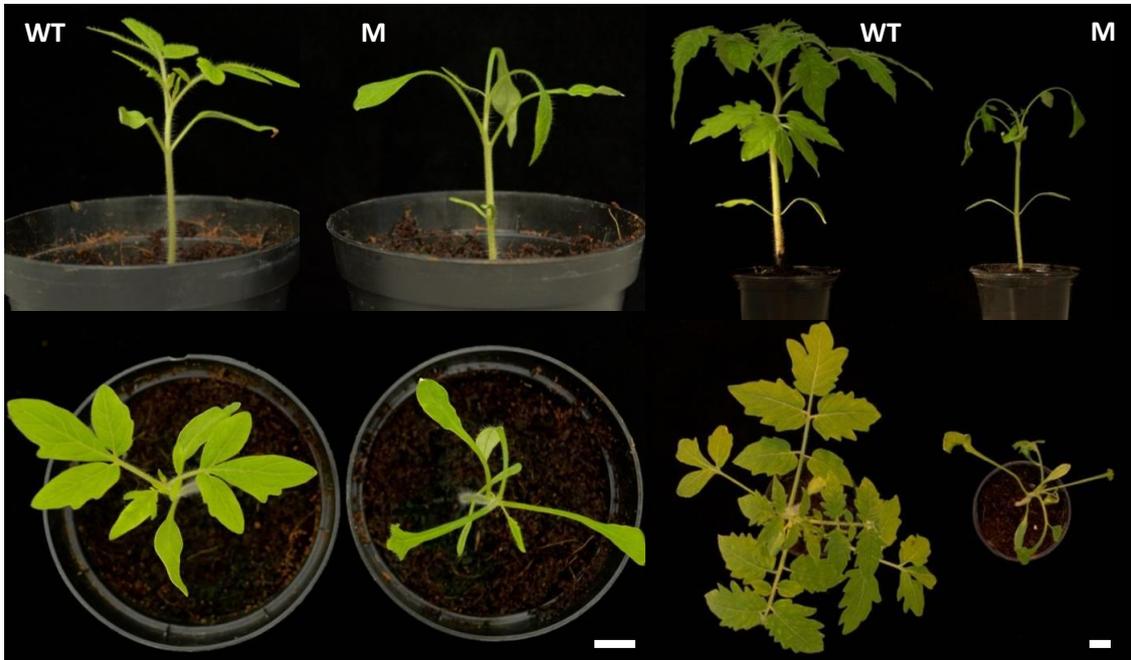
Se realizó el subcultivo de los ápices meristemáticos de las plantas axénicas que se encontraban cultivadas en medio básico a medio de enraizamiento y tras un mes de cultivo, se vio que las plantas mutantes presentaban un tamaño

similar al de las plantas WT pero la alteración en la morfología de la hoja continuaba en las hojas nuevas que se iban generando (Figura 28).



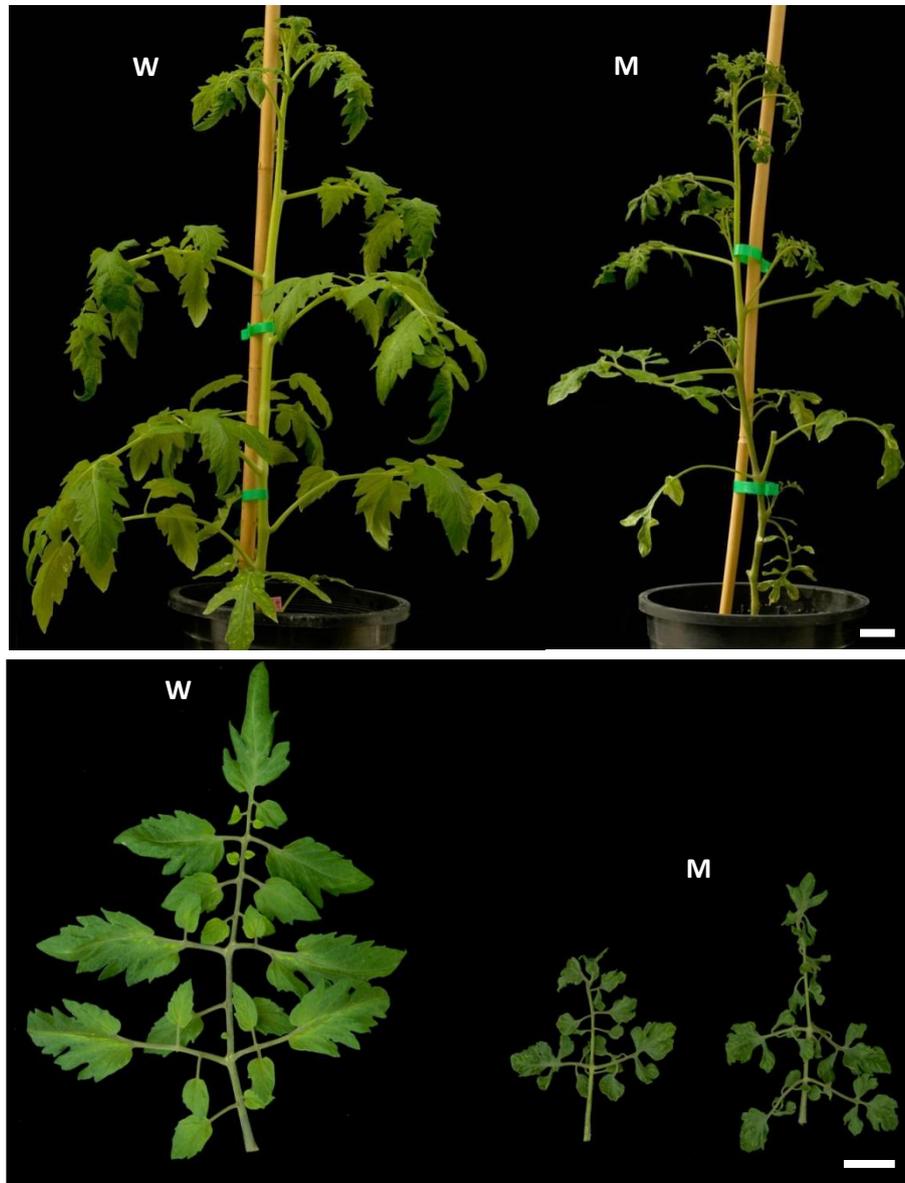
**Figura 28.** Fenotipo de plantas axénicas procedentes de ápices meristemáticos de la línea 1381 ET MM tras 30 días de cultivo en medio básico. La barra representa 1 cm.

Para comprobar si el fenotipo identificado *in vitro* se observaba también en condiciones de cultivo *in vivo*, se sembraron semillas TG2 en el invernadero de esta línea. Se comprobó que el fenotipo mutante también se observaba en este material. A los 15 días de cultivo, la alteración en la morfología de las hojas ya era evidente en las plantas mutantes. A los 30 días las plantas mutantes presentaban un crecimiento similar al de las plantas WT (altura, número de hojas desarrolladas,...) aunque el menor desarrollo de masa foliar hace que parezca que su crecimiento se haya detenido (Figura 29).



**Figura 29.** Fenotipo de plántulas procedentes de semillas de la línea 1381 ET MM tras 15 días (izquierda) y 30 días (derecha) de cultivo en el invernadero. La barra representa 1 cm.

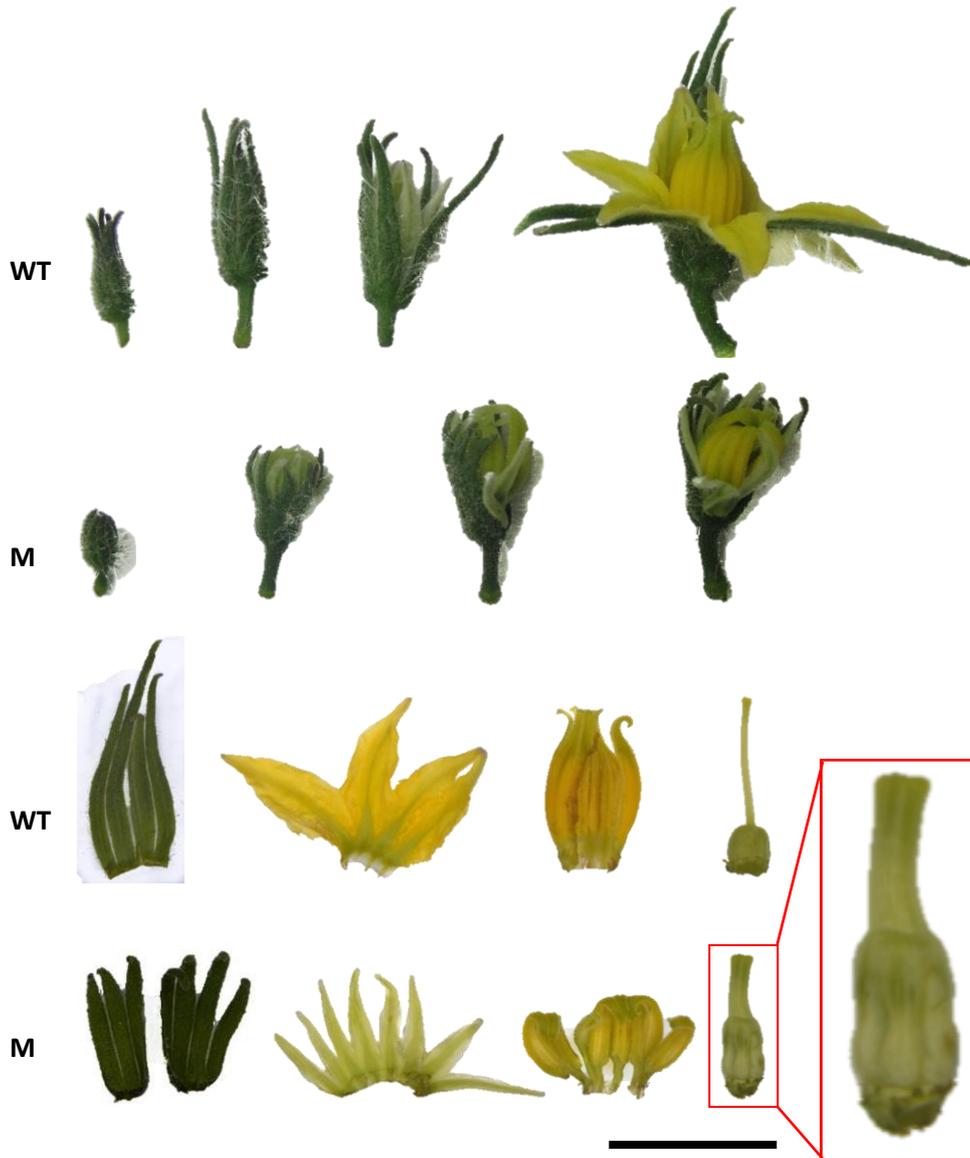
A los 50 días de cultivo en invernadero se observó que las plantas mutantes no presentaban diferencias considerables en cuanto a diferentes parámetros de su crecimiento como la altura o el número de hojas desarrolladas en comparación con las plantas de fenotipo WT. En este estado de crecimiento las hojas eran significativamente más pequeñas que las de las plantas WT. Se vio la generación de más folíolos, pero éstos eran de menor tamaño que los de plantas WT y con una morfología totalmente diferente (Figura 30).



**Figura 30.** Fenotipo de plantas cultivadas en el invernadero durante 50 días de la línea 1381 ET MM. La barra representa 5 cm.

En cuanto al desarrollo floral de este mutante, también se han detectado algunas alteraciones en prácticamente todos sus verticilos. Desde el estado de botón floral se pudo observar como las flores eran más pequeñas que las de plantas WT. En estados más avanzados del desarrollo se pudo ver como las flores tenían los sépalos más cortos y no permitían la apertura normal de los

pétalos. El ovario también presentaba un desarrollo anómalo, era más ancho y alargado que el del WT y el estilo era considerablemente más ancho que el de las plantas WT (Figura 31).



**Figura 31.** Fenotipo de flores en distintos estados del desarrollo de la línea 1381 ET MM. Detalle de los verticilos de flores en anthesis. La barra representa 1 cm.

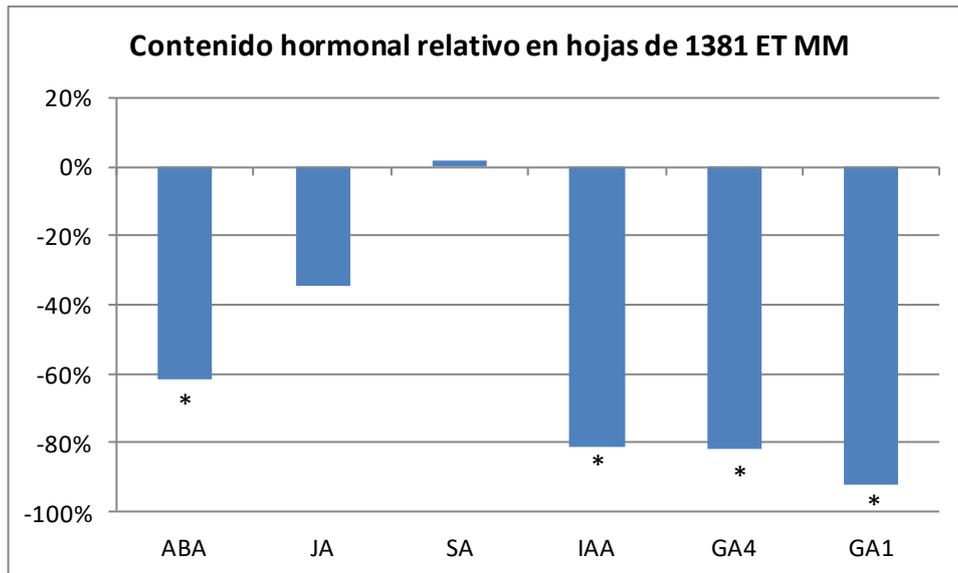
Las plantas mutantes produjeron algunos frutos a partir de estas flores con diversas alteraciones. Los pocos frutos que llegaron a madurar fueron de menor tamaño que los frutos WT, no superaron los 3 cm de diámetro, no tenían

una forma redonda como los frutos de plantas WT y no producían ninguna semilla (Figura 32).



**Figura 32.** Fenotipo de frutos maduros de la línea 1381 ET MM. La barra representa 1 cm.

En este mutante se ha analizado el contenido hormonal endógeno a partir de muestras de hojas. Se representa el contenido relativo de las hormonas analizadas en el mutante respecto de su testigo correspondiente. En este caso, se observaron diferencias significativas en el ácido abscísico, ácido indol acético y las dos giberelinas analizadas. En los cuatro casos las concentraciones endógenas del mutante eran menores que las de las hojas WT (Figura 33).



**Figura 33.** Contenido hormonal endógeno en las hojas de plantas mutantes de la línea 1381 ET MM. Se representa la diferencia relativa de cada hormona analizada del mutante respecto del cv. Money Maker ((M-WT)/WT). El asterisco representa que existe diferencia significativa (test t:  $P < 0,05$ ) entre la media de la concentración del WT y del mutante.

### Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante

Se analizaron 78 individuos en tres experimentos en condiciones de cultivo *in vitro* y se detectó la mutación en 20 plantas. El análisis de homogeneidad indicó que las muestras eran homogéneas y el análisis de los datos acumulados ( $\chi^2$  datos acumulados) indicó que no había motivos para dudar de un modelo de herencia monogénica recesiva para la mutación observada en la línea 1381 ET MM (Tabla 18).

**Tabla 18.** Análisis del modo de herencia del mutante 1381 ET MM.

	Segregación	WT	M	Total	$\chi^2$
<b>Experimento 1</b>	Observada	12	6	18	0.66
	Esperada (3:1)	13.5	4.5		
<b>Experimento 2</b>	Observada	33	11	44	0.00
	Esperada (3:1)	33	11		
<b>Experimento 3</b>	Observada	13	3	16	0.33
	Esperada (3:1)	12	4		
<b>Datos acumulados</b> <sup>a</sup>	Observada	58	20	78	0.02
	Esperada (3:1)	56.5	19.5		

<sup>a</sup> Análisis  $\chi^2$  homogeneidad ( $\chi^2_H = 0.98$ ) indica que la muestras son homogéneas ( $P > 0.05$ ;  $\chi^2_{2 \text{ g.l.}} = 5.99$ )

## Análisis genético del número de insertos T-DNA

En cuanto a la resistencia a la kanamicina, el análisis de los datos acumulados nos indicó que no había motivos para dudar de que la línea 1381 ET MM porte un único inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional (Tabla 19).

**Tabla 19.** Análisis del número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional de la línea 1381 ET MM.

	Segregación	Kan <sup>R</sup>	Kan <sup>S</sup>	Total	$\chi^2_{(3:1)}$
<b>Experimento 1</b>	Observada	15	3	18	0.66
	Esperada (3:1)	13.5	4.5		
<b>Experimento 2</b>	Observada	35	9	44	0.49
	Esperada (3:1)	33	11		
<b>Experimento 3</b>	Observada	11	5	16	0.33
	Esperada (3:1)	12	4		
<b>Datos acumulados</b> <sup>a</sup>	Observada	61	17	78	0.43
	Esperada (3:1)	56.5	19.5		

<sup>a</sup> Análisis  $\chi^2$  homogeneidad ( $\chi^2_H = 1.06$ ) indica que la muestras son homogéneas ( $P > 0.05$ ;  $\chi^2_{2 \text{ g.l.}} = 5.99$ )

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

Para saber si el inserto presente en esta línea es el responsable de la mutación se realizó el ensayo de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante. Entre las 78 plantas TG2 se observan 17 sensibles a la kanamicina y de fenotipo WT, y 41 plantas con fenotipo WT y resistentes a la kanamicina. Las 20 plantas mutantes fueron resistentes a la kanamicina. Tras realizar la prueba de la  $\chi^2$  y ver que se ajustaba ( $\chi^2_{DA (1:2:1)} = 0.44 < 5.99$  1 g. l. (5%)) a una segregación 1 WT Kan<sup>S</sup> : 2 WT Kan<sup>R</sup> : 1 M Kan<sup>R</sup> se pudo concluir, con una probabilidad de fallo menor del 2%, que existe cosegregación entre el fenotipo mutante y el inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional presente en la línea 1381 ET MM (Tabla 20).

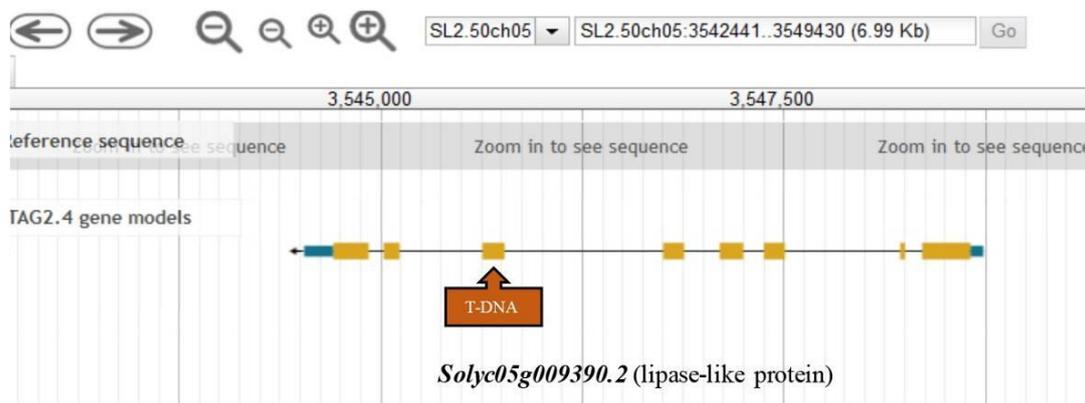
**Tabla 20.** Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 1381 ET MM.

	Segregación	WT Kan <sup>S</sup>	WT Kan <sup>R</sup>	M Kan <sup>R</sup>	M Kan <sup>S</sup>	Total	$\chi^2$
<b>Experimento 1</b>	Observada	3	9	6	0	18	1.00
	Esperada (1:2:1)	4.5	9	4.5	0		
<b>Experimento 2</b>	Observada	9	24	11	0	44	0.54
	Esperada (1:2:1)	11	22	11	0		
<b>Experimento 3</b>	Observada	5	8	3	0	16	0.50
	Esperada (1:2:1)	4	8	4	0		
<b>Datos acumulados</b> <sup>a</sup>	Observada	17	41	20	0	78	0.44
	Esperada (1:2:1)	19.5	39	19.5	0		

<sup>a</sup> Análisis  $\chi^2$  homogeneidad ( $\chi^2_H = 1.61$ ) indica que la muestras son homogéneas ( $P > 0.05$ ;  $\chi^2_{4 \text{ g.l.}} = 9.48$ )

### Identificación del gen etiquetado mediante Anchor-PCR

La identificación del gen etiquetado en la línea 1381 ET MM se realizó siguiendo la metodología de Anchor-PCR descrita con anterioridad, la cual permite amplificar los bordes del T-DNA junto con el fragmento de ADN genómico adyacente a éste. El producto de dicha reacción de PCR se secuenció y, posteriormente, dicha secuencia se analizó contra el genoma de referencia de *S. lycopersicum* (Sol Genomics Network, [www.solgenomics.net](http://www.solgenomics.net)) con el objeto de identificar el punto del genoma en el que se ha insertado el T-DNA. El análisis bioinformático de las secuencias flanqueantes al borde derecho del T-DNA indicó que el inserto se localiza en el brazo largo del cromosoma 5, en el sexto exón del gen *Solyc05g009390.2* (Figura 34), que codifica para una proteína de tipo lipasa con un dominio alpha-beta hidrolasa. David-Schwartz y colaboradores (2009) describieron la función de este gen en tomate, al cual denominaron *LYRATE*. Este gen actúa regulando el crecimiento lateral de las hojas compuestas mediante su interacción con rutas transcripcionales mediadas por auxinas y factores de transcripción tipo KNOX.

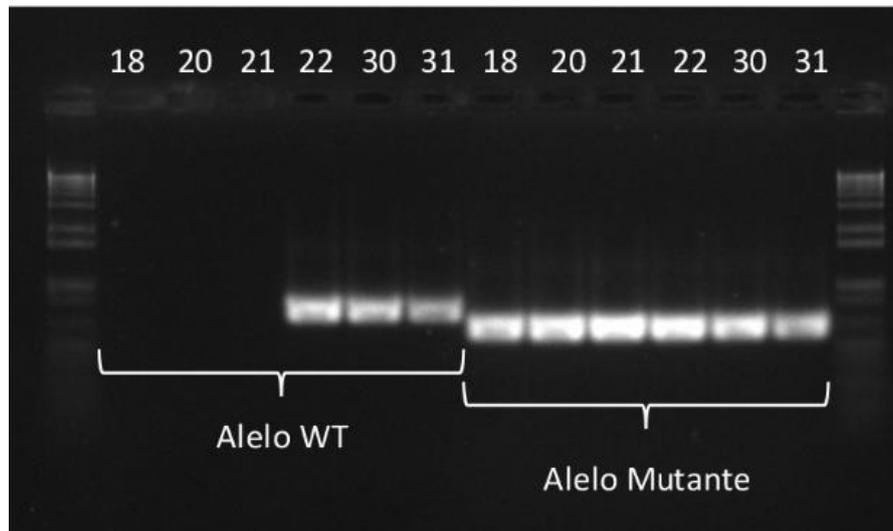


**Figura 34.** Localización genómica del inserto T-DNA de la línea 1381 ET MM. Se muestra la organización genómica del gen *Solyc05g009390.2* que consiste en 8 exones (representados como rectángulos amarillos) y 7 intrones (representados como líneas grises). Además, se muestran las regiones 5' y 3' UTR representadas con rectángulos azules.

### **Análisis de cosegregación mediante PCR del gen identificado por Anchor-PCR y el fenotipo mutante**

Una vez realizado por Anchor-PCR el clonaje de las secuencias flanqueantes al inserto T-DNA, es posible comprobar si dicho inserto (alelo mutante) se encuentra en homocigosis, hemicigosis o acigosis en cada una de las plantas que constituye la población segregante en estudio. Dada la naturaleza recesiva de la mutación observada en esta línea, únicamente deberían mostrar fenotipo mutante aquellas plantas donde el inserto T-DNA se encuentre en homocigosis.

En este caso, se analizaron seis plantas TG2, tres de ellas de fenotipo mutante y otras tres de fenotipo WT, todas ellas tolerantes a kanamicina y, por tanto, portadoras de un inserto T-DNA. El análisis genotípico se realizó mediante dos reacciones de PCR, una para el alelo WT, utilizando una pareja de oligonucleótidos diseñados sobre la secuencia genómica del gen *LYRATE*, y otra para el alelo mutante, empleando un oligonucleótido del T-DNA y uno de los oligonucleótidos utilizados para amplificar el alelo WT, en este caso el *forward* (Figura 35).



**Figura 35.** Detección mediante PCR del alelo WT (sin el inserto T-DNA que ha etiquetado el gen clonado) o el alelo mutante (con el inserto T-DNA que ha etiquetado el gen clonado) en 3 plantas M Kan<sup>R</sup> (18, 20 y 21) y 3 plantas WT Kan<sup>R</sup> (22, 30 y 31) de la línea 1381 ET MM.

Los resultados del genotipado mostraron que las plantas de fenotipo WT resultaron ser hemicigotas para el inserto T-DNA, dado que amplificaron tanto el alelo WT como el alelo mutante. Las plantas de fenotipo mutante fueron homocigotas para el inserto T-DNA, puesto que únicamente amplifica el alelo mutante. Por tanto, los resultados indicaron que el inserto T-DNA localizado en el sexto exón del gen *LYRATE* cosegregaba con el fenotipo mutante observado en la línea 1381 ET MM.

#### **4.1.2.- Identificación y caracterización de mutantes afectados en el desarrollo radicular**

A pesar del papel clave de las raíces en la absorción de nutrientes y agua o la tolerancia a estreses abióticos, hay muy pocos ejemplos de programas de mejora centrados en esta parte de la planta. Las raíces tienen un patrón de desarrollo muy plástico y son difíciles de evaluar por lo que el coste de esos estudios suele ser elevado. Sin embargo, la mayor comprensión de los procesos que regulan el desarrollo de las raíces puede permitir la mejora en caracteres como la absorción de agua y nutrientes y, por consiguiente, un mayor rendimiento de los cultivos con sistemas productivos más amigables con el medio ambiente (Scherr y McNeely, 2008). Por tanto, es normal que cada vez haya más investigaciones cuyo objetivo es conocer qué mecanismos biológicos regulan estos procesos y cuáles son los genes que los controlan. Hasta el momento, la mayor parte de las investigaciones para mejorar el conocimiento básico sobre el desarrollo de la raíz se realizan en especies modelo como *Arabidopsis*. Esto tiene la ventaja de que pueden identificarse genes cruciales en este carácter de forma relativamente rápida. Sin embargo, el mayor reto con el que nos encontramos en este caso es la transferencia del conocimiento obtenido a las especies cultivadas (Gonzales *et al.*, 2009).

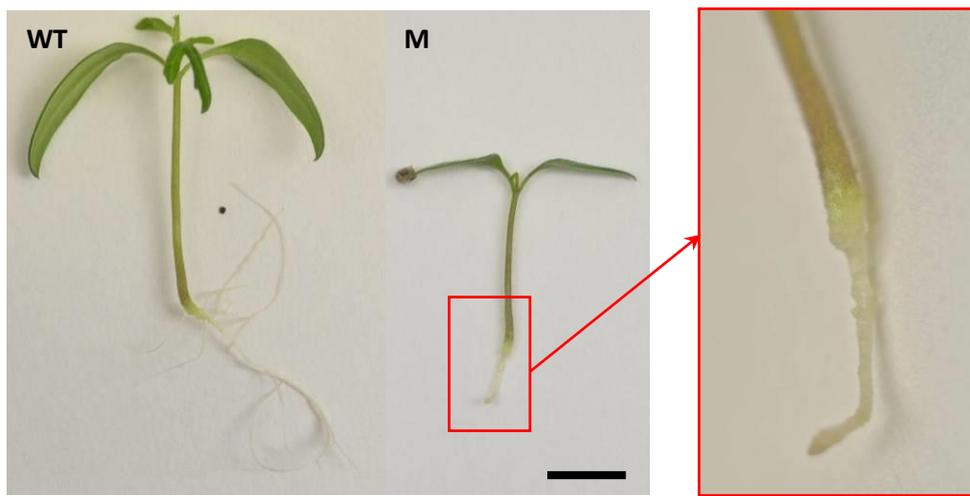
En este trabajo se han identificado cinco mutantes alterados en diferentes caracteres del desarrollo radicular a partir del escrutinio de 762 líneas T-DNA de tomate. Tras la identificación de estos mutantes en condiciones de cultivo *in vitro* se cultivaron estas líneas en condiciones de invernadero con el objetivo de ver si esas alteraciones se observarían también *in vivo*. Otra parte importante de la caracterización de dichos mutantes es el cultivo en medios suplementados con diferentes auxinas, tanto naturales como de síntesis. Por otro lado, en algunos de los mutantes se realizó la cuantificación de hormonas endógenas para ver si la mutación producida afectaba el contenido de hormonas en las plantas. Para mejorar la caracterización fenotípica, en alguno de estos mutantes se han llevado a cabo injertos combinando la parte aérea y la raíz de plantas WT con las de mutantes para estudiar las interacciones entre

las diferentes partes de la plantas. De forma simultánea a la caracterización fenotípica, se estudió el modo de herencia de la mutación, el número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional (confiere resistencia a la kanamicina) que contiene cada una de las líneas y si existe cosegregación entre un inserto T-DNA y el fenotipo mutante. Esta información es clave para la identificación del gen que causa el fenotipo mutante ya que si existe cosegregación se puede identificar el gen etiquetado mediante Anchor-PCR pero, si no existe cosegregación, la identificación del gen mutado se tiene que realizar mediante otras metodologías. En nuestro caso, se hace mediante el cruzamiento de una planta mutante con *S. pimpinellifolium*, obteniendo la generación F2 de ese cruce y secuenciando plantas WT y plantas mutantes de esa población segregante para localizar la mutación en el genoma del tomate mediante genotipado por secuenciación.

Como ya se ha comentado se han identificado y evaluado cinco líneas T-DNA con alteraciones en el desarrollo radicular: 1317 ET MM, 1862 ET MM, 2666 ET MM, 1662 ET MM, 1608 ET MM. A continuación se pasa a describir sus características.

#### 4.1.2.1.- Mutante 2666 ET MM

Este mutante se detectó al ver que algunas plántulas procedentes de semillas TG2 de esta línea T-DNA eran de menor tamaño y no presentaban un crecimiento de la raíz embrionaria como la de las plántulas WT. Además, no se observó la emergencia de raíces secundarias a partir la raíz primaria tras 10 días de cultivo en medio de germinación (Figura 36).



**Figura 36.** Fenotipo de plántulas procedentes de semillas de la línea 2666 ET MM tras 10 días de cultivo en medio de germinación. La barra representa 1 cm.

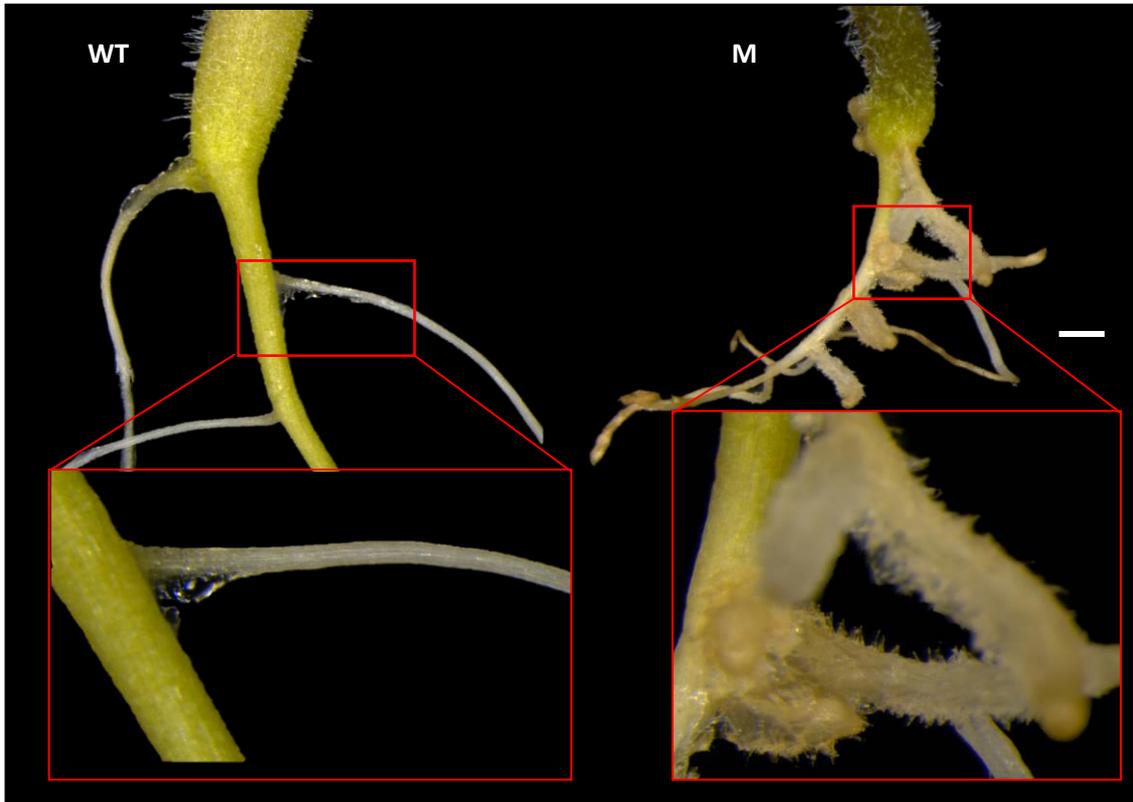
Tras 30 días de cultivo de las semillas en medio de germinación, se vio que las plántulas mutantes emitían raíces secundarias a partir de la raíz principal, pero éstas eran de menor longitud que las de plantas WT. Además, se observó que la morfología de las hojas de las plántulas mutantes presentaban ciertas anomalías. Las hojas tenían un menor número de folíolos y éstos eran arrugados. Cuando se cultivaron los ápices meristemáticos en medio básico, las plantas axénicas mutantes desarrollaron algunas hojas pero tenían un menor crecimiento que las plantas WT y presentaban un desarrollo de las raíces adventicias alterado. Estas plantas formaron raíces adventicias primarias de las cuales emergían raíces secundarias, pero todas estas raíces de las plantas mutantes eran de menor longitud que las de las plantas WT (Figura 37).



**Figura 37.** Fenotipo de plántulas procedentes de semillas tras 30 días de cultivo en medio de germinación (arriba) y plantas axénicas procedentes de ápices meristemáticos tras 25 días de cultivo en medio básico (abajo) de la línea 2666 ET MM. La barra representa 1 cm.

Además, las plantas mutantes formaron pequeños pelos radiculares en las raíces secundarias, mientras que en las raíces de plantas WT no se observaron estas estructuras en este estado de desarrollo. Esto podría explicar la

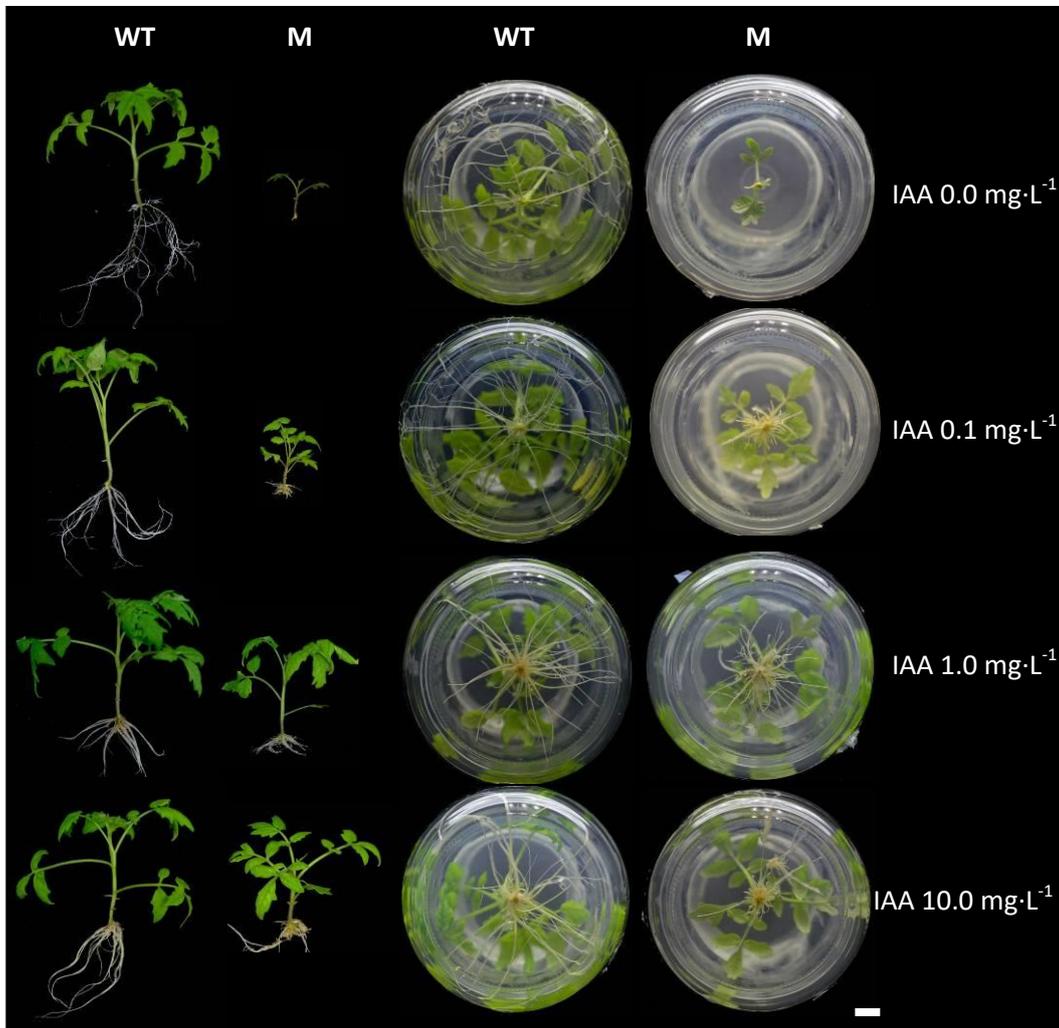
capacidad de las plantas M para continuar con su crecimiento pese al desarrollo anómalo del sistema radicular, ya que es posible que estos pelos radiculares faciliten la absorción de nutrientes (Figura 38).



**Figura 38.** Fenotipo de las raíces de plántulas procedentes de semillas de la línea 2666 ET MM tras 30 días de cultivo en medio de germinación. La barra representa 1 mm.

Posteriormente, se diseñó un experimento en el que se cultivaron ápices meristemáticos de plántulas WT y mutantes en medios con diferentes tipos y concentraciones de auxinas naturales. Se observó que, a las concentraciones de IAA utilizadas, las plantas mutantes presentaban un enraizamiento adventicio diferente al de las plantas WT. No se observó en el mutante un enraizamiento similar al de las plantas WT en ninguna de las concentraciones utilizadas ( $0-10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Sin embargo, se vio que a concentraciones de  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de IAA había un mayor enraizamiento en las plantas mutantes. También se vio que conforme se aumentaba la concentración de la auxina, el desarrollo de la parte aérea en las plantas mutantes era mayor y formaban más hojas. Sin embargo, en ninguna de las condiciones analizadas las plantas mutantes desarrollaron un sistema radicular análogo al de las plantas WT. Es decir, el

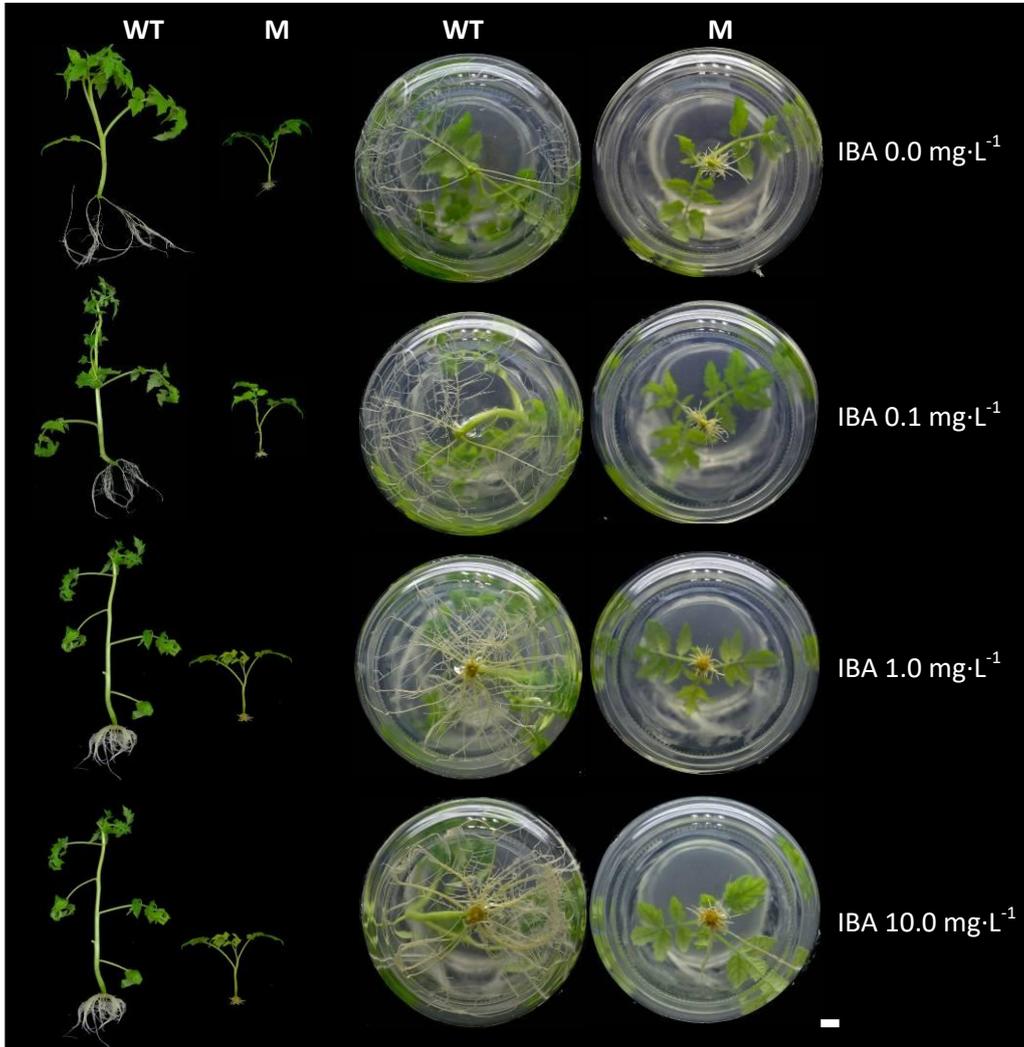
cultivo de las plantas mutantes en medios suplementados con IAA no permitió obtener una fenocopia del WT (Figura 39).



**Figura 39.** Fenotipo de plantas axénicas procedentes del cultivo de ápices meristemáticos de la línea 2666 ET MM tras 30 días de cultivo en medios con diferentes concentraciones de ácido indolacético. La barra representa 1 cm.

Cuando se analizó el efecto de distintas concentraciones de IBA en el medio de cultivo, se observó que las plantas mutantes presentaban un enraizamiento diferente de las plantas WT. Con esta auxina no se vio un mayor enraizamiento al aumentar la concentración. Tampoco se observó un mayor crecimiento de la parte aérea en las plantas mutantes al aumentar la concentración de esta hormona, como ocurrió con IAA. Las plantas WT cultivadas en estos mismos medios también presentaban una masa radicular mayor a medida que se

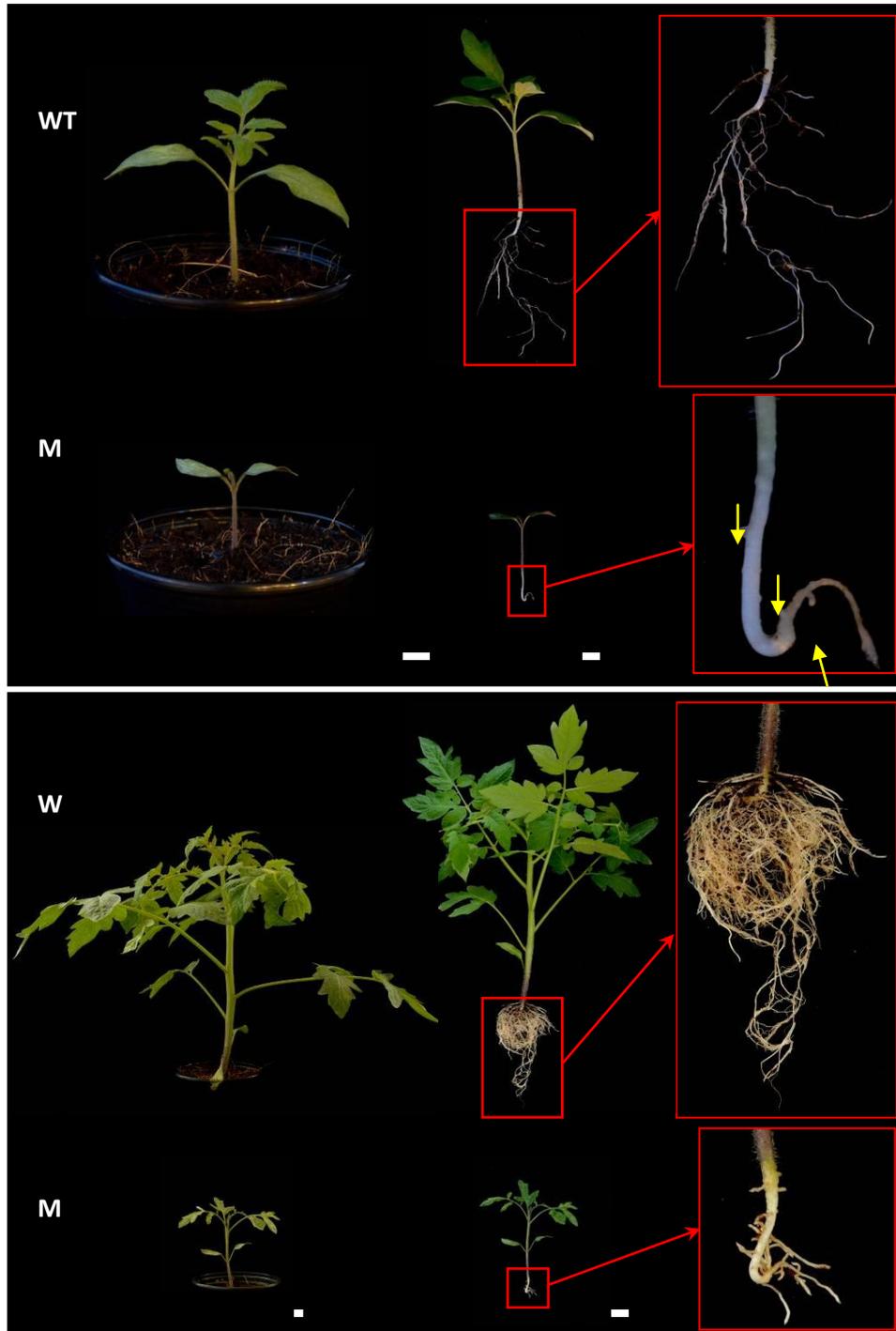
aumentaba la concentración de la hormona. A concentraciones de IBA 1.0 mg·L<sup>-1</sup> y 10.0 mg·L<sup>-1</sup> se observó la mayor cantidad de raíces adventicias y las plantas tenían un mayor desarrollo vegetativo de la parte aérea (Figura 40).



**Figura 40.** Fenotipo de plantas axénicas procedentes del cultivo de ápices meristemáticos de la línea 2666 ET MM tras 30 días de cultivo en medios con diferentes concentraciones de ácido indolbutírico. La barra representa 1 cm.

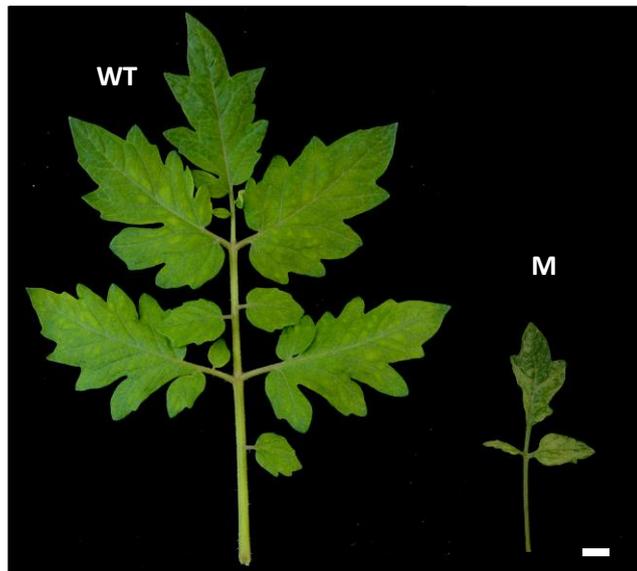
Para comprobar si el fenotipo observado en condiciones de cultivo *in vitro* se reproducía en el invernadero, se cultivaron semillas TG2 en macetas. A los 15 días de cultivo se observó que las plantas mutantes presentaban un menor crecimiento de la parte aérea y tenían un menor desarrollo radicular. La raíz principal de las plantas mutantes era más corta que la de las plantas con fenotipo WT. También se observó que las plantas mutantes desarrollaban

ciertas raíces secundarias, pero éstas eran muy cortas, a diferencia de las raíces secundarias en plantas WT. Tras 30 días de cultivo se comprobó que el sistema radicular tenía raíces secundarias más cortas que las WT (Figura 41).



**Figura 41.** Fenotipo de plantas procedentes del cultivo de semillas en macetas de la línea 2666 ET MM tras 15 días (arriba) y 30 días (abajo) de cultivo en invernadero. La barra representa 1 cm.

A los 30 días de cultivo en el invernadero se observó una alteración en la morfología de las hojas que ya se ha visto en cultivo *in vitro*. Las primeras hojas de las plantas eran de menor tamaño, con un menor número de folíolos y de morfología diferente (Figura 42).



**Figura 42.** Fenotipo de hojas de plantas procedentes del cultivo de semillas en macetas de la línea 2666 ET MM tras 30 días de cultivo en invernadero. La barra representa 1 cm.

Al transcurrir tres meses de cultivo en el invernadero las plantas mutantes eran de menor tamaño, la morfología de las hojas presentaba importantes alteraciones y no florecieron con normalidad. Sin embargo, en una de las plantas mutantes apareció una flor aunque no se obtuvo ningún fruto (Figura 43).



**Figura 43.** Fenotipo de plantas procedentes del cultivo de semillas en macetas de la línea 2666 ET MM tras tres meses de cultivo en invernadero. La barra representa 5 cm.

### **Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante**

El fenotipo mutante se ha visto en los cuatro experimentos realizados. Sin embargo, la segregación observada en los cuatro experimentos se desvió de los valores esperados para un mutante recesivo (3 plantas WT por cada planta mutante). El análisis de homogeneidad indicó que las muestras eran homogéneas y el análisis de los datos acumulados ( $\chi^2$  datos acumulados) refleja el mismo resultado que el de los cuatro experimentos (Tabla 21).

**Tabla 21.** Análisis del modo de herencia del mutante 2666 ET MM.

	<b>Segregación</b>	<b>WT</b>	<b>M</b>	<b>Total</b>	$\chi^2$
<b>Experimento 1</b>	Observada	23	1	24	5.56
	Esperada (3:1)	18.0	6.0		
<b>Experimento 2</b>	Observada	68	8	76	8.49
	Esperada (3:1)	57.0	19.0		
<b>Experimento 3</b>	Observada	70	11	81	5.63
	Esperada (3:1)	60.7	20.3		
<b>Experimento 4</b>	Observada	39	5	44	4.36
	Esperada (3:1)	33.0	11.0		
<b>Datos acumulados</b> <sup>a</sup>	Observada	200	25	225	23.15
	Esperada (3:1)	168.7	56.3		

<sup>a</sup> Análisis  $\chi^2$  homogeneidad ( $\chi^2_H = 0.90$ ) indica que la muestras son homogéneas ( $P > 0.05$ ;  $\chi^2_{3 \text{ g.l.}} = 7.82$ )

Los resultados sugieren que la naturaleza de la mutación es monogénica recesiva. Lo que podría explicar la desviación entre los valores esperados y los observados para la clase mutante es que puede existir un cierto grado de subletalidad asociada a este fenotipo, lo cual daría como resultado una disminución respecto de lo esperado del número de plantas con el fenotipo mutante. Tampoco se puede descartar que la alteración en el desarrollo radicular provoque una reducción en la capacidad de germinación de las semillas mutantes.

### Análisis genético del número de insertos T-DNA

En cuanto a la resistencia a la kanamicina, se vio que la línea 2666 ET MM no era portadora de un único inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional ( $\chi^2_{DA(3:1)} = 5.12 > 3.84_{1 \text{ g. l. } (5\%)}$ ). Por tanto, se realizó el análisis de los datos obtenidos para comprobar si la segregación se ajustaba a la presencia de dos o tres insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional (Tabla 22).

**Tabla 22.** Análisis del número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional de la línea 2666 ET MM.

	Segregación	Kan <sup>R</sup>	Kan <sup>S</sup>	Total	$\chi^2$
<b>Experimento 1</b>	Observada	24	0	24	1.60
	Esperada (15:1)	22.5	1.5		
	Esperada (63:1)	23.6	0.3		
<b>Experimento 2</b>	Observada	69	7	76	1.14
	Esperada (15:1)	71.3	4.7		
	Esperada (63:1)	74.8	1.2		
<b>Experimento 3</b>	Observada	77	4	81	0.24
	Esperada (15:1)	75.9	5.1		
	Esperada (63:1)	79.8	1.2		
<b>Experimento 4</b>	Observada	39	5	44	1.96
	Esperada (15:1)	41.3	2.3		
	Esperada (63:1)	43.3	0.7		
<b>Datos acumulados<sup>a</sup></b>	Observada	209	16	225	0.28
	Esperada (15:1)	211.0	14.0		
	Esperada (63:1)	221.5	3.5		

<sup>a</sup> Análisis  $\chi^2$  homogeneidad indica que la muestras son homogéneas, para una segregación 15:1 (4.65) pero no para una segregación 63:1 (17.73) ( $P > 0.05$ ;  $\chi^2_{3 \text{ g. l.}} = 7.82$ ).

Finalmente, se comprobó que no había motivos para dudar que la línea porte dos insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional.

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

Se comprobó que no existía cosegregación de ningún inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional y el fenotipo mutante ya que se observó una planta mutante sensible a la kanamicina (Tabla 23).

**Tabla 23.** Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 2666 ET MM.

	WT		M		Total
	Kan <sup>R</sup>	Kan <sup>S</sup>	Kan <sup>R</sup>	Kan <sup>S</sup>	
Experimento 1	23	0	1	0	24
Experimento 2	61	7	8	0	76
Experimento 3	66	4	11	0	81
Experimento 4	35	4	4	1	44
Datos acumulados	185	15	24	1	225

Dado el interés de este mutante, se ha analizado molecularmente para ver si la mutación pudiera estar causada por un inserto parcial del T-DNA o por la inserción de un fragmento del cuerpo del vector. Para ello, el grupo del Dr. Lozano utilizó una batería de PCR's con amplicones que abarcan siete secuencias el T-DNA y 14 del cuerpo del vector (ver Figura 6). Estas pruebas se han hecho en una planta con fenotipo mutante y sensible a la kanamicina. En este caso, todas las pruebas PCR fueron negativas, por lo que lo más probable es que esta mutación no esté causada por ningún fragmento de T-DNA ni del cuerpo del vector. Por tanto, pensamos que la mutación observada en esta línea es de naturaleza somaclonal. Al no haber identificado ningún fragmento de ADN de secuencia conocida que nos permita abordar la clonación del gen afectado mediante Anchor-PCR, debemos utilizar otra aproximación para lograr la identificación y clonación de dicho gen. En estos casos la metodología a seguir consiste en cruzar una planta mutante con *Solanum pimpinellifolium* e identificar plantas mutantes y WT entre los individuos de la población F2 de ese cruce. Tras la secuenciación de estas

plantas WT y mutantes y su comparación se puede llegar a averiguar la región cromosómica en la que se encuentra el gen alterado.

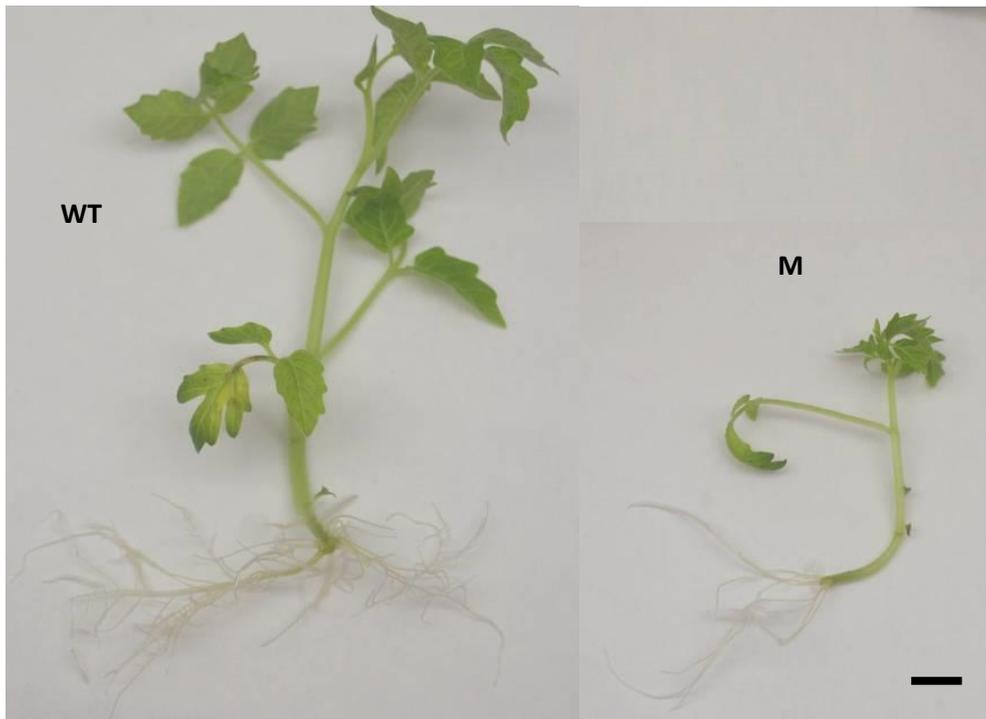
#### 4.1.2.2.- Mutante 1662 ET MM

Este mutante se detectó al ver plántulas que no desarrollaban raíces secundarias a partir de la raíz embrionaria tras siete días de cultivo en medio de germinación. Las plántulas mutantes también tenían un menor desarrollo de la parte aérea y, en ese momento, no habían desarrollado ninguna hoja mientras que las plantas WT tienen un par de ellas (Figura 44).



**Figura 44.** Fenotipo de plántulas procedentes de semillas de la línea 1662 ET MM tras 7 días de cultivo en medio de germinación. La barra representa 1 cm.

Tras el cultivo de los ápices meristemáticos en condiciones axénicas, las plantas mutantes presentaban una menor altura y un menor desarrollo del sistema radicular adventicio a los 25 días de cultivo (Figura 45).



**Figura 45.** Fenotipo de plantas axénicas procedentes de ápices meristemáticos de la línea 1662 ET MM tras 25 días de cultivo en medio básico. La barra representa 1 cm.

Tras las observaciones anteriores, se decidió subcultivar los ápices meristemáticos de las plantas mutantes a un medio de enraizamiento suplementado con  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de IAA y se observó que, aunque las plantas mutantes formaban raíces adventicias de longitud normal, éstas no tenían ninguna raíz secundaria (Figura 46).



**Figura 46.** Fenotipo de las raíces adventicias de plantas axénicas procedentes de ápices meristemáticos de la línea 1662 ET MM tras 30 días de cultivo en medio de enraizamiento. La barra representa 1 cm.

Este resultado es muy interesante ya que en este mutante podría haberse alterado algún mecanismo específico de la iniciación de primordios de raíces secundarias tanto en la raíz embrionaria como en el sistema radicular adventicio. Los resultados de la caracterización indican que la raíz primaria de la plántula tiene una arquitectura normal y lo mismo parece ocurrir con las raíces primarias adventicias. Es verdad que las raíces primarias de ambos tipos se desarrollan de manera algo más lenta que en el WT, pero esto podría deberse a la anomalía en la iniciación de primordios de raíces laterales.

Pese a la anomalía en el desarrollo radicular, las plantas mutantes soportan el proceso de aclimatación en invernadero. En el momento en que alcanzan un metro de altura aproximadamente se comienza a observar cierta necrosis apical. Esta alteración hace que el tallo principal deje de crecer, lo cual permite que se active alguna yema axilar. Este nuevo meristemo apical acaba también necrosándose de forma que se repite de nuevo todo el proceso. Con todo, las plantas mutantes desarrollan flores y frutos. Lo más destacable es que los frutos que se forman son similares al WT y dan semillas viables (Figura 47).



**Figura 47.** Fenotipo de plantas procedentes de semillas de la línea 1662 ET MM cultivadas en invernadero durante tres meses. Detalle de tallo con necrosis apical y brote lateral (derecha). La barra representa 5 cm.

## Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante

El fenotipo mutante se vio en los dos experimentos realizados. Tras la evaluación de 42 y 30 plantas el análisis de homogeneidad indicó que las muestras son homogéneas (Tabla 24).

**Tabla 24.** Análisis del modo de herencia del mutante 1662 ET MM.

	Segregación	WT	M	Total	$\chi^2$
<b>Experimento 1</b>	Observada	36	6	42	2.57
	Esperada (3:1)	31.5	10.5		
<b>Experimento 2</b>	Observada	25	5	30	1.11
	Esperada (3:1)	22.5	7.5		
<b>Datos acumulados</b> <sup>a</sup>	Observada	61	11	72	3.63
	Esperada (3:1)	54.0	18.0		

<sup>a</sup> Análisis  $\chi^2$  homogeneidad ( $\chi^2_{H} = 0.05$ ) indica que la muestras son homogéneas ( $P > 0.05$ ;  $\chi^2_{1 \text{ g.l.}} = 3.84$ )

El análisis de los datos acumulados ( $\chi^2$  datos acumulados) indicó que no había motivos para dudar de que la mutación sea monogénica recesiva.

## Análisis genético del número de insertos T-DNA

Tras analizar la resistencia a la kanamicina de las 72 plantas TG2, los resultados indicaron que no había motivos para dudar de que la línea 1662 ET MM porte un único inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional (Tabla 25).

**Tabla 25.** Análisis del número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional de la línea 1662 ET MM.

	Segregación	Kan <sup>R</sup>	Kan <sup>S</sup>	Total	$\chi^2$
<b>Experimento 1</b>	Observada	30	12	42	0.28
	Esperada (3:1)	31.5	10.5		
<b>Experimento 2</b>	Observada	19	11	30	2.28
	Esperada (3:1)	22.5	7.5		
<b>Datos acumulados</b> <sup>a</sup>	Observada	49	23	72	1.85
	Esperada (3:1)	54.0	18.0		

<sup>a</sup> Análisis  $\chi^2$  homogeneidad ( $\chi^2_{H} = 0.51$ ) indica que la muestras son homogéneas ( $P > 0.05$ ;  $\chi^2_{1 \text{ g.l.}} = 3.84$ )

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

Se ha comprobado que no existe cosegregación del inserto T-DNA entre el fenotipo mutante en la línea 1662 ET MM y la expresión de un gen *nptII* funcional, ya que se observaron dos plantas mutantes sensibles a la kanamicina en los experimentos realizados (Tabla 26).

**Tabla 26.** Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 1662 ET MM.

	WT		M		Total
	Kan <sup>R</sup>	Kan <sup>S</sup>	Kan <sup>R</sup>	Kan <sup>S</sup>	
Experimento 1	25	11	5	1	42
Experimento 2	15	10	4	1	30
Datos acumulados	40	21	9	2	72

Ante la falta de cosegregación fenotipo-inserto de T-DNA, se ha realizado el cruce de las dos plantas TG2 mutantes sensible a la kanamicina con una accesión de *Solanum pimpinellifolium* para poder abordar el clonaje del gen mutado a partir de la generación F2 de dicho cruce.

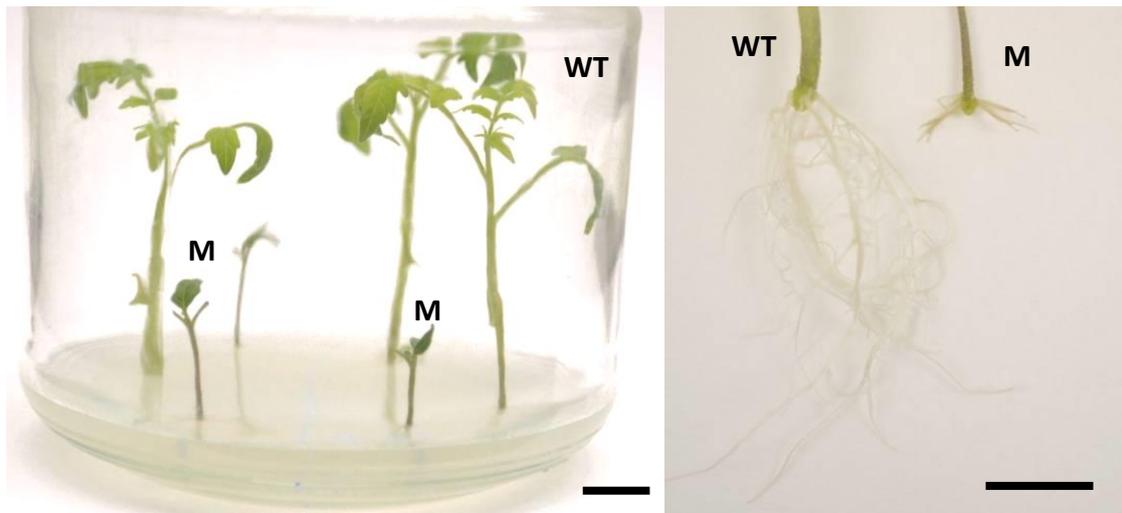
#### 4.1.2.3.- Mutante 1608 ET MM

Este mutante se detectó al observar que tras la siembra de semillas en medio de germinación algunas plántulas tenían una menor altura y una alteración en el desarrollo de la raíz primaria. La raíz principal tenía una longitud más corta y, a diferencia de lo que ocurre en las plántulas WT, no se observó la emergencia de raíces secundarias (Figura 48).



**Figura 48.** Fenotipo de plántulas procedentes de semillas de la línea 1608 ET MM tras 7 días de cultivo en medio de germinación. La barra representa 1 cm.

Tras el cultivo de los ápices meristemáticos en medio básico, se observó que las plántulas que presentaban un fenotipo mutante en el medio de germinación no tenían problemas en la formación inicial de raíces adventicias. Sin embargo, a los 15 días de cultivo, se observó que el desarrollo de estas raíces adventicias también estaba alterado ya que eran de menor longitud y tampoco se observó la formación de raíces secundarias (Figura 49).



**Figura 49.** Fenotipo de plantas axénicas procedentes de ápices meristemáticos de la línea 1608 ET MM tras 15 días de cultivo en medio básico. La barra representa 1 cm.

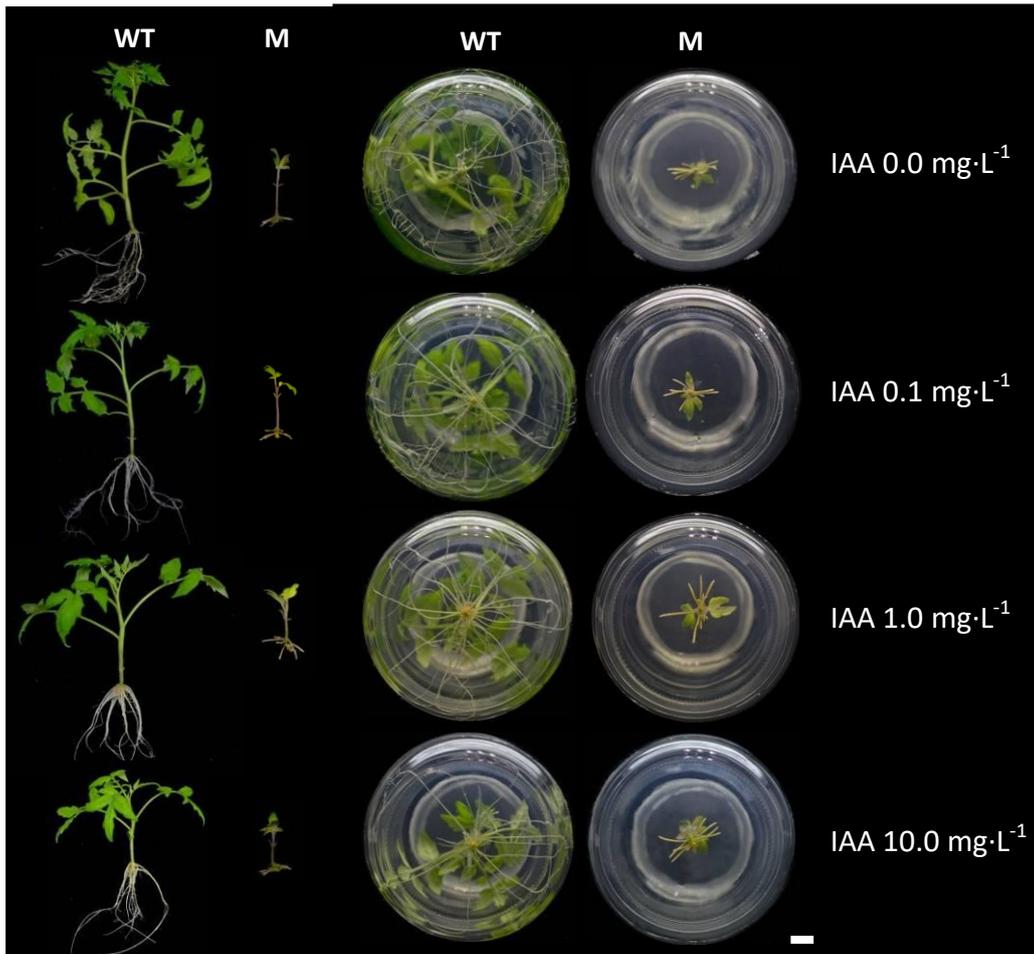
Se subcultivaron los ápices meristemáticos de las plantas con fenotipo mutante a un medio de enraizamiento suplementado con  $0.1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de IAA para ver si se mejoraría el enraizamiento adventicio. Tras 50 días de cultivo en este medio los ápices prácticamente no habían crecido, las raíces adventicias que se formaron eran pequeñas y no aparecieron raíces secundarias (Figura 50).



**Figura 50.** Fenotipo de una planta axénica procedente de un ápice meristemático mutante de la línea 1608 ET MM tras 50 días de cultivo en medio de enraizamiento. La barra representa 1 cm.

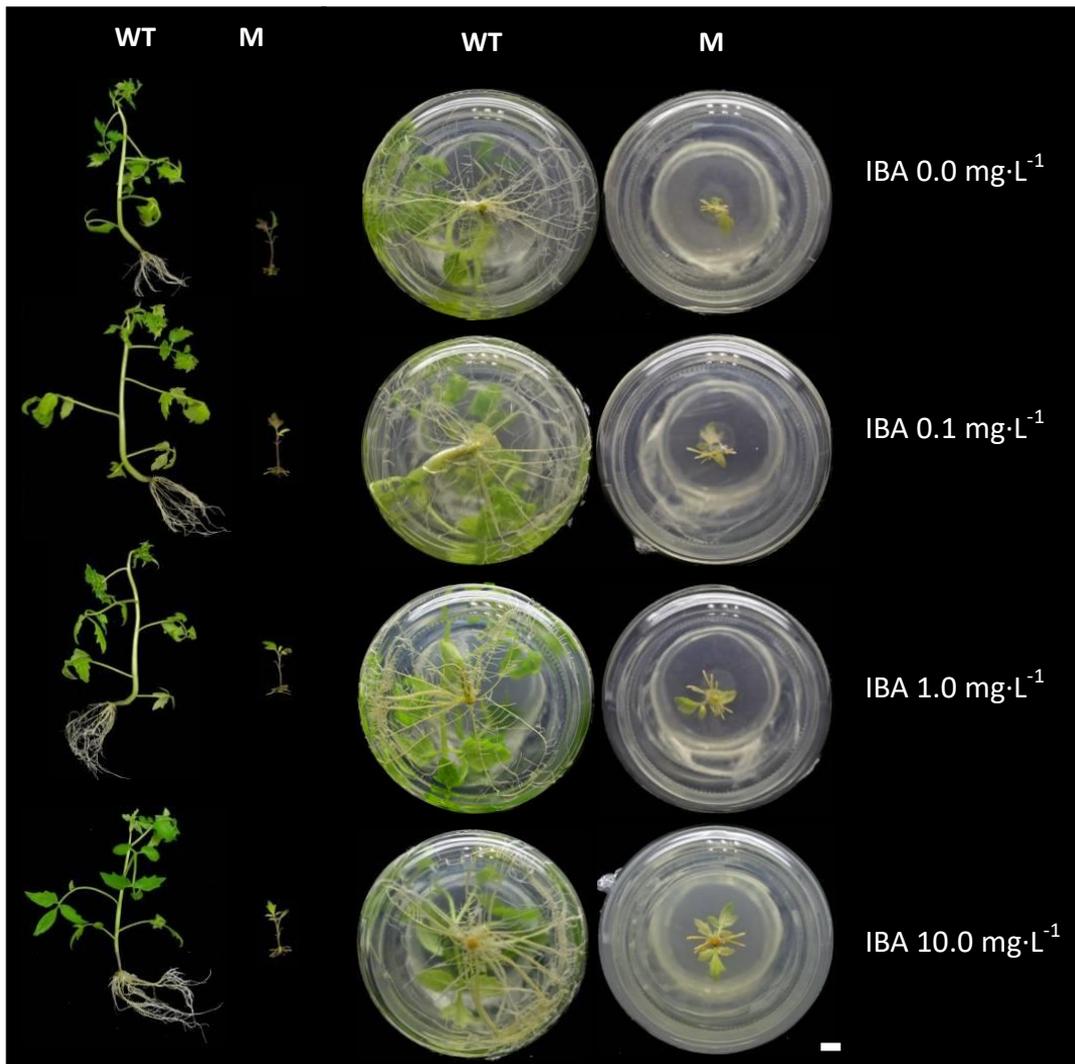
Para ver con más detalle cómo afectaba la adición exógena de distintas auxinas al desarrollo de este mutante, se realizó un experimento en el que se cultivaron ápices meristemáticos de plántulas WT y mutantes en medios con

diferentes tipos y concentraciones de estas hormonas. Se observó que, a las concentraciones de IAA utilizadas, las plantas mutantes presentaban un enraizamiento adventicio claramente diferente de las plantas WT. Las plantas mutantes no mejoraron su enraizamiento y la parte aérea tampoco se desarrolla normalmente, incluso al aumentar la concentración de esta auxina (Figura 51).



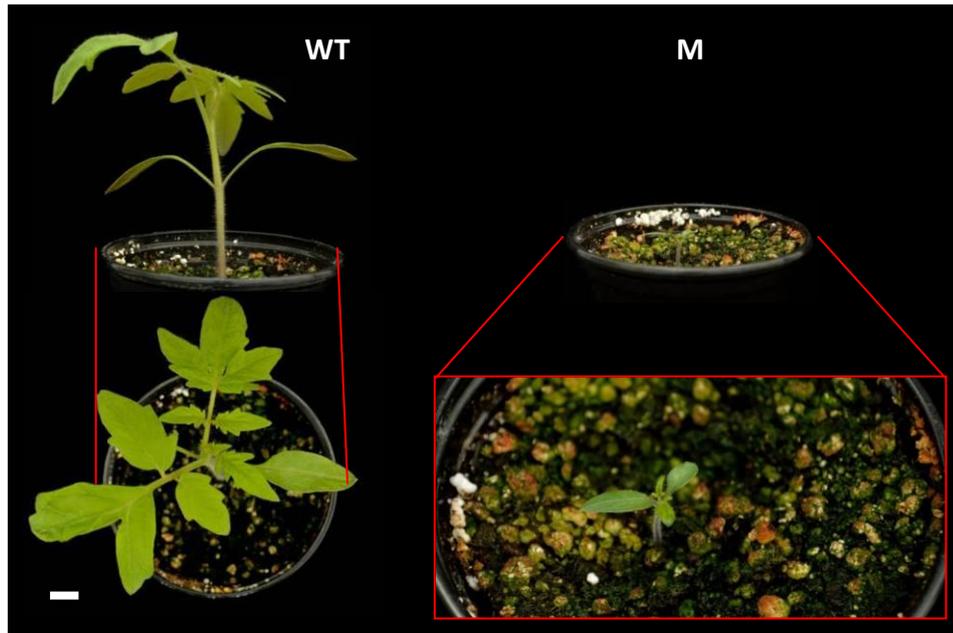
**Figura 51.** Fenotipo de plantas axénicas procedentes del cultivo de ápices meristemáticos de la línea 1608 ET MM tras 30 días de cultivo en medios con diferentes concentraciones de ácido indolacético. La barra representa 1 cm.

Las plantas WT cultivadas en los medios con IBA presentaban una masa radicular mayor a medida que se aumenta la concentración de esta auxina. En cambio, las plantas mutantes presentaban un enraizamiento diferente de las plantas WT y, como ocurría con el IAA, tampoco se mejoró el enraizamiento al aumentar la concentración de esta hormona (Figura 52).



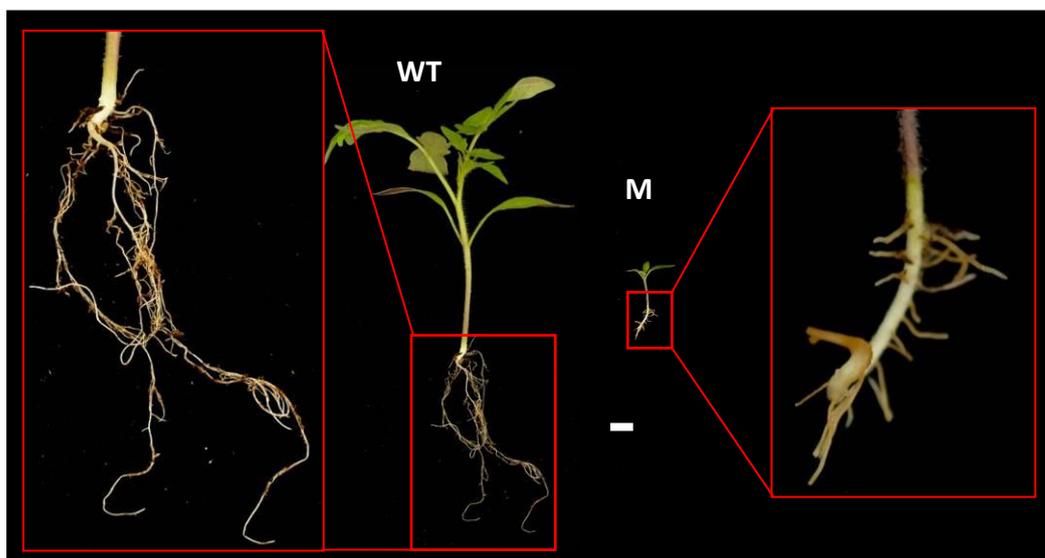
**Figura 52.** Fenotipo de plantas axénicas procedentes del cultivo de ápices meristemáticos de la línea 1608 ET MM tras 30 días de cultivo en medios con diferentes concentraciones de ácido indolbutírico. La barra representa 1 cm.

Se cultivaron semillas TG2 en macetas para evaluar el fenotipo de esta línea en condiciones de cultivo *in vivo*. Tras quince días de cultivo en el invernadero, se vio que las plántulas mutantes presentaban diferencias claras respecto del correspondiente WT. En concreto, tenían los cotiledones y las hojas de menor tamaño, así como un desarrollo mucho más lento y menor altura que las plantas WT (Figura 53).



**Figura 53.** Fenotipo de plántulas procedentes de semillas de la línea 1608 ET MM tras 15 días de cultivo el invernadero. La barra representa 1 cm.

En condiciones de cultivo *in vivo* se observó la misma alteración en el desarrollo radicular que en las plantas cultivadas *in vitro*. La raíz primaria de estas plantas no superó los pocos centímetros de longitud y, de forma similar, las raíces secundarias tenían menor longitud que las raíces del mismo tipo de las plantas WT (Figura 54).



**Figura 54.** Fenotipo de las raíces de plántulas procedentes de semillas de la línea 1608 ET MM tras 15 días de cultivo el invernadero. La barra representa 1 cm.

Tras 50 días de cultivo en la maceta, las plantas mutantes no desarrollaron más que dos pequeñas hojas y su crecimiento radicular presentó las mismas alteraciones descritas anteriormente (Figura 55).



**Figura 55.** Fenotipo de una plántula procedente de una semilla mutante de la línea 1608 ET MM tras 50 días de cultivo en el invernadero. La barra representa 1 cm.

Por tanto, se puede concluir que este mutante presenta una alteración que dificulta severamente el desarrollo de las raíces sean de origen embrionario, adventicio o secundarias. Probablemente, como consecuencia de este problema, la planta no es capaz de desarrollarse más allá de unos pocos centímetros aunque se mantenga por un largo periodo en el invernadero. Por último, se ha comprobado que la adición exógena de auxinas naturales al medio de cultivo no permite normalizar el desarrollo radicular del mutante.

### **Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante**

Se analizaron 124 individuos de la línea 1608 ET MM en condiciones de cultivo *in vitro* en tres experimentos independientes. El análisis de homogeneidad indicó que las muestras eran homogéneas (Tabla 27).

**Tabla 27.** Análisis del modo de herencia del mutante 1608 ET MM.

	Segregación	WT	M	Total	$\chi^2$
<b>Experimento 1</b>	Observada	16	3	19	0.86
	Esperada (3:1)	14.3	4.7		
<b>Experimento 2</b>	Observada	62	19	81	0.10
	Esperada (3:1)	60.7	20.3		
<b>Experimento 3</b>	Observada	19	5	24	0.22
	Esperada (3:1)	18.0	6.0		
<b>Datos acumulados</b> <sup>a</sup>	Observada	97	27	124	0.69
	Esperada (3:1)	93.0	31.0		

<sup>a</sup> Análisis  $\chi^2$  homogeneidad ( $\chi^2_H = 0.50$ ) indica que la muestras son homogéneas ( $P > 0.05$ ;  $\chi^2_{2\text{ g.l.}} = 5.99$ )

El análisis de los datos acumulados ( $\chi^2$  datos acumulados) indicó que no había motivos para dudar de que la naturaleza de la mutación es monogénica recesiva.

### Análisis genético del número de insertos T-DNA

En cuanto a la resistencia a la kanamicina, se analizaron 124 plantas y se vio que la línea 1608 ET MM no era portadora de un único inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional ( $\chi^2_{DA (3:1)} = 5.12 > 33.72_{1\text{ g.l. (5\%)}$ ). Por tanto, se comprobó si las segregaciones observadas se ajustaban a lo esperado para la presencia de dos o tres insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional (Tabla 28).

**Tabla 28.** Análisis del número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional de la línea 1608 ET MM.

	Segregación	Kan <sup>R</sup>	Kan <sup>S</sup>	Total	$\chi^2$
<b>Experimento 1</b>	Observada	19	0	19	1.27
	Esperada (15:1)	18.0	1.0		
	Esperada (63:1)	18.7	0.3		
<b>Experimento 2</b>	Observada	79	2	81	1.98
	Esperada (15:1)	69.3	4.7		
	Esperada (63:1)	79.7	1.3		
<b>Experimento 3</b>	Observada	23	1	24	1.27
	Esperada (15:1)	22.5	1.5		
	Esperada (63:1)	23.7	0.3		
<b>Datos acumulados</b> <sup>a</sup>	Observada	121	3	124	3.11
	Esperada (15:1)	109.7	7.3		
	Esperada (63:1)	122.0	2.0		

<sup>a</sup> Análisis  $\chi^2$  homogeneidad indica que la muestras son homogéneas, para una segregación 15:1 (0.32) y 63:1 (1.20) ( $P > 0.05$ ;  $\chi^2_{2\text{ g.l.}} = 5.99$ ).

Los resultados obtenidos indicaron que no existían motivos para dudar de ninguna de las dos hipótesis planteadas, que la línea porta dos insertos T-DNA

con el gen *nptII* funcional, o que tiene tres insertos. Para poder discernir entre una y otra hipótesis habría que aumentar el tamaño de familia, aunque, con las plantas analizadas hasta el momento, la segregación se ajusta mejor a la hipótesis de una línea con tres insertos.

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

Tras el análisis de cosegregación en la línea 1608 ET MM, se comprobó que no existía una asociación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante, ya que se observaron plantas mutantes sensibles a la kanamicina (Tabla 29).

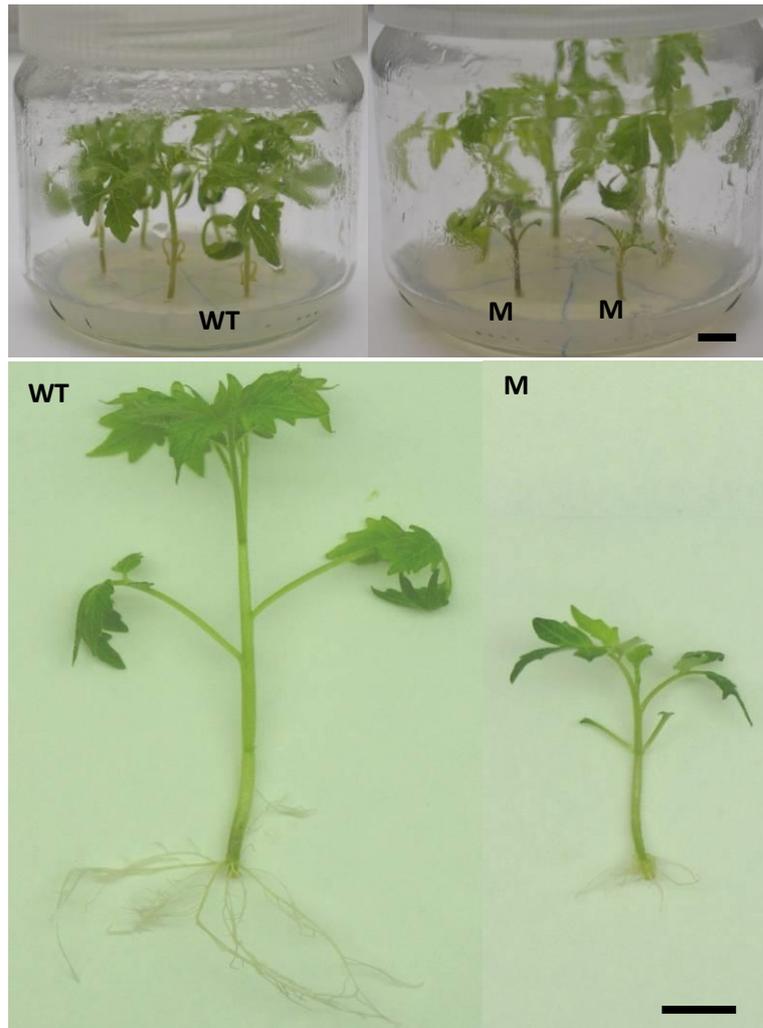
**Tabla 29.** Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 1608 ET MM.

	WT		M		Total
	Kan <sup>R</sup>	Kan <sup>S</sup>	Kan <sup>R</sup>	Kan <sup>S</sup>	
<b>Experimento 1</b>	16	0	3	0	19
<b>Experimento 2</b>	62	0	17	2	81
<b>Experimento 3</b>	18	1	5	0	24
<b>Datos acumulados</b>	91	1	25	2	124

Hay que matizar el anterior comentario, ya que la peculiaridad del fenotipo de este mutante podría ocasionar una interferencia con la lectura de resistencia-sensibilidad a la kanamicina (i.e. podría ocurrir que un explante resistente se calificara como sensible). Por si así fuera, se va a intentar corroborar la ausencia de cosegregación mediante el análisis de las descendencias TG3 procedentes de tres plantas TG2 WT - sensibles a la kanamicina. Si en alguna de estas tres descendencias TG3 se observara el fenotipo mutante se comprobará que no existe cosegregación entre el fenotipo mutante y unos de los insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional.

#### 4.1.2.4.- Mutante 1317 ET MM

Este mutante se detectó durante el cultivo de ápices meristemáticos en medio básico ya que en las plántulas procedentes de semillas no se vio ninguna alteración. Se observó que algunas plantas presentaban una menor altura y el sistema radicular adventicio se encontraba alterado con raíces de menor longitud que las de las plantas WT (Figura 56).



**Figura 56.** Fenotipo de plantas axénicas procedentes de ápices meristemáticos de la línea 1317 ET MM tras 18 días de cultivo en medio básico. La barra representa 1 cm.

Para ver si la adición de auxinas al medio de cultivo era capaz de normalizar el desarrollo radicular, se realizó un experimento en el que se cultivaron ápices meristemáticos de plantas WT y mutantes en medios con diferentes tipos y concentraciones de auxinas naturales. Se observó que, a las concentraciones

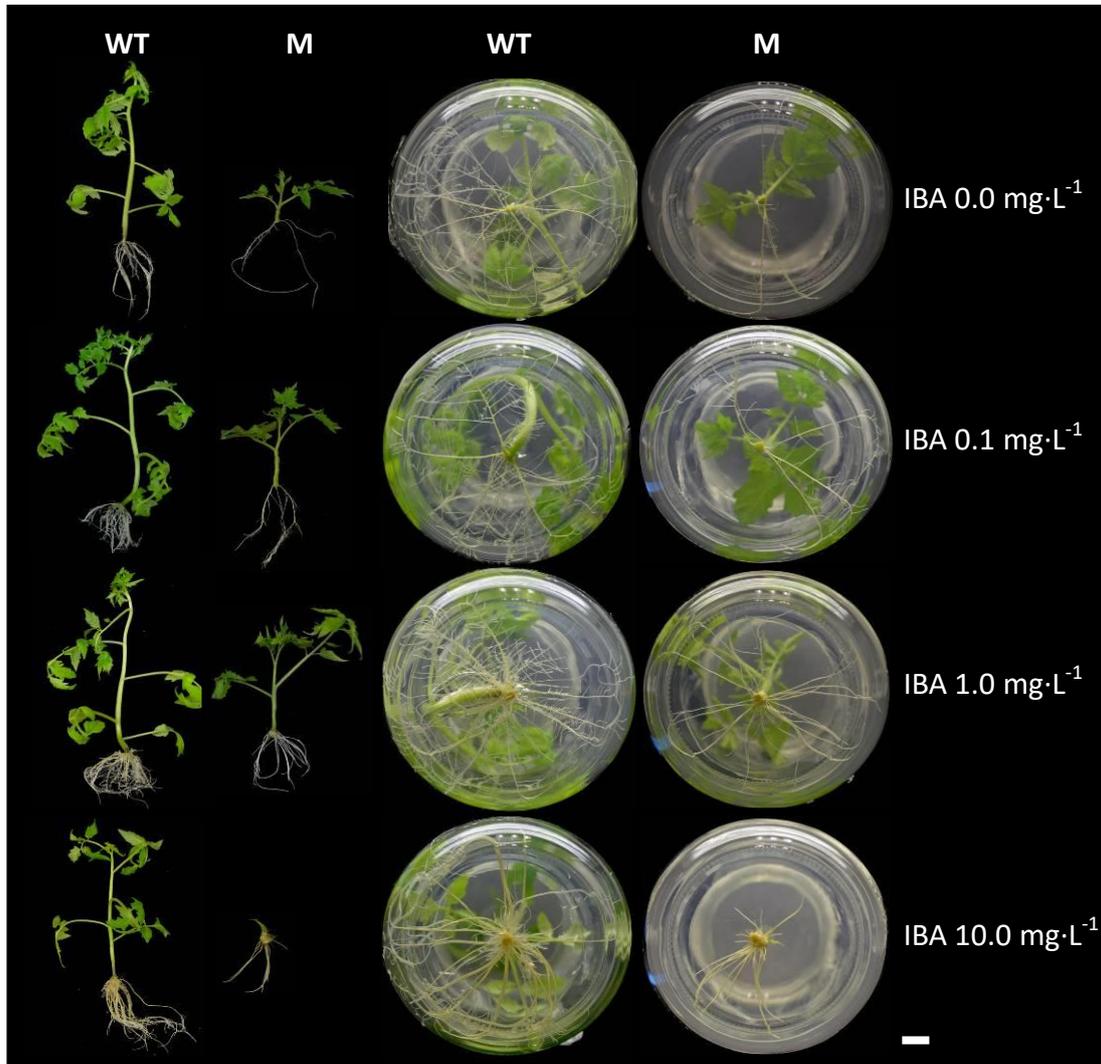
de IAA utilizadas, las plantas mutantes no presentaron un enraizamiento adventicio parecido al de las plantas WT. Al aumentar la concentración de esta hormona, las plantas mutantes no mejoraron su enraizamiento (Figura 57).



**Figura 57.** Fenotipo de plantas axénicas procedentes del cultivo de ápices meristemáticos de la línea 1317 ET MM en medio de enraizamiento suplementado con ácido indolacético después de 30 días de cultivo. La barra representa 1 cm.

También se observó que, a las concentraciones de IBA utilizadas, las plantas mutantes tenían un enraizamiento diferente del de las plantas WT. Sin embargo, las plantas mutantes presentaron una mejor respuesta al desarrollo de raíces adventicias cuando se utiliza IBA en comparación con IAA. En concreto, se observó un mejor enraizamiento adventicio, incluso la formación de algunas

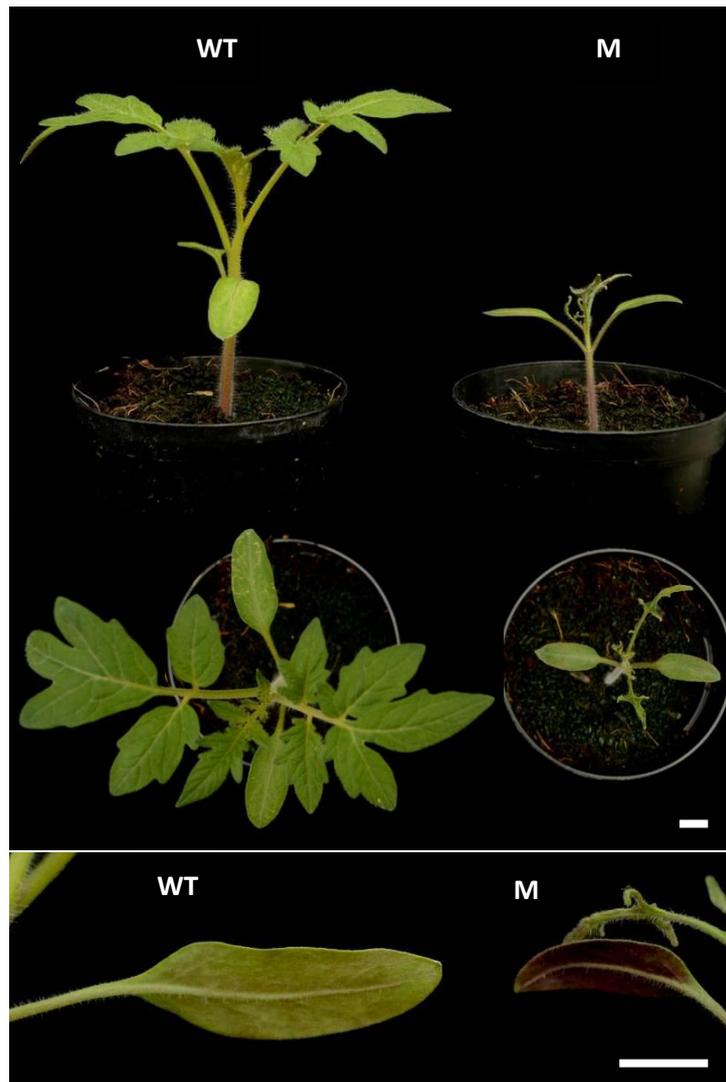
raíces secundarias, acompañado con un mejor desarrollo de la parte aérea a concentraciones de IBA  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . En cambio, a una concentración de  $10.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  se produjo una inhibición casi total del desarrollo de la parte aérea en las plantas mutantes (Figura 58).



**Figura 58.** Fenotipo de plantas axénicas procedentes del cultivo de ápices meristemáticos de la línea 1317 ET MM en medio de enraizamiento suplementado con ácido indolbutírico después de 30 días de cultivo. La barra representa 1 cm.

Se cultivaron semillas pregerminadas en macetas para ver si las alteraciones observadas en condiciones de cultivo *in vitro* se reproducían cuando las plantas mutantes se cultivaban en el invernadero. A los 20 días después de la germinación ya se apreciaban diferencias significativas en el tamaño de las

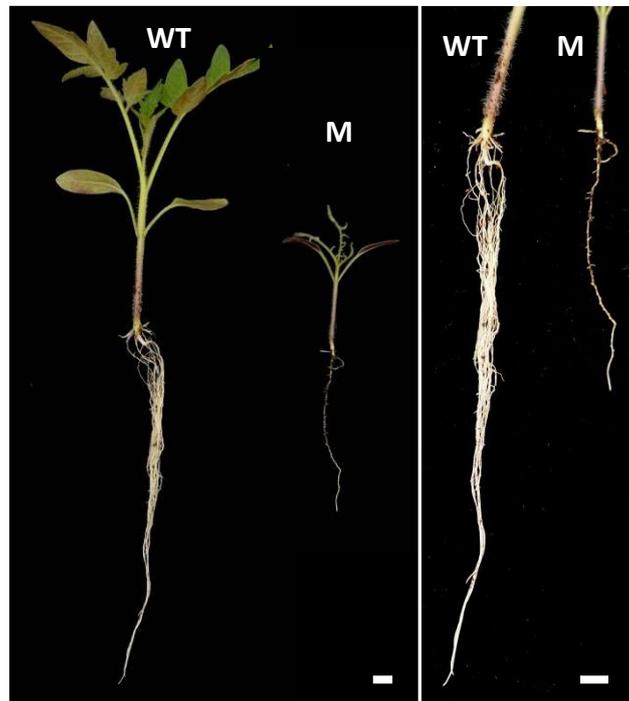
plantas mutantes. También se observó que los folíolos de las primeras hojas verdaderas de las plantas mutantes crecían con una morfología alterada, ya que no se expandían de la misma forma que los folíolos de plantas WT. Además, se observó que el envés de los cotiledones de las plantas mutantes era de color violeta, probablemente debido a la acumulación de antocianos (Figura 59).



**Figura 59.** Fenotipo de plántulas cultivadas en invernadero durante 20 días de la línea 1317 ET MM (parte superior). Detalle del envés de los cotiledones (parte inferior). La barra representa 1 cm.

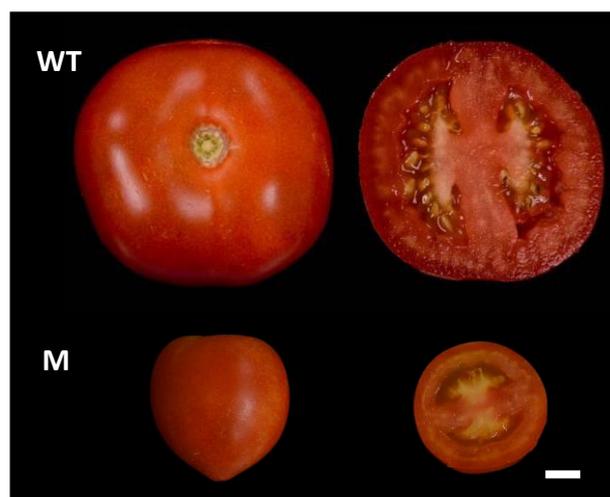
El sistema radicular de las plantas mutantes cultivadas en el invernadero se encontraba menos desarrollado. La raíz principal de las plantas mutantes era de menor longitud. Por otra parte, se observó la emergencia de raíces

secundarias, pero también eran de menor longitud que las raíces secundarias de las plantas WT (Figura 60).



**Figura 60.** Fenotipo de las raíces de plántulas procedentes de semillas de la línea 1317 ET MM tras 20 días de cultivo en el invernadero. La barra representa 1 cm.

Las plantas con fenotipo mutante crecían de manera más lenta que las plantas WT y la mayor parte de las flores no produjeron frutos. Además, los pocos frutos que cuajaban en las plantas mutantes eran de menor tamaño aunque sí que produjeron algunas semillas (Figura 61).



**Figura 61.** Fenotipo de frutos maduros de la línea 1317 ET MM. La barra representa 1 cm.

## Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante

El fenotipo mutante se ha visto en los dos experimentos realizados con un total de 62 plantas TG2. En el experimento 1, los datos obtenidos nos indicaron que no había motivos para dudar de que el fenotipo alterado estaba causado por una mutación monogénica recesiva ( $\chi^2_{(3:1)} = 0.88 < 3.84_{1 \text{ g. l. (5\%)}$ ). Sin embargo, en el experimento 2 se observó una desviación de los valores esperados para una segregación 3 plantas WT y 1 planta M (4 plantas M observadas vs 9.5 plantas esperadas) ( $\chi^2_{(3:1)} = 4.24 > 3.84_{1 \text{ g. l. (5\%)}$ ). Tras comprobar que los datos eran homogéneos ( $\chi^2_H = 0.49 < 3.84_{1 \text{ g. l. (5\%)}$ ) se realizó la prueba de la  $\chi^2$  de los datos acumulados (Tabla 30).

**Tabla 30.** Análisis del modo de herencia del mutante 1317 ET MM.

	Segregación	WT	M	Total	$\chi^2$
<b>Experimento 1</b>	Observada	20	4	24	0.88
	Esperada (3:1)	18.0	6.0		
<b>Experimento 2</b>	Observada	34	4	38	4.24
	Esperada (3:1)	28.5	9.5		
<b>Datos acumulados<sup>a</sup></b>	Observada	54	8	62	4.83
	Esperada (3:1)	46.5	15.5		

<sup>a</sup> Análisis  $\chi^2$  homogeneidad ( $\chi^2_H = 0.49$ ) indica que la muestras son homogéneas ( $P > 0.05$ ;  $\chi^2_{1 \text{ g. l.}} = 3.84$ )

El resultado nos indicó que no se ajustaba para una segregación 3 plantas WT y 1 planta M ( $DA_{(3:1)} = 4.83 > 3.84_{1 \text{ g. l. (5\%)}$ ). Una posible explicación es que existe un cierto grado de subletalidad asociada al fenotipo mutante, lo cual daría como resultado una disminución del número de plantas con este fenotipo respecto de lo esperado. Por otro lado, no se debe descartar que la alteración en el desarrollo radicular provoque una reducción en la capacidad de germinación, posiblemente debido a que la raíz embrionaria en los mutantes tenga más dificultades para romper la testa de la semilla.

## Análisis genético del número de insertos T-DNA

Tras analizar 62 plantas TG2, los resultados indicaron que no había motivos para dudar de que la línea 1317 ET MM porte un único inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional (Tabla 31).

**Tabla 31.** Análisis del número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional de la línea 1317 ET MM.

	Segregación	Kan <sup>R</sup>	Kan <sup>S</sup>	Total	$\chi^2$
<b>Experimento 1</b>	Observada	20	4	24	0.88
	Esperada (3:1)	18.0	6.0		
<b>Experimento 2</b>	Observada	32	6	38	1.71
	Esperada (3:1)	28.5	9.5		
<b>Datos acumulados</b> <sup>a</sup>	Observada	52	10	62	2.60
	Esperada (3:1)	46.5	15.5		

<sup>a</sup> Análisis  $\chi^2$  homogeneidad ( $\chi^2_{H} = 0.01$ ) indica que la muestras son homogéneas ( $P > 0.05$ ;  $\chi^2_{1 \text{ g.l.}} = 3.84$ )

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

Tras el análisis de cosegregación de un inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional y el fenotipo mutante en la línea 1317 ET MM se comprobó que no había asociación entre ambos, ya que se detectaron dos plantas mutantes sensibles a la kanamicina (Tabla 32).

**Tabla 32.** Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 1317 ET MM.

	WT		M		Total
	Kan <sup>R</sup>	Kan <sup>S</sup>	Kan <sup>R</sup>	Kan <sup>S</sup>	
<b>Experimento 1</b>	17	3	3	1	24
<b>Experimento 2</b>	29	5	3	1	38
<b>Datos acumulados</b>	46	8	6	2	62

En esta línea ya se ha realizado el cruce de una planta mutante sensible a la kanamicina con *Solanum pimpinellifolium* y se dispone de la población F2 de dicho cruce. Se han podido identificar plantas con el fenotipo mutante en dicha población y ya se dispone del material necesario para abordar la identificación del gen mutado mediante técnicas de genotipado por secuenciación.

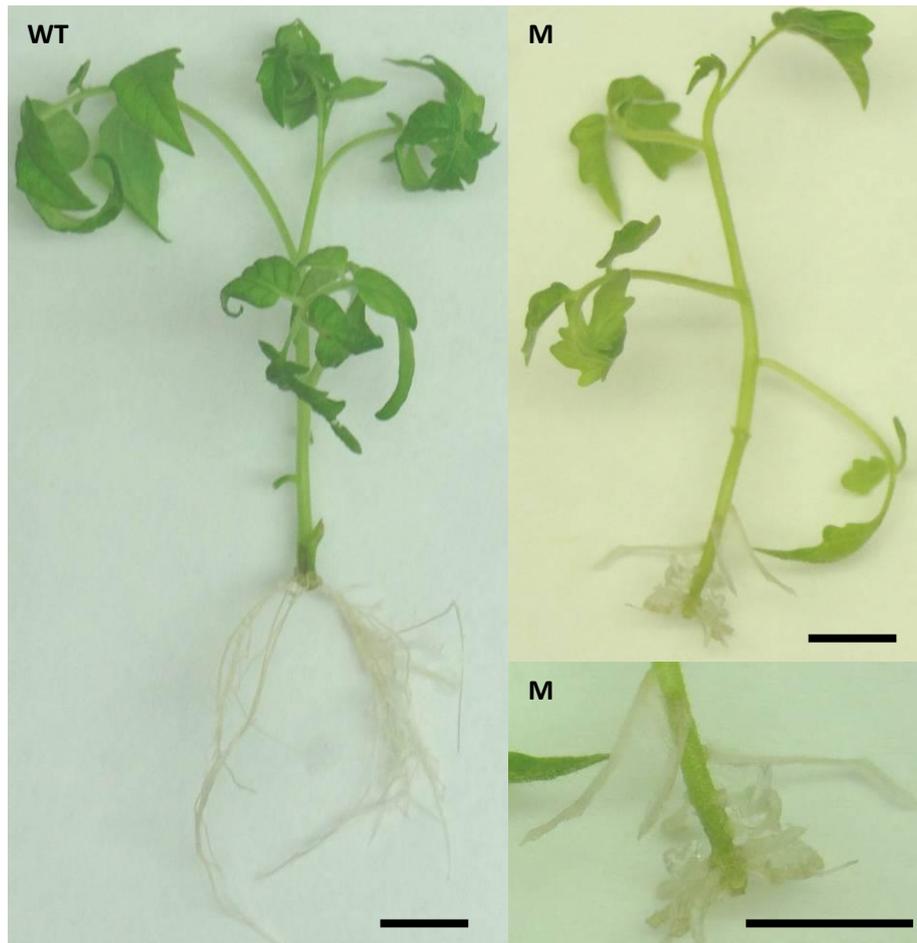
#### 4.1.2.5.- Mutante 1862 ET MM

Este mutante se detectó al ver que los cotiledones de algunas plántulas procedentes de semillas TG2 tenían un color clorótico en medio de germinación. Las plántulas mutantes desarrollaron la raíz principal de forma normal, sin embargo, no desarrollaban raíces secundarias, como lo hacían las plantas WT, a los 7 días de estar cultivadas en medio de germinación (Figura 62).



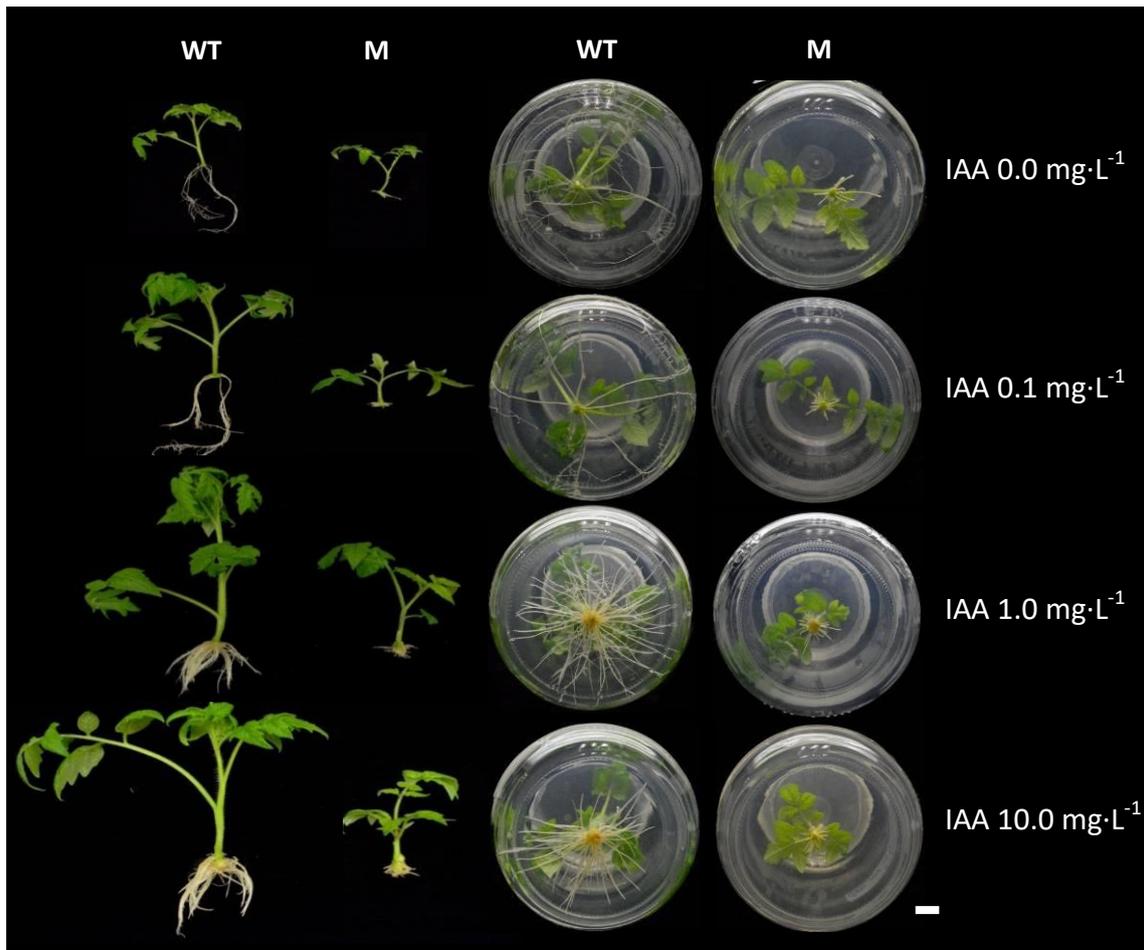
**Figura 62.** Fenotipo de plántulas procedentes de semillas de la línea 1862 ET MM tras 7 días de cultivo en medio de germinación. La barra representa 1 cm.

Tras el cultivo de los ápices de plantas axénicas en medio de enraizamiento, las plantas mutantes presentaron alteraciones en el desarrollo de las raíces adventicias. Mientras que las plantas WT generaban raíces adventicias en la base y, posteriormente, generaban raíces secundarias y terciarias, las plantas mutantes formaron raíces adventicias primarias más cortas, de mayor grosor, y sin raíces secundarias (Figura 63).



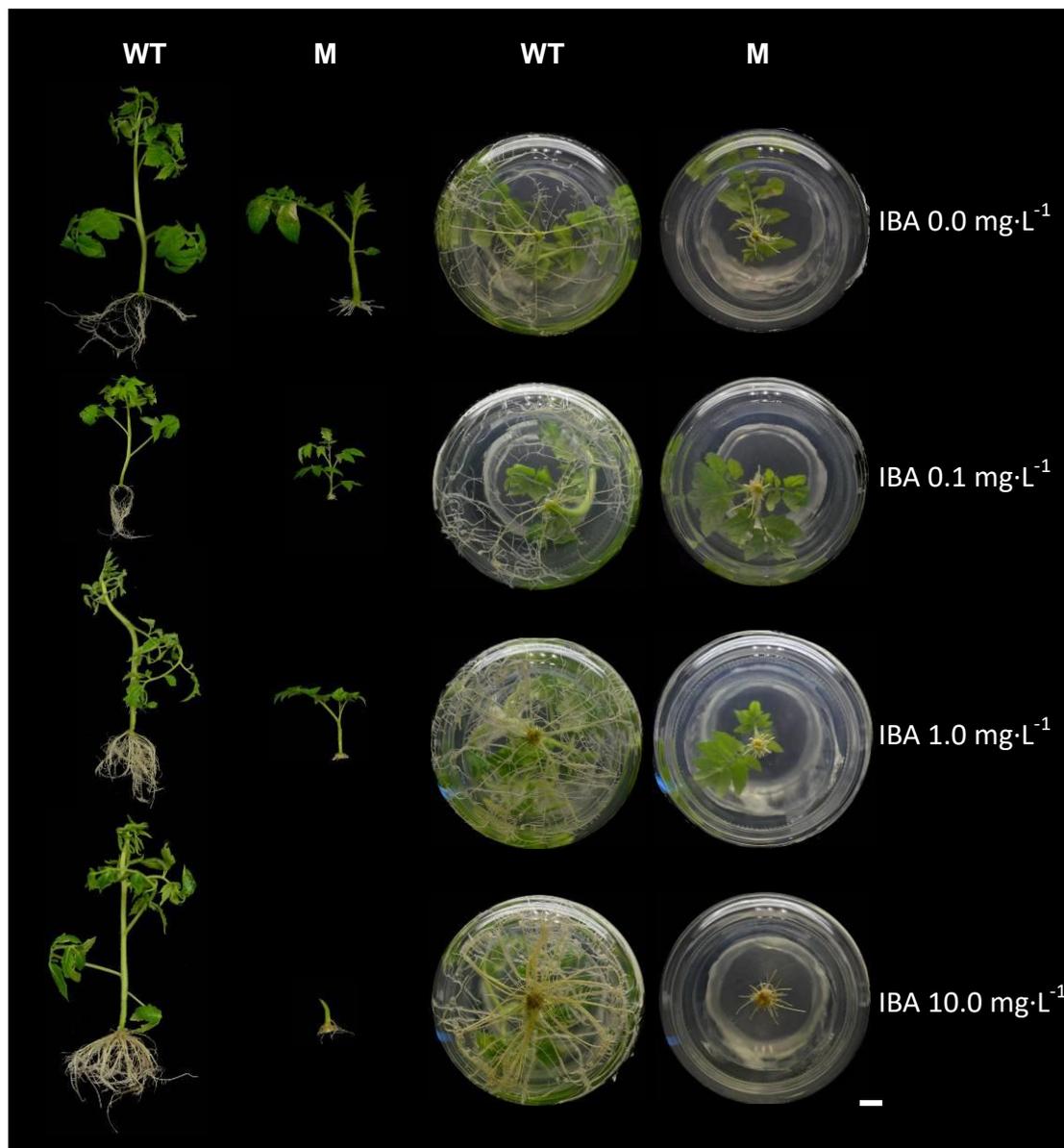
**Figura 63.** Fenotipo de plantas axénicas procedentes del cultivo de ápices meristemáticos de la línea 1862 ET MM tras 15 días de cultivo en medio básico. La barra representa 1 cm.

Para ver si este comportamiento estaba relacionado con un posible déficit en auxinas endógenas, se diseñó un experimento en el que se cultivaban ápices meristemáticos de plantas WT y mutantes en medios con diferentes tipos y concentraciones de auxinas naturales. Las plantas WT presentaron una masa radicular mayor cuando se aumentó la concentración de la hormona. A concentraciones de IAA  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $10.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  se observó mayor cantidad de raíces adventicias y aumento en el desarrollo vegetativo de la parte aérea, probablemente como consecuencia de lo anterior. Se observó que, a las concentraciones de IAA utilizadas, las plantas mutantes presentaban un enraizamiento adventicio claramente menor que el de las WT (Figura 64).



**Figura 64.** Fenotipo de plantas axénicas procedentes del cultivo de ápices meristemáticos de la línea 1862 ET MM tras 30 días de cultivo en medios con diferentes concentraciones de ácido indolacético. La barra representa 1 cm.

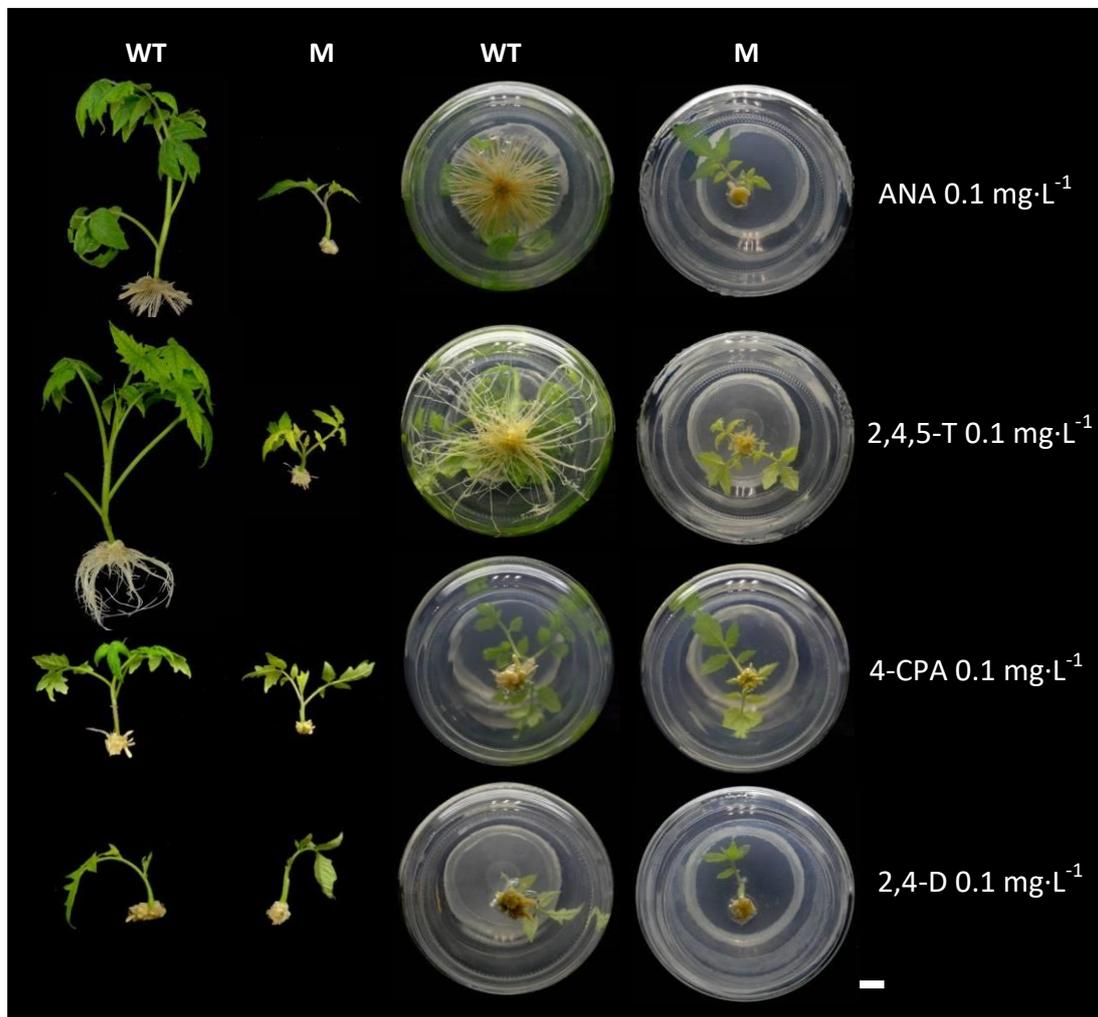
También se observó que, en todas las concentraciones de IBA utilizadas, las plantas mutantes tenían un enraizamiento diferente de las plantas WT. Los ápices meristemáticos procedentes de plantas WT cultivados en estos medios presentaban una masa radicular mayor a medida que se aumentaba la concentración de la hormona. En las plantas mutantes se observó un cierto aumento en el número de raíces formadas a concentraciones de IBA 1.0 mg·L<sup>-1</sup> y 10.0 mg·L<sup>-1</sup>. En estas condiciones las plantas tenían un mayor desarrollo vegetativo de la parte aérea, lo cual puede estar relacionado con la producción de una mayor masa radicular pero, en ningún caso, la longitud de las raíces mutantes alcanzó a las que se forman en los ápices WT (Figura 65).



**Figura 65.** Fenotipo de plantas axénicas procedentes del cultivo de ápices meristemáticos de la línea 1862 ET MM tras 30 días de cultivo en medios con diferentes concentraciones de ácido indolbutírico. La barra representa 1 cm.

Tras estos experimentos se cultivaron ápices meristemáticos de plantas WT y mutantes en medios suplementados con diferentes tipos de auxinas de síntesis. No se observó un enraizamiento de las plantas mutantes que se pareciera a las WT en ninguno de los medios suplementados con estas hormonas. Las plantas mutantes que se cultivaron en medio básico suplementado con ANA ( $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) formaron un callo desorganizado mientras

que las plantas WT cultivadas en estas condiciones tuvieron la capacidad de generar raíces adventicias y crecer de manera normal. Sin embargo, hubo un cierto enraizamiento adventicio en las plantas mutantes cultivadas con 2,4,5-T ( $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). De hecho, las plantas WT cultivadas en este medio también desarrollaron un buen sistema radicular. Las plantas WT y mutantes que se cultivaron en medios con 4-CPA y 2,4-D ( $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) sólo formaron un callo desorganizado del que, en algunas plantas WT, surgían algunas pequeñas raíces adventicias (Figura 66).



**Figura 66.** Fenotipo de plantas axénicas procedentes del cultivo de ápices meristemáticos de la línea 1862 ET MM tras 30 días de cultivo en medios con distintos tipo de auxinas. La barra representa 1 cm.

Se diseñó un nuevo experimento para comprobar si el fenotipo identificado *in vitro* se observaría también en condiciones de cultivo *in vivo*. Tras la siembra de semillas TG2 de esta línea en macetas con fibra de coco, se vio que los cotiledones de las plantas mutantes presentaban una clorosis similar a la observada en el medio de germinación (Figura 67).



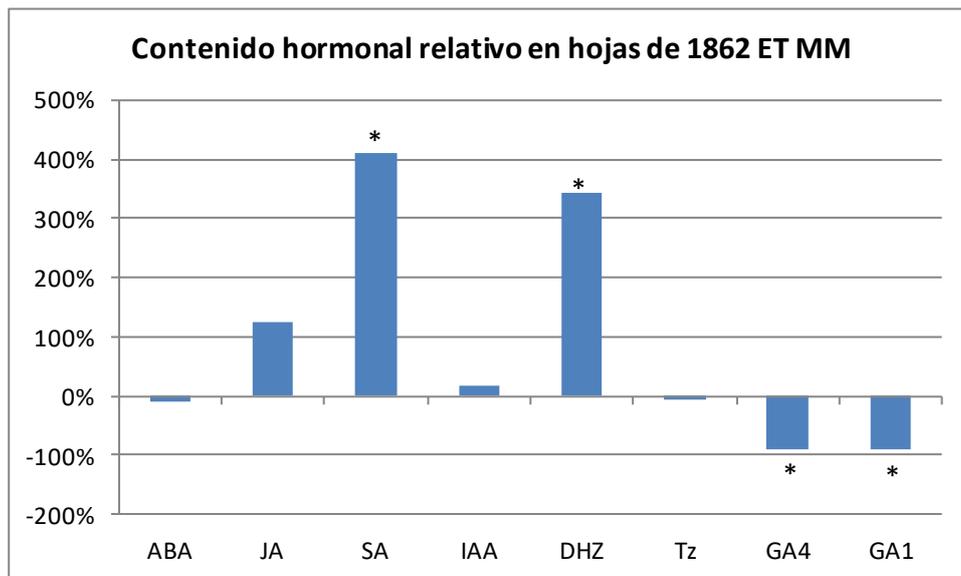
**Figura 67.** Fenotipo de plántulas procedentes de semillas de la línea 1862 ET MM tras 7 días de cultivo en el invernadero. La barra representa 1 cm.

A los quince días de cultivo la clorosis de los cotiledones en las plantas mutantes se vio menos e iban adquiriendo una coloración verde. Por otra parte, desde las primeras etapas de su desarrollo, se observó que el crecimiento de la parte aérea de las plantas mutantes era más lento en comparación con las plantas WT. El sistema radicular de las plantas mutantes se encontraba también alterado en estas condiciones. Aunque las plantas mutantes tenían la capacidad de formar raíces secundarias a partir de la raíz principal, todo el sistema radicular se encontraba menos desarrollado comparado con el de las plantas WT (Figura 68).



**Figura 68.** Fenotipo de plántulas procedentes de semillas de la línea 1862 ET MM tras 15 días de cultivo en el invernadero. La barra representa 1 cm.

En este mutante se analizó el contenido hormonal endógeno. Se representa el contenido relativo de las hormonas analizadas respecto de su testigo correspondiente. En este caso, el mutante tenía un mayor contenido de la citoquinina DHZ (triplica el contenido de las plantas WT) y del ácido salicílico (cuadruplicando el contenido de las plantas WT). Por otra parte, también se observó una reducción de ambas giberelinas analizadas (GA1 y GA4) respecto del contenido de las plantas WT (Figura 69).



**Figura 69.** Contenido hormonal endógeno en las hojas de plantas mutantes de la línea 1862 ET MM. Se representa la diferencia relativa de cada hormona analizada del mutante respecto del cv. Money Maker  $((M-WT)/WT)$ . El asterisco representa que existe diferencia significativa (test t:  $P < 0,05$ ) entre la media de la concentración del WT y del mutante.

Se procedió a realizar injertos utilizando como parte aérea y parte radicular a plantas mutantes y plantas WT en todas las combinaciones posibles. De esta forma se pudo establecer la influencia que tiene la parte radicular o la parte aérea sobre el fenotipo mutante. Se observó una reducción en la altura total de la planta en todas las combinaciones en que el injerto tenía al menos una parte procedente de plantas mutantes, bien sea la parte aérea, la parte radicular o ambas (Figura 70).



**Figura 70.** Fenotipo de plantas injertadas y cultivadas en el invernadero durante 45 días de la línea 1862 ET MM. El injerto se representa como un cociente en el que el numerador es el genotipo de la parte aérea y el denominador el genotipo de la parte radicular. La barra representa 5 cm.

Esto indica que el fenotipo de este mutante está causado tanto por alteraciones de la parte aérea de la planta (ver comparación entre WT / WT y M / WT) como de la parte radicular (ver comparación entre (WT / WT y WT / M). Además, parece que esos efectos no son aditivos ya que el desarrollo de M / M no difiere mucho del que se observa en WT / M o M / WT.

### **Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante**

El fenotipo mutante se vio en los cinco experimentos realizados. Al realizar la prueba de la  $\chi^2$  en cada uno de los experimentos para una hipótesis de una mutación monogénica recesiva (3 plantas WT por cada planta mutante) nos

indicó que no había motivos para dudar de esta hipótesis. Tras comprobar que las muestras eran homogéneas mediante la  $\chi^2$  de homogeneidad y realizar el análisis de los datos acumulados ( $\chi^2$  datos acumulados), la  $\chi^2$  para una segregación 3 plantas WT por cada mutante se desvía ligeramente debido a que al sumar los datos se vio un número menor de plantas mutantes con respecto a las esperadas (41 observadas vs 53.5 esperadas). A pesar de ello, se podría decir que la naturaleza de la mutación en la línea 1862 ET MM es monogénica recesiva (Tabla 33).

**Tabla 33.** Análisis del modo de herencia del mutante 1862 ET MM.

	Segregación	WT	M	Total	$\chi^2$
<b>Experimento 1</b>	Observada	18	6	24	0.00
	Esperada (3:1)	18.0	6.0		
<b>Experimento 2</b>	Observada	55	13	68	1.25
	Esperada (3:1)	51.0	17.0		
<b>Experimento 3</b>	Observada	40	8	48	1.77
	Esperada (3:1)	36.0	12.0		
<b>Experimento 4</b>	Observada	44	7	51	3.45
	Esperada (3:1)	38.3	12.7		
<b>Experimento 5</b>	Observada	16	7	23	0.36
	Esperada (3:1)	17.3	5.7		
<b>Datos acumulados</b> <sup>a</sup>	Observada	173	41	214	3.89
	Esperada (3:1)	160.5	53.5		

<sup>a</sup> Análisis  $\chi^2$  homogeneidad ( $\chi^2_H = 2.96$ ) indica que la muestras son homogéneas ( $P > 0.05$ ;  $\chi^2_{4 g. l.} = 9.49$ )

Lo que podría explicar la desviación de los datos esperados con respecto a los observados para la clase mutante sería que existe un cierto grado de subletalidad asociada a este fenotipo, lo cual daría como resultado una disminución del número de plantas con el fenotipo mutante. También, se debe tener en cuenta que la alteración en el desarrollo radicular puede provocar una reducción en la capacidad de germinación, posiblemente debido a que la raíz embrionaria en los mutantes tenga más dificultades en romper la testa de la semilla.

### **Análisis genético del número de insertos T-DNA**

En cuanto a la resistencia a la kanamicina, se observó que la línea 1862 ET MM no era portadora de un único inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional ( $\chi^2$

DA (3:1) = 56.23 > 3.84<sub>1 g. l. (5%)</sub>). Por lo tanto se realizó un ajuste de la  $\chi^2$  en todos los experimentos para dos hipótesis. Si la línea portaba dos insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional, se observaría una segregación de 15 plantas resistentes a la kanamicina por cada planta sensible (15 Kan<sup>R</sup>: 1 Kan<sup>S</sup>). La otra hipótesis es que la línea portaba tres insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional, en cuyo caso se observaría una segregación de 63 plantas resistentes a la kanamicina por cada planta sensible (63 Kan<sup>R</sup>: 1 Kan<sup>S</sup>). Los resultados de la  $\chi^2$  en cada uno de los experimentos individuales nos indicaron que se podrían aceptar ambas hipótesis. Sin embargo, tras comprobar que las muestras son homogéneas y realizar la prueba de la  $\chi^2$  de datos acumulados, los resultados sugieren que hay motivos para dudar de una hipótesis para dos insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional ( $\chi^2$  DA (15:1) = 4.34 > 3.84<sub>1 g. l. (5%)</sub>), pero no para una hipótesis donde haya tres ( $\chi^2$  DA (63:1) = 2.14 < 3.84<sub>1 g. l. (5%)</sub>) (Tabla 34).

**Tabla 34.** Análisis del número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional de la línea 1862 ET MM.

	Segregación	Kan <sup>R</sup>	Kan <sup>S</sup>	Total	$\chi^2$
<b>Experimento 1</b>	Observada	23	1		
	Esperada (15:1)	22.5	1.5	24	0.18
	Esperada (63:1)	23.6	0.4		1.06
<b>Experimento 2</b>	Observada	65	3		
	Esperada (15:1)	63.8	4.2	68	0.39
	Esperada (63:1)	67.0	1.0		3.59
<b>Experimento 3</b>	Observada	48	0		
	Esperada (15:1)	45.0	3.0	48	3.20
	Esperada (63:1)	47.3	0.7		0.76
<b>Experimento 4</b>	Observada	49	2		
	Esperada (15:1)	47.8	3.2	51	0.47
	Esperada (63:1)	50.2	0.8		1.85
<b>Experimento 5</b>	Observada	23	0		
	Esperada (15:1)	21.5	1.5	23	1.63
	Esperada (63:1)	22.6	0.4		0.37
<b>Datos acumulados<sup>a</sup></b>	Observada	208	6		
	Esperada (15:1)	200.6	13.4	214	4.34
	Esperada (63:1)	210.7	3.3		2.14

<sup>a</sup> Análisis  $\chi^2$  homogeneidad indica que la muestras son homogéneas, para una segregación 15:1 (1.53) y 63:1 (5.48) (P>0.05;  $\chi^2$  4 g. l. = 9.49).

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

Para comprobar si alguno de los tres insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional es el responsable de la mutación se decidió cultivar 15 plantas TG2 de fenotipo WT resistentes a la kanamicina con el objetivo de segregar los insertos T-DNA y detectar una línea TG3 en la que se observe el fenotipo mutante y tenga uno o dos insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional. Tras el análisis de las progenies TG3 se detectó una en la cual se observó la mutación y segregaba para dos insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional. Sin embargo, en esta línea se detectó una planta mutante que es sensible al antibiótico. Con este resultado y tras corroborar la ausencia de resistencia a la kanamicina, podemos concluir que ninguno de los tres insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional presentes en la línea 1862 ET MM es el responsable de la mutación.

Dado el interés de este mutante se ha analizado molecularmente para ver si la mutación pudiera estar causada por un inserto parcial del T-DNA o por la inserción de un fragmento del cuerpo del vector. Para ello se ensayó una batería de PCR's con amplicones que abarcan siete secuencias el T-DNA y 14 del cuerpo del vector (Figura 6). Se realizaron estas pruebas en una planta con fenotipo mutante y sensible a la kanamicina. Todas las pruebas PCR fueron negativas por lo que lo más probable es que esta mutación no esté causada por ningún fragmento de T-DNA ni del cuerpo del vector. Por tanto, pensamos que la mutación observada en esta línea es de naturaleza somaclonal.

Al no haber identificado ningún fragmento de ADN de secuencia conocida que nos permita abordar la clonación del gen afectado mediante Anchor-PCR, debemos utilizar otro abordaje para lograr la identificación y clonación de dicho gen. En estos casos la metodología a seguir consiste en cruzar una planta mutante con *Solanum pimpinellifolium* e identificar plantas mutantes y WT entre las plantas de la población F2 de ese cruce. Tras la secuenciación de estas plantas se puede acotar la región cromosómica en la que se encuentra el gen alterado.

#### **4.1.3.- Identificación y caracterización de mutantes con fenotipo de muerte celular y necrosis**

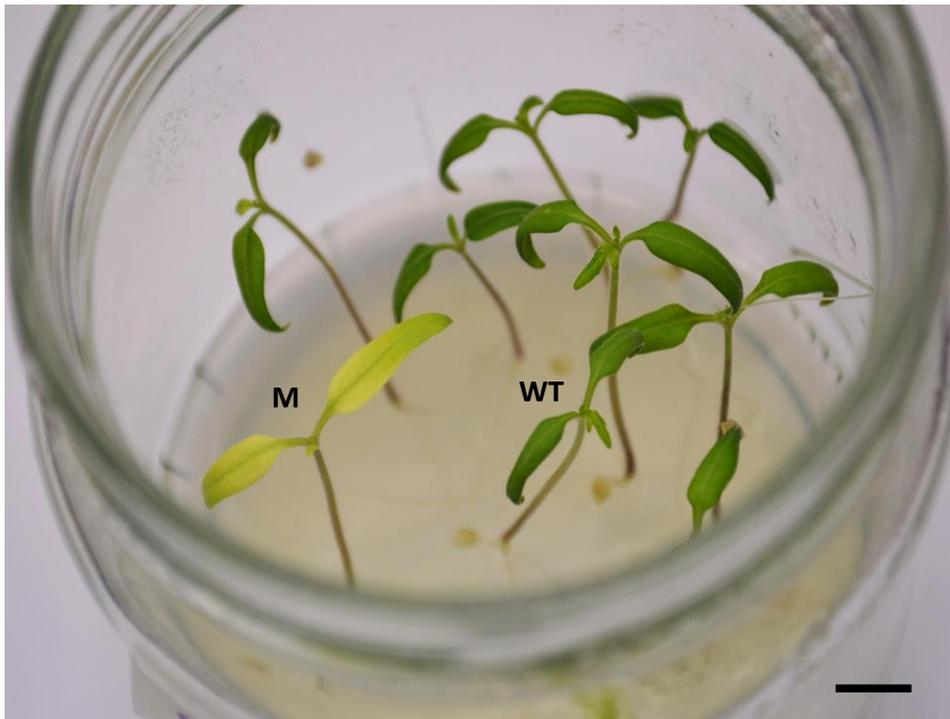
La muerte celular programada es un mecanismo que las plantas han desarrollado para afrontar diversas etapas de su desarrollo (e. g.: embriogénesis, morfogénesis foliar, desarrollo del fruto, etc.) al igual que para defenderse de factores adversos (e. g.: ataque de patógenos) a lo largo de su vida. Cuando las plantas son atacadas por hongos o bacterias, se inician una amplia gama de respuestas, dentro de las cuales está la muerte celular programada para detener el avance de los patógenos. Existen, en diversas especies de plantas, los mutantes *lesion mimic mutants* que exhiben manchas espontáneas en las hojas en ausencia de estrés que son similares a las lesiones causadas por la infección de patógenos. Actualmente, se han mapeado y clonado varios genes gracias a la identificación de mutantes *lesion mimic mutant* (Collins *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 2003; Wang *J. J.*, 2004; Zeng *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005; Qiao *et al.*, 2010). Debido a las grandes pérdidas en la producción en el cultivo del tomate provocadas por el ataque de patógenos, la búsqueda de nuevas fuentes de resistencia es una constante muy importante en el mundo de la mejora genética del tomate cultivado y la detección de genes que controlan este tipo de respuestas es prioritario para desarrollar variedades élite con una mejor respuesta a estos problemas.

En el presente Trabajo de Tesis doctoral se han identificado cuatro líneas que presentan un fenotipo de muerte celular y necrosis. De las cuatro líneas identificadas, en dos de ellas (1421 ET MM y 2142 ET MM) la muerte celular no permite el desarrollo de las plantas que portan la mutación, lo que ocasiona su colapso y muerte. Por otro lado, en las líneas 2477 ET MM y 1512 ET MM, la plantas presentan necrosis foliar aunque pudieron continuar con su crecimiento de forma similar al WT. Se comprobó que los fenotipos identificados en condiciones de cultivo *in vitro* se reproducen cuando se cultivan en invernadero. Además, se realizó en análisis genético de las mutaciones al igual que se analiza el número de insertos T-DNA y la cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante. Tras el análisis de cosegregación, se determinó que

en tres líneas (1421 ET MM, 1512 ET MM, 2142 ET MM) no existe, mientras que en la otra (2477 ET MM) se ha comprobado la existencia de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante y se ha llegado a la clonación de un gen candidato.

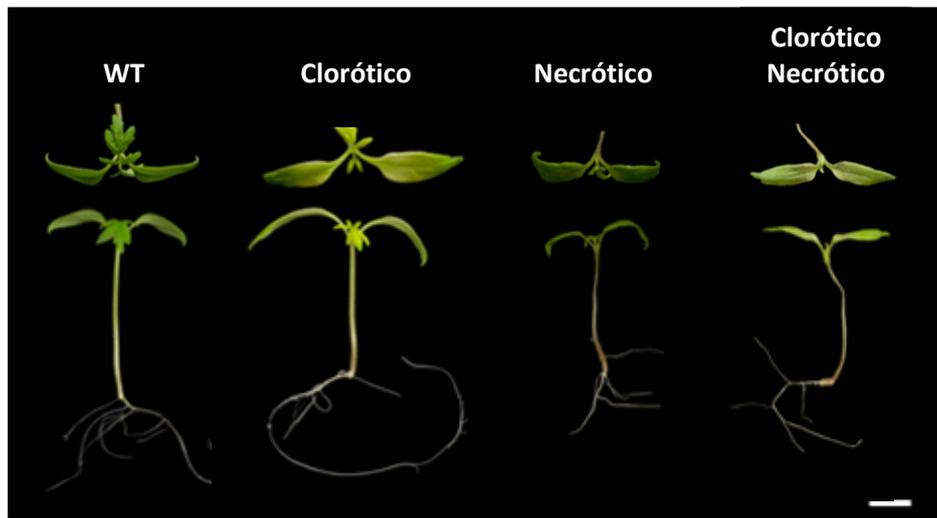
#### 4.1.3.1- Mutante 1421 ET MM

Cuando se cultivó por primera vez este mutante se comprobó que, incluso antes de obtener los explantes de cotiledón, ya se observaban dos fenotipos, el WT y otro que denominamos clorótico por tener las plántulas un color más amarillento (Figura 71).

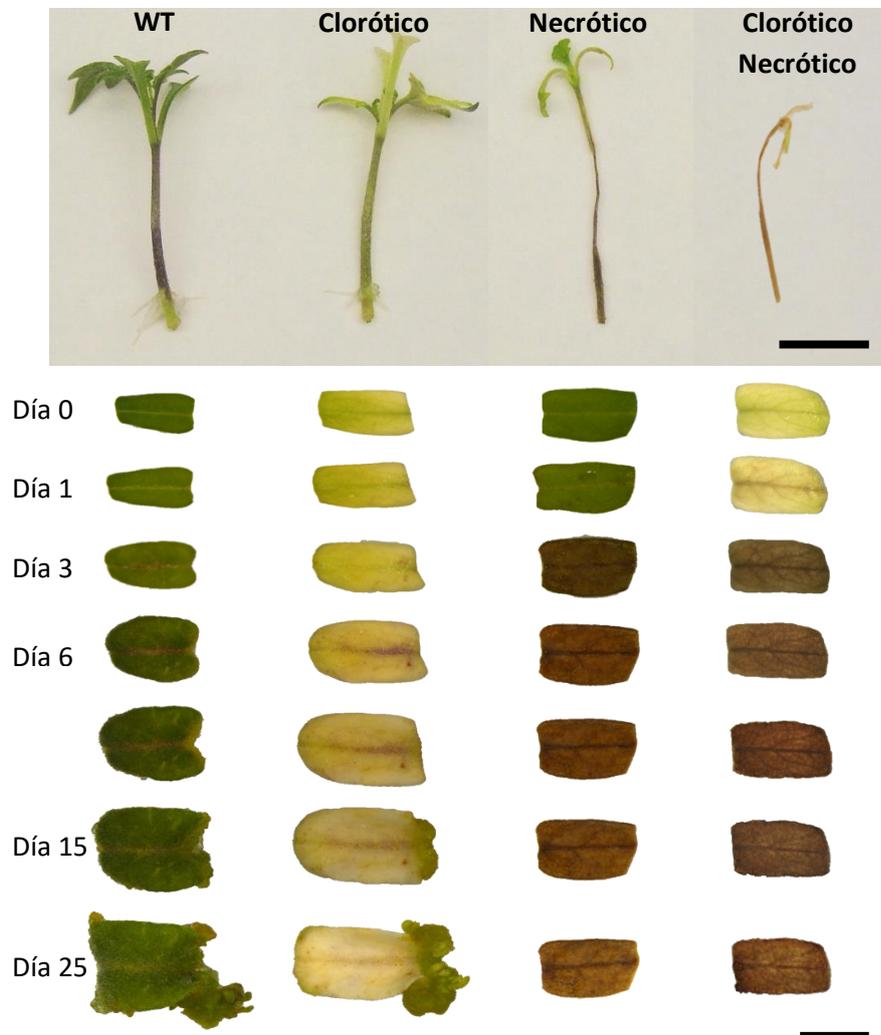


**Figura 71.** Fenotipo de plántulas procedentes de semillas de la línea 1421 ET MM tras 7 días de cultivo en medio de germinación. La barra representa 1 cm.

Al transcurrir diez días de cultivo en medio de germinación, se observaron dos clases fenotípicas más. Entre las plantas que eran de fenotipo WT hasta ese momento, se observó una mutación que causaba la necrosis de las plantas empezando por el cuello del tallo, posteriormente se veía como el hipocótilo se iba necrosando lo cual provocó que las plantas se doblaran y no pudieran continuar con su crecimiento. A esta clase se le llamó, mutación necrótica. La cuarta clase combinaba dos aspectos fenotípicos, clorosis y necrosis, se denominó clorótica-necrótica (Figura 72).



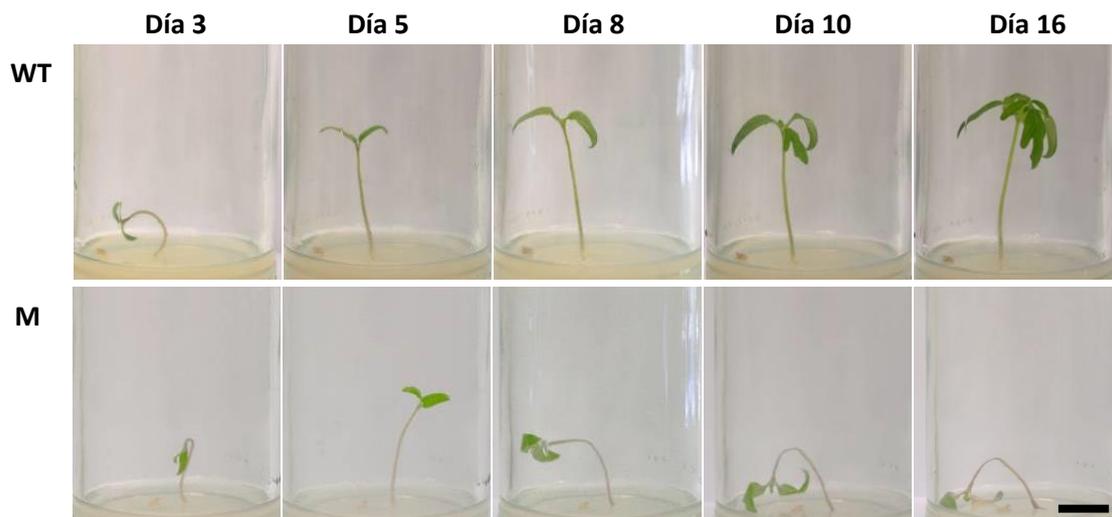
**Figura 72.** Fenotipo de plántulas procedentes de semillas de la línea 1421 ET MM tras 10 días de cultivo en medio de germinación. La barra representa 1 cm.



**Figura 73.** Fenotipo de ápices meristemáticos tras 5 días de cultivo en medio de enraizamiento y de explantes de cotiledón cultivados en medio organogénico de la línea 1421 ET MM. La barra representa 1 cm.

A los pocos días de cultivar los ápices meristemáticos de las plantas que portaban la mutación necrótica (fenotipo necrótico y clorótico-necrótico) no se desarrollaron ya que la respuesta necrótica provocó el colapso de las plantas axénicas. En cuanto a los cotiledones de estas plantas, se observó también cierta necrosis que, de forma sistemática, terminó con el colapso del explante (Figura 73).

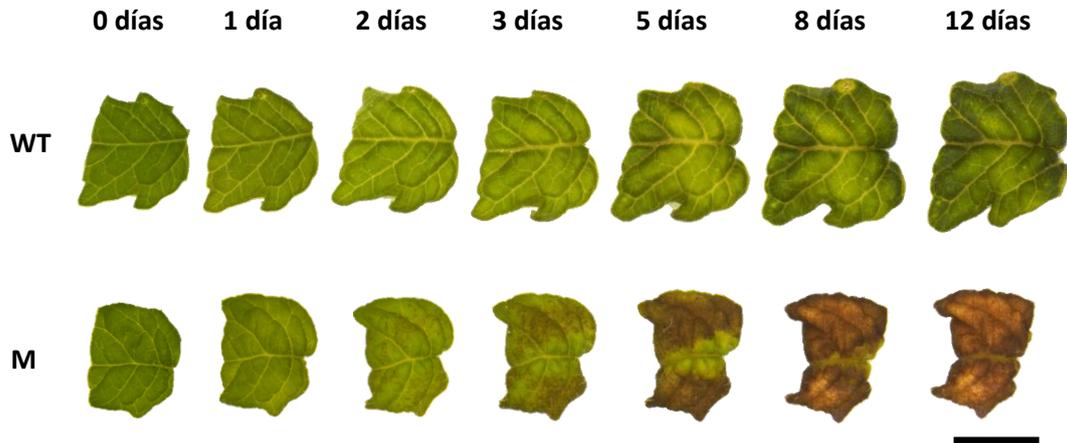
Se realizó el seguimiento del desarrollo de las plantas que portaban la mutación necrótica y se comprobó que a los ocho días de su siembra en medio de enraizamiento ya se vía la marchitez en el hipocótilo y las plantas no podían seguir erectas como las WT, a los 16 días de cultivo las plantas se marchitaron por completo (Figura 74).



**Figura 74.** Fenotipo de plántulas procedentes de semillas de la línea 1421 ET MM tras la siembra en medio de enraizamiento. La barra representa 1 cm.

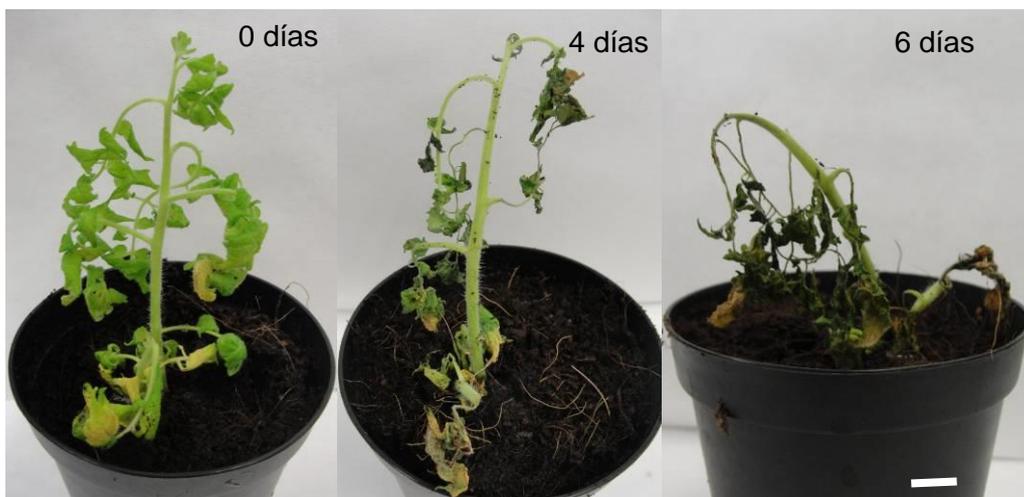
Sin embargo, una de las plantas necróticas pudo continuar con su crecimiento y se pudieron tomar explantes de foliolo para ver si la alteración que causa la necrosis de los cotiledones también se veía en los foliolos. Se corroboró que el fenotipo observado en los cotiledones se repite en explantes de foliolo de hoja. Los foliolos se veían normales sólo el primer día de cultivo, pero a los tres días

se empezaron a observar ciertas zonas necróticas y a los cinco días ya era evidente la necrosis. A los 12 días los explantes se tornaron necróticos (Figura 75).



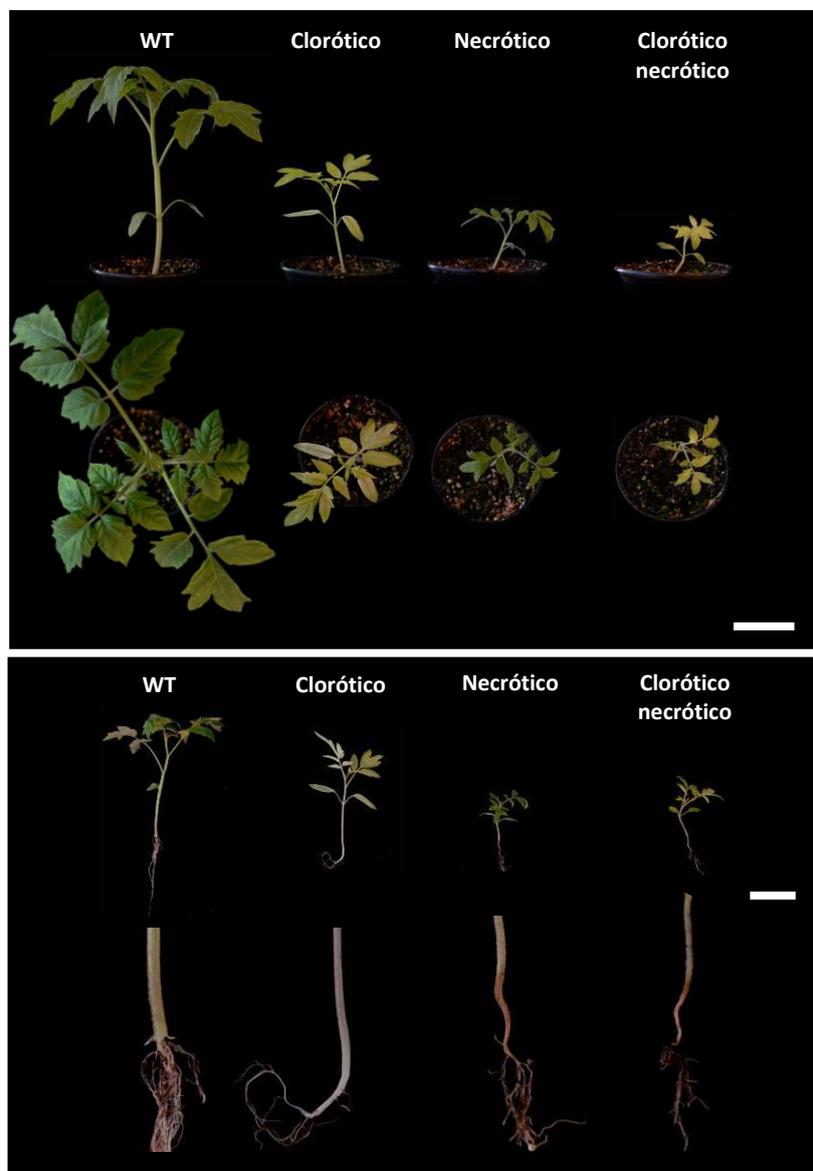
**Figura 75.** Fenotipo de explantes de hoja de la línea 1421 ET MM tras su cultivo en medio organogénico. La barra representa 1 cm.

Tras haber conseguido que una de las plantas que portaba la mutación necrótica creciera con cierta normalidad en condiciones *in vitro*, se decidió aclimatarla para obtener progenies TG3. Por desgracia, cuatro días después de ser aclimatada la planta ya presentaba síntomas muy notorios de marchitez y a los seis días la planta se marchitó por completo y colapsó (Figura 76).



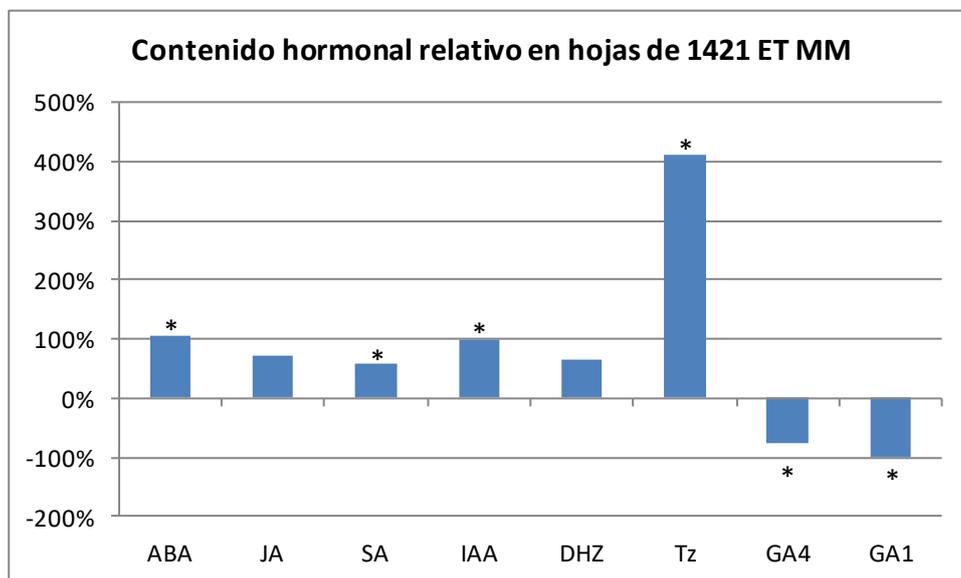
**Figura 76.** Fenotipo de una planta axénica de la línea 1421 ET MM con fenotipo necrótico tras su aclimatación. La barra representa 1 cm.

El siguiente experimento se diseñó para tratar de ver si los fenotipos vistos *in vitro* se observaban también en condiciones de cultivo *in vivo*. Tras la siembra de nuevas semillas, se comprobó que *in vivo* se identificaban los mismos fenotipos. Al analizar el desarrollo de estas plántulas se corroboró que el tamaño de las plantas WT era superior al de fenotipo clorótico, que a su vez era claramente mayor al de las plantas con fenotipo necrótico y clorótico-necrótico. Además, se observó un fenómeno similar al visto *in vitro* ya que apareció cierta necrosis en la parte baja del hipocótilo que impedía el buen desarrollo de las plantas con este fenotipo (Figura 77).



**Figura 77.** Fenotipo de plántulas procedentes de semillas de la línea 1421 ET MM tras 25 días de cultivo en el invernadero. La barra representa 5 cm.

En este mutante se ha analizado el contenido hormonal endógeno de hojas de plantas WT y de fenotipo necrótico. Se representa el contenido relativo de las hormonas analizadas respecto de su testigo correspondiente. En este caso, varias de las hormonas analizadas presentan valores que diferían de forma significativa entre las plantas WT y las mutantes necróticas. Entre ellas resulta interesante que la trans-zeatina presenta valores en los mutantes que cuadruplican los observados en los correspondientes testigos. Por otra parte, las dos giberelinas analizadas presentan una menor concentración en las hojas de las plantas mutantes (Figura 78).



**Figura 78.** Contenido hormonal endógeno en las hojas de plantas mutantes de la línea 1421 ET MM. Se representa la diferencia relativa de cada hormona analizada del mutante respecto del cv. Money Maker ((M-WT)/WT). El asterisco representa que existe diferencia significativa (test t:  $P < 0,05$ ) entre la media de la concentración del WT y del mutante.

### Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante

Las mutaciones clorótica y necrótica se observaron en los cuatro experimentos realizados. El análisis de homogeneidad indicó que las muestras eran homogéneas. Se realizó el análisis de la prueba de la  $\chi^2$  para una hipótesis de dos mutaciones independientes recesivas, en donde la planta que presentaba el fenotipo clorótico-necrótico era portadora de ambas mutaciones en homocigosis. El resultado del análisis de los datos acumulados ( $\chi^2$  datos

acumulados) nos indicó que no había motivos para dudar de que la línea 1421 ET MM tiene dos mutaciones independientes mongénicas recesivas (Tabla 35).

**Tabla 35.** Análisis del modo de herencia del mutante 1421 ET MM.

	Segregación	WT	M (Clo.)	M (Nec.)	M (Clo.-Nec.)	Total	$\chi^2$
<b>Experimento 1</b>	Observada	13	5	6	0	24	2.07
	Esperada (9:3:3:1)	13.5	4.5	4.5	1.5		
<b>Experimento 2</b>	Observada	32	8	6	0	46	5.17
	Esperada (9:3:3:1)	26	9	9	3		
<b>Experimento 3</b>	Observada	8	4	1	1	14	1.75
	Esperada (9:3:3:1)	7.9	2.6	2.6	0.9		
<b>Experimento 4</b>	Observada	9	5	8	0	22	5.20
	Esperada (9:3:3:1)	12.4	4.1	4.1	1.4		
<b>Datos acumulados</b> <sup>a</sup>	Observada	62	22	21	1	106	5.16
	Esperada (9:3:3:1)	59.6	19.9	19.9	6.6		

<sup>a</sup> Análisis  $\chi^2$  homogeneidad ( $\chi^2_H = 7.26$ ) indica que las muestras son homogéneas ( $P > 0.05$ ;  $\chi^2_{6 g.l.} = 16.92$ )

### Análisis genético del número de insertos T-DNA

En cuanto a la resistencia a la kanamicina, se evaluó la resistencia al antibiótico de todas las plantas con fenotipo WT. Para el caso de las plantas que presentaban la mutación clorótica, no fue posible evaluar la resistencia a la kanamicina de todas las plantas ya que la mutación provocó que algunas de las plantas después de ser subcultivadas no crezcan. Se evaluaron 16 plantas con el fenotipo clorótico de las 22 detectadas. No se pudo analizar la resistencia a la kanamicina de las plantas que portaban la mutación necrótica ni la única planta que presentó las dos mutaciones (clorótica-necrótica) ya que estas plantas se necrosaban y morían. Sin embargo, la segregación que se observó en las plantas evaluadas se ajustó a una segregación 3 Kan<sup>R</sup> : 1 Kan<sup>S</sup>. Tras realizar el test la  $\chi^2$  no había motivos para dudar de que la línea 1421 ET MM cuente con un único inserto *nptII* funcional (Tabla 36).

**Tabla 36.** Análisis del número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional de la línea 1421 ET MM.

	Segregación	Kan <sup>R</sup>	Kan <sup>S</sup>	Total	$\chi^2$
Experimento 1	Observada	15	3	18	0.67
	Esperada (3:1)	13.5	4.5		
Experimento 2	Observada	25	15	40	3.33
	Esperada (3:1)	30	10		
Experimento 3	Observada	8	3	11	0.03
	Esperada (3:1)	8.3	2.7		
Experimento 4	Observada	7	2	9	0.04
	Esperada (3:1)	6.7	2.3		
Datos acumulados <sup>a</sup>	Observada	55	23	78	0.84
	Esperada (3:1)	58.5	19.5		

<sup>a</sup> Análisis  $\chi^2$  homogeneidad ( $\chi^2_H = 3.23$ ) indica que la muestras son homogéneas ( $P > 0.05$ ;  $\chi^2_{3 g.l.} = 7.82$ )

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

El análisis de cosegregación entre el único inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional detectado y alguno de los fenotipos mutantes nos indicó que dicho inserto presente en la línea 1421 ET MM no es responsable de la mutación clorótica, ya que 5 plantas con este fenotipo fueron sensibles a la kanamicina (Tabla 37).

**Tabla 37.** Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo clorótico del mutante 1421 ET MM.

	WT		M (Clo.)		M (Nec.)		M (Clo.-Nec.)		Total
	Kan <sup>R</sup>	Kan <sup>S</sup>							
Experimento 1	11	2	4	1	Nd	Nd	Nd	Nd	18
Experimento 2	20	12	5	3	Nd	Nd	Nd	Nd	40
Experimento 3	6	2	2	1	Nd	Nd	Nd	Nd	11
Experimento 4	7	2	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	9
Datos acumulados	44	18	11	5	Nd	Nd	Nd	Nd	78

Para separar las mutaciones y determinar si existe cosegregación del inserto de T-DNA con el gen *nptII* funcional y el fenotipo necrótico, se cultivaron 15 plantas TG2 con fenotipo WT resistentes a la kanamicina. Tras analizar las

progenies TG3 procedentes de 6 de estas plantas TG2 se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 38).

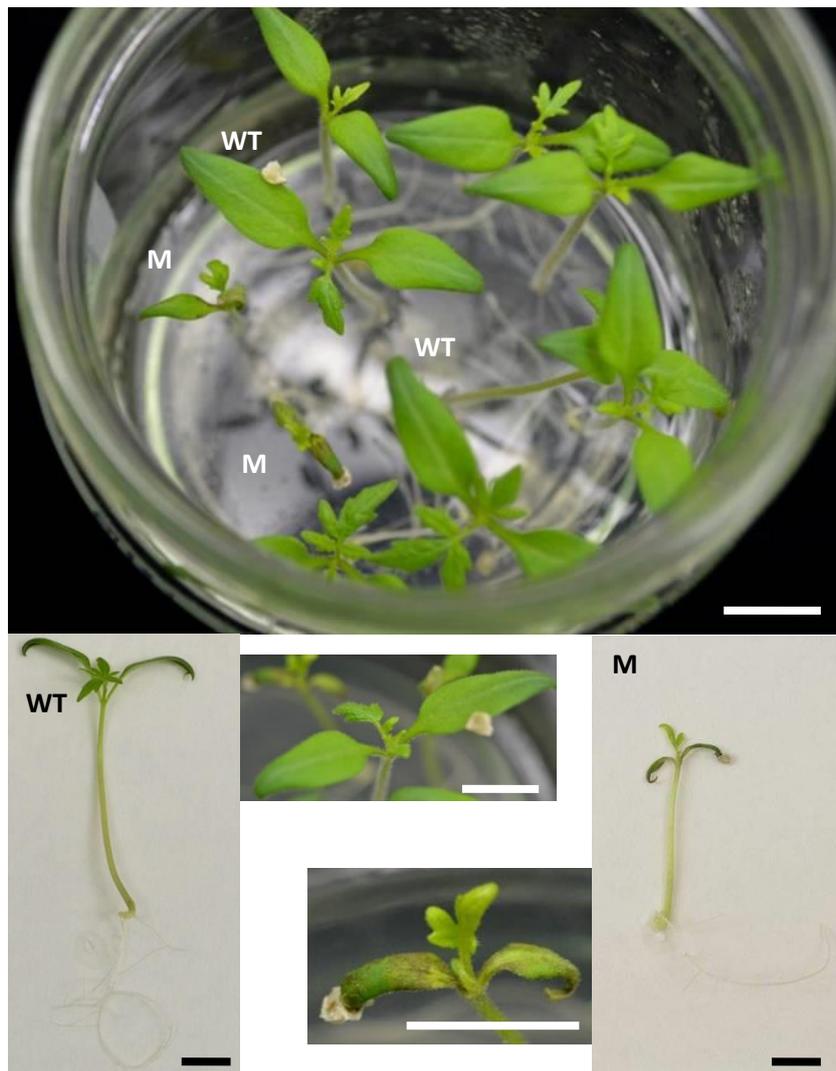
**Tabla 38.** Fenotipo y resistencia a la kanamicina de 6 progenies TG3 procedentes de plantas TG2 WT Kan<sup>R</sup> de la línea 1421 ET MM.

	WT		M (Clo.)		M (Nec.)		M (Clo.-Nec.)	
	Kan <sup>R</sup>	Kan <sup>S</sup>						
1421-18	37	12	0	0	3	2	0	0
1421-16	43	0	5	0	0	0	0	0
1421-15	37	7	3	4	2	1	0	0
1421-12	44	0	2	0	8	0	0	0
1421-6	19	9	0	0	3	0	0	0
1421-1	47	0	7	0	0	0	0	0

Se han obtenido líneas TG3 segregantes para el fenotipo clorótico en la que no se han observado plantas con el fenotipo necrótico (1421-1 y 1421-16 ET MM). De igual forma, se han obtenido dos líneas TG3 que por los fenotipos mostrados sólo portan la mutación que causa la necrosis (1421-6 y 1421-18 ET MM). Se comprobó la ausencia de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante necrótico ya que se observaron tres plantas con la mutación necrótica sensibles a la kanamicina en las líneas 1421-18 y 1421-15. Debido a las dificultades que conlleva la evaluación de la resistencia a la kanamicina en explantes procedentes de plantas con fenotipo necrótico, es conveniente confirmar esta ausencia de cosegregación de una forma diferente. Esto es posible gracias a que hay otro dato que nos indicó la ausencia de cosegregación. En las líneas 1421-1, 1421-12 y 1421-16, la resistencia a la kanamicina fue homogénea, indicando que el inserto que confiere resistencia al antibiótico se encuentra en homocigosis en las plantas TG2 correspondientes y éstas son de fenotipo WT (Tabla 38). A pesar de no haber cosegregación entre un inserto de T-DNA con el gen *nptII* funcional y ninguna de las dos mutaciones detectadas, se dispone del material necesario para seguir con la identificación de los genes alterados en ambos mutantes de forma independiente. De hecho, ya se dispone de semillas F2 del cruce con *S. pimpinellifolium*.

#### 4.1.3.2.- Mutante 2142 ET MM

Este mutante se detectó al ver que a los 10 días de cultivo en medio de germinación algunas plántulas tenían los cotiledones necrosados y no desarrollaron su parte aérea como lo hacían las plántulas WT. Las plántulas mutantes tenían un menor tamaño, menor desarrollo radicular y los cotiledones eran más pequeños en comparación con las plántulas de fenotipo WT (Figura 79).



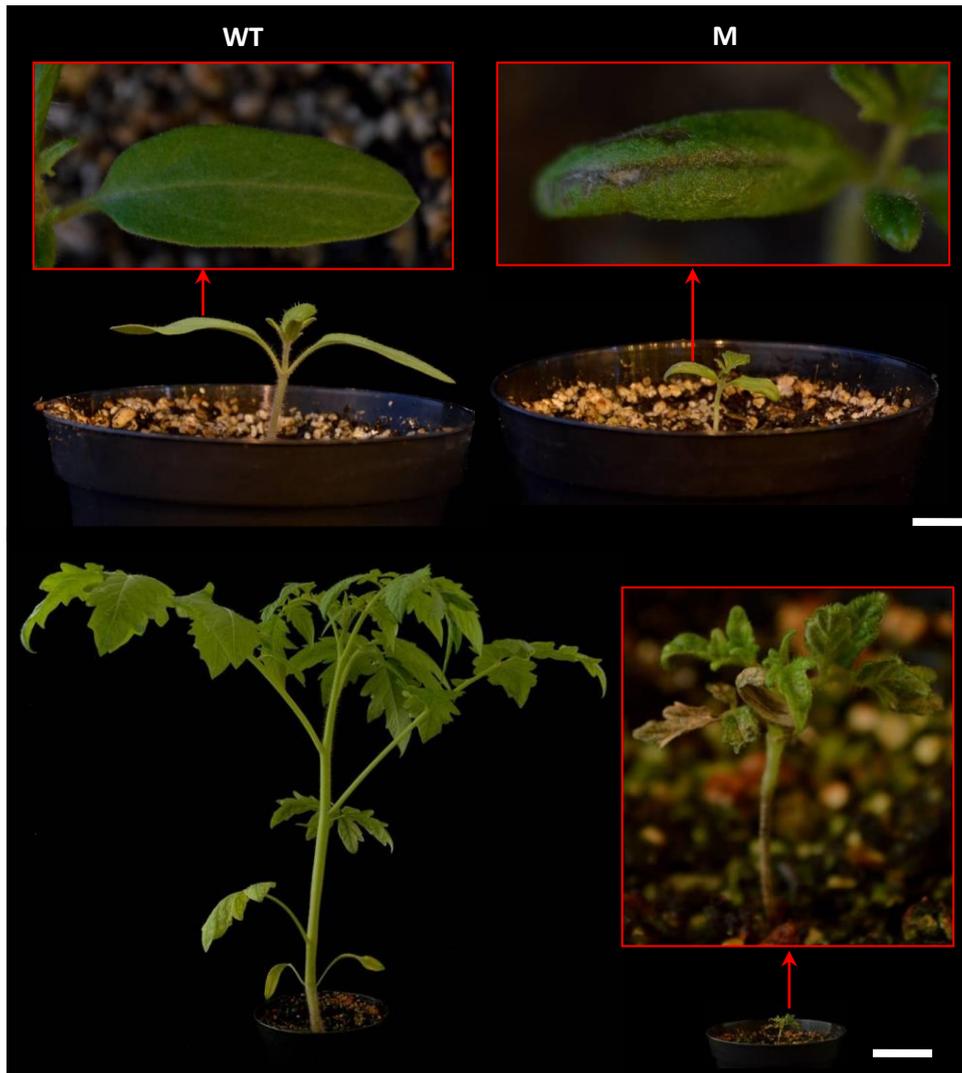
**Figura 79.** Fenotipo de plántulas procedentes de semillas de la línea 2142 ET MM tras 10 días de cultivo en medio de germinación. La barra representa 1 cm.

Tras el subcultivo de los ápices meristemáticos a medio básico, a los 25 días de cultivo, se vio que las plantas axénicas mutantes no crecieron como lo hacían las plantas WT. Además, se observó que la necrosis afectaba más a las hojas más viejas y evolucionaba de manera ascendente hacia el meristemo apical (Figura 80).



**Figura 80.** Fenotipo de plantas axénicas procedentes de ápices meristemáticos de la línea 2142 ET MM tras 25 días de cultivo en medio básico. La barra representa 1 cm.

Para ver si esta mutación se observaba en condiciones de cultivo *in vivo*, se procedió a sembrar más semillas TG2 en macetas. A los diez días de cultivo se comprobó que el fenotipo visto *in vitro* se reproduce en el invernadero. Las plántulas mutantes tenían una menor altura y necrosis de los cotiledones. A los 30 días de cultivo se vio que las plantas mutantes no continuaban con su crecimiento, los cotiledones ya estaban completamente necrosados y se observó necrosis en los folíolos más viejos. También se vio cómo la necrosis que aparece en el hipocótilo iba progresando y dejaba este tejido cada vez más afectado. Probablemente ésta es la razón por la cual las plantas mutantes no podían continuar creciendo y acaban muriendo en estas condiciones (Figura 81).



**Figura 81.** Fenotipo de plántulas procedentes de semillas de la línea 2142 ET MM tras 10 días (arriba) y 30 días (abajo) de cultivo en el invernadero. La barra representa 1 cm (arriba) y 5 cm (abajo).

### **Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante**

Se realizaron dos experimentos *in vitro* y se observó la mutación en 13 de las 63 plantas analizadas. El resultado del análisis de los datos acumulados ( $\chi^2$  datos acumulados) nos indicó que no había motivos para dudar de que el fenotipo alterado en la línea 2142 ET MM esté causado por una mutación monogénica recesiva (Tabla 39).

**Tabla 39.** Análisis del modo de herencia del mutante 2142 ET MM.

	Segregación	WT	M	Total	$\chi^2$
Experimento 1	Observada	20	4	24	0.89
	Esperada (3:1)	18	6		
Experimento 2	Observada	30	9	39	0.08
	Esperada (3:1)	29.3	9.7		
Datos acumulados <sup>a</sup>	Observada	50	13	63	0.64
	Esperada (3:1)	47.3	15.7		

<sup>a</sup> Análisis  $\chi^2$  homogeneidad ( $\chi^2_{H} = 0.33$ ) indica que la muestras son homogéneas ( $P > 0.05$ ;  $\chi^2_{1 \text{ g.l.}} = 3.84$ )

### Análisis genético del número de insertos T-DNA

El análisis de la resistencia a kanamicina para determinar el número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional en la línea 2142 ET MM nos indicó que había motivos para dudar de que esta línea porte un único inserto ( $DA_{(3:1)} = 8.06 > 3.84_{1 \text{ g.l. (5\%)}$ ). El ajuste de la  $\chi^2$  a una hipótesis para dos insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional nos demostró que no había motivos para dudar de que esta línea porte dos insertos T-DNA ( $DA_{(15:1)} = 1.15 < 3.84_{1 \text{ g.l. (5\%)}$ ). Para comprobar si la línea podría portar, o no, 3 insertos, se realizó el ajuste para una segregación 63:1. Los resultados de la  $\chi^2$  nos permitió dudar de esta hipótesis ( $DA_{(63:1)} = 25.96 > 3.84_{1 \text{ g.l. (5\%)}$ ). Por lo tanto, podemos concluir que no hay motivos para dudar de que la línea 2142 ET MM porte dos insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional (Tabla 40).

**Tabla 40.** Análisis del número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional de la línea 2142 ET MM.

	Segregación	Kan <sup>R</sup>	Kan <sup>S</sup>	Total	$\chi^2$
Experimento 1	Observada	21	3	24	2.00
	Esperada (3:1)	18	6		
	Esperada (15:1)	22.5	1.5		
	Esperada (63:1)	23.6	0.3		
Experimento 2	Observada	36	3	39	6.23
	Esperada (3:1)	29.3	9.7		
	Esperada (15:1)	36.6	2.4		
	Esperada (63:1)	38.4	0.6		
Datos acumulados <sup>a</sup>	Observada	57	6	63	8.06
	Esperada (3:1)	47.3	15.7		
	Esperada (15:1)	59.1	3.1		
	Esperada (63:1)	62	1		

<sup>a</sup> Análisis  $\chi^2$  homogeneidad indica que la muestras son homogéneas, para una segregación 3:1 (0.18), 15:1 (0.59) y 63:1 (2.23) ( $P > 0.05$ ;  $\chi^2_{1 \text{ g.l.}} = 3.84$ )

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

Tras el análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante en la línea 2142 ET MM se comprobó que no existe, ya que se observaron dos plantas mutantes sensibles a la kanamicina en los experimentos realizados (Tabla 41).

**Tabla 41.** Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 2142 ET MM.

	WT		M		Total
	Kan <sup>R</sup>	Kan <sup>S</sup>	Kan <sup>R</sup>	Kan <sup>S</sup>	
<b>Experimento 1</b>	18	2	3	1	24
<b>Experimento 2</b>	28	2	8	1	39
<b>Datos acumulados</b>	46	4	11	2	63

Una vez que se ha descartado la posible cosegregación de un inserto de T-DNA con el gen *nptII* funcional con el fenotipo mutante se va a analizar si existe algún inserto parcial de T-DNA o del cuerpo del vector que cause esta mutación. De forma simultánea se van a realizar los cruces con *S. pimpinellifolium* para llegar a obtener plantas F2.

#### 4.1.3.3.- Mutante 1512 ET MM

Este mutante se detectó al ver que algunas plantas presentaban un color clorótico. También se vio que las plantas que presentan la alteración en la coloración tenían zonas necróticas en los folíolos (Figura 82).



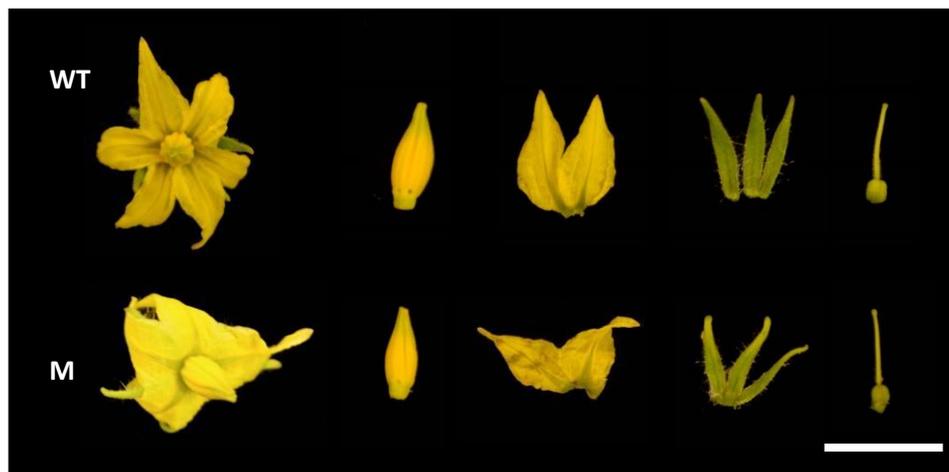
**Figura 82.** Fenotipo de plantas axénicas procedentes de ápices meristemáticos de la línea 1512 ET MM tras 25 días de cultivo en medio básico. La barra representa 1 cm.



**Figura 83.** Fenotipo de plantas procedentes de semillas de la línea 1512 ET MM tras 30 días de cultivo en el invernadero. La barra representa 5 cm.

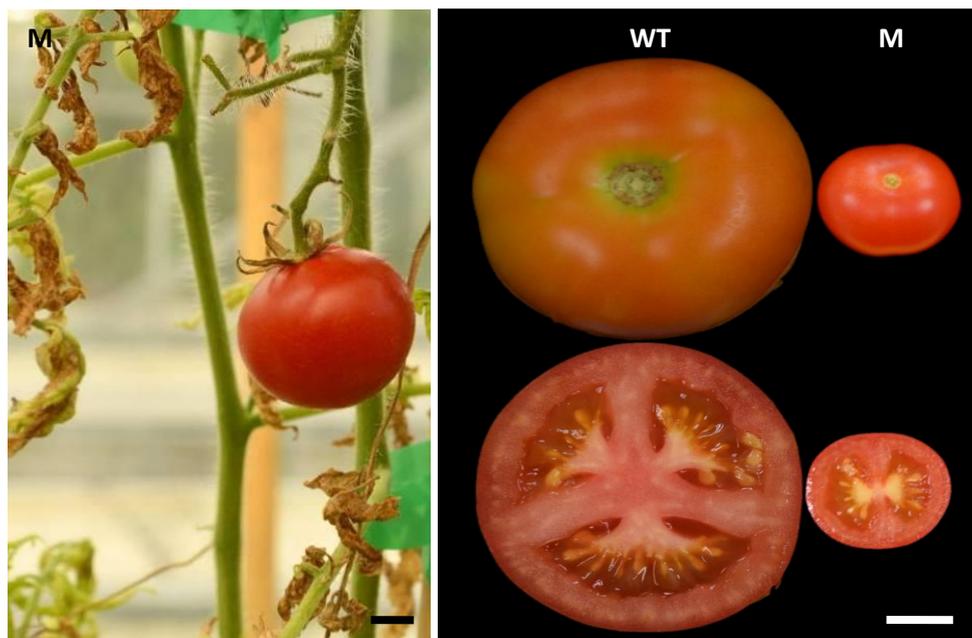
Al aclimatar estas plantas se observó que la mutación que se vía en condiciones de cultivo *in vitro* se mantenía también en cultivo *in vivo*. A medida que las plantas mutantes crecían en el invernadero, los nuevos folíolos que se iban formando eran más pequeños, de color clorótico y en ellos se seguían formando manchas necróticas (Figura 83).

Tras haber transcurrido ocho meses de cultivo en el invernadero, las plantas mutantes formaron inflorescencias. Las flores de las plantas mutantes no presentaban diferencias morfológicas en ninguno de sus cuatro verticilos en comparación con las flores de las plantas WT (Figura 84).



**Figura 84.** Fenotipo de flores en antesis y verticilos florales de plantas cultivadas durante ocho meses en el invernadero de la línea 1512 ET MM. La barra representa 1 cm.

A los nueve meses de cultivo en invernadero, las plantas mutantes desarrollaron algunos frutos. Sólo se observó el desarrollo de un fruto por inflorescencias, ya que la mayor parte de las flores se caen antes de que se produzca el cuajado. Los frutos de las plantas mutantes, aunque eran algo más pequeños, tenían la misma forma que un fruto de plantas WT y daban algunas semillas (Figura 85).



**Figura 85.** Fenotipo de un fruto maduro de una planta cultivada durante nueve meses en el invernadero de la línea 1512 ET MM. La barra representa 1 cm.

### **Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante**

Para conocer el modo de herencia se analizaron 50 individuos de la línea 1512 ET MM en condiciones *in vitro* en dos experimentos y se vio la mutación en ambos experimentos. El análisis de homogeneidad indicó que las muestras eran homogéneas. El análisis de los datos acumulados ( $\chi^2$  datos acumulados) indicó que no había motivos para dudar de que la naturaleza de la mutación sea monogénica recesiva (Tabla 42).

**Tabla 42.** Análisis del modo de herencia del mutante 1512 ET MM.

	<b>Segregación</b>	<b>WT</b>	<b>M</b>	<b>Total</b>	$\chi^2$
<b>Experimento 1</b>	Observada	18	4	22	0.55
	Esperada (3:1)	16.5	5.5		
<b>Experimento 2</b>	Observada	21	7	28	0.00
	Esperada (3:1)	21	7		
<b>Datos acumulados<sup>a</sup></b>	Observada	39	11	50	0.24
	Esperada (3:1)	37.5	12.5		

<sup>a</sup> Análisis  $\chi^2$  homogeneidad ( $\chi^2_H = 0.31$ ) indica que la muestras son homogéneas ( $P > 0.05$ ;  $\chi^2_{2 \text{ g.l.}} = 3.84$ )

## Análisis genético del número de insertos T-DNA

En cuanto a la resistencia a la kanamicina, las 50 plantas analizadas eran resistentes al antibiótico. Por tanto, la línea 1512 ET MM no es portadora de un único inserto *nptII* funcional ( $\chi^2$  DA (3:1) = 16.67 > 3.84<sub>1 g. l. (5%)</sub>) y, al menos, debe portar dos o más insertos (Tabla 43).

**Tabla 43.** Análisis del número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional de la línea 1512 ET MM.

	Segregación	Kan <sup>R</sup>	Kan <sup>S</sup>	Total	$\chi^2$
<b>Experimento 1</b>	Observada	22	0	22	1.47 0.35
	Esperada (15:1)	20.6	1.4		
	Esperada (63:1)	21.7	0.3		
<b>Experimento 2</b>	Observada	28	0	28	1.87 0.44
	Esperada (15:1)	26.3	1.7		
	Esperada (63:1)	27.6	0.4		
<b>Datos acumulados<sup>a</sup></b>	Observada	50	0	50	3.33 0.79
	Esperada (15:1)	46.9	3.1		
	Esperada (63:1)	49.2	0.8		

<sup>a</sup> Análisis  $\chi^2$  homogeneidad indica que la muestras son homogéneas, para una segregación 15:1 (0.00) y 63:1 (0.00) ( $P > 0.05$ ;  $\chi^2_{2 g. l.} = 3.84$ ).

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

Se cultivaron 10 plantas TG2 de fenotipo WT y resistentes a la kanamicina para intentar separar los insertos T-DNA y poder determinar si existía cosegregación entre uno de ellos y el fenotipo mutante. Se analizaron cinco progenies TG3 (Tabla 44).

**Tabla 44.** Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 1512 ET MM.

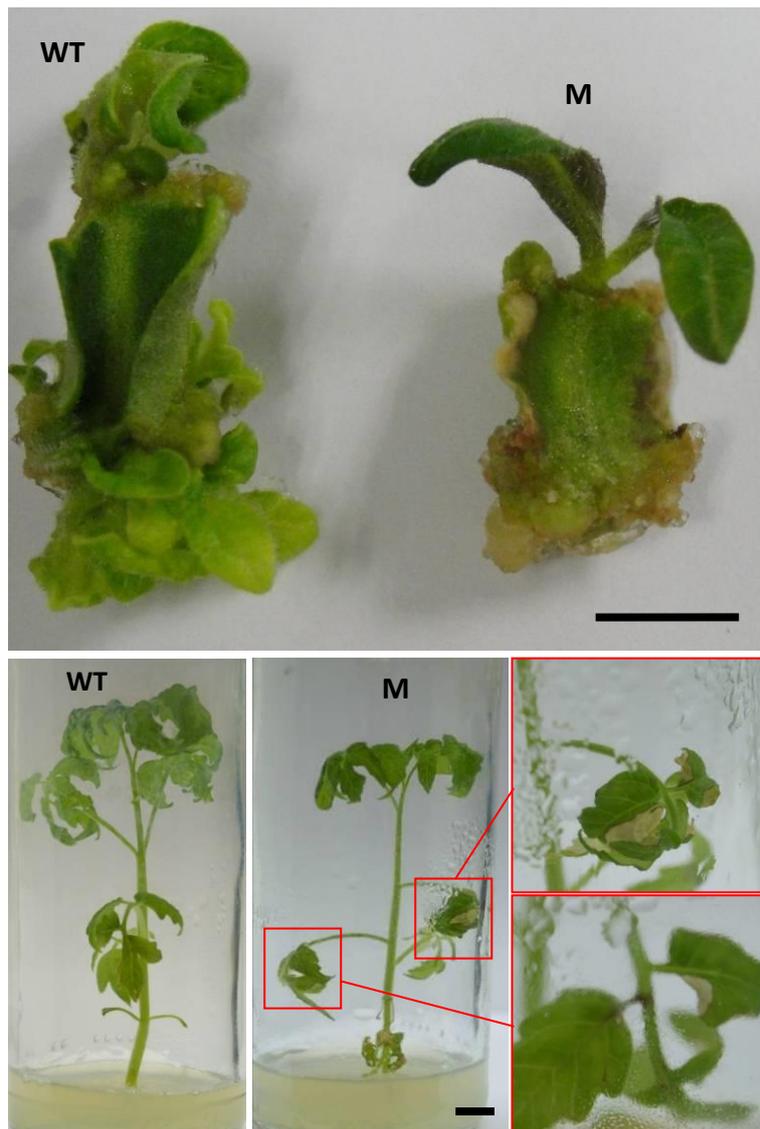
	WT		M		Total
	Kan <sup>R</sup>	Kan <sup>S</sup>	Kan <sup>R</sup>	Kan <sup>S</sup>	
1512-25	50	0	18	0	68
1512-33	57	0	15	0	72
1512-36	53	3	15	0	71
1512-38	57	4	0	0	61
1512-40	83	6	30	1	120

Dentro de las cinco progenies TG3 analizadas, se detectaron tres (1512-36, 1512-38, 1512-40) en las cuales la segregación se ajustaba para dos insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional. Dentro de estas tres líneas, en dos de ellas seguía apareciendo la mutación (1512-36 y 1512-40). Se comprobó que no existe cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante porque en la progenie TG3 de la línea 1512-40 TG2 se detectó una planta mutante que era sensible a la kanamicina.

Una vez que se ha descartado la posible cosegregación de un inserto de T-DNA con el gen *nptII* funcional con el fenotipo mutante se va a analizar si existe algún inserto parcial de T-DNA o del cuerpo del vector que cause esta mutación. De forma simultánea se van a realizar los cruces con *S. pimpinellifolium* para llegar a obtener plantas F2.

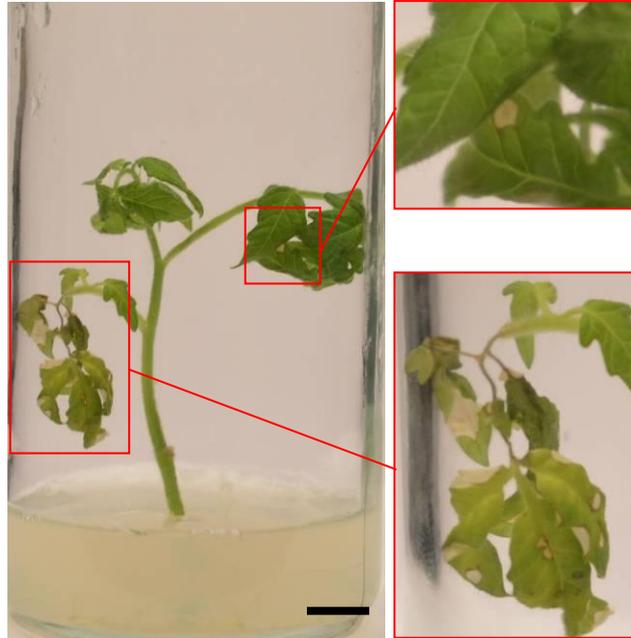
#### 4.1.3.4.- Mutante 2477 ET MM

Este mutante se detectó al ver cómo algunos explantes de cotiledón presentaban necrosis lateral, aunque éstos mantenían la capacidad de formar callo y regenerar brotes. En las plantas axénicas cuyos explantes de cotiledón presentaron necrosis también se observó la necrosis en sus folíolos (Figura 86).



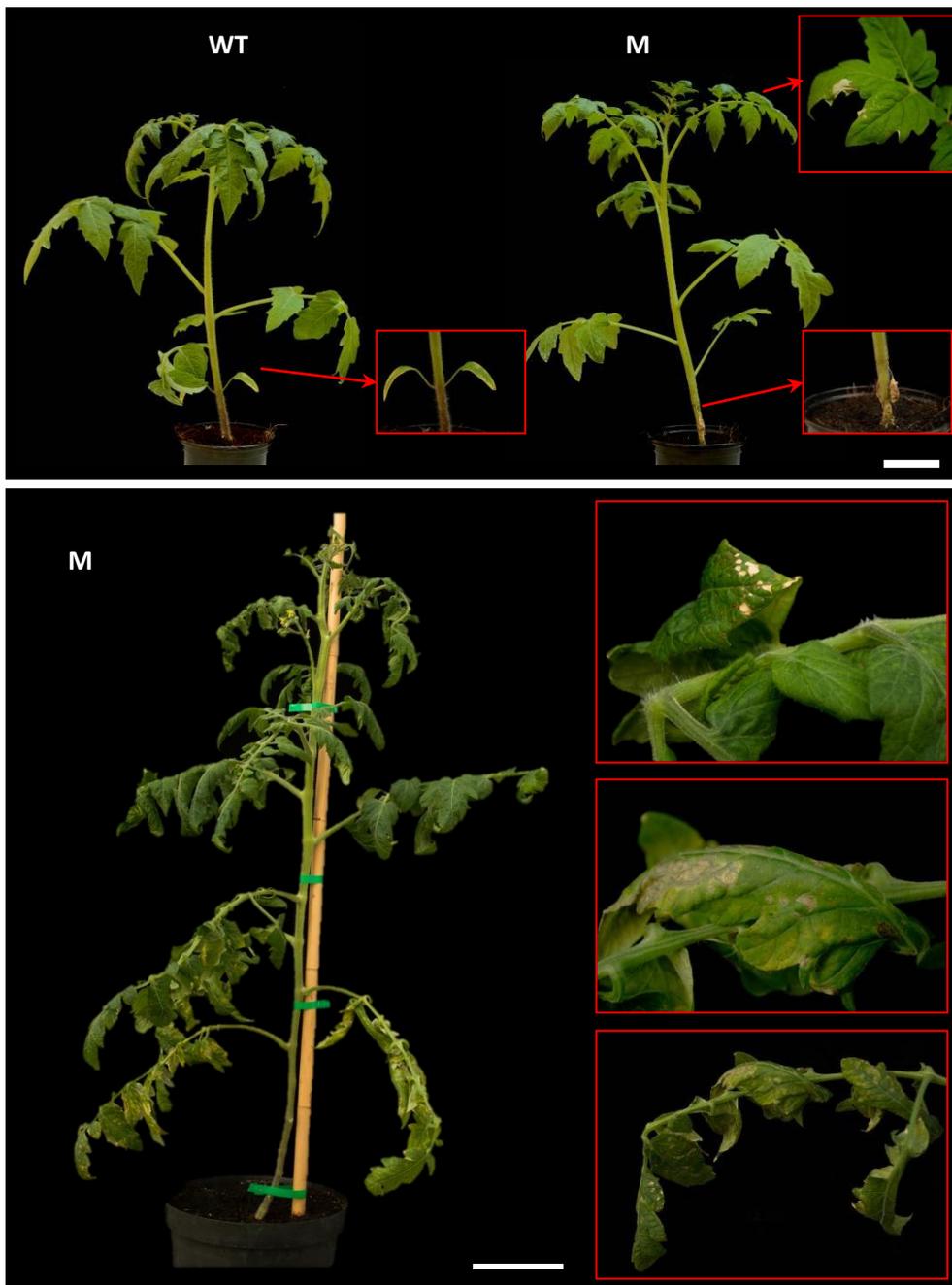
**Figura 86.** Fenotipo de explantes de cotiledón tras 25 días de cultivo en medio organogénico (arriba) y de plantas axénicas procedentes de ápices meristemáticos tras 15 días de cultivo en medio básico (abajo) de la línea 2477 ET MM. La barra representa 1 cm.

La necrosis evolucionó de forma ascendente, es decir, se veía primero en los folíolos de las hojas más viejas hasta que causaba su colapso final (Figura 87).



**Figura 87.** Fenotipo de plantas axénicas procedentes del subcultivo de ápices meristemáticos tras 25 días de cultivo en medio básico (abajo) de la línea 2477 ET MM. La barra representa 1 cm.

Se cultivaron más progenies TG2 en el invernadero para corroborar si el fenotipo visto en condiciones de cultivo *in vitro* se reproducía *in vivo*. A los 25 días de cultivo se empezó a ver la necrosis en los folíolos y además se observó que los cotiledones de las plantas mutantes se marchitaban antes que los cotiledones de plantas WT. A los 50 días de cultivo la necrosis era más evidente, en las hojas más viejas se veía que la necrosis provocaba que los folíolos se doblaran hacia abajo. Posteriormente los folíolos se volvían de color verde amarillento, típico de una hoja senescente y al final se separaban del tallo (Figura 88). A pesar de todos estos cambios, las plantas mutantes dieron flores y frutos como las plantas WT.



**Figura 88.** Fenotipo de plantas procedentes de semillas de la línea 2477 ET MM tras 25 días (arriba) y 50 días (abajo) de cultivo en el invernadero. La barra representa 5 cm.

### **Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante**

El fenotipo mutante se detectó en 34 de las 129 plantas analizadas en los cuatro experimentos realizados en condiciones de cultivo *in vitro*. El análisis de homogeneidad indicó que las muestras eran homogéneas y el análisis de los

datos acumulados ( $\chi^2$  datos acumulados) indicó que en la línea 2477 ET MM no había motivos para dudar de un modelo de herencia monogénica recesiva para la mutación observada (Tabla 51).

**Tabla 51.** Análisis del modo de herencia del mutante 2477 ET MM.

	Segregación	WT	M	Total	$\chi^2$
Experimento 1	Observada	10	2	12	0.44
	Esperada (3:1)	9	3		
Experimento 2	Observada	24	9	33	0.09
	Esperada (3:1)	24.7	8.3		
Experimento 3	Observada	18	8	26	0.46
	Esperada (3:1)	19.5	6.5		
Experimento 4	Observada	43	15	58	0.02
	Esperada (3:1)	43.5	14.5		
Datos acumulados <sup>a</sup>	Observada	95	34	129	0.13
	Esperada (3:1)	96.7	32.3		

<sup>a</sup> Análisis  $\chi^2$  homogeneidad ( $\chi^2_H = 0.89$ ) indica que la muestras son homogéneas ( $P > 0.05$ ;  $\chi^2_{3 g.l.} = 7.82$ )

### Análisis genético del número de insertos T-DNA

El test de resistencia a la kanamicina se ajustó a una segregación de 3 plantas Kan<sup>R</sup> por cada planta Kan<sup>S</sup> en tres de los experimentos realizados (1, 2, 4). En el tercer experimento ( $\chi^2 DA_{(3:1)} = 4.14 < 3.84_{1 g.l. (5\%)}$ ) hay cierta desviación de los datos observados frente a los esperados para esta hipótesis. Sin embargo, el análisis de homogeneidad confirmó que las muestras son homogéneas y el análisis de los datos acumulados nos indicó que no había motivos para dudar de que la línea 2477 ET MM porta un único inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional (Tabla 52).

**Tabla 52.** Análisis del número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional de la línea 2477 ET MM.

	Segregación	Kan <sup>R</sup>	Kan <sup>S</sup>	Total	$\chi^2$
Experimento 1	Observada	9	3	12	0.00
	Esperada (3:1)	9	3		
Experimento 2	Observada	24	9	33	0.09
	Esperada (3:1)	24.7	8.3		
Experimento 3	Observada	15	11	26	4.14
	Esperada (3:1)	19.5	6.5		
Experimento 4	Observada	42	16	58	0.21
	Esperada (3:1)	43.5	14.5		
Datos acumulados <sup>a</sup>	Observada	90	39	129	1.88
	Esperada (3:1)	96.7	32.3		

<sup>a</sup> Análisis  $\chi^2$  homogeneidad ( $\chi^2_H = 2.57$ ) indica que la muestras son homogéneas ( $P > 0.05$ ;  $\chi^2_{3 g.l.} = 7.82$ )

## Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante mediante técnicas de cultivo *in vitro*

Para saber si el inserto T-DNA presente en esta línea es el responsable de la mutación se realizó el ensayo de cosegregación con el fenotipo mutante. Entre las 129 plantas TG2 se observaron 39 plantas sensibles a la kanamicina y todas eran de fenotipo WT (las supuestas acigotas). Otras 56 plantas presentaron fenotipo WT y eran resistentes a la kanamicina (las supuestas hemicigotas). Por otra parte, las 34 plantas mutantes fueron resistentes a la kanamicina (las supuestas homocigotas), por tanto, no se observó ninguna planta mutante sensible al antibiótico. Tras realizar la prueba de la  $\chi^2$  y ver que los datos observados se ajustaban ( $\chi^2$  DA (1:2:1) = 2.63 < 5.99 2 g. l. (5%)) a una segregación 1 WT Kan<sup>S</sup> : 2 WT Kan<sup>R</sup> : 1 M Kan<sup>R</sup> se puede concluir, con una probabilidad de fallo menor del 1.8 %, que existe cosegregación entre la mutación y el inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional presente en la línea 2477 ET MM (Tabla 53).

**Tabla 53.** Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 2477 ET MM.

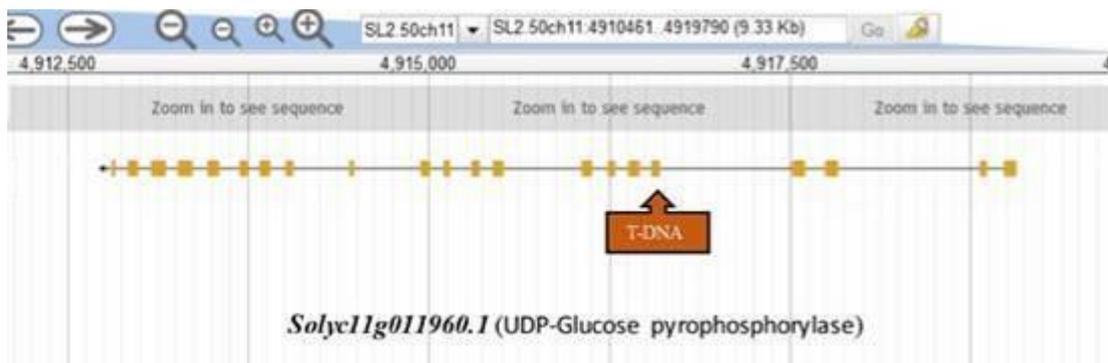
	Segregación	WT Kan <sup>S</sup>	WT Kan <sup>R</sup>	M Kan <sup>R</sup>	M Kan <sup>S</sup>	Total	$\chi^2$
<b>Experimento 1</b>	Observada	3	7	2	0	12	0.50
	Esperada (1:2:1)	3	6	3	0		
<b>Experimento 2</b>	Observada	9	15	9	0	33	0.27
	Esperada (1:2:1)	8.3	16.4	8.3	0		
<b>Experimento 3</b>	Observada	11	7	8	0	26	6.23
	Esperada (1:2:1)	6.5	13	6.5	0		
<b>Experimento 4</b>	Observada	16	27	15	0	58	0.31
	Esperada (1:2:1)	14.5	29	14.5	0		
<b>Datos acumulados<sup>a</sup></b>	Observada	39	56	34	0	129	2.63
	Esperada (1:2:1)	32.3	64.4	32.3	0		

<sup>a</sup> Análisis  $\chi^2$  homogeneidad ( $\chi^2_H = 4.69$ ) indica que la muestras son homogéneas ( $P > 0.05$ ;  $\chi^2_{6 \text{ g. l.}} = 12.59$ )

## Identificación del gen etiquetado mediante Anchor-PCR

Para identificar las regiones flanqueantes del T-DNA insertado en la línea 2477 ET MM y, por tanto, conocer la localización genómica de la inserción de dicho T-DNA, se realizó un experimento de Anchor-PCR. Esta técnica permite amplificar los bordes del T-DNA junto con el fragmento de ADN genómico adyacente a éste. De este modo, tras amplificar esta región genómica, se

secuencia dicho producto de amplificación y el resultado obtenido se analiza contra el genoma de referencia de *S. lycopersicum* contenido en la base de datos Sol Genomics Network ([www.solgenomics.net](http://www.solgenomics.net)). El análisis bioinformático de las secuencias flanqueantes al borde derecho e izquierdo del T-DNA indicó que dicho inserto se localiza en el cromosoma 11 del genoma de tomate, concretamente en el quinto exón del gen *Solyc11g011960.1*, el cual codifica una proteína de tipo UDP-glucosa pirofosforilasa (Figura 89).



**Figura 89.** Localización genómica del inserto T-DNA de la línea 2477 ET MM. Se muestra la organización genómica del gen *Solyc11g011960.1* que consiste en 21 exones (representados como rectángulos amarillos) y 20 intrones (representados como líneas grises).

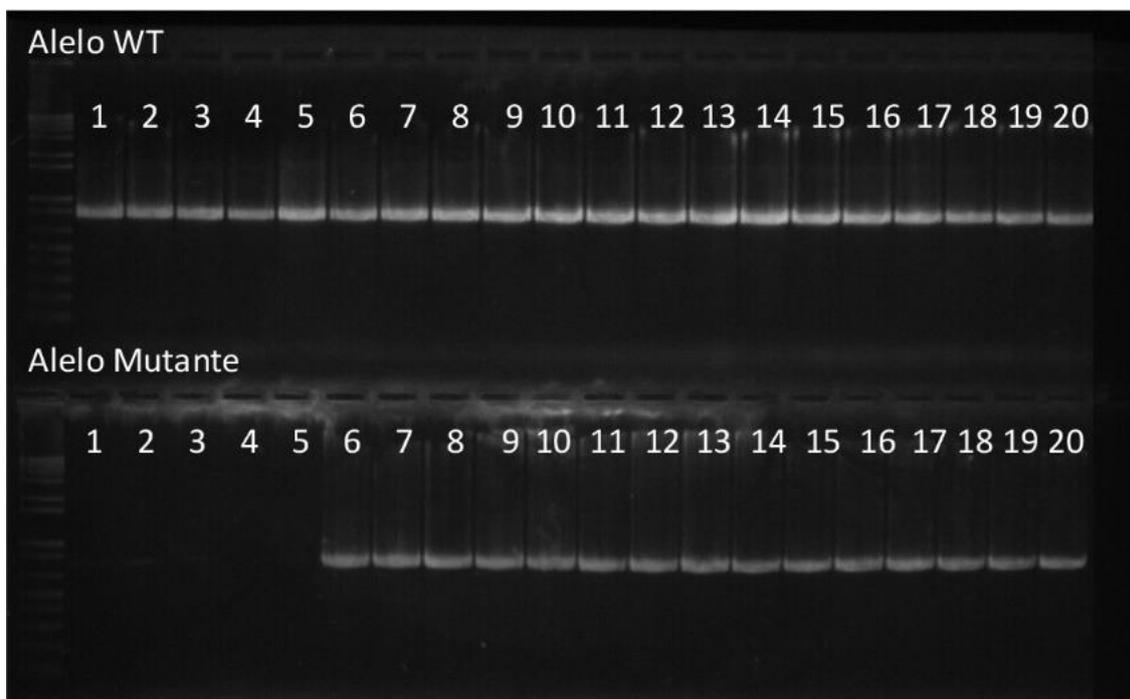
Con el objeto de obtener información sobre la función de dicho gen, a partir de su secuencia proteica, se realizó una búsqueda de genes homólogos en la especie *Arabidopsis thaliana*. El genoma de esta especie contiene dos genes, *AT3G03250* y *AT5G17310*, que codifican proteínas UDP-glucosa pirofosforilasa. Estas proteínas son esenciales para el metabolismo de la UDP-glucosa, un precursor de la síntesis de calosa y celulosa, componentes básicos de la pared celular. Park y colaboradores (2010) describieron que los genes *AT3G03250* y *AT5G17310* son funcionalmente redundantes. Mediante una estrategia de genética inversa, observaron que la inhibición de uno de estos genes no es suficiente para provocar modificaciones en el desarrollo vegetativo y reproductivo de *A. thaliana*, mientras que el doble mutante da lugar a drásticas alteraciones en el crecimiento y esterilidad masculina.

El genoma de tomate igualmente contiene dos genes putativos que codifican para proteínas UDP-glucosa pirofosforilasa. Además del gen *Solyc11g011960.1*, etiquetado en la línea 2477 ET MM, en el cromosoma 5 se encuentra el gen *Solyc05g054060.2*. Sin embargo, a diferencia de *A. thaliana*, el hecho de que en la línea 2477 ET MM se hayan encontrado plantas que muestran fenotipo mutante, sugiere que los genes *Solyc11g011960.1* y *Solyc05g054060.2* son funcionalmente no redundantes, aunque sería necesario realizar el análisis funcional comparativo de cada uno de estos dos genes para poder establecer conclusiones más robustas.

### **Análisis de cosegregación mediante PCR del gen identificado por Anchor-PCR y el fenotipo mutante**

A partir de las secuencias flanqueantes al T-DNA, se diseñaron cebadores para el genotipado por PCR con el objeto de comprobar si las plantas analizadas son portadoras del inserto T-DNA (alelo mutante) en homocigosis, hemicigosis, o acigosis. El genotipado se realizó en una población compuesta por 20 plantas TG2 que inicialmente fueron evaluadas en condiciones *in vitro* para conocer su fenotipo y su respuesta a la kanamicina. Así, las plantas etiquetadas del 1 al 5 muestran fenotipo silvestre (WT) y sensibilidad a kanamicina (acigotas para el T-DNA), las plantas del 6 al 14 exhiben fenotipo WT y tolerancia a kanamicina (hemicigotas para el T-DNA), mientras que las plantas del 15 al 20 muestran fenotipo mutante y tolerancia a kanamicina (homocigotas para el T-DNA).

El genotipado de esta población TG2 se realizó utilizando dos reacciones de PCR. El alelo WT se evaluó mediante oligonucleótidos diseñados sobre la secuencia genómica del gen *Solyc11g011960.1*, mientras que el alelo mutante se analizó empleando uno de los oligonucleótidos utilizados para amplificar el alelo WT, en este caso el *reverse*, y un oligonucleótido del T-DNA. Los resultados muestran que el alelo mutante amplifica únicamente en las plantas tolerantes a la kanamicina (homocigotas y hemicigotas para el T-DNA). Sin embargo, el alelo WT amplifica tanto en las plantas de fenotipo WT como en las de fenotipo mutante (Figura 90).



**Figura 90.** Detección mediante PCR del alelo WT (sin el inserto T-DNA que ha etiquetado el gen clonado) o el alelo mutante (con el inserto T-DNA que ha etiquetado el gen clonado) en 5 plantas WT Kan<sup>S</sup> (1-5), 9 plantas WT Kan<sup>R</sup> (6-14) y 5 plantas M Kan<sup>R</sup> (15-20) de la línea 2477 ET MM.

Al tratarse de una mutación que sigue un patrón de herencia monogénica recesiva, el alelo WT únicamente debería amplificar en aquellas plantas acigotas y hemicigotas para el T-DNA. Ante estos resultados, podría plantearse la hipótesis de que los oligonucleótidos utilizados no sólo estén amplificando el gen *Solyc11g011960.1* sino también su homólogo, el gen *Solyc05g054060.2*. Por tanto, sería necesario diseñar una pareja de oligonucleótidos más específica para poder determinar con precisión si el inserto T-DNA cosegrega con el fenotipo mutante observado en la línea 2477 ET MM.

#### **4.1.4.- Identificación y caracterización de mutantes con alteraciones en la respuesta morfogénica *in vitro***

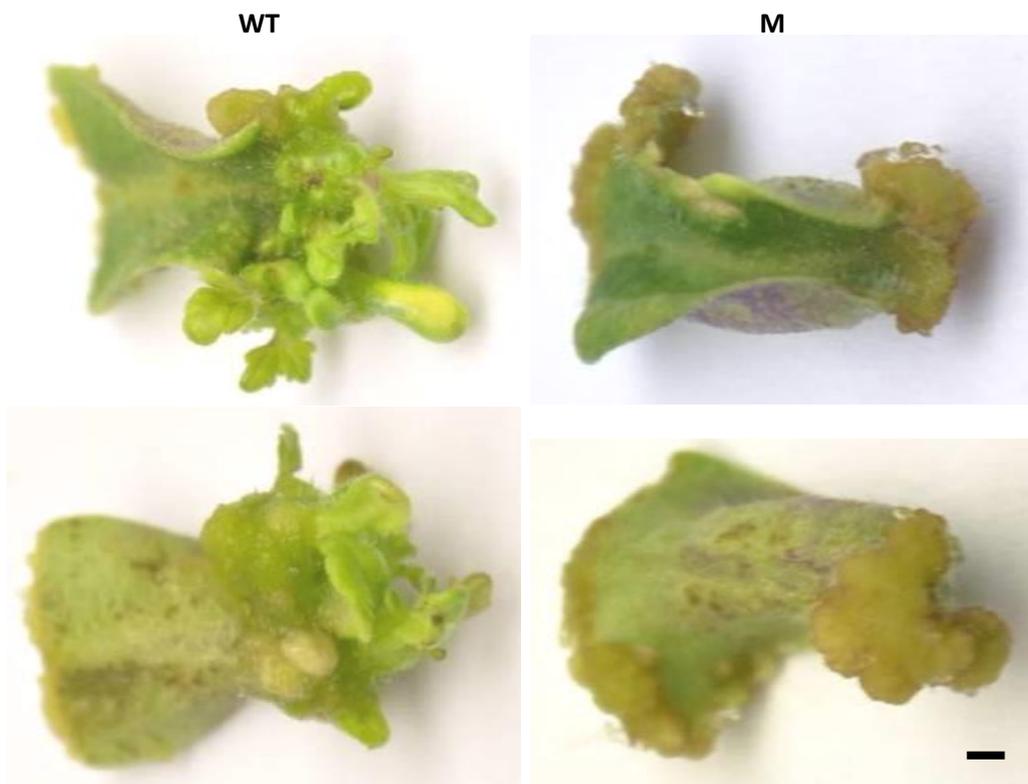
Por su gran valor comercial y debido que hay cultivares de tomate que, pese a su importancia agronómica, tienen una baja respuesta morfogénica, existe un gran interés en todo lo relacionado con la regeneración de plantas enteras *in vitro* a partir de cualquier órgano, tejido o tipo celular. El avance en el conocimiento de la base genética de este carácter tiene implicaciones básicas ya que se sabe muy poco sobre qué genes controlan este proceso del desarrollo e implicaciones prácticas por el gran potencial que tendría en el mundo de la mejor genética (e. g.: obtención de plantas transgénicas, obtención de líneas puras por el método haplodiploide,...). En este trabajo de Tesis hemos realizado un escrutinio que permite la identificación de mutantes con la respuesta morfogénica alterada a partir de un material vegetal que regenera perfectamente en condiciones de cultivo *in vitro*. Las líneas con las que se trabajaron en este proyecto se han obtenido a partir de un cultivar (Moneymaker) que no presenta problemas para la regeneración en nuestras condiciones.

En este trabajo de Tesis se han identificado cinco mutantes que exhiben una respuesta morfogénica alterada. El nivel de alteración visto en la capacidad de regeneración adventicia mediante organogénesis en los mutantes fue diferente entre ellos afectando la capacidad de formación de callo desorganizado, yemas adventicias o brotes. De los cinco mutantes identificados, tres de ellos (1524 ET MM, 1801 ET MM, 1920 ET MM) presentan alteraciones en el desarrollo vegetativo en condiciones de cultivo *in vitro* a diferentes niveles. En cambio, los otros dos no presentan alteraciones (1311 ET MM, 2225 ET MM). En algunos de los mutantes, se realizaron diferentes evaluaciones con distintos medios organogénicos para ver el comportamiento que tienen los mutantes. Además, de algunos mutantes se analizó el contenido de hormonas endógenas por ser un aspecto clave en este carácter. Se llevó a cabo la caracterización del fenotipo, el modo de herencia, el análisis para determinar el número de insertos T-DNA con el gen *nptII*

funcional y se determinó si existe cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante. A continuación se muestran los resultados obtenidos en los mutantes identificados con alteraciones en la respuesta morfogénica *in vitro*.

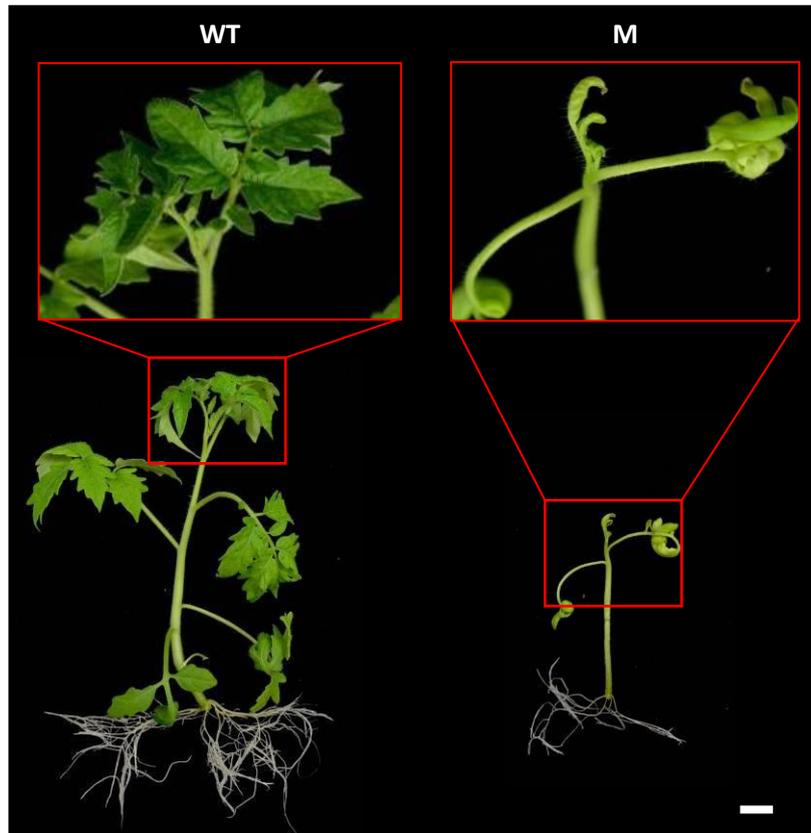
#### 4.1.4.1.- Mutante 1524 ET MM

Esta línea mutante se detectó al ver que algunos explantes de cotiledón en medio de regeneración formaban callo desorganizado pero no regeneraban yemas ni brotes adventicios (Figura 91).

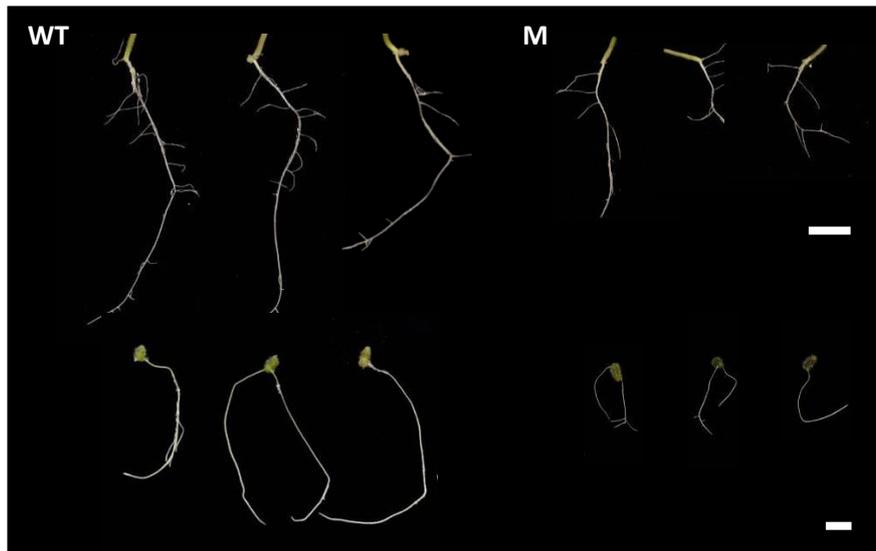


**Figura 91.** Fenotipo de explantes de cotiledón de la línea 1524 ET MM tras 25 días de cultivo en medio organogénico. La barra representa 1 mm.

Al observar los ápices meristemáticos cultivados en medio básico procedentes de las plántulas cuyos explantes de cotiledón dieron fenotipo mutante, se vio que también presentaban alteraciones severas en su desarrollo vegetativo ya que apenas desarrollaron hojas, eran de menor altura y presentan un porte más débil (Figura 92).



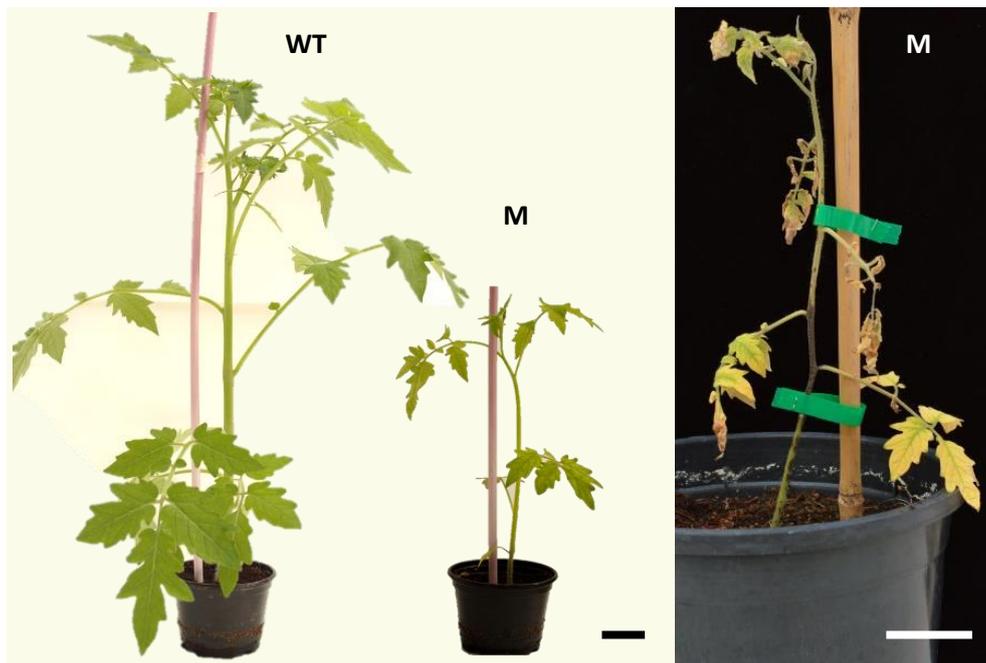
**Figura 92.** Fenotipo de plantas axénicas procedentes de ápices meristemáticos de la línea 1524 ET MM tras 25 días de cultivo en medio básico. La barra representa 1 cm.



**Figura 93.** Fenotipo de las raíces embrionarias de plántulas procedentes de semilla tras 10 días de cultivo en medio de germinación (arriba) y de las raíces adventicias procedentes de explantes de hipocótilo tras 25 días de cultivo en medio I 4.0 (abajo) de la línea 1524 ET MM. La barra representa 1 cm.

El enraizamiento embrionario de las plántulas mutantes, presentaron un menor desarrollo, ya que la raíz principal tenía menor longitud. Sin embargo, se formaron raíces secundarias como en las plántulas WT. De forma análoga cuando se cultivaron segmentos de hipocótilo en medio de enraizamiento (IAA 4.0 mg·L<sup>-1</sup>) de plántulas WT y M las raíces adventicias que se formaron en los segmentos de las plántulas mutantes eran de menor longitud que la de plántulas WT (Figura 93).

Se sembraron progenies TG2 para ver si la alteración del desarrollo vegetativo se reproducía en condiciones de invernadero. Un mes después de germinación, se vio que las plantas mutantes eran de menor tamaño pero las hojas siguen siendo verdes. Cuando las plantas tenían dos meses, se observó una clorosis severa de las hojas que posteriormente se necrosaron al igual que el tallo. Al poco tiempo la planta terminó por morir (Figura 94).



**Figura 94.** Fenotipo de plántulas procedentes de semillas de la línea 1524 ET MM tras 30 días (izquierda) y 60 días (derecha) de cultivo en el invernadero. La barra representa 5 cm.

## Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante

Se realizaron dos experimentos en condiciones de cultivo *in vitro* en los cuales se observó el fenotipo mutante. El análisis de homogeneidad indicó que las muestras eran homogéneas y el de datos acumulados ( $\chi^2$  datos acumulados) nos indicó que no había motivos para dudar de que el fenotipo alterado esté causado por una mutación monogénica recesiva (Tabla 54).

**Tabla 54.** Análisis del modo de herencia del mutante 1524 ET MM.

	Segregación	WT	M	Total	$\chi^2$
Experimento 1	Observada	21	3	24	2.00
	Esperada (3:1)	18	6		
Experimento 2	Observada	48	17	65	0.46
	Esperada (3:1)	48.7	16.3		
Datos acumulados <sup>a</sup>	Observada	69	20	89	0.30
	Esperada (3:1)	66.7	22.3		

<sup>a</sup> Análisis  $\chi^2$  homogeneidad ( $\chi^2_H = 1.87$ ) indica que las muestras son homogéneas ( $P > 0.05$ ;  $\chi^2_{1 g. l.} = 3.84$ )

## Análisis genético del número de insertos T-DNA

Para llevar a cabo el análisis del número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional, sólo se analizaron las plantas que presentaban fenotipo WT debido a que las plantas mutantes colapsaban antes de la evaluación y, por tanto, no era posible hacer el test de resistencia a la kanamicina. Por tanto, tras excluir la clase mutante, para el caso de que haya un único inserto y haya cosegregación se realizó el ajuste para una segregación de 2 plantas WT Kan<sup>R</sup> por cada planta Kan<sup>S</sup> (2:1). En cambio, en el caso de que no haya asociación fenotipo-*nptII*, la segregación se ajustaría a 3 plantas WT Kan<sup>R</sup> por cada WT Kan<sup>S</sup> (3:1). Tras analizar 68 plantas WT (se elimina una planta WT por contaminación), los resultados indicaron que no había motivos para dudar de ambas hipótesis ( $\chi^2_{DA (2:1)} = 1.44 < 3.84_{1 g. l. (5\%)}$ ,  $\chi^2_{DA (3:1)} = 0.08 < 3.84_{1 g. l. (5\%)}$ ). Con todo esto, se puede concluir que no había motivos para dudar de que la línea 1524 ET MM porte un único inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional pero no sabemos si existe cosegregación con el fenotipo mutante (Tabla 55).

**Tabla 55.** Análisis del número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional de la línea 1524 ET MM.

	Segregación	Kan <sup>R</sup>	Kan <sup>S</sup>	Total	$\chi^2$
<b>Experimento 1</b>	Observada	15	6	21	0.88
	Esperada (2:1)	14	7		
	Esperada (3:1)	15.7	5.3		
<b>Experimento 2</b>	Observada	35	12	47	1.71
	Esperada (2:1)	31.3	15.7		
	Esperada (3:1)	35.3	11.7		
<b>Datos acumulados</b> <sup>a</sup>	Observada	50	18	68	1.44
	Esperada (2:1)	46.3	22.7		
	Esperada (3:1)	51	17		

<sup>a</sup> Análisis  $\chi^2$  homogeneidad indica que la muestras son homogéneas, para una segregación 2:1 (0.06) y 3:1 (0.07) ( $P > 0.05$ ;  $\chi^2_{1 \text{ g.l.}} = 3.84$ ).

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

Al realizar el análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la forma habitual sólo se pudo obtener información de la resistencia a la kanamicina de las plantas WT por lo que no se obtuvo un resultado concluyente (Tabla 55). Por lo tanto, para este mutante, se tuvo que diseñar una estrategia en la cual fuera posible evaluar la resistencia a la kanamicina de las plantas mutantes y así comprobar la existencia o no de cosegregación.

Para lograr este objetivo, se sembraron semillas directamente en un medio de germinación suplementado con 100 mg·L<sup>-1</sup> de kanamicina. En estas condiciones es posible conocer la resistencia a la kanamicina de cada planta TG2. Posteriormente, una vez se conoce si la planta es resistente o sensible a la kanamicina pero antes de que las plantas sensibles detengan totalmente su desarrollo, se cultivaron los explantes de cotiledón de estas plantas para ver si muestran fenotipo WT o mutante. De esta forma se pudo analizar la resistencia a la kanamicina de las plantas con fenotipo mutante (Figura 95).

Con esta aproximación se analizaron 47 plantas, de las cuales 29 fueron resistentes a la kanamicina y 18 sensibles. Tras el cultivo de los explantes de cotiledón en medio organogénico se obtuvo una distribución de 41 explantes WT y 6 M.



**Figura 95.** Fenotipo de plántulas procedentes de semillas tras 10 días de cultivo en medio de germinación suplementado con  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de kanamicina (arriba) y explantes de cotiledón tras 25 días de cultivo en medio organogénico (abajo) de la línea 1524 ET MM. La barra representa 1 cm.

Al analizar los datos, dentro de las 18 plantas que fueron sensibles a la kanamicina, 16 eran WT para la regeneración y 2 eran mutantes. Con estos datos, podemos concluir que no existe cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante (Tabla 56).

**Tabla 56.** Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 1524 ET MM.

	WT		M		Total
	Kan <sup>R</sup>	Kan <sup>S</sup>	Kan <sup>R</sup>	Kan <sup>S</sup>	
Experimento 1	25	16	4	2	47

Con este mutante se han realizado los cruces con *S. pimpinellifolium* con el fin de poder llegar a clonar el gen afectado y ya se dispone de plantas F1.

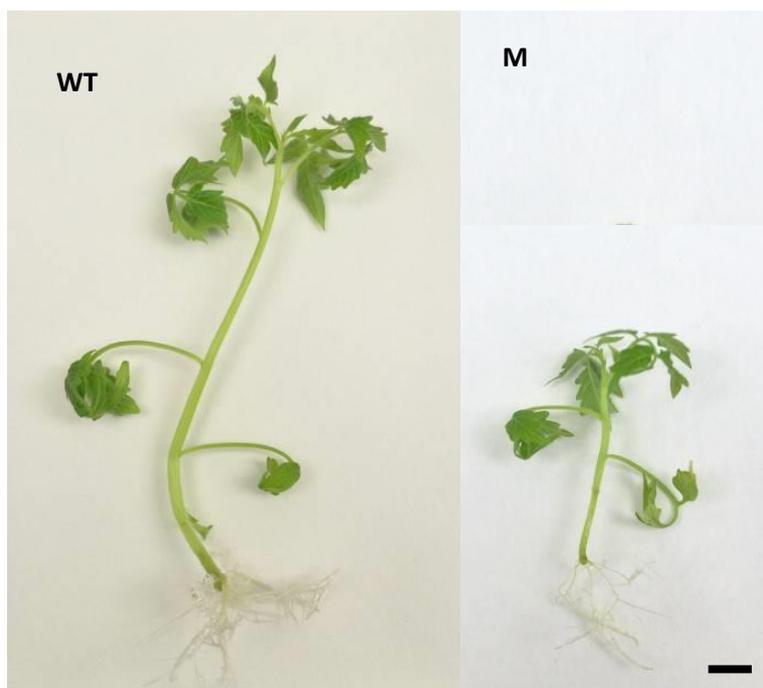
#### 4.1.4.2.- Mutante 1920 ET MM

La línea 1920 ET MM se detectó porque tras el cultivo de explantes de cotiledón en medio organogénico se observaron algunos que sólo producían callo desorganizado pero que no regeneraban brotes adventicios (Figura 96).



**Figura 96.** Fenotipo de explantes de cotiledón de la línea 1920 ET MM tras 25 días de cultivo en medio organogénico. La barra representa 1 mm.

A los 25 días de cultivo en medio base, las plantas mutantes (i.e. aquellas cuyos explantes de cotiledón no diferencian yemas adventicias) tenían menor altura que las plantas WT. Sin embargo, no se observaron diferencias en cuanto a la arquitectura de las plantas (Figura 97). Por otro lado, a los 10 días de cultivo en medio de germinación, el sistema radicular embrionario de las plántulas no presentó diferencias significativas con respecto al WT. Adicionalmente, tras realizar la caracterización del sistema radicular adventicio, se observó en las plantas mutantes una menor masa radicular en comparación con la de las plantas WT (Figura 98).



**Figura 97.** Fenotipo de plantas axénicas procedentes de ápices meristemáticos de la línea 1920 ET MM tras 25 días de cultivo en medio básico. La barra representa 1 cm.



**Figura 98.** Fenotipo de las raíces embrionarias de plántulas procedentes de semillas tras 10 días de cultivo en medio de germinación (arriba) y de las raíces adventicias procedentes del hipocótilo tras 25 días de cultivo de ápices meristemáticos en medio de enraizamiento (abajo) de la línea 1920 ET MM. La barra representa 1 cm.

## Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante

Para conocer el modo de herencia de esta mutación se analizó un total de 39 plantas TG2. Se observó una segregación de 30 plantas con fenotipo WT y 9 plantas con fenotipo mutante. Tras realizar la prueba de la  $\chi^2$  para una hipótesis de 3 plantas WT por cada mutante ( $\chi^2$  DA (3:1) = 0.08 < 3.84 1 g. l. (5%)), los resultados nos indicaron que no había motivos para dudar de un modo de herencia monogénico recesivo para la mutación (Tabla 57).

**Tabla 57.** Análisis del modo de herencia del mutante 1920 ET MM.

	Segregación	WT	M	Total	$\chi^2$
Experimento 1 <sup>a</sup>	Observada	30	9	39	0.08
	Esperada (3:1)	29.3	9.7		

<sup>a</sup> Análisis de la  $\chi^2$  (P>0.05;  $\chi^2$  1 g. l. = 3.84)

## Análisis genético del número de insertos T-DNA

Para conocer el número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional, se realizó la prueba de la resistencia a la kanamicina y se observó una segregación de 30 plantas resistentes y 9 plantas sensibles. De tal modo, tras realizar la prueba de la  $\chi^2$  se comprobó que la línea 1920 ET MM era portadora de un único inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional (Tabla 58).

**Tabla 58.** Análisis del número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional de la línea 1920 ET MM.

	Segregación	Kan <sup>R</sup>	Kan <sup>S</sup>	Total	$\chi^2$
Experimento 1 <sup>a</sup>	Observada	30	9	39	0.08
	Esperada (3:1)	29.3	9.7		

<sup>a</sup> Análisis de la  $\chi^2$  (P>0.05;  $\chi^2$  1 g. l. = 3.84)

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

Tras el análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante en la línea 1920 ET MM se comprobó que no existe, ya que se observaron dos plantas mutantes sensibles a la kanamicina (Tabla 59).

**Tabla 59.** Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 1920 ET MM.

	WT		M		Total
	Kan <sup>R</sup>	Kan <sup>S</sup>	Kan <sup>R</sup>	Kan <sup>S</sup>	
<b>Experimento 1</b>	23	7	7	2	39

Una vez que se ha descartado la posible cosegregación de un inserto de T-DNA con el gen *nptII* funcional y el fenotipo mutante, se va a analizar si existe algún inserto parcial de T-DNA o del cuerpo del vector que cause esta mutación. De forma simultánea se van a realizar los cruces con *S. pimpinellifolium* para llegar a obtener plantas F2 y poder localizar el gen causante de este fenotipo mutante.

#### 4.1.4.3.- Mutante 1801 ET MM

Esta línea se detectó al ver cómo los explantes de cotiledón que se cultivaron en medio de organogénico presentaban una respuesta morfológica diferente a los explantes de plantas WT. Los cotiledones mutantes tenían la capacidad de formar un callo desorganizado pero no regeneraban brotes adventicios como lo hacen los explantes WT (Figura 99).



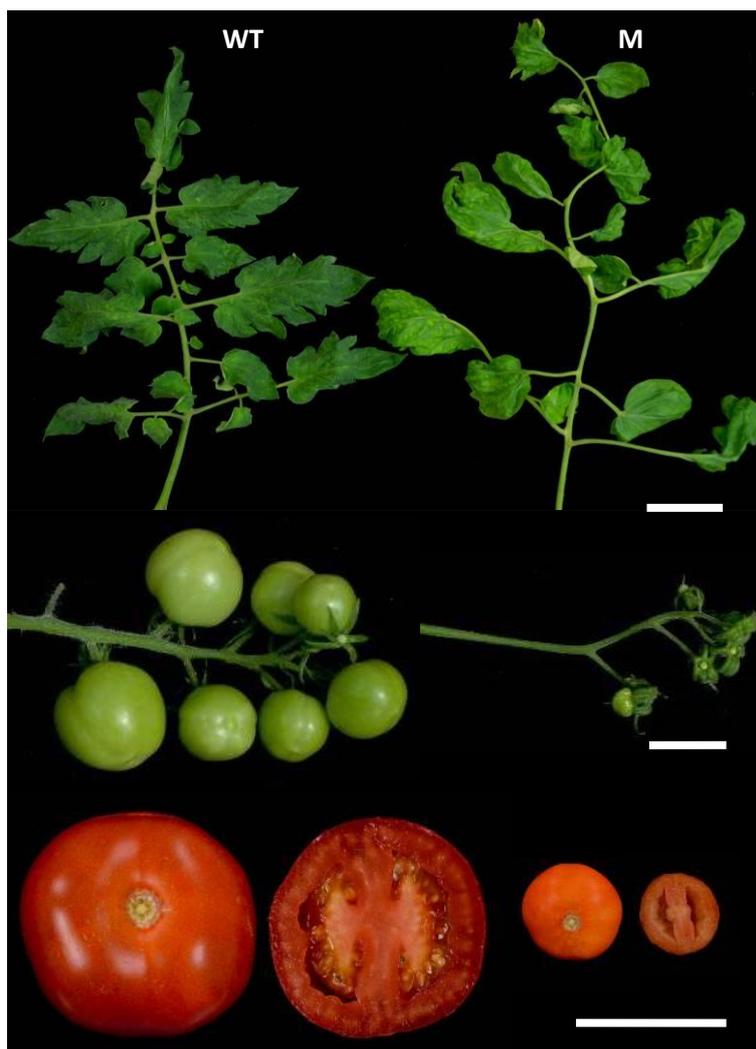
**Figura 99.** Fenotipo de explantes de cotiledón de la línea 1801 ET MM tras 25 días de cultivo en medio organogénico. La barra representa 1 mm.

Al evaluar el fenotipo de las plantas cultivadas se vio que presentaban alteraciones muy sutiles en el desarrollo vegetativo en condiciones de cultivo *in vitro*. Los foliolos de estas plantas presentaban cierto enrollamiento lo cual impedía que se expandan de forma normal como en plantas WT. Por otra parte, no se apreciaron diferencias en otras variables relacionadas con el desarrollo vegetativo, tales como altura de las plantas, sistema radicular, etc. (Figura 100).



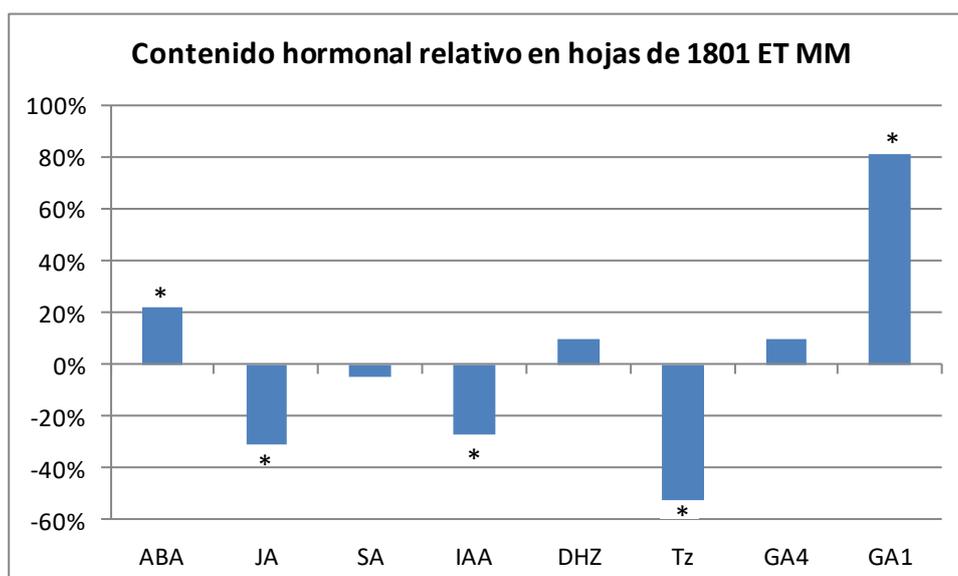
**Figura 100.** Fenotipo de plantas axénicas procedentes de ápices meristemáticos de la línea 1801 ET MM tras 25 días de cultivo en medio básico. La barra representa 1 cm.

Sin embargo, al aclimatar las plantas que presentaban fenotipo mutante para la regeneración en el invernadero, se observó un cambio drástico, ya que aparecieron alteraciones en diversos caracteres con respecto al WT. El enrollamiento de los folíolos se veía con más claridad, los sépalos de las flores eran más largos que los de plantas WT y se vio un cierto fenómeno de enrollamiento parecido al que se observa en los folíolos. Además, los frutos eran de menor tamaño que los frutos de plantas WT y no se obtuvieron semillas a partir de éstos (Figura 101).



**Figura 101.** Fenotipo de hojas, frutos verdes y frutos maduros procedentes de plantas cultivadas en el invernadero de la línea 1801 ET MM. La barra representa 5 cm.

En este mutante se ha analizado el contenido hormonal endógeno como se describe en Material y métodos. Se representa el contenido relativo de las hormonas analizadas respecto de su testigo correspondiente. En este caso, el ácido abscísico y la giberelina GA1 que aumentan su contenido y el ácido jasmónico y ácido indolacético que disminuye respecto del WT, presentan valores que difieren de forma significativa entre las plantas WT y las mutantes. Además, se aprecia una reducción en el contenido endógeno de trans-zeatina (Figura 102).



**Figura 102.** Contenido hormonal endógeno en las hojas de plantas mutantes de la línea 1801 ET MM. Se representa la diferencia relativa de cada hormona analizada del mutante respecto del cv. Money Maker ((M-WT)/WT). El asterisco representa que existe diferencia significativa (test t:  $P < 0,05$ ) entre la media de la concentración del WT y del mutante.

### Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante

Se analizaron 76 individuos en tres experimentos en condiciones de cultivo *in vitro* y se detectó la mutación en 19 plantas. El análisis de homogeneidad indicó que las muestras eran homogéneas y el análisis de los datos acumulados ( $\chi^2$  datos acumulados) indicó que no había motivos para dudar de un modelo de herencia monogénica recesiva para la mutación observada en la línea 1801 ET MM (Tabla 60).

**Tabla 60.** Análisis del modo de herencia del mutante 1801 ET MM.

	Segregación	WT	M	Total	$\chi^2_{(3:1)}$
<b>Experimento 1</b>	Observada	17	4	21	0.40
	Esperada (3:1)	15.7	5.3		
<b>Experimento 2</b>	Observada	20	6	26	0.05
	Esperada (3:1)	19.5	6.5		
<b>Experimento 3</b>	Observada	22	7	29	0.01
	Esperada (3:1)	21.7	7.3		
<b>Datos acumulados<sup>a</sup></b>	Observada	59	17	76	0.28
	Esperada (3:1)	57	19		

<sup>a</sup> Análisis  $\chi^2$  homogeneidad ( $\chi^2_H = 0.18$ ) indica que la muestras son homogéneas ( $P > 0.05$ ;  $\chi^2_{2 \text{ g.l.}} = 5.99$ )

## Análisis genético del número de insertos T-DNA

En cuanto a la resistencia a la kanamicina, el análisis de los datos acumulados, tras comprobar mediante el test de homogeneidad que las muestras eran homogéneas, nos indicó que no había motivos para dudar de que la línea 1801 ET MM porte un único inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional (Tabla 61).

**Tabla 61.** Análisis del número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional de la línea 1801 ET MM.

	Segregación	Kan <sup>R</sup>	Kan <sup>S</sup>	Total	$\chi^2$
Experimento 1	Observada	18	3	21	1.29
	Esperada (3:1)	15.7	5.3		
Experimento 2	Observada	19	7	26	0.05
	Esperada (3:1)	19.5	6.5		
Experimento 3	Observada	24	5	29	0.93
	Esperada (3:1)	21.7	7.3		
Datos acumulados <sup>a</sup>	Observada	61	15	76	1.12
	Esperada (3:1)	57	19		

<sup>a</sup> Análisis  $\chi^2$  homogeneidad ( $\chi^2_H = 1.15$ ) indica que la muestras son homogéneas ( $P > 0.05$ ;  $\chi^2_{2 \text{ g. l.}} = 5.99$ )

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

Para saber si el inserto presente en esta línea es el responsable de la mutación se realizó el ensayo de cosegregación entre el inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional y el fenotipo mutante. Entre las 76 plantas, se observaron 15 sensibles a la kanamicina y todas eran de fenotipo WT. El resto de plantas WT, 44 individuos, fueron resistentes a la kanamicina. Por otra parte, todas las plantas mutantes, 17 individuos, fueron resistentes a la kanamicina. Tras realizar la prueba de la  $\chi^2$  y ver que esta segregación se ajustaba a una distribución 1 WT Kan<sup>S</sup> : 2 WT Kan<sup>R</sup> : 1 M Kan<sup>R</sup> ( $\chi^2_{DA (1:2:1)} = 2.00 < 5.99_{2 \text{ g. l.}} (5\%)$ ) se puede concluir, con una probabilidad de fallo menor del 1%, que existe cosegregación entre la mutación y el inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional presente en esta línea 1801 ET MM (Tabla 62).

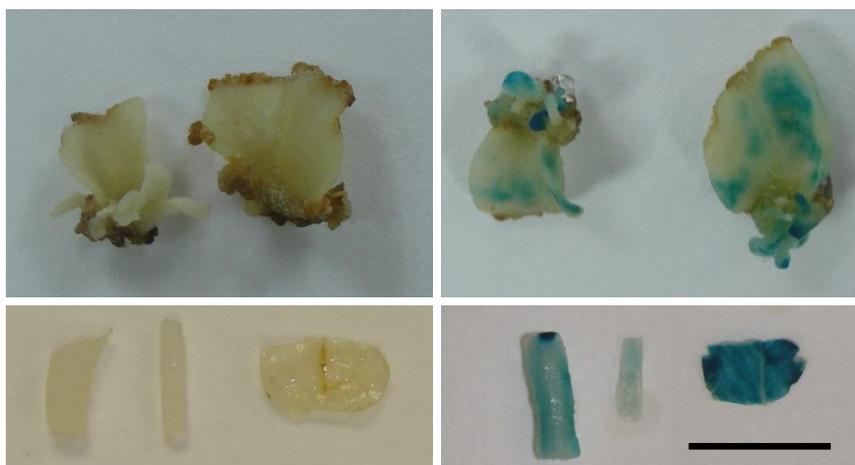
**Tabla 62.** Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 1801 ET MM.

	Segregación	WT Kan <sup>S</sup>	WT Kan <sup>R</sup>	M Kan <sup>R</sup>	M Kan <sup>S</sup>	Total	$\chi^2$
<b>Experimento 1</b>	Observada	3	14	4	0	21	2.43
	Esperada (1:2:1)	5.2	10.6	5.2	0		
<b>Experimento 2</b>	Observada	7	13	6	0	26	0.08
	Esperada (1:2:1)	6.5	13	6.5	0		
<b>Experimento 3</b>	Observada	5	17	7	0	29	1.14
	Esperada (1:2:1)	7.2	14.6	7.2	0		
<b>Datos acumulados</b> <sup>a</sup>	Observada	15	44	17	0	76	2.00
	Esperada (1:2:1)	19	38	19	0		

<sup>a</sup> Análisis  $\chi^2$  homogeneidad ( $\chi^2_H = 1.64$ ) indica que la muestras son homogéneas ( $P > 0.05$ ;  $\chi^2_{4 g.l.} = 9.48$ )

### Evaluación de la expresión del gen delator

Al estudiar el patrón de expresión GUS, se ha detectado su presencia en explantes de cotiledón, limbo de foliolo, raquis de hoja y tallo. El patrón de expresión del gen delator, visto en las plantas mutantes y en las WT Kan<sup>R</sup>, ha resultado ser ubicuo en todos los explantes analizados (Figura 103).

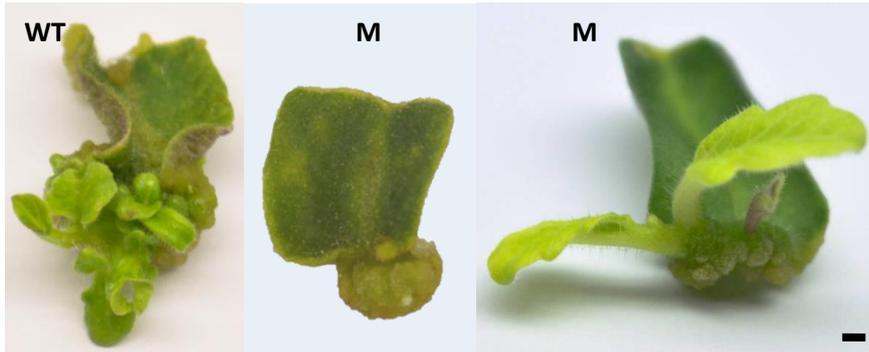


**Figura 103.** Expresión del gen delator *uidA* en explantes de cotiledón (parte superior) y explantes de tallo, raquis y limbo de hoja (parte inferior) de plantas acigotas para el T-DNA (parte izquierda) y portadoras del T-DNA (parte derecha) de la línea 1801 ET MM. La barra representa 1 cm.

Actualmente se está abordando la clonación del gen etiquetado para, posteriormente, poder realizar su análisis funcional.

#### 4.1.4.4.- Mutante 1311 ET MM

Este mutante se detectó al observar que al cultivar explantes de cotiledón en medio organogénico algunos de los explantes sólo generan un callo desorganizado y en otros se ve la generación de estructuras similares a hojas, mientras que en los explantes de fenotipo WT se forman yemas y ápices meristemáticos en las mismas condiciones (Figura 104).



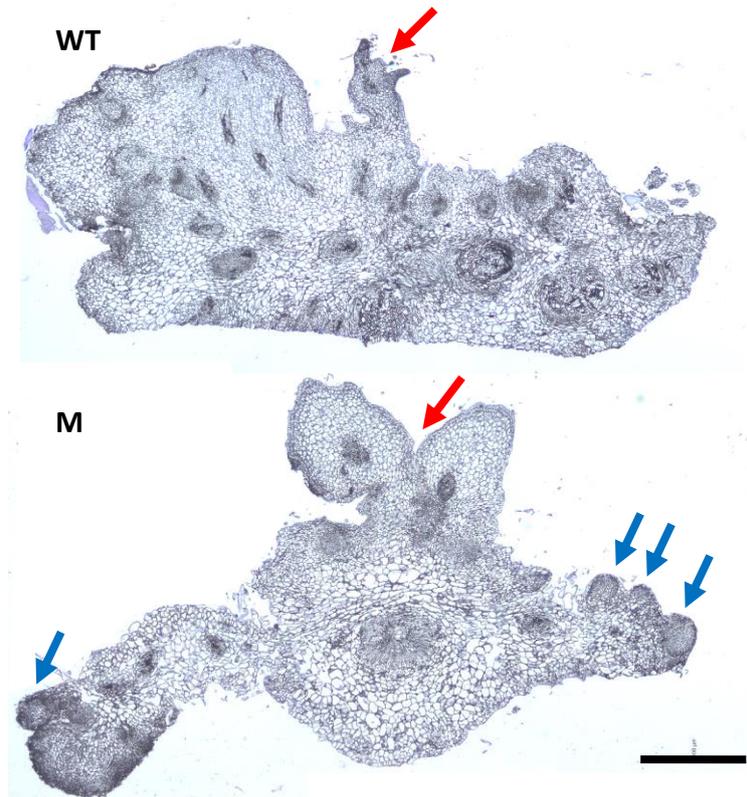
**Figura 104.** Fenotipo de explantes de cotiledón de la línea 1311 ET MM tras 25 días de cultivo en medio organogénico. La barra representa 1 mm.

Los explantes de cotiledón que no regeneraron brotes adventicios no presentaban ninguna alteración en su reacción de herida, es decir, en las primeras rondas de división celular que suelen producirse tras el cultivo de los explantes. Sin embargo, tras veinticinco días de cultivo los explantes mutantes sólo generaron estructuras similares a hojas pero sin la presencia aparente de brotes adventicios (Figura 105).



**Figura 105.** Fenotipo de explantes de cotiledón de la línea 1311 ET MM tras 0, 7 y 30 días de cultivo en medio organogénico. La barra representa 1 cm.

Ante la duda que se plantea de si esas estructuras que se forman realmente van acompañadas de lo que cabría calificar como un brote adventicio, se realizaron cortes histológicos del callo perpendiculares al nervio del explante. De esta forma se pudo observar con más detalle que en los callos de fenotipo mutante no se observaron brotes adventicios con un meristemo apical organizado (Figura 106).



**Figura 106.** Cortes histológicos de la línea 1311 ET MM. Corte transversal de callos organogénicos de explantes de cotiledón cultivados 25 días en medio de regeneración. La flecha roja indica donde está (WT) o debería localizarse (M) el meristemo apical. Las flechas azules indican la formación de estructuras nodulares. La barra representa 1 mm.

Además, para comprobar la ausencia de meristemos apicales, se cultivaron los explantes de cotiledón que habían pasado un mes en medio organogénico a un medio de elongación (IK 4.0 4.0). Tras veinte días de cultivo, no se vio la elongación de ningún brote en los explantes mutantes, sino que lo único que se observó es que las hojas aumentaban de tamaño. En cambio, en los callos del

WT, las yemas adventicias originaron brotes que elongaron normalmente (Figura 107).

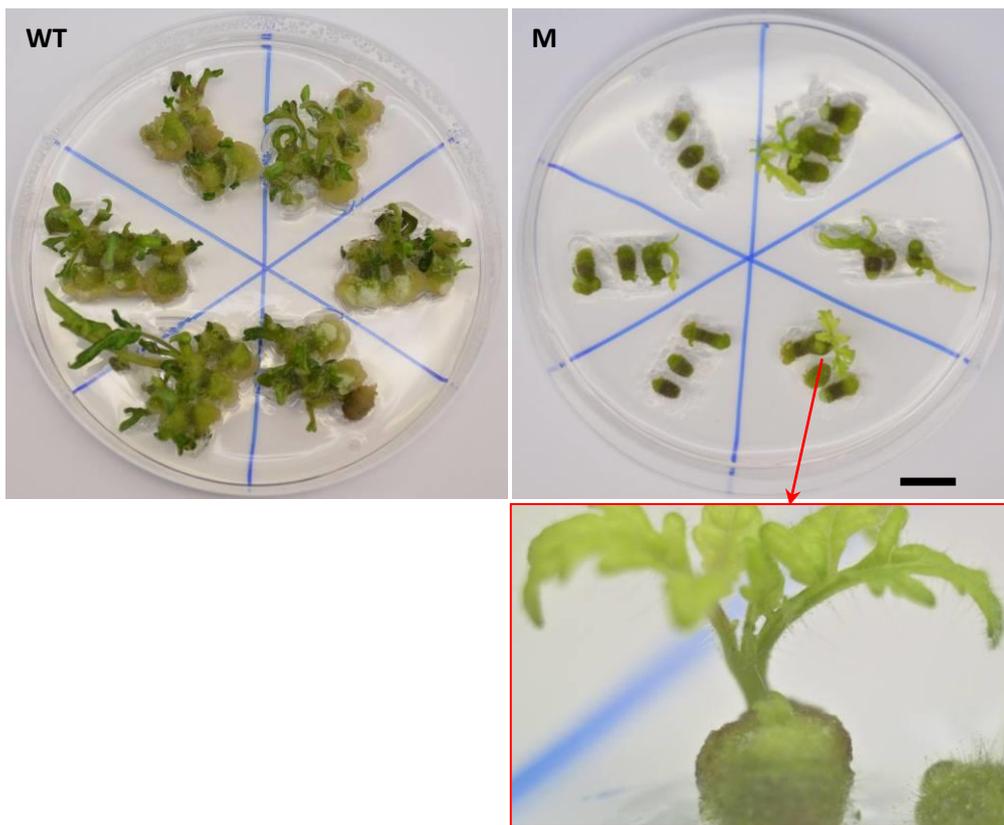


**Figura 107.** Fenotipo de explantes de cotiledón de la línea 1311 ET MM cultivados en un medio organogénico durante 25 días y después subcultivados a un medio de elongación durante 20 días más. La barra representa 1 cm.

Para comprobar si el desarrollo anormal de los brotes estaba relacionado con una concentración insuficiente de citoquininas en el medio organogénico, se cultivaron explantes de cotiledón en medios con alguna modificación en su composición hormonal: doble concentración de zeatina, de kinetina o de ambas citoquininas. Como no se obtuvieron resultados significativos con este experimento, se decidió probar el cambio del tipo de citoquinina empleada. La zeatina y la kinetina se reemplazaron en el medio de cultivo por otras citoquininas tales como 6-benciladenina y tidiazurón. En uno de ellos se añade  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de 6-benciladenina en lugar de la kinetina. En estas condiciones se vio que los explantes mutantes formaron callo desorganizado y sólo se vio la generación, como en el IKZ, de pequeñas hojas. En el segundo medio utilizado la única citoquinina utilizada fue  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de tidiazuron. En estas condiciones

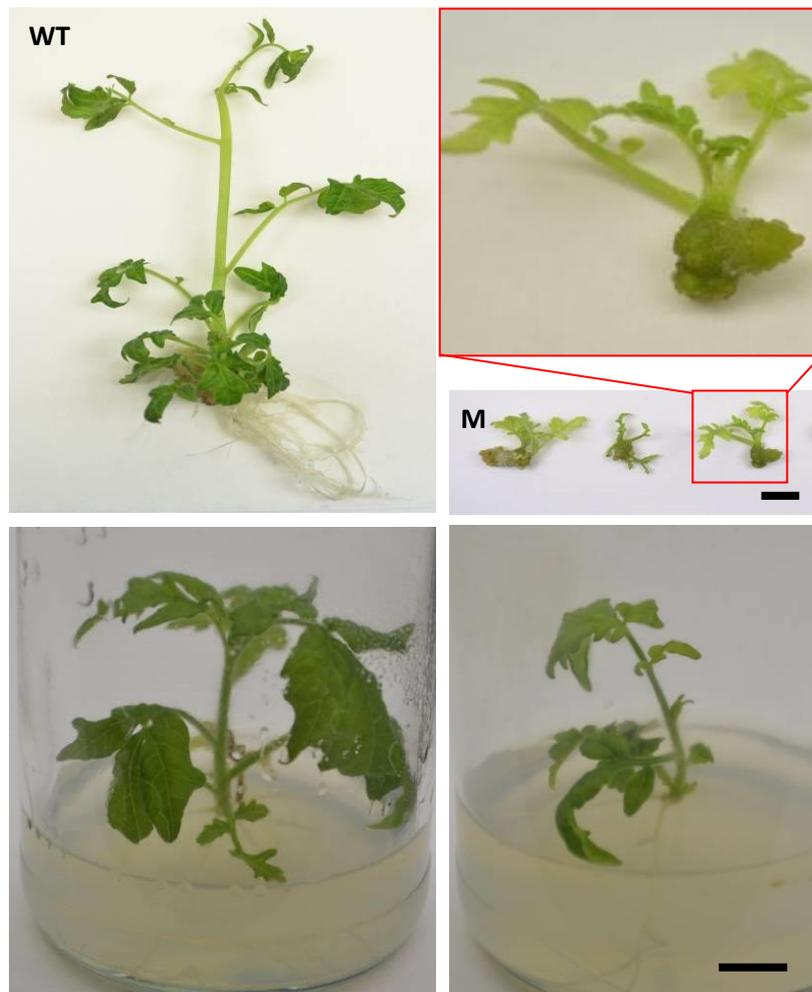
de cultivo, los explantes mutantes sólo generaron un pequeño callo desorganizado mientras que los explantes WT formaron un callo desorganizado de mayor tamaño y se observó la regeneración de estructuras vegetativas. Con este experimento se comprobó que la presencia de otras citoquininas de tipo adenina y fenilurea en el medio de regeneración habitual, no revierten el fenotipo mutante ya que no se forman estructuras organogénicas.

Para ver la influencia del explante de partida en el fenotipo mutante se cultivaron segmentos de hipocótilo en medio de regeneración. Se observaron diferencias en cuanto a la respuesta morfogénica del mutante con respecto al WT. Los explantes procedentes de plántulas mutantes no produjeron tanto callo desorganizado como los WT. Sin embargo, aunque los explantes de hipocótilo del mutante tenían menor capacidad morfogénica, en algunos de los explantes se vio la regeneración de ápices meristemáticos, lo cual no se observó en ningún caso a partir de explantes de cotiledón (Figura 108).



**Figura 108.** Fenotipo de explantes de hipocótilo de la línea 1311 ET MM cultivados durante 25 días en medio de regeneración. La barra representa 1 cm.

Los segmentos de hipocótilo de plántulas mutantes se subcultivaron en un medio de elongación de los ápices (IK 4.0 4.0) para ver si se formaban plantas completas. Tras el subcultivo de segmentos WT y M se vio que los ápices meristemáticos formados a partir del cultivo de segmentos de hipocótilo mutante no elongaban como los procedentes de explantes WT. Sin embargo, tras el posterior subcultivo a medio de enraizamiento de los brotes mutantes, éstos desarrollaron raíces y siguieron creciendo hasta formar una planta completa (Figura 109).



**Figura 109.** Fenotipo de explantes de hipocótilo cultivados durante 25 días en medio de regeneración y otros 25 en medio de elongación (arriba) y de los brotes cultivados en medio de enraizamiento (abajo) de la línea 1311 ET MM. La barra representa 1 cm.

Las plantas regeneradas a partir de explantes de hipocótilo de fenotipo mutante no presentaban alteraciones en el desarrollo vegetativo en condiciones de cultivo *in vitro* y crecieron de la misma manera que lo hacían las plantas cuyos explantes de cotiledón fueron de fenotipo WT.

En cuanto al enraizamiento de las plantas mutantes, no se observaron diferencias significativas con las plántulas WT procedentes de semillas. El sistema radicular embrionario de plántulas mutantes 18 días después de su germinación no difiere en ninguno de los caracteres analizados con respecto a plántulas WT. En cuanto al enraizamiento adventicio a partir del cultivo de

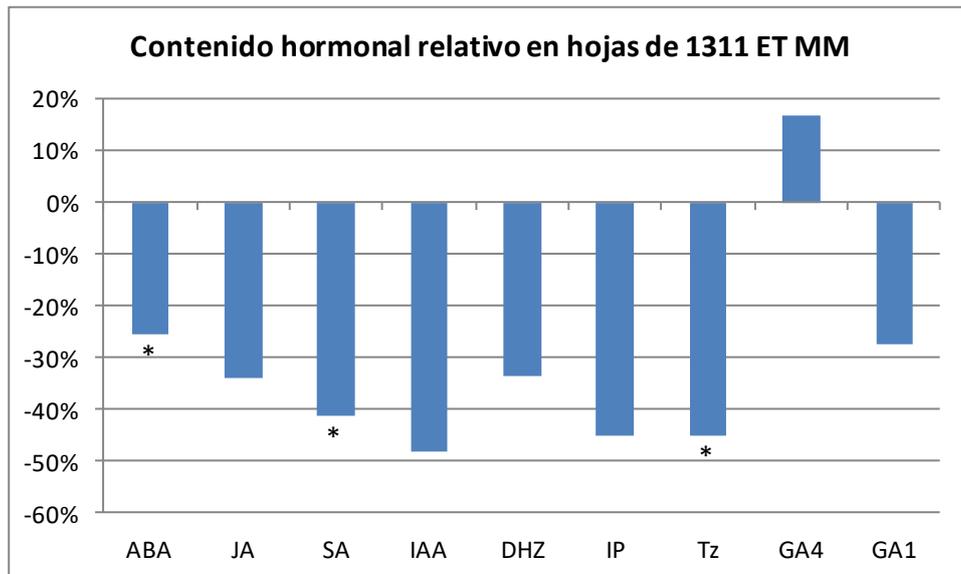
ápices meristemáticos y yemas axilares tampoco se observaron diferencias entre WT y M (Figura 110).



**Figura 110.** Fenotipo de plantas axénicas procedentes de ápices meristemáticos de la línea 1311 ET MM tras 30 días de cultivo en medio básico. La barra representa 1 cm.

En resumen, los callos de los explantes de la línea 1311 ETMM diferencian yemas adventicias pero no desarrollan brotes normales. Los análisis histológicos revelan que su desarrollo anormal se debe a un defecto en la organización de los meristemos apicales adventicios. Desde nuestro punto de vista, lo más destacable es que el desarrollo de las plántulas mutantes no presenta ninguna alteración, lo que indica que el gen alterado cumple un papel específico en el desarrollo de meristemos adventicios.

Por último, en este mutante se ha analizado el contenido hormonal endógeno como se describe en Material y métodos. Se representa el contenido relativo de las hormonas analizadas respecto de su testigo correspondiente. En este caso, se observan diferencias significativas en ácido abscísico, ácido salicílico y trans-zeatina. En los tres casos el contenido hormonal del mutante es menor que el WT (Figura 111).



**Figura 111.** Contenido hormonal endógeno en las hojas de plantas mutantes de la línea 1311 ET MM. Se representa la diferencia relativa de cada hormona analizada del mutante respecto del cv. Money Maker ((M-WT)/WT). El asterisco representa que existe diferencia significativa (test t:  $P < 0,05$ ) entre la media de la concentración del WT y del mutante.

### Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante

Se realizaron dos experimentos y la mutación se manifestó en ambos. El análisis de homogeneidad indicó que las muestras eran homogéneas. El resultado del análisis de los datos acumulados ( $\chi^2$  datos acumulados) nos indicó que no había motivos para dudar de que el fenotipo alterado esté causado por una mutación monogénica recesiva en línea 1311 ET MM (Tabla 63).

**Tabla 63.** Análisis del modo de herencia del mutante 1311 ET MM.

	<b>Segregación</b>	<b>WT</b>	<b>M</b>	<b>Total</b>	$\chi^2$
<b>Experimento 1</b>	Observada	18	4	22	0.54
	Esperada (3:1)	16.5	5.5		
<b>Experimento 2</b>	Observada	27	8	35	0.08
	Esperada (3:1)	26.3	8.7		
<b>Datos acumulados</b> <sup>a</sup>	Observada	45	12	57	0.47
	Esperada (3:1)	42.7	14.3		

<sup>a</sup> Análisis  $\chi^2$  homogeneidad ( $\chi^2_H = 0.16$ ) indica que la muestras son homogéneas ( $P > 0.05$ ;  $\chi^2_{1 \text{ g.l.}} = 3.84$ )

### **Análisis genético del número de insertos T-DNA**

Tras analizar un total de 57 plantas TG2, los resultados indican que no hay motivos para dudar de que la línea 1311 ET MM porte un único inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional (Tabla 64).

**Tabla 64.** Análisis del número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional de la línea 1311 ET MM.

	<b>Segregación</b>	<b>Kan<sup>R</sup></b>	<b>Kan<sup>S</sup></b>	<b>Total</b>	$\chi^2$
<b>Experimento 1</b>	Observada	16	6	22	0.06
	Esperada (3:1)	16.5	5.5		
<b>Experimento 2</b>	Observada	27	8	35	0.08
	Esperada (3:1)	26.3	8.7		
<b>Datos acumulados</b> <sup>a</sup>	Observada	43	14	57	0.01
	Esperada (3:1)	42.7	14.3		

<sup>a</sup> Análisis  $\chi^2$  homogeneidad ( $\chi^2_H = 0.14$ ) indica que la muestras son homogéneas ( $P > 0.05$ ;  $\chi^2_{1 \text{ g.l.}} = 3.84$ )

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

Se comprobó que no existe cosegregación del inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional y el fenotipo mutante en la línea 1311 ET MM, ya que se observaron tres plantas mutantes sensibles a la kanamicina en los dos experimentos realizados (Tabla 65).

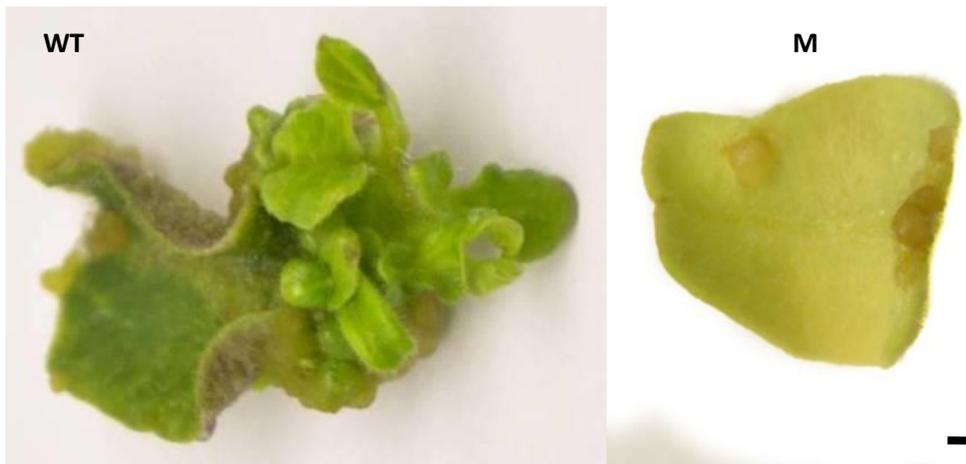
**Tabla 65.** Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 1311 ET MM.

	WT		M		Total
	Kan <sup>R</sup>	Kan <sup>S</sup>	Kan <sup>R</sup>	Kan <sup>S</sup>	
<b>Experimento 1</b>	13	5	3	1	22
<b>Experimento 2</b>	21	6	6	2	35
<b>Datos acumulados</b>	34	11	9	3	57

Al comprobar que no existe cosegregación entre ningún T-DNA con el gen *nptII* funcional y el fenotipo mutante, se han realizado cruces entre plantas mutantes y plantas de *Solanum pimpinellifolium*. Tras la obtención de semillas F1 y su cultivo se ha conseguido la generación de semillas F2 mediante autofecundación. En este material se han identificado individuos mutantes y WT mediante el cultivo de explantes de cotiledón en medio organogénico y se ha guardado material vegetal de suficientes individuos (40 plantas de cada fenotipo) para abordar la identificación del gen mutado mediante técnicas de genotipado por secuenciación.

#### 4.1.4.5.- Mutante 2225 ET MM

Este mutante se detectó al cultivar explantes de cotiledón en medio organogénico. Se observó que los explantes procedentes de plántulas mutantes sólo generaron un pequeño callo desorganizado, tenían una coloración clorótica y, en ningún caso, formaron yemas adventicias (Figura 112).



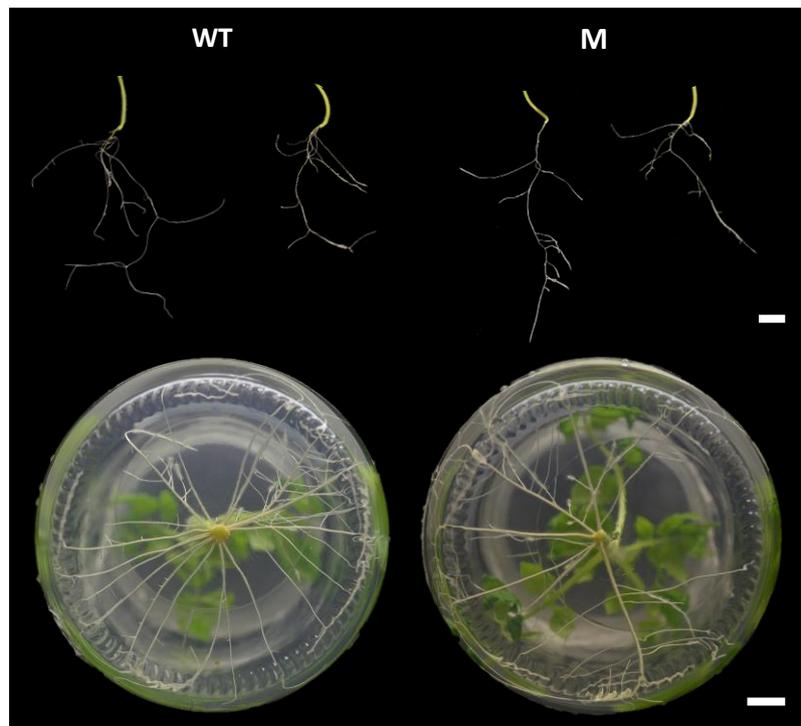
**Figura 112.** Fenotipo de explantes de cotiledón de la línea 2225 ET MM tras 25 días de cultivo en medio organogénico. La barra representa 1 mm.



**Figura 113.** Fenotipo de plantas axénicas procedentes de ápices meristemáticos de la línea 2225 ET MM tras 15 días de cultivo en medio básico. La barra representa 1 cm.

Tras el cultivo de los ápices meristemáticos en medio básico no se observó ninguna alteración respecto de las plantas WT en su desarrollo vegetativo en condiciones de cultivo *in vitro* (Figura 113).

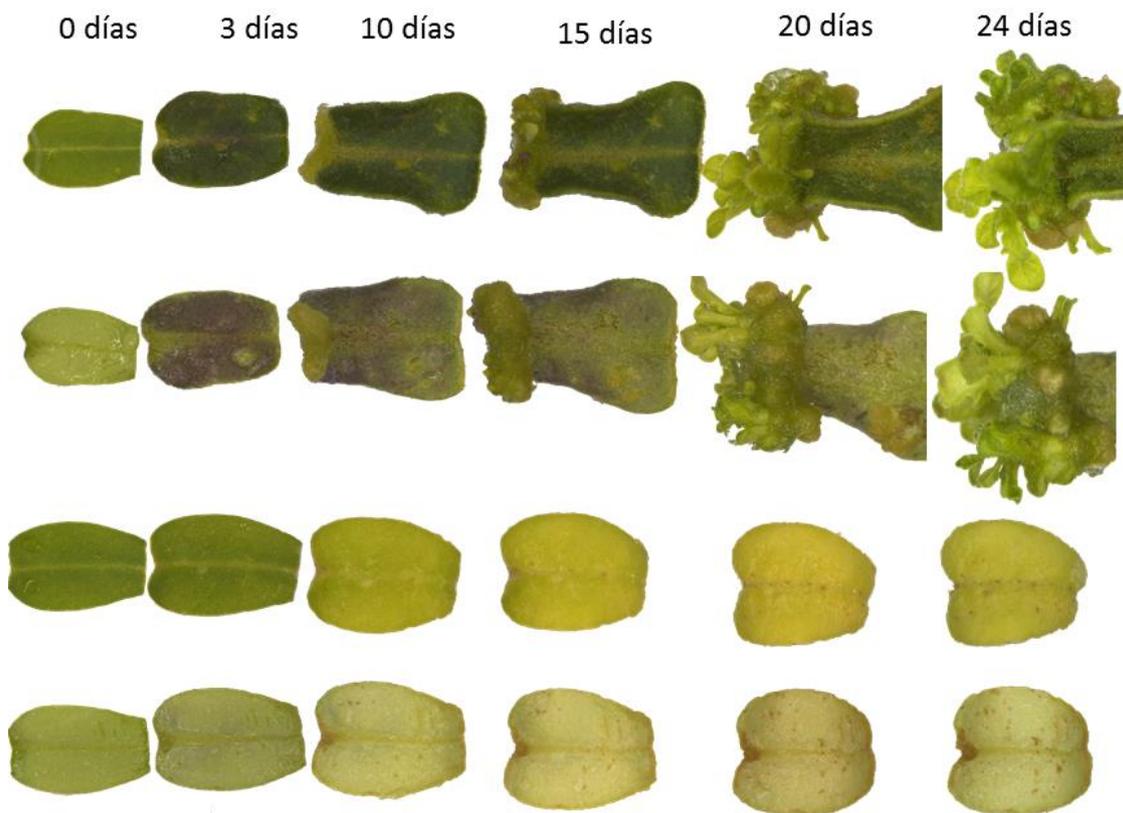
El sistema radicular embrionario que se obtuvo a partir del cultivo de semillas en medio de germinación durante 18 días tenía la capacidad de elongar la raíz principal de manera normal y se observó la emergencia de raíces laterales como ocurría en plántulas WT. Al igual que ocurrió con la raíz embrionaria, en el sistema radicular adventicio no se observaron diferencias entre las plantas WT y las mutantes (Figura 114).



**Figura 114.** Fenotipo de las raíces embrionarias de plántulas procedentes de semillas tras 10 días de cultivo en medio de germinación (arriba) y de las raíces adventicias procedentes del hipocótilo tras 25 días de cultivo de ápices meristemáticos en medio de enraizamiento (abajo) de la línea 2225 ET MM. La barra representa 1 cm.

Para estudiar con detalle el proceso que sufren los explantes de cotiledón procedentes de plántulas mutantes respecto de explantes WT, se realizó el seguimiento de su desarrollo. Se observó que los explantes de cotiledón mutantes presentaban una pérdida gradual de clorofila, a diferencia de lo que ocurría con los explantes WT. A los diez días de cultivo en medio organogénico

los explantes mutantes tenían un color totalmente clorótico. Además, los explantes mutantes no sintetizaban lo que parecen ser antocianos como lo hacían los explantes WT. En el envés de explantes mutantes no se observó la típica coloración rojiza de los explantes WT. Sólo se pudo ver esta coloración de forma tenue a los tres días en el envés de los explantes. Por otra parte, en cuanto a la formación de callo desorganizado, se observó claramente en los explantes WT con 10 días de cultivo mientras que en ese momento no se observa ningún crecimiento celular en los explantes mutantes. Por último, tras 15 días de cultivo y en etapas posteriores, se observó con claridad la formación de estructuras organogénicas, primero yemas y luego ápices, en los explantes testigo mientras que en los mutantes tan sólo se observó la formación de un pequeño callo desorganizado con aspecto necrótico (Figura 115).

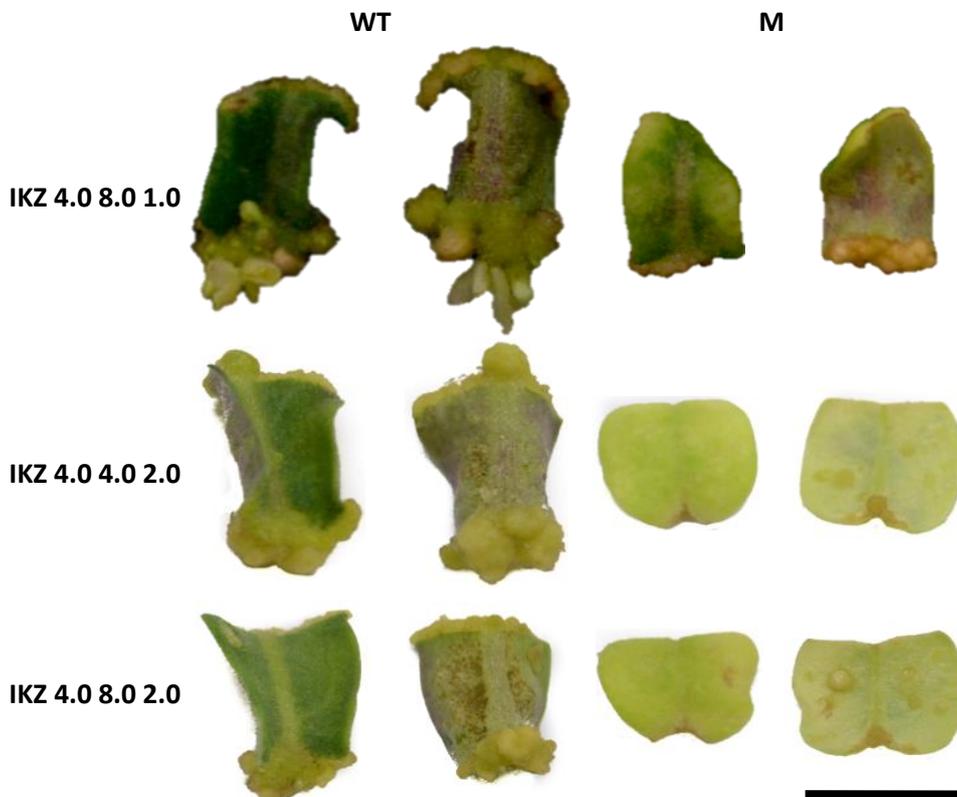


**Figura 115.** Fenotipo de explantes de cotiledón de la línea 2225 ET MM en diferentes momentos de su desarrollo tras ser cultivados en medio organogénico. En la parte superior de la figura hay explantes de fenotipo normal (línea superior el haz y línea inferior el envés) y en la parte inferior explantes de fenotipo mutante (línea superior el haz y línea inferior el envés). La barra representa 1 cm.

Se realizó el ensayo de regeneración en medio organogénico con explantes de hojas para ver si lo observado con explantes de cotiledón se reproducía en explantes de foliolo. Se corroboró que lo observado en cotiledones mutantes también se veía en explantes de foliolo, en los que también ocurría la pérdida de la clorofila, la formación de pequeños callos desorganizados y la incapacidad de regenerar yemas adventicias (Figura 116).



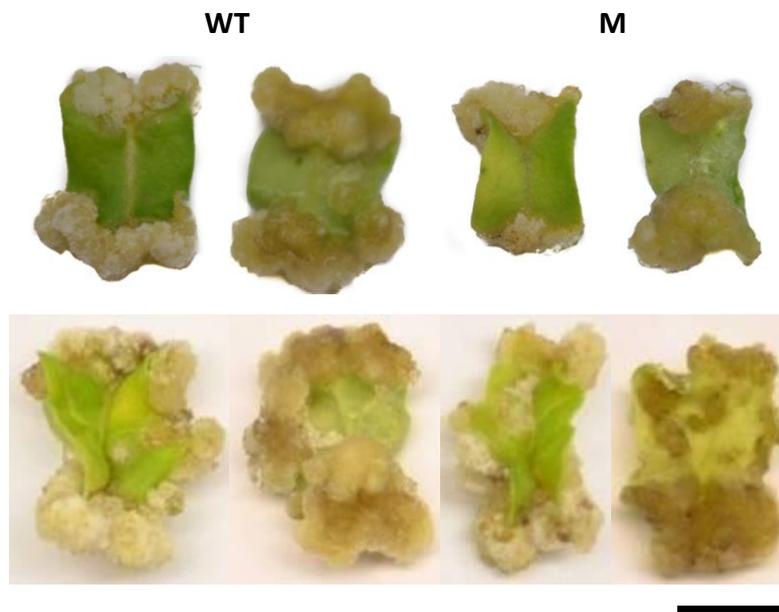
**Figura 116.** Fenotipo de explantes de foliolo de la línea 2225 ET MM a los 25 días de cultivo en medio organogénico (a la izquierda haz y a la derecha envés). La barra representa 1 cm.



**Figura 117.** Fenotipo de explantes de cotiledón de la línea 2225 ET MM a los 25 días de cultivo en medio organogénico con distintas concentraciones de citoquininas (izquierda haz y derecha envés). La barra representa 1 cm.

Se cultivan explantes de cotiledón de tres medios organogénicos en los cuales se aumentaban los niveles de citoquininas. En el único medio que se obtuvo una respuesta diferente a la vista hasta ese momento es en el medio en el cual solamente se duplica la concentración de la kinetina (IAA 4.0 mg·L<sup>-1</sup> Kinetina 8.0 mg·L<sup>-1</sup> Zeatina 1.0 mg·L<sup>-1</sup>, IKZ 4.0 8.0 1.0). En estas condiciones se observó que los explantes mutantes generaron cierto callo desorganizado. Sin embargo, en ningún caso se observó la presencia de estructuras organogénicas (Figura 117).

Por otra parte, dado el fenotipo de este mutante, también se cultivaron explantes de cotiledón y de foliolo en un medio que favorece la formación de callo desorganizado en tomate (DNB 1.0 2.0 1.0: MB3 + 2-4 D 1.0 mg·L<sup>-1</sup> + NAA 2.0 mg·L<sup>-1</sup> + 6-Benciladenina 1.0 mg·L<sup>-1</sup>). En estas condiciones, a diferencia de lo observado en el medio organogénico, los explantes de cotiledón y de foliolo mutantes formaron un callo desorganizado similar al que forman los explantes WT (Figura 118).

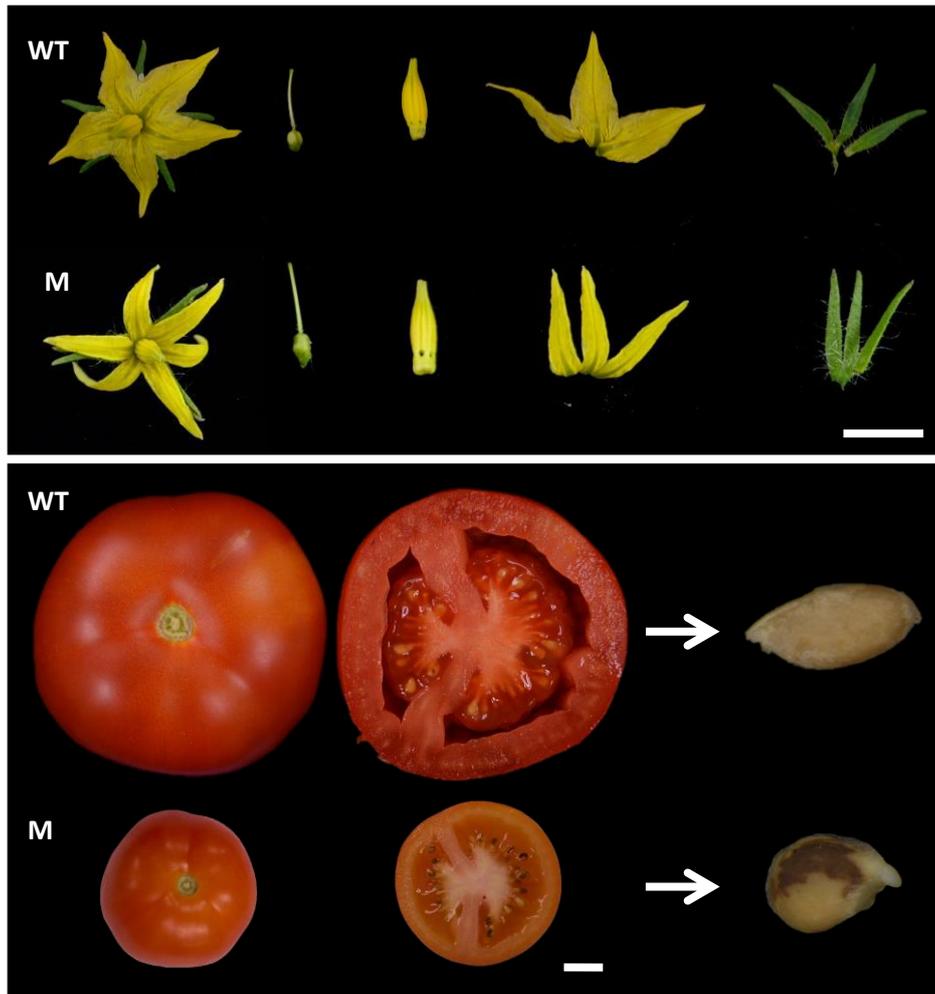


**Figura 118.** Fenotipo de explantes de cotiledón (arriba) y hoja (abajo) de la línea 2225 ET MM a los 25 días de cultivo en medio de inducción de callo desorganizado (izquierda haz y derecha envés). La barra representa 1 cm.

En resumen, la mutación presente en la línea 2225 ETMM impide la formación de callo dependiendo de la composición de reguladores del crecimiento en el medio de cultivo. Sin embargo, la planta mutante no tiene afectado el desarrollo

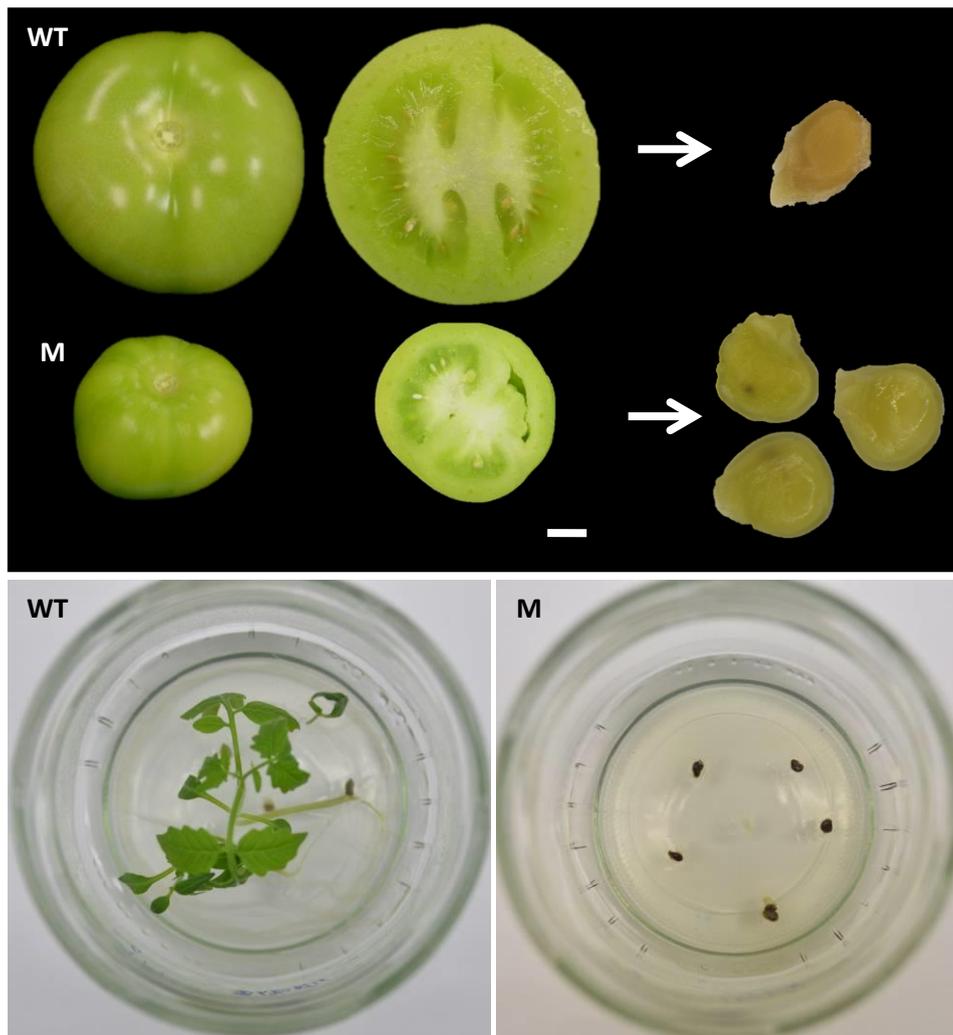
vegetativo *in vitro*, lo que indica que la mutación no afecta a los procesos de división celular *in planta*, sino que su efecto está restringido a la proliferación celular a partir de las zonas de corte de los explantes cultivados *in vitro*.

Se aclimataron plantas mutantes para la obtención de semillas TG3 y para evaluar su fenotipo *in vivo*. Estas plantas no presentaban alteraciones significativas en su desarrollo vegetativo en condiciones de invernadero. Sin embargo, las flores de plantas mutantes tenían los pétalos más delgados. Además, los frutos de las plantas mutantes eran más pequeños que los de las plantas WT. Adicionalmente, la testa de las semillas procedentes de plantas mutantes tiene zonas de color marrón, lo cual podría indicar una cierta necrosis. Además, la parte distal de la radícula embrionaria se encontraba en el exterior de la cubierta de la semilla. (Figura 119).



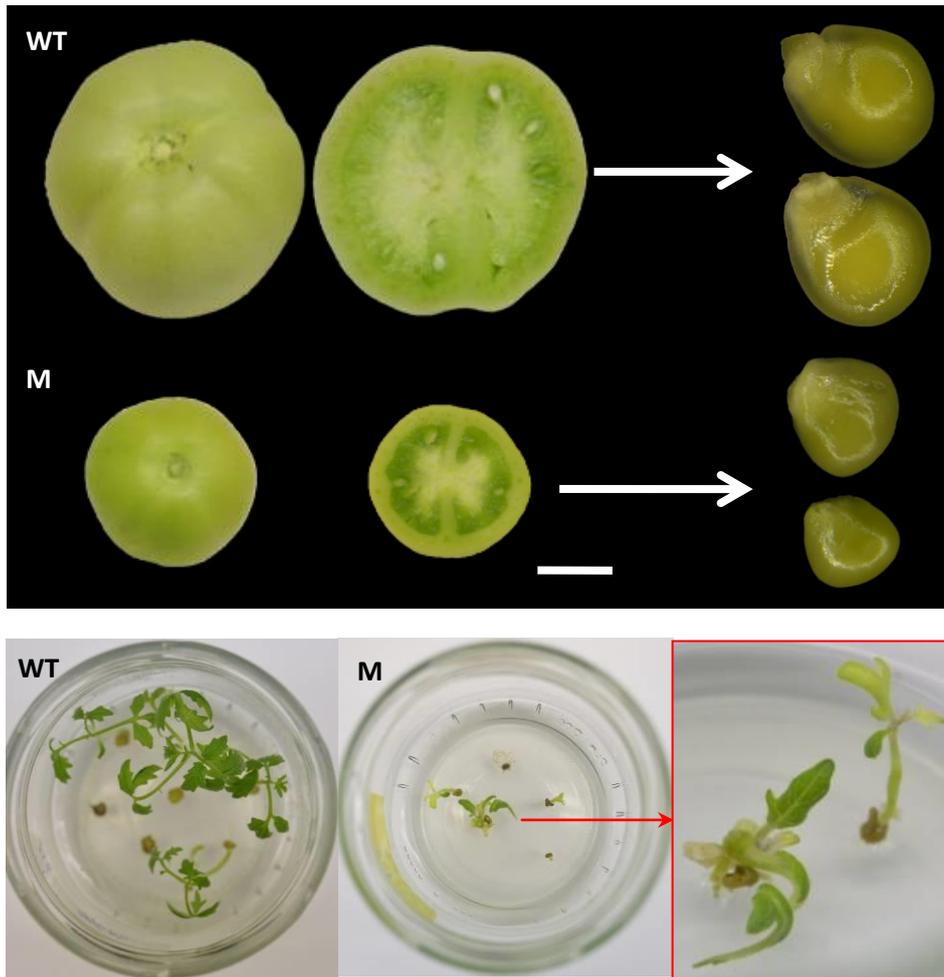
**Figura 119.** Fenotipo de las flores, frutos maduros y semillas de la línea 2225 ET MM procedentes de plantas cultivadas en el invernadero. La barra representa 1 cm.

Cuando se esterilizaron las semillas procedentes de frutos rojos de la forma habitual y se cultivaron en medio de germinación no creció ninguna plántula. Probablemente el proceso de necrosis y/o la anómala emergencia del meristemo radicular pueden explicar esto. Para profundizar en las características de este mutante e intentar obtener plantas a partir de semillas mutantes se decidió ampliar su estudio con frutos verde-inmaduros y de frutos verde-maduros. En el caso de frutos verde-maduros se observó una menor incidencia de manchas marrones en las cubiertas de las semillas, sin embargo, cuando de se extraen las semillas directamente de los frutos y se cultivaron en medio de germinación, éstas tampoco germinan (Figura 120).



**Figura 120.** Fenotipo de frutos verde-maduros y semillas extraídas de esos frutos (arriba) de la línea 2225 ET MM y cultivadas en medio de germinación (abajo). La barra representa 1 cm.

Las semillas de plantas mutantes que provienen de frutos verde-inmaduro no presentaban manchas color marrón. Además, cuando se sembraron las semillas en medio MG se consiguió la germinación de alguna de ellas, pero las plantas que se formaban presentaron ciertas alteraciones que no permiten un crecimiento normal, como sí ocurría en plantas procedentes de semillas WT en ese mismo estado de desarrollo (Figura 121).



**Figura 121.** Fenotipo de frutos verde-inmaduros y semillas extraídas de esos frutos (arriba) de la línea 2225 ET MM y cultivadas en medio de germinación (abajo). La barra representa 1 cm.

### **Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante**

La mutación se observó en los tres experimentos realizados. El análisis de homogeneidad indicó que las muestras eran homogéneas. Sin embargo, cabe señalar que los resultados del experimento 1, a diferencia de los experimentos 2 y 3, se desviaron de esta segregación. Además, el resultado del análisis de los datos acumulados ( $\chi^2$  datos acumulados) fue significativa para una hipótesis de una mutación monogénica recesiva ( $\chi^2$  DA  $_{(3:1)} = 5.12 > 3.84$  1 g. l. (5%). A pesar de estas desviaciones, la segregación observada sugiere que el modo de herencia de la mutación es monogénica recesiva (Tabla 66).

**Tabla 66.** Análisis del modo de herencia del mutante 2225 ET MM.

	<b>Segregación</b>	<b>WT</b>	<b>M</b>	<b>Total</b>	$\chi^2$
<b>Experimento 1</b>	Observada	17	1	18	3.63
	Esperada (3:1)	13.5	4.5		
<b>Experimento 2</b>	Observada	30	6	36	1.33
	Esperada (3:1)	27	9		
<b>Experimento 3</b>	Observada	37	8	45	1.25
	Esperada (3:1)	33.7	11.3		
<b>Datos acumulados</b> <sup>a</sup>	Observada	84	15	99	5.12
	Esperada (3:1)	74.3	24.7		

<sup>a</sup> Análisis  $\chi^2$  homogeneidad ( $\chi^2_H = 1.09$ ) indica que la muestras son homogéneas ( $P > 0.05$ ;  $\chi^2_{2 \text{ g.l.}} = 5.99$ )

La explicación para el desvío de la prueba de la  $\chi^2$  podría ser un cierto grado de subletalidad que se asocia al fenotipo mutante, lo que justificaría un menor número de plantas mutantes, fenómeno que se observa en los tres experimentos y, obviamente, en los datos acumulados.

### **Análisis genético del número de insertos T-DNA**

Los resultados indicaron que no había motivos para dudar de que la línea 2225 ET MM porte un único inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional (Tabla 67).

**Tabla 67.** Análisis del número de insertos T-DNA con el gen *nptII* funcional de la línea 2225 ET MM.

	<b>Segregación</b>	<b>Kan<sup>R</sup></b>	<b>Kan<sup>S</sup></b>	<b>Total</b>	$\chi^2$
<b>Experimento 1</b>	Observada	13	5	18	0.18
	Esperada (3:1)	13.5	4.5		
<b>Experimento 2</b>	Observada	28	8	36	0.15
	Esperada (3:1)	27	9		
<b>Experimento 3</b>	Observada	35	10	45	0.18
	Esperada (3:1)	33.7	11.3		
<b>Datos acumulados</b> <sup>a</sup>	Observada	76	23	99	0.16
	Esperada (3:1)	74.3	24.7		

<sup>a</sup> Análisis  $\chi^2$  homogeneidad ( $\chi^2_H = 0.24$ ) indica que la muestras son homogéneas ( $P > 0.05$ ;  $\chi^2_{2 \text{ g.l.}} = 5.99$ )

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

Se comprobó que no existe cosegregación del inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional y el fenotipo mutante en la línea 2225 ET MM, ya que se observaron cinco plantas mutantes sensibles a la kanamicina entre los tres experimentos realizados (Tabla 68).

**Tabla 68.** Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 2225 ET MM.

	WT		M		Total
	Kan <sup>R</sup>	Kan <sup>S</sup>	Kan <sup>R</sup>	Kan <sup>S</sup>	
Experimento 1	14	4	0	1	18
Experimento 2	24	6	4	2	36
Experimento 3	29	8	6	2	45
Datos acumulados	66	18	10	5	99

Al comprobar que no existe cosegregación entre ningún T-DNA con el gen *nptII* funcional y el fenotipo mutante se han realizado diferentes cruces entre plantas mutantes y plantas de *Solanum pimpinellifolium*. Tras la obtención de semillas F1 y su cultivo se ha conseguido la generación de semillas F2 mediante autofecundación. En este material se han identificado individuos mutantes y WT mediante el cultivo de explantes de cotiledón en medio organogénico y se ha guardado material vegetal de suficientes individuos (40 plantas de cada fenotipo) para abordar la identificación del gen mutado mediante técnicas de genotipado por secuenciación.

# Discusión

## **5.1.- Identificación de mutantes en tomate mediante la utilización del cultivo *in vitro***

El estudio de mutantes es una estrategia clásica y probablemente la herramienta genética más valiosa para profundizar en el conocimiento de los genes que son responsables de los procesos biológicos. Además de su gran importancia económica, el tomate (*Solanum lycopersicum*) presenta diversas características que lo hacen una especie interesante para la investigación. Presenta un genoma relativamente pequeño (950 Mb) y, gracias a esfuerzos de entidades tanto públicas como privadas, se dispone de una gran colección de germoplasma, tanto de la propia especie como de especies silvestres relacionadas. Además, se han realizado múltiples avances metodológicos que han permitido poner a punto distintos protocolos para poder investigar esta especie entre los que destacan varios de transformación genética. Por todo ello, el tomate se considera un organismo modelo para el estudio de caracteres de interés agronómico como, por ejemplo, el desarrollo del fruto.

Generalmente, el escrutinio e identificación de mutantes de tomate se realiza mediante el fenotipado de poblaciones mutagenizadas cultivadas en el campo o el invernadero. Las plantas se evalúan para detectar mutantes de carácter dominante y se cosechan las semillas para detectar mutaciones recesivas. Para la detección de mutantes en tomate, se ha utilizado preferentemente el cultivar Micro-Tom. Esto es debido a que este cultivar presenta una estatura pequeña (15-20 cm), tiene un ciclo de vida corto (70-90 días), se pueden cultivar las plantas en un espacio reducido y es fácil de transformar mediante *Agrobacterium tumefaciens* (Meissner *et al.*, 1997; Emmanuel y Levy, 2002; Sun *et al.*, 2006). De esta forma, se han detectado 1,048 mutantes tras el escrutinio de una población de 9,183 líneas M1 obtenidas mediante mutagénesis con EMS y rayos gamma en Microtom (Saito *et al.*, 2011). También, se han obtenido 2,932 líneas mutantes obtenidas con elementos transponibles de maíz (Meissner *et al.*, 2000).

En el presente trabajo se ha utilizado una colección de líneas mutagenizadas de tomate generada a partir del cultivar comercial Moneymaker. La planta de Moneymaker tiene un hábito de crecimiento indeterminado y tiene un ciclo de vida de hasta dos años. En nuestro laboratorio, se cuenta con un método de transformación con una elevada eficacia útil (número de plantas transgénicas diploides procedentes de eventos de transformación independientes/número de explantes transformados). En el caso de tomate, disponemos de un método de transformación que tiene una eficacia útil en torno al 20-25%. Esto quiere decir que por cada 100 explantes del cultivar Moneymaker que se inoculan con *Agrobacterium tumefaciens*, se obtienen entre 20 y 25 plantas transgénicas diploides procedentes de eventos de transformación independientes. En nuestro caso y en colaboración con los grupos dirigidos por la Dra. Bolarín (CEBAS – Murcia) y el Dr. Lozano (Universidad de Almería), se ha utilizado la mutagénesis insercional con T-DNA como herramienta para la generación de mutantes que afecten a diversos caracteres de tomate. A partir del estudio de estos mutantes se pretende identificar y posteriormente clonar los genes afectados. Para alcanzar este objetivo se ha generado y evaluado alrededor de 7,000 líneas transgénicas, dentro de las cuales se incluye tomate y también especies silvestres relacionadas como, *S. pimpinellifolium*, *S. pennelli* y *S. galapagense* que presentan mayores niveles de tolerancia a estreses abióticos como la sequía y salinidad.

Como ya se ha comentado previamente, la mayor parte de las evaluaciones que se ha llevado a cabo en colecciones de líneas mutagenizadas se realizan mediante el cultivo de las plantas en invernadero. Aunque para detectar algún tipo de mutante, por ejemplo, los afectados en el desarrollo del fruto, es imprescindible hacer las evaluaciones de esta forma, nosotros hemos utilizado el cultivo *in vitro* como estrategia para la detección de mutantes afectados en caracteres del desarrollo temprano. Las principales ventajas de esta metodología son su fiabilidad, la menor necesidad de espacio y tiempo y la detección de fenotipos mutantes difíciles, o incluso imposibles de identificar, mediante la evaluación de plantas en invernadero.

Para detectar mutantes por sus alteraciones fenotípicas es importante que las condiciones ambientales en las que crecen las plantas sean lo más homogéneas posibles para que los mutantes detectados por sus alteraciones fenotípicas sean producto de cambios genéticos. Esta metodología de evaluación es más fiable ya que las condiciones ambientales (iluminación, temperatura, disponibilidad de agua y nutrientes,...) que podrían alterar el fenotipo de las plantas en cultivo *in vitro* están más controladas que en el invernadero. Además, las plantas no están sometidas a ningún estrés biótico (plagas y enfermedades) que pueda alterar su fenotipo.

Por otra parte, esta evaluación ofrece ventajas en comparación con otros métodos de detección de mutantes en tomate, como el menor requerimiento de espacio. Por ejemplo, para evaluar 100 progenies (2,400 plantas) de líneas T-DNA del cultivar comercial MoneyMaker se necesitaría unos 1,000 m<sup>2</sup> de invernadero mientras que la evaluación de este mismo número de plantas en cultivo *in vitro* ocupa 8 m<sup>2</sup> de una cámara de cultivo. Gracias a esta ventaja, en el presente trabajo se han evaluado 762 líneas T-DNA para lo que ha sido necesario cultivar más de 18,000 plantas.

Adicionalmente, la utilización del cultivo *in vitro* ha permitido identificar y avanzar más rápidamente en la caracterización de algunos mutantes. Los ciclos de cultivo en estas condiciones son más cortos que en el invernadero y eso permite avanzar más rápidamente en la obtención de resultados. Además, en algunos casos, gracias al cultivo *in vitro* se han podido identificar varios mutantes que presentan alteraciones en la raíz. Su caracterización se ha completado de forma más rápida y eficiente que si las plantas hubieran estado cultivadas *in vivo* ya que las plantas se encontraban cultivadas en un medio con agar que permite visualizar el desarrollo de las raíces.

La utilización del cultivo *in vitro* aporta ventajas cuando se trabaja con mutantes que son difíciles de evaluar mediante otros métodos. Este método de detección posibilita caracterizar los mutantes con más precisión, ya que al tenerlas cultivadas *in vitro*, se puede ver toda la planta desde la raíz hasta la parte aérea y así determinar qué partes están más afectadas y cuándo aparecen los

primeros síntomas. Además, permite caracterizar mutaciones que afectan el desarrollo inicial de las plantas, por ejemplo, los mutantes letales. Los mutantes llamados *seedling-lethal* son complicados de estudiar en condiciones de cultivo *in vivo* debido a que las plantas colapsan en estadios del desarrollo temprano o sólo son capaces de desarrollar un par de hojas verdaderas y luego mueren. El cultivo *in vitro* facilita el crecimiento de las plantas que portan este tipo de mutaciones, ya que las condiciones de cultivo están más controladas, las plantas se encuentran en un cultivo axénico, alejadas de los estreses que conlleva el cultivo en invernadero y con mayor disponibilidad de nutrientes.

En este laboratorio ya se habían identificado 14 mutantes con fenotipo de albinismo y/o letalidad. Tres de estos mutantes de tomate se han encontrado recientemente y aún se continúa su investigación (Sánchez Martín-Sauceda, 2016). Tada y colaboradores (2014) utilizaron el cultivo *in vitro* para caracterizar el mutante *seedling lethal (ppi2-2)* de *Arabidopsis*. También, existen mutaciones que alteran el desarrollo de las raíces y en algunos casos las plantas no son capaces de sobrevivir cuando se cultivan en el invernadero. El cultivo *in vitro* permite mantener las plantas que presentan este tipo de alteraciones y evaluarlas. Por ejemplo, en este laboratorio se ha identificado un mutante de *S. pennellii* con alteraciones en el desarrollo radicular que no es capaz de sobrevivir cuando se cultiva en el invernadero. El cultivo *in vitro* permitió realizar evaluaciones del comportamiento de este mutante cuando se cultivaba en medios con distintas hormonas. En otros casos, el cultivo *in vitro* se ha utilizado para realizar evaluaciones de la arquitectura y el patrón de crecimiento de las raíces en mutantes de *Arabidopsis (mlo4 y mlo1)* que mostraban enraizamiento aberrante (Bidzinki *et al.*, 2014).

La utilización del cultivo *in vitro* en este proyecto permitió detectar mutantes en caracteres difíciles de evaluar con otra metodología, por ejemplo, mutantes afectados en el enraizamiento adventicio. Cuando se realiza el corte del hipocótilo para cultivar los ápices meristemáticos y obtener plantas axénicas, éstos emiten raíces adventicias y continúan con su crecimiento. Este enraizamiento se consigue gracias a que los ápices meristemáticos se

encuentran en un ambiente que les ayuda a generar este tipo de raíces, sin presión por deshidratación o el ataque de patógenos que puedan infectar la planta a través de la zona de corte.

Por otro lado, el uso de técnicas de cultivo *in vitro* de tejidos permite identificar mutaciones que son imposibles de detectar en condiciones de cultivo *in vivo*, como mutantes alterados en la capacidad de regeneración adventicia. Además, una vez detectado un mutante con alteraciones en este carácter, la utilización del cultivo *in vitro* permite profundizar en su estudio. Por ejemplo, gracias al cultivo *in vitro*, fuimos capaces de conocer el comportamiento de mutantes con respuesta morfogénica alterada cuando eran cultivados en medio de regeneración suplementados con diferentes hormonas, estudiar la capacidad morfogénica de diversos tipos de explantes (e. g. de foliolo, cotiledón y segmentos de hipocótilo).

Una de las cuestiones a tener en cuenta cuando se realiza un escrutinio de esta forma es si el fenotipo visto *in vitro* se observa también *in vivo*. Es importante comprobar que las mutaciones que son detectadas y corroboradas en condiciones de cultivo *in vitro* también se reproduzcan en invernadero ya que si una mutación detectada *in vitro* no se observara *in vivo* perdería interés. Por tanto, la posterior comprobación que dicha mutación se reproduce en el invernadero aumenta el valor del mutante, considerando posibles aplicaciones futuras. Nuestra experiencia previa (Sánchez-Sauceda, 2016) y los resultados en este Trabajo de Tesis es que las mutaciones detectadas en condiciones de cultivo *in vitro* se observan también cuando las plantas se cultivaban en el invernadero. En ningún caso se ha detectado un mutante *in vitro* cuyo fenotipo no se haya visto también en condiciones *in vivo*. Estos análisis permiten también realizar una caracterización con mayor detalle de las mutaciones en diversos ambientes.

En este Trabajo de Tesis se han analizado 762 líneas T-DNA y se han identificado un total de 22 líneas mutantes, lo cual supone un 3%. En comparación con otros trabajos realizados en nuestro grupo con un escrutinio para otro tipo de caracteres se ha obtenido un porcentaje de detección de

mutantes similar tras analizar 1888 líneas T-DNA. Por lo que respecta al porcentaje total de líneas mutantes detectadas en el grupo, se acerca al 10% ya que en este dato se acumulan los mutantes identificados con diversos tipos de escrutinios (Sánchez Martín-Sauceda, 2016). Por lo que respecta a los resultados de otros grupos de investigación, Li y colaboradores (2006) obtuvieron un 9% de porcentaje de detección de mutantes en arroz, Chantreau y colaboradores (2013) obtuvieron un 38.5% de porcentaje en *Linun usitatissimum* y Alonso y colaboradores (2003) obtuvieron un porcentaje de detección de mutantes del 25% en *Arabidopsis*.

En tomate, Minoia y colaboradores (2010) observaron un porcentaje de detección del 39% tras evaluar una población mutagenizada con EMS. Aunque el porcentaje de mutaciones obtenido es mayor al obtenido en este Trabajo de Tesis, el método de generación de líneas mutantes que se emplea en nuestro laboratorio es más adecuado para llegar a clonar el gen que ha causado el fenotipo mutante porque, a diferencia de cuando se emplea EMS, el método basado en la generación de líneas T-DNA conlleva a que, en ocasiones, el gen afectado queda etiquetado lo cual facilita significativamente los trabajos de clonación génica.

## **5.2.- Análisis del modo de herencia del fenotipo mutante**

En este trabajo de tesis doctoral se han detectado 22 líneas mutantes. La mayor parte de ellas, 21 (95%), son portadoras de una sola mutación, mientras que una (5%) de las líneas (1421 ET MM) es portadora de dos mutaciones independientes. Las 23 mutaciones detectadas en este trabajo son causadas por la alteración de un gen, es decir, son monogénicas. Se han observado dos modos de herencia dentro de las 23 mutaciones identificadas: 21 mutaciones (91%) son de naturaleza recesiva y 2 (9%) son de naturaleza semidominante. Por comparación, Berná y colaboradores (1999) determinaron tras el estudio de líneas mutantes con alteraciones en la morfología foliar en *Arabidopsis thaliana*

que 122 líneas mutantes eran monogénicas y de naturaleza recesiva (94%), seis de tipo semidominante (5%), y una de naturaleza dominante (1%).

Dentro de las 21 mutaciones de naturaleza recesiva detectadas, en 5 de ellas (2733 ET MM, 2666 ET MM, 2225 ET MM, 1862 ET MM y 1317 ET MM) las proporciones fenotípicas se desvían significativamente de lo esperado para una distribución mendeliana, 3 WT : 1 M. En los cinco casos el número de plantas observadas con fenotipo mutante resultó menor a lo esperado. Posiblemente, esto es debido a que podría haber un cierto grado de subletalidad cuando el alelo mutante se presenta en configuración homocigótica. De igual forma, Berná y colaboradores (1999), observaron 23 mutaciones que se comportaban inequívocamente de manera monogénica recesiva, pero se desviaban significativamente de una proporción 3:1. Ellos también lo interpretan como un problema de subletalidad ya que comentan que posiblemente existía un nivel bajo de viabilidad de los embriones en estos mutantes.

Se ha detectado una línea (1421 ET MM) que es portadora de dos mutaciones monogénicas independientes. Una de las mutaciones generaba un fenotipo en el cual las plantas eran cloróticas y la otra causaba necrosis en las plantas, la cual provocaba el colpaso de las mismas. Las plantas que eran portadoras de las dos mutaciones, eran cloróticas y se necrosaban totalmente. Tras el análisis de los datos obtenidos de número de plantas de cada clase mutante la prueba de la  $\chi^2$  indica que no hay motivos para dudar de que en esta línea haya dos mutaciones monogénicas recesivas que segregan de forma independiente.

Para algunos de los caracteres en los cuales se han detectado mutaciones (e.g.: morfogénesis, enraizamiento adventicio, etc.) una mutación dominante de anulación de función (e.g.: que anulara la capacidad de regeneración) hubiera imposibilitado su detección ya que no se podría obtener la planta transgénica original (TG1). En cambio, si la mutación es recesiva (sólo aparece cuando la planta porta los dos alelos mutados en homocigosis), la planta transgénica se puede desarrollar perfectamente porque, al ser hemocigótica, el alelo mutante no interfiere en el proceso de regeneración, lo cual permite que la planta se desarrolle normalmente. Así pues, es de suma importancia hacer el escrutinio

en progenies TG2 (descendencias de la línea transgénica original) para detectar mutaciones con efecto recesivo (e.g.: en una línea en la que ha mutado un gen, la cuarta parte de las plantas analizadas expresarán el fenotipo mutante) ya que esto permite identificar la mayor parte de las mutaciones producidas.

### **5.3.- Análisis genético del número de insertos T-DNA**

El análisis del número de insertos T-DNA integrados en las líneas mutantes identificadas en este Trabajo de Tesis Doctoral se hizo fundamentalmente comprobando la resistencia a la kanamicina que confiere el gen *nptII*. De las 22 líneas mutantes detectadas, 15 (68%) portan un único inserto T-DNA, 4 (18%) portan dos insertos y tres (14%) portan tres copias (además, hay una línea de la que todavía no se sabe si porta dos o tres insertos), lo cual ha dado como resultado un número medio de 1.57 insertos T-DNA por línea evaluada. El promedio del número de insertos T-DNA obtenido en este Trabajo de Tesis es algo menor aunque similar al número medio de insertos de todas líneas que se han evaluado en este laboratorio (1.7). En otros trabajos, el dato del promedio de número de copias de T-DNA es similar al observado en esta Tesis: 1.37 y 1.29 es lo que observaron Feldmann (1991) y Ríos y colaboradores (2002) respectivamente.

En un programa de mutagénesis insercional es recomendable tener un número bajo de copias insertadas por línea transgénica ya que un número muy elevado dificultaría la clonación del gen afectado mediante Anchor-PCR. Este método se basa en la amplificación de fragmentos de ADN genómico a partir del RB (*right border*) y el LB (*left border*) del T-DNA. Por tanto, si en una línea se han insertado muchas copias de T-DNA, aumentan las probabilidades de amplificar regiones que no son candidatas por haber etiquetado el gen que provoca el fenotipo mutante. Para alcanzar un número promedio de insertos por línea T-DNA relativamente bajo, la metodología de transformación genética tiene un gran impacto. En nuestro laboratorio todas la plantas transgénicas

independientes han sido obtenidas mediante transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens*, y el número promedio de copias de T-DNA insertadas es adecuado (1.7). Otros autores, que utilizan el cocultivo de explantes primarios con *Agrobacterium* como método de transformación, también reportan un número de copias insertadas adecuado en *Arabidopsis* (McElver *et al.*, 2001; Alonso *et al.*, 2003) y en arroz (*Oriza sativa*; Barakat *et al.*, 2000; Jeon *et al.*, 2000). Por contra, con otros métodos de transformación genética como el bombardeo de partículas, se pueden insertar un mayor número promedio de copias de T-DNA alcanzando valores superiores a 100 insertos (Shou *et al.*, 2004). Con otros métodos de transformación directa se pueden alcanzar promedios de 3 copias de T-DNA con la presencia de un alto número de líneas con entre 4 y 6 insertos (Kohli *et al.*, 1998). Por lo tanto, el método de transformación genética que se ha utilizado para obtener las líneas transgénicas en nuestro laboratorio demuestra ser más adecuado para tener un número limitado (o bajo) de inserciones de T-DNA por planta transgénica.

Como ya se ha comentado, lo más habitual es realizar la prueba de la resistencia a la kanamicina para determinar el número de insertos T-DNA de las líneas mutantes. Sin embargo, la metodología utilizada para conocer si una línea mutante es portadora de un inserto T-DNA con *nptII* funcional puede depender en función de la mutación observada. Por ejemplo, se puede conocer si una planta es resistente a la kanamicina si se cultivan yemas o ápices meristemáticos en un medio de enraizamiento suplementado con el antibiótico. Si las plantas son capaces de enraizar, quiere decir que son resistentes a la kanamicina, por lo tanto, portadoras de, al menos, un inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional. De lo contrario, si no son capaces de enraizar, las plantas son sensibles a la kanamicina y se concluye que no poseen ningún inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional. Sin embargo, si el mutante tiene afectada la capacidad de enraizamiento, no se puede utilizar esta metodología, ya que si se cultivan explantes de yemas axilares o ápices meristemáticos de una planta y no enraíza no se podría saber si es por su naturaleza mutante, porque es sensible al antibiótico o por ambos motivos. Una alternativa metodológica para estos mutantes sería evaluar la resistencia a la kanamicina sobre la base del

cultivo de explantes de cotiledón, foliolo o hipocotilo en medio organogénico suplementado con kanamicina.. De tal forma, como ya se ha visto en otros trabajos (De Block *et al.*, 1984) es muy importante disponer de una amplia gama de opciones de cultivo para saber cuando una planta es resistente o sensible a la kanamicina para, dependiendo del carácter afectado en cada mutante, utilizar la opción más factible para saber si las plantas mutantes son portadoras o no de un inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional.

La genética molecular proporciona otras herramientas que nos permiten saber si las plantas mutantes han quedado etiquetadas por algún fragmento de ADN de secuencia conocida que permita abordar su clonación mediante Anchor-PCR. Así, mediante estas técnicas es posible detectar si una planta mutante que no es viable o muere en etapas del desarrollo temprano y a la que no se le puede hacer ningún test de resistencia a la kanamicina porta un inserto de T-DNA ya que mediante la recolección de una pequeña cantidad de tejido vegetal y haciendo pruebas de PCR es posible conocer si estas plantas son portadoras de algún inserto. Por otra parte, en plantas de fenotipo mutante que presentan sensibilidad a la kanamicina, las técnicas de genética molecular hacen posible comprobar la presencia de insertos de T-DNA truncados en los cuales el gen que confiere resistencia al antibiótico no es funcional o la presencia de fragmentos del cuerpo del vector. La utilización de estas técnicas de genética molecular nos permitió corroborar que las mutaciones observadas en dos líneas (1862 ET MM y 2666 ET MM) eran de carácter somaclonal. En estos casos se llevó a cabo el estudio molecular de algunas plantas mutantes sensibles a la kanamicina con una gama de cebadores que amplifican dentro de la región que compone el T-DNA y el cuerpo del vector. Como resultado de esas reacciones de PCR no se observó la amplificación de ningún cebador. Por lo tanto, la utilización de técnicas de genética molecular nos ha permitido llegar a la conclusión de que las mutaciones identificadas en estas líneas no fueron causadas por la disrupción de un gen debido a la integración de un T-DNA truncado o segmentos del cuerpo del vector sino que son casos de variación somaclonal.

#### **5.4.- Análisis de cosegregación del inserto T-DNA y el fenotipo mutante**

La gran ventaja de la utilización de una colección de plantas transgénicas para la identificación de mutantes es que el T-DNA puede etiquetar molecularmente el gen afectado y, por lo tanto, llegar a saber cuál es el gen causante del fenotipo mutante de forma rápida. Sin embargo, debido al proceso de obtención de las plantas transgénicas, no es posible descartar a priori que un fenotipo mutante esté causado por otras fuentes de variación genética. Para saber el origen de las mutaciones observadas es necesario realizar un análisis de cosegregación entre un inserto de T-DNA y el fenotipo mutante. Para lograr esto, una posibilidad es realizar el análisis de cosegregación entre la resistencia a la kanamicina que confiere el gen *nptII* presente en el T-DNA y el fenotipo mutante, teniendo en cuenta que dicho gen marcador confiere resistencia al antibiótico tanto en hemicigosis como en homocigosis. En este Trabajo de Tesis, del total de las mutaciones detectadas (23), en cinco (21%) se ha comprobado con una probabilidad de fallo menor al 5%, que existe cosegregación de un inserto T-DNA con el gen *nptII* funcional y el fenotipo mutante. En todas las líneas T-DNA mutantes de nuestro laboratorio en las que se ha estudiado esta característica, la frecuencia de cosegregación observada entre un inserto de T-DNA y el fenotipo mutante es algo superior al 13%. En trabajos realizados por otros grupos de investigación, por ejemplo, el de Azpiroz-Leehan y Feldmann (1997) en *Arabidopsis*, tras analizar múltiples líneas T-DNA y determinar la frecuencia de cosegregación utilizando las plantas con fenotipo mutante y la resistencia a la kanamicina, encontraron que el 35% de las mutaciones son debido a un inserto. Van Lijsebettens y colaboradores (1991) al estudiar una población de líneas T-DNA de *Arabidopsis* y realizar el test de cosegregación mediante el análisis de la resistencia a la kanamicina observaron una frecuencia de cosegregación inserto T-DNA y mutación del 10%. Hunter y colaboradores (2013) utilizaron un elemento transponible (Mu-seq) en maíz y encontraron mediante genotipado por PCR que el 50% de las líneas mutantes detectadas, cosegregaban con una

inserción. Por contra, Li y colaboradores (2006) al analizar líneas T-DNA en arroz y la posterior determinación de cosegregación mediante técnicas de PCR, encontraron una frecuencia de cosegregación muy baja (1.4%).

Como ya se ha comentado, saber si existe cosegregación entre un inserto T-DNA y el fenotipo mutante, es esencial para los trabajos posteriores con cada mutante. Una vez que se ha establecido la existencia de cosegregación entre un inserto T-DNA con gen *nptII* funcional y el fenotipo mutante, se inicia la clonación del gen que ha sido etiquetado. Para ello se puede recurrir a diferentes alternativas metodológicas TAIL-PCR (Liu *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2006), (SON)-PCR (Antal *et al.*, 2004) o T-linker PCR (Yuanxin *et al.*, 2003). En el presente trabajo, gracias a la colaboración con el grupo del Dr. Rafael Lozano, se han clonado dos de los genes etiquetados mediante la técnica de Anchor-PCR. En ambos casos se han amplificado los fragmentos de ADN genómico a partir de los RB (*right border*) y LB (*left border*) del T-DNA. Una vez clonado el gen, se puede continuar con otras investigaciones como el análisis funcional del mismo mediante su sobre-expresión o anulación de función con la técnica del ARN de interferencia. En resumen, la detección de líneas mutantes insercionales es muy importante ya que permite reducir significativamente el trabajo y tiempo necesario para cumplir con los objetivos antes mencionados.

En el caso de las 17 mutaciones detectadas que no están causadas por la inserción de un T-DNA con el gen *nptII* funcional, es importante mencionar que no se debe descartar la posibilidad de que hayan sido provocadas por insertos T-DNA truncados en los cuales el gen *nptII* no sea funcional. Este fenómeno ya ha sido reportado por otros autores en *Arabidopsis* (Castle *et al.*, 1993). Además, las mutaciones pueden haber sido provocadas por la integración de fragmentos del cuerpo del vector. En trabajos previos se ha demostrado que la integración de secuencias del cuerpo del vector al DNA genómico de plantas transgénicas ocurre con cierta frecuencia. Por ejemplo, Kononov y colaboradores (1997) detectaron secuencias del cuerpo del vector en el 75% de las plantas transgénicas de tabaco que examinaron. De hecho, en otros trabajos se comprobó la integración completa del cuerpo del vector en alguna

de las plantas transgénicas obtenidas (De Buck *et al.*, 2000). Por lo tanto, es importante continuar analizando molecularmente estas líneas mutantes para descartar la ocurrencia de algunos de estos casos que permitiría la clonación del gen de forma más rápida mediante Anchor-PCR. En nuestro grupo hemos encontrado algunos ejemplos de este tipo de inserciones anómalas, normalmente fragmentos de T-DNA truncados, en algunas líneas T-DNA.

Entre las 17 líneas mutantes que presentaron ausencia de cosegregación, en dos de ellas (1862 ET MM y 2666 ET MM) se ha determinado si estas mutaciones están causadas por algún T-DNA truncado o por alguna secuencia del cuerpo del vector. Se ha comprobado que no es así ya que, tras realizar una batería de PCRs del vector pD991 (vector utilizado para generar las líneas T-DNA) constituida por 21 amplicones, no se observó amplificación alguna. Con estos datos, se pudo concluir que las mutaciones observadas en las líneas 1862 ET MM y 2666 ET MM son de naturaleza somaclonal. En resumen, con estos análisis se intenta establecer si existe alguna posibilidad de etiquetado molecular entre un fragmento de ADN de secuencia conocida y el gen que produce el fenotipo mutante antes de proceder con los costosos trabajos en tiempo y recursos que son necesarios para realizar un clonaje por secuenciación.

Cuando no se ha podido establecer ningún tipo de cosegregación entre una secuencia de ADN conocida y el fenotipo mutante hay que recurrir a técnicas de clonaje por secuenciación. Para ello, primero hay que cruzar las plantas mutantes con *Solanum pimpinellifolium*, y autofecundar la F1 para obtener semillas F2. Después, en la generación F2, se debe identificar plantas WT y plantas mutantes y secuenciar el genoma de esas plantas para ver los cambios genéticos que comparten todas las plantas F2 mutantes. El procedimiento es costoso en tiempo, esfuerzo y recursos económicos por lo que lo estamos empleando sólo en el caso de que el fenotipo del mutante sea de gran interés.

## 5.5.- Identificación y caracterización de mutantes con alteraciones en la parte aérea

En este trabajo de Tesis se han detectado dos líneas mutantes (1405 ET MM, 1440 ET MM) que presentan alteraciones en el desarrollo del meristemo apical. En las plantas con fenotipo mutante se ve el desarrollo de una o dos hojas verdaderas y posteriormente se observa la interrupción en el crecimiento de la zona apical del tallo. Se analizó una de las líneas (1440 ET MM) en el invernadero y se vio la misma alteración que se observa en condiciones de cultivo *in vitro*. Además, algunas plantas, en las que el meristemo retomó su capacidad de formar nuevas hojas al cabo de unos días, presentan importantes alteraciones morfológicas. En tomate se han descrito mutantes que presentan alteraciones el desarrollo apical. Keddie y colaboradores (1998) caracterizaron el mutante *dem* (*defective embryo and meristem*) que no tiene ápice meristemático. Los autores clonaron el gen *DEM* y tras el análisis del patrón de expresión vieron que se expresa en el ápice meristemático a niveles altos. La proteína que codifica *DEM* tiene dos homólogos, CYPRO4 (identidad 93%, similitud 98%) de alcachofa (*Artichoke thistle*) y YNV2 (identidad 33%, similitud 51%) de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*). La función de estas proteínas es desconocida. Los autores concluyeron que *DEM* juega un papel muy importante en el desarrollo del ápice meristemático en tomate (Keddie *et al.*, 1998). Por otro lado, Brand y colaboradores (2007) realizaron un escrutinio en una población mutagenizada de tomate e identificaron mutantes con diversos grados de alteración en el desarrollo apical. Dentro de los mutantes identificados, el mutante *goblet* (*gob*) tiene un severo fenotipo de alteración del ápice meristemático. Mediante análisis con microscopía electrónica, se ve que el mutante *gob* no tiene ápice y no se forman primordios de hojas. Otro mutante, *expelled shoot* (*exp*), es capaz de producir cuatro o cinco hojas y posteriormente el meristemo apical se detiene. Los autores mencionan que el meristemo se recupera en raras ocasiones y, por tanto, produce una planta anormal, lo cual coincide con lo que visto en nuestros mutantes. Por último, describen otros mutantes (*spd2<sup>2</sup>* y *spd2<sup>5</sup>*) en los cuales el ápice aborta después

de formar un par de hojas verdaderas (Brand *et al.*, 1998). En *Arabidopsis*, Lee y colaboradores (2014) caracterizaron un doble mutante (*sue slk2*) el cual carece de meristemo apical. Los autores mencionan que la ausencia del ápice en el doble mutante se asocia con la expresión reducida de los genes *KNOXI*, *STM* (*SHOOTMERISTEMLESS*), *BREVIPEDCELLUS* y *KNAT2*. Además, tras elevar la expresión de *STM* se restaura el desarrollo del ápice en el doble mutante, pero no su actividad post embrionaria, mientras que la formación y actividad post embrionaria del ápice se rescata cuando se expresa *SLK2*. Los autores concluyen que *SEUSS* y *SLK2* (*SEUSS-LIKE 2*) tienen una función redundante en el desarrollo del ápice y probablemente actúan para promover la actividad de la ruta *KNOXI*. Hasta el momento no hay trabajos en tomate donde se haya realizado el análisis funcional de genes responsables del desarrollo del meristemo apical. Debido a que uno de los mutantes (1440 ET MM) presenta cosegregación inserto T-DNA y el fenotipo mutante esperamos llegar a conocer el gen alterado en breve. Una vez clonado el gen responsable de la pérdida en la actividad del meristemo apical en este mutante, se abordará su análisis funcional.

### **2489 ET MM**

El mutante 2489 ET MM presenta una alteración muy peculiar. Las plantas crecen mucho más despacio que las WT, son muy compactas y las hojas son de menor tamaño, arrugadas y con los bordes ondulados, y tienen una pigmentación verde más oscura. Las inflorescencias y flores tienen un desarrollo anormal aunque se ha conseguido observar la formación de un fruto. Parnis y colaboradores (1997) identificaron un mutante dominante similar al detectado en esta Tesis. Este mutante presenta un desarrollo de hojas extremadamente compactas y arrugadas, anomalías en el desarrollo reproductivo y una pigmentación de color verde oscuro similar a la del 2489 ET MM. Los autores mencionan que este fenotipo es debido a que el gen *TKn2* perteneciente a la clase I Kn1-Like, se encuentra sobreexpresado (Parnis *et al.*, 1997). Adicionalmente, Koka y colaboradores (2000) caracterizaron dos mutantes, uno con fondo genético de tomate (*dpy*, *dumpy*) y otro de *S.*

*pimpinellifolium* (*cu-3*, *curl-3*) que presentaban fenotipos similares al visto en nuestro mutante. Los autores observaron que tras la aplicación exógena de brasinolide y catasterona el fenotipo de *dpy* recobraba una apariencia WT. Sin embargo, cuando dejan de aplicar la hormona, las nuevas hojas rápidamente revertían al fenotipo *dpy*. También vieron que este mutante no revertía a fenotipo WT al aplicar los precursores de los brasinosteroides (campesterol, campestanol, 6-deoxocatasterona) por lo que sugieren que el mutante *dpy* puede estar afectado en la conversión de 6-deoxocatasterona a 6-deoxoteasterona. En contraste con lo que ocurre con el mutante *dpy*, el mutante *cu-3* no presenta respuesta a la aplicación exógena de brasinosteroides. Los autores mencionan que la expresión del gen relacionado con brasinosteroides *LeBR1* tiene un nivel de expresión bajo en el mutante *dpy* en comparación con el WT. Sin embargo, cuando aplican brasinosteroides al mutante, los niveles de expresión de gen *LeBR1* se elevan.

Los brasinosteroides juegan un papel muy importante en la regulación de varios procesos del crecimiento y desarrollo de las plantas (Fariduddin *et al.*, 2014). Por tanto, dados los antecedentes comentados, se procedió a aplicar brasinosteroides de manera exógena a las plantas mutantes. Aunque no se observó una reversión total, el mutante 2489 ET MM sí que responde a la aplicación de brasinosteroides ya que se observa cómo las hojas se expanden y pierden ese aspecto arrugado típico del mutante. Este resultado nos permite conocer algo más de los mecanismos biológicos que están alterados en este mutante y, por tanto, nos va a facilitar un estudio más profundo del mismo. Además, a partir de esta información se puede abordar el estudio de los análisis de expresión de los genes que juegan un papel importante en la ruta de los brasinosteroides en otras especies. El abordaje del mapeo y clonaje del gen afectado es también muy importante ya que actualmente no se han clonado los genes que tienen un papel clave en la ruta de biosíntesis de los brasinosteroides en tomate.

### **1381 ET MM**

El mutante 1381 ET MM presenta alteraciones en el desarrollo de las hojas. Éstas tienen un menor número de foliolos y otras alteraciones morfológicas. David-Schwartz y colaboradores (2009) describen el mutante espontáneo *lyr* (*lyrate*) de tomate con las mismas alteraciones que se han visto en nuestro trabajo. Los autores encontraron que el fenotipo *lyr* resulta de una mutación de pérdida de función del gen ortólogo *JAGGED* de *Arabidopsis*, un regulador positivo en la división celular de órganos laterales. Ellos mencionan que *LYR* actúa al promover la expansión de órganos aéreos y el patrón de expresión de *LYR* es puntual durante el desarrollo de la hoja, coincidiendo con el punto máximo de respuesta a auxinas y subsiguiente iniciación del desarrollo de la hoja. También añaden que *LYR* promueve la respuesta a auxinas en la hojuela en desarrollo, primero para dirigir la iniciación del primordio y luego para promover la expansión de los bordes. Además, comprueban que la expresión de dos genes (*LeT6*, ortólogo de *STM*, y *TKN1*) de la familia de factores de transcripción KNOX se encuentra elevada en el mutante *lyr*. Con estos datos, sugieren que *LYR* regula negativamente la expresión de genes KNOX en el desarrollo de las hojas en tomate (David-Schwartz *et al.*, 2009). Como se vio en el apartado de resultados, la mutación que provoca el fenotipo en el mutante 1381 ET MM cosegrega con el inserto T-DNA con *nptII* funcional. El gen etiquetado ya ha sido clonado, gracias a la colaboración con el Dr. Rafael Lozano Ruiz de la Universidad de Almería y se ha comprobado que el T-DNA ha provocado la disrupción de gen *LYR* de Moneymaker (fondo génico utilizado en el laboratorio). Además de que este mutante aporta un nuevo alelo de *LYR* al ya descrito por David-Schwartz y colaboradores (2009), sería interesante conocer más sobre cómo los factores moleculares y reguladores fisiológicos pueden influir en la gran variedad de patrones morfológicos de las hojas.

### **2635 ET MM**

La línea mutante 2635 ET MM, que fue identificada recientemente, presenta alteraciones en la morfología de las hojas, su raquis es más corto y los foliolos se enrollan sobre si mismos. De igual forma presenta cambios en el desarrollo

de los órganos reproductivos. Así, la mutación provoca la caída de algunos frutos lo cual da como resultado la cosecha de pocos tomates por inflorescencia (~1-2 frutos con semillas). Nuestros datos, nos permiten aceptar la hipótesis de que se trate de una mutación provocada por la alteración de un gen y que su naturaleza sea semidominante ya que cuando el gen alterado se encuentra en homocigosis la alteración de la morfología foliar se exagera y las plantas no forman frutos debido a que las flores abortan. El análisis de cosegregación nos permitió asegurar con una probabilidad de fallo de 1.7% que existe cosegregación inserto T-DNA con *nptII* funcional y el fenotipo mutante. Este dato es muy importante ya que facilita el camino hacia la futura clonación del gen alterado porque ha quedado etiquetado por un inserto T-DNA. Debido a la reciente identificación del mutante, hay que realizar una caracterización más extensa para conocer con más detalle qué partes de la planta se encuentran alteradas. Además, el análisis del contenido de hormonas endógenas podría aportar una valiosa información sobre los mecanismos biológicos afectados en este mutante.

## **5.6.- Identificación y caracterización de mutantes afectados en el desarrollo radicular**

Se han identificado varias mutaciones que causan diferentes alteraciones tanto en el sistema radicular embrionario como en el adventicio. Una de las cuestiones que nos planteamos al empezar este sistema de escrutinio mediante cultivo *in vitro* era si los resultados observados en estas condiciones se reproducirían cuando se cultivaran las plantas *in vivo*. Cuando se han cultivado plantas mutantes en invernadero, se ha corroborado el fenotipo observado *in vitro* en todos los casos, por lo que, por nuestra experiencia, el empleo del cultivo *in vitro* puede ser un sistema ideal para la detección de este tipo de mutantes.

En algunos mutantes se vieron, además de las alteraciones en las raíces, otros cambios fenotípicos, por ejemplo, la morfología foliar, el tamaño de la planta,

los frutos, etc. En el caso de estos mutantes, estos cambios hacen que la obtención de semillas TG3 mutantes sea muy complicada. El número de semillas mutantes que se han obtenido ha sido muy bajo y, en la mayoría de los casos, estas semillas tenían una baja viabilidad. Por lo tanto, para realizar la mayoría de las evaluaciones se tuvo que recurrir a semilla proveniente de una planta de fenotipo WT pero que tuviese la mutación en hemigosis para que en su progenie se observara una segregación 3 WT: 1 M. Estas alteraciones pleiotrópicas se han visto también en mutantes de raíz identificadas por Hoth (2013), tras caracterizar los mutantes (*ara*) de raíz de tomate, e Ivanchenko y colaboradores (2006), al caracterizar tres mutantes (*dgt1-1*, *dgt1-2*, *dgt-dp* [*droopy*]), también de tomate. Además, Hoth (2013) también observó la dificultad en obtener semillas a partir de sus mutantes (*ara 2*) por lo que tuvo que recurrir a retrocruces con plantas WT y utilizar poblaciones segregantes para la mutación para continuar con sus evaluaciones. Posiblemente, la incapacidad de los mutantes de presentar un buen desarrollo radicular tenga como consecuencia una baja capacidad de nutrirse de los elementos presentes en las soluciones nutritivas del sustrato lo cual podría causar un efecto general en el desarrollo de las plantas mutantes. Una alternativa para superar este inconveniente y que está funcionando en algunas líneas mutantes es el uso de injertos. Además, las plantas injertadas (parte aérea WT con raíz mutante y viceversa) pueden dar una información muy valiosa a la hora de interpretar los efectos que tiene la mutación en la parte aérea de la planta como los resultados obtenidos en la línea 1862 ET MM.

Se estudió el comportamiento de algunos mutantes cuando se cultivan en medios suplementados con distintas auxinas tanto naturales como de síntesis, al igual que a diferentes concentraciones. Tras el cultivo de los mutantes en estos medios, el fenotipo de alteración de la raíz no revertía en ninguna de las líneas identificadas. Este resultado coincide con el de Rogg y colaboradores (2001), quienes no observaron respuesta en el mutante de *Arabidopsis* *iaa28* de ganancia de función tras la aplicación de auxinas. Quint y colaboradores (2009) también observaron tras caracterizar el mutante *et5* de *Arabidopsis* que presentaba una respuesta reducida a auxinas exógenas comparado con el WT

(Quint *et al.*, 2009). Este fenómeno también fue observado por Okushima y colaboradores (2005) al ver que el mutante *arf19-1* presentaba un menor crecimiento de la raíz al aplicarle auxinas exógenas. Sin embargo, Chun y colaboradores (2003) al aplicar auxinas exógenas al mutante de enraizamiento en arroz (*Irt1*) observaron la restauración del fenotipo y que la densidad de las raíces laterales aumentaba en paralelo con el incremento de las concentraciones de auxinas. En el caso de tomate, el mutante *dgt*, se ha caracterizado como resistente a la aplicación de auxinas exógenas (Ivanchenko *et al.*, 2006). La señalización y el transporte de auxinas son componentes integrales en el desarrollo de las raíces tanto embionarias como las adventicias. Una alteración en cualquiera de estas rutas metabólicas podría provocar una reducción en la respuesta a las auxinas.

Se identificaron dos líneas mutantes, 1608 ET MM y 2666 ET MM, que no elongan la raíz principal embrionaria como lo hace una plántula WT. Esta raíz detiene su crecimiento poco después de la germinación, 6-7 días después de la emergencia de la radícula. Ühlken y colaboradores (2014) caracterizaron un mutante de pérdida de función en *Arabidopsis*. El mutante, *mail1*, presenta alteraciones en el desarrollo de la raíz primaria, ya que su crecimiento se interrumpe 6 días después de germinar. Ellos vieron que en ese momento las células del meristemo de la raíz primaria se encontraban, en su mayoría, muertas. También observaron el desarrollo de raíces adventicias en el cuello de las plantas mutantes. Sugieren que el desarrollo de raíces adventicias en este mutantes representa un mecanismo para compensar la pérdida del potencial de crecimiento de la raíz principal. Además, el análisis de expresión de los genes esenciales para el mantenimiento del nicho de células fundadoras, *WOX5* (*WUSHEL-RELATED HOMEODOMAIN*) y *SHR* (*SHORTROOT*), reveló que estos genes tenían un nivel de expresión más bajo en los mutantes que en plantas WT tanto en la raíces adventicias como en la raíz principal (Ühlken *et al.*, 2014). En los mutantes que hemos identificado, un análisis más detallado de la zona apical de la raíz embrionaria podría aportar más información sobre el mecanismo afectado. La futura identificación de los genes afectados en nuestros mutantes podría dar información sobre qué genes

están implicados en el mantenimiento de la elongación de la raíz primaria en tomate.

Los mutantes 1662 ET MM y 1862 ET MM no tienen afectado el desarrollo de la raíz principal pero presentan alteraciones en el desarrollo del sistema radicular lateral. Estas raíces emergen más tarde que las de las plantas WT, son de mayor grosor y su crecimiento se detiene. Lucas y colaboradores (2011), tras caracterizar el mutante *shr* de *Arabidopsis*, fueron capaces de ver que *SHR* (SHORTROOT) también es necesario para la emergencia de las raíces laterales. Mediante microscopía electrónica observaron que las raíces que emergían a partir de la raíz primaria eran más gruesas que las de plantas WT. Al analizar la organización celular mediante microscopía confocal vieron que el patrón de organización celular en el mutante se encontraba alterado. Los autores concluyen que *SHR* es requerido para la iniciación, el mantenimiento del patrón radial y la organización de los primordios de las raíces laterales (Lucas *et al.*, 2011). Por otro lado, De Veylder y colaboradores (1999) han aislado un nuevo gen tipo-D ciclina (*CYCD4;1*). Mediante hibridación *in-situ* vieron que este gen se expresa durante los procesos de desarrollo de tejido vascular, embriogénesis y en la formación de los primordios de la raíz lateral. Los autores vieron una reducción en la transcripción del gen en la zona distal del primordio de la raíz lateral. Mencionan que puede existir una señalización negativa producida por el meristemo que se acaba de formar. También vieron que cuando el nuevo primordio lateral se encuentra completamente desarrollado, la expresión de *CYCD4;1* se reprime. Los autores concluyen que se requiere la expresión de *CYCD4;1* para la organogénesis de las raíces laterales pero no para el mantenimiento de la división celular (De Veylder *et al.*, 1999). Posteriormente, Nieuwland y colaboradores (2009) descubrieron que *CYCD4;1* también modula la densidad de raíces laterales en *Arabidopsis* (Nieuwland *et al.*, 2009). Fukaki y colaboradores (2002) caracterizaron un mutante de ganancia de función en *Arabidopsis* (*slr*). El mutante dominante *slr* no presente enraizamiento lateral. El análisis con marcadores de ciclo y diferenciación celular reveló que *slr* bloquea la división celular de las células del periciclo en el proceso de iniciación de la raíz lateral. Mediante mapeo

posicional, comprueban que SLR codifica para *IAA14* y terminan concluyendo que *SRL/IAA14* es un regulador clave en la formación de las raíces laterales (Fukaki *et al.*, 2002). En el caso de tomate, Ivanchenko y colaboradores (2006) caracterizaron tres mutantes (*dgt1-1*, *dgt1-2*, *dgt1-dp*) que no forman raíces laterales y vieron que la mutación provoca una disrupción en el desarrollo de los primordios de las raíces laterales. Tras la clonación del gen afectado, vieron que el producto génico era una ciclofilina de tipo A y que el gen se expresa en la iniciación y desarrollo de la raíz lateral. Finalmente, concluyen que el gen *DGT* es esencial para la morfogénesis de la raíz lateral (Ivanchenko *et al.*, 2006). La identificación de los genes que son responsables de suprimir el buen desarrollo de las raíces laterales podría aportar más información sobre el control genético implicado en el enraizamiento lateral en tomate con las implicaciones tanto básicas como aplicadas que ello conllevaría.

Una alteración que se ha observado en los mutantes de raíz detectados fue la incapacidad o dificultad de desarrollar raíces adventicias. Aunque en algunos mutantes se observa la emergencia de raíces adventicias, éstas son de menor longitud, más gruesas y no tienen un desarrollo secundario como el de las plantas WT. Inukai y colaboradores (2005) caracterizaron un mutante (*crl1*) en arroz (*Oryza sativa*) que no era capaz de desarrollar raíces de la corona, un tipo de raíces adventicias que es muy importante en el sistema radicular de cereales. *CRL1* (CROWN ROOTLESS1) codifica un miembro de la familia proteica ASYMETRIC LEAVES2/LATERAL ORGAN BOUNDARIES, y su expresión se localiza en las zonas de iniciación de raíces adventicias en arroz. Los autores mencionan que *CRL1* cuenta con dos elementos de respuesta a auxinas en su región promotora (AuxREs). Ellos concluyen que *CRL1* codifica un regulador positivo para la formación de raíces adventicias en arroz y que su expresión es directamente regulada por factores de respuesta a auxinas (ARF) en la ruta de señalización de auxinas (Inukai *et al.*, 2005). En un estudio posterior, Coudert y colaboradores (2011) añaden que los genes *FAS1/FSM*, *GTE4* y *MAP* requieren la activación de *CRL1* mediada por auxinas y que estos genes probablemente son regulados de forma directa por *CRL1*. Estos genes tienen funciones relacionadas con el crecimiento celular, la regulación del ciclo

celular y la remodelización de la cromatina. Los autores sugieren que estos genes están controlados por *CRL1* y que se involucran en la iniciación de las raíces adventicias en arroz (Coudert *et al.*, 2011). En conclusión, los mutantes de raíz descritos en este Trabajo de Tesis pueden ser una fuente de identificación de genes clave en el desarrollo radicular en tomate. La posibilidad de establecer homologías con genes implicados en el enraizamiento de otras especies nos puede ayudar a profundizar en el conocimiento de este carácter tan importante y que puede tener también un elevado impacto a nivel aplicado.

### **5.7.- Identificación y caracterización de mutantes con fenotipo de muerte celular y necrosis**

En este Trabajo de Tesis se han identificado varios mutantes que presentan diferentes reacciones necróticas o de muerte celular que dan como resultado la necrosis de algunas partes o la muerte de toda la planta. Se han identificado dos mutantes (1421 ET MM, 2142 ET MM) con un fenotipo de respuesta necrótica general lo cual provoca que las plantas mutantes colapsen y mueran. En las plantas mutantes de la línea 1421 ET MM la necrosis empieza en el hipocótilo de las plántulas, posteriormente avanza de forma ascendente y termina por necrosar las plantas por completo. Jabs y colaboradores (1996) identificaron un mutante en *Arabidopsis* (*lsd1*) en el cual la muerte celular no podía ser controlada y causaba un efecto parecido. Posteriormente, Dietrich y colaboradores (1997) mencionan que *LSD1* codifica para una proteína *zinc-finger* que podría actuar como un regulador negativo de señal para programar la muerte celular. En arroz, Jian-yang y colaboradores (2012) identificaron un mutante (*lms1*) en el cual la necrosis se propagaba a toda la planta. Tras pruebas moleculares, los autores concluyeron que el gen *LMS1* se encuentra entre el marcador Indel1 y MM0112-4 a una distancia de 400 kb en el cromosoma 6, pero no ha podido ser clonado todavía. Nuestros mutantes son un valioso material para continuar con el estudio de los mecanismos que intervienen en la muerte celular en tomate. El futuro mapeo y posterior clonaje

de los genes que se encuentran alterados en los mutantes de este trabajo también pueden ayudar a mejorar el conocimiento de la maquinaria molecular implicada en los procesos de muerte celular en esta especie.

Por otro lado, en alguno de los mutantes (2477 ET MM, 1512 ET MM), se ve la formación de manchas necróticas en los folíolos, manifestándose generalmente en las hojas viejas y evolucionando dentro de la planta de forma ascendente, es decir, primero se ven en la base y conforme pasa el tiempo se ven también en la parte apical de la planta. En el mutante 1512 ET MM además de presentar las manchas necróticas en los folíolos, también tiene afectado su desarrollo vegetativo ya que presenta clorosis general y un porte débil. Otro de los mutantes, 2477 ET MM, no presenta alteraciones vegetativas importantes; las zonas necróticas aparecen en los folíolos de las hojas más viejas pero no afecta de forma significativa al crecimiento de la plantas. En la bibliografía se ha encontrado alguna referencia de un mutante que pudiera estar relacionado con los vistos aquí. Barker y colaboradores (2006) identificaron un mutante de tomate (M205) que presentaba un retraso en el crecimiento, marchitez y una necrosis progresiva que empezaba por la hojas viejas. Mediante RT-PCR los autores vieron que algunos genes de defensa (*PR-1*, *PR-5* y *Lehr203J*) se encontraban en el mutante altamente expresados en comparación con las plantas WT. También mencionan que las plantas mutantes presentan una mayor resistencia a *Oidium lycopersici* en comparación con el WT. Los autores concluyen, tras diferentes análisis moleculares, que el mutante M205 habría experimentado una recombinación en el locus Cf-9, generando un gen quimérico (*Hcr9-M205*) que codifica para una proteína autoactiva.

Tras los análisis de cosegregación, se puede decir con una probabilidad de fallo menor del 1.8% que la mutación en la línea 2477 ET MM es insercional. De hecho, mediante Anchor-PCR, se ha identificado las regiones flanqueantes del T-DNA insertado en la línea 2477 ET MM y se ha visto que la inserción ocurrió en el gen *Solyc11g011960.1* el cual codifica una proteína de tipo UDP-glucosa pirofosforilasa. Este gen presenta homología con dos genes de *Arabidopsis* con función redundante que codifican proteínas UDP-glucosa

pirofosforilasa. Se ha demostrado que estos genes juegan un papel importante en la regulación de la muerte celular en *Arabidopsis* (Chivasa *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2010). Por lo que respecta a la redundancia génica vista en *Arabidopsis*, en tomate también existe otro gen (*Solyc05g054060.2*) que codifica una proteína UDP-glucosa pirofosforilasa localizado en el cromosoma 5. Sin embargo, al detectar el mutante 2477 ET MM con un fenotipo de necrosis, pensamos que los dos genes (*Solyc11g011960.1* y *Solyc05g054060.2*) no tiene función redundante en tomate. Se deberían realizar análisis funcionales comparativos de ambos genes para poder profundizar en su función y en un posible mecanismo diferencial respecto de *Arabidopsis*. Hasta el momento no se ha descrito en tomate ningún gen que codifique para una proteína UDP-glucosa pirofosforilasa. Por tanto, el gen etiquetado en esta línea mutante puede ayudar a mejorar el conocimiento que se tiene sobre el mecanismo de necrosis y muerte celular en tomate. Con respecto a la posible relevancia agronómica, se deberían realizar estudios sobre el comportamiento de las plantas mutantes cuando son expuestas al ataque por patógenos para ver hasta qué punto esa respuesta necrótica puede tener relación con una reacción hipersensible que evite la propagación de patógenos por toda la planta.

## **5.8.- Identificación y caracterización de mutantes con alteraciones en la respuesta morfogénica *in vitro***

Se ha abordado la identificación de mutantes con respuesta morfogénica alterada a partir de un material vegetal que regenera perfectamente en condiciones de cultivo *in vitro*. Según hemos comprobado en la bibliografía consultada, ésta es la primera vez que se hace un escrutinio de este tipo para la identificación de mutantes que estén afectados de forma específica en procesos de regeneración adventicia. En cuanto a la especie elegida para realizar este proyecto, cabe destacar que algunos autores incluyen al tomate entre las especies de media o baja respuesta morfogénica (Locky, 1983), debido a que hay diversos cultivares o líneas que generan problemas a la hora

de conseguir la regeneración de plantas. Esto dificulta o puede llegar a impedir que se alcancen resultados al emplear técnicas basadas en el cultivo *in vitro* en las que es imprescindible la regeneración de plantas (Hamza y Chupeau, 1993, Frary y Earle, 1996). Las líneas T-DNA con las que se ha trabajado en el presente proyecto se han obtenido a partir de un cultivar que no presenta problemas para la regeneración en nuestras condiciones. Por lo que respecta a la identificación de mutaciones que afecten la capacidad organogénica, hay que tener en cuenta que cualquier mutación dominante de anulación de función (e.g.: que impidiera la regeneración) no se detectaría porque no se podría obtener la planta transgénica original (TG1). En cambio, si la mutación es recesiva (sólo aparece cuando la planta porta el alelo mutado en homocigosis), la planta transgénica se puede desarrollar perfectamente porque, al ser hemicigótica, el alelo mutante no interfiere en el proceso de regeneración. Por ello, para identificar este tipo de mutantes se ha hecho imprescindible realizar el escrutinio en progenies TG2 (descendencias de la línea transgénica original) para detectar mutaciones con efecto recesivo.

Por otra parte, hay que tener en cuenta la dificultad metodológica que supone este tipo de escrutinios ya que, si se ha producido alguna alteración en el desarrollo de la plántula o ha habido una manipulación inadecuada durante la extracción de los explantes, puede que éstos no regeneren, en cuyo caso se corre el riesgo de calificar una línea como mutante, cuando en realidad no lo es. Para evitar este problema se realizó un diseño experimental en el que, tras la identificación inicial de un mutante se hizo inmediatamente un experimento de corroboración con un número mayor de individuos. Por otro lado, el medio y las condiciones de cultivo que se han utilizado para la detección de mutantes con alteraciones en la capacidad morfogenética *in vitro* deben estar perfectamente ajustados para que la eficacia de regeneración sea del 100%. Esto es lo que permite tener la certeza de que un evento de no regeneración en varias plantas de una línea se deben a una alteración genética y no a un fallo en la manipulación o el cultivo de los explantes. Dicho de otro modo, la utilización de un medio y condiciones que no fueran óptimas para la regeneración, nos daría como resultado considerar líneas como mutantes

cuando no lo son con la consiguiente pérdida de tiempo y recursos. En definitiva, este escrutinio sólo puede tener éxito si se tiene perfectamente puesto a punto el sistema de regeneración tanto en las condiciones de cultivo, como en el medio de cultivo y en el conocimiento y manejo adecuado del material vegetal.

La metodología que se utilizó para la identificación de mutantes alterados en la respuesta morfogénica *in vitro* en este trabajo de Tesis Doctoral es una estrategia novedosa. Partiendo del cultivo de explantes de cotiledón de progenies TG2 provenientes de una población de líneas mutagenizadas, el posterior cultivo en un medio de cultivo óptimo para la regeneración y el fenotipado para detectar líneas en las cuales se observen explantes incapaces de regenerar nos puede dar como resultado la detección de mutantes que hayan sufrido alteración genéticas (e. g.: disrupción de gen clave y/o específico para la regeneración) que lleven como resultado la incapacidad de regenerar como los explantes de plantas WT. El estudio para determinar qué genes son los implicados en la capacidad organogénica en plantas se ha llevado a cabo generalmente mediante el análisis del patrón de expresión de genes cuando se cultivan los explantes en medios de regeneración (Cary *et al.*, 2002; Che *et al.*, 2006). Una de las críticas que se le podrían hacer a esta aproximación es que tras el corte de un explante (e. g.: cotiledón, foliolo, hipocótilo, tallo, etc.) y posterior cultivo, el estrés creado puede conducir a que un gran número de genes sean activados y, por lo tanto, se vea un cambio en el patrón de expresión de muchos genes que nada tienen que ver con la regeneración. En cambio, con la estrategia que estamos utilizando, la detección de mutantes de reducción o pérdida de respuesta morfogénica, se pueden identificar alteraciones que son provocados por genes mayores que controlan este proceso. Por lo tanto, creemos que la metodología que hemos utilizado es la más adecuada para buscar los genes que controlan y regulan de forma específica el proceso de regeneración en tomate.

El estudio de la respuesta morfogénica se ha llevado a cabo extensivamente en la planta modelo *Arabidopsis*. Dentro del gran número de investigaciones

realizadas, algunos estudios han sugerido que existe un control genético similar entre la regeneración adventicia de ápices meristemáticos y la iniciación de las raíces laterales. Las raíces laterales de las plantas se originan a partir del periciclo (Dubrovsky *et al.*, 2001) y se ha establecido que los explantes de raíz desarrollan los callos organogénicos a partir de células periclinales, en un medio de inducción de callo y, posteriormente, ápices en un medio de inducción de ápices (Atta *et al.*, 2009; Sugimoto *et al.*, 2010; Sangwan *et al.*, 1992; Che *et al.*, 2007). Por otra parte, un estudio reciente ha demostrado que la formación de callo organogénico a partir de explantes de raíz, cotiledón y pétalos está bajo el mismo control genético que el de la iniciación de la división de células del periciclo (Sugimoto *et al.*, 2010). Tras el análisis de los mutantes de *Arabidopsis alf4-1* (*aberrant lateral root formatio 4*) en los cuales se bloquea la iniciación de las raíces laterales, la formación de callo organogénico y la regeneración a partir de explantes de raíz se encuentra drásticamente reducida. Los autores sugieren que la formación de callo organogénico y la formación de raíces laterales comparte muchos elementos (Sugimoto *et al.*, 2010). Por otro lado, Atta y colaboradores (2009) mencionan que tras el cultivo de explantes de parte aérea de la planta y de raíz, se expresan genes específicos de raíz (*WOX5*, *SCR*, *SHR*, *PLT1*, *RCH1*), lo cual les hizo sugerir que el mecanismo de regeneración adventicia de ápices meristemáticos y la formación de raíces laterales comparten un control genético similar.

En el caso de los mutantes de regeneración detectados en este trabajo de Tesis, la línea 1524 ET MM presenta alteraciones fenotípicas que afectan también el enraizamiento. Sin embargo, tras el fenotipado de las plantas axénicas cultivadas en condiciones de cultivo *in vitro*, observamos que el enraizamiento embrionario y adventicio no presenta alteraciones claras en el resto de los mutantes de morfogénesis identificados. Según la hipótesis anteriormente planteada un mutante de regeneración debería tener alterado algún carácter relacionado con el enraizamiento lateral, pero esto no es así, al menos en el caso del tomate. Por lo que respecta a las otras tres líneas mutantes detectadas (1311 ET MM, 1801 ET MM, 2225 ET MM) se ha comprobado que las raíces, tanto embrionarias como adventicias, de las

plantas cuyos explantes de cotiledón no fueron capaces de desarrollar ápices adventicios, son similares al de las plantas WT. Estos datos nos hacen pensar que, a diferencia de lo que se ha descrito en *Arabidopsis*, en el caso del tomate no hay una conexión estricta entre los procesos que generan la formación de callo y los que determinan la emergencia de raíces laterales. Puede que ambos procesos estén relacionados, pero nuestros datos indican que la incapacidad de formar un callo no está necesariamente ligada a la emergencia de raíces laterales, o a la inversa.

Se han identificado cuatro mutantes que no regeneran brotes adventicios a partir de explantes de cotiledón. Dentro de estos mutantes, hay diferentes fenotipos, desde los que sólo experimentan una pequeña proliferación celular (2225 ET MM) hasta los que forma una gran cantidad de callo desorganizado y producen ciertas estructuras similares a hojas pero no son capaces de formar brotes adventicios (1311 ET MM). Esta gama de comportamientos nos pueden permitir estudiar de forma diferenciada los procesos biológicos que tienen lugar durante la regeneración. Es de destacar que dos de ellos prácticamente no difieren en su desarrollo vegetativo y reproductivo respecto de las plantas WT, lo cual hace aumentar su interés ya que el proceso alterado en estos mutantes parece ser específico de la regeneración adventicia.

El modo de herencia de las mutaciones que afecta la capacidad de regeneración en este trabajo son todas monogénicas recesivas. En comparación, a través de análisis genéticos de la regeneración en tomate, diversos autores sugieren que hay alelos dominantes que determinan una alta capacidad de regeneración (Koornneef *et al.*, 1987; Fary y Illg, 1996; Satoh *et al.*, 2000; Pratta *et al.*, 2003; Marchionni *et al.*, 2007). Por ejemplo, Koornneef y colaboradores (1993) encontraron un alelo dominante (Rg-1, Regeneration 1) proveniente de una especie silvestre de tomate (*Solanum peruvianum*). Los autores concluyeron, mediante pruebas moleculares con RFLPs, que Rg-1 se localiza en el cromosoma 3.

Uno de los aspectos que se ve en los mutantes 1524 ET MM y 1801 ET MM, es que además de presentar una respuesta morfogenética baja, se observan otras

alteraciones en el desarrollo vegetativo en condiciones de cultivo *in vitro* al igual que en condiciones *in vivo*. Sin embargo, en nuestro trabajo se han identificado dos mutantes (2225 ET MM, 1311 ET MM) que en las condiciones estandar de cultivo tanto *in vitro* como *in vivo*, no presentan alteraciones en el desarrollo vegetativo. Este resultado es muy importante porque hasta el momento no conocemos la existencia de ningun mutante de tomate que solamente tenga alterada la capacidad de regenerar ápices adventicios *in vitro*. Esto aumenta el valor de estos mutantes, ya que al no tener alteraciones obvias en el desarrollo y solamente en la capacidad de regeneración de ápices adventicios, se pude inferir que el gen mutado es específico de regeneración. En la especie modelo *Arabidopsis*, Johnson y colaboradores (2011) caracterizaron un mutante (*fla1-1*) el cual presentaba una respuesta morfogénetica baja y, al igual que con nuestros mutantes (2225 ET MM, 1311 ET MM), los autores mencionan que las plantas que tenían alterada la regeneración no presentaban diferencias fenotípicas en comparación con el WT.

Los resultados obtenidos de la indentificación de líneas mutantes con alteraciones en la capacidad morfogénetica *in vitro*, nos aporta un valioso material para determinar algunos de los genes clave para la regeneración. Esperamos que trabajos futuros permitan conocer cuáles son los genes alterados en cada una de las líneas detectadas. Por último, independientemente de la identidad genética de las mutaciones observadas en cada línea, la utilidad de identificar genes que puedan mejorar la capacidad de regeneración *in vitro* del tomate es evidente, tanto para el conocimiento básico como su utilización en micropropagación o mejora biotecnológica.

# Conclusiones

1. Se han evaluado 762 líneas T-DNA de tomate para detectar mutantes afectadas en caracteres del desarrollo temprano y/o en su capacidad de regeneración adventicia *in vitro*. Se han identificado 22 mutantes, de las que 21 portan una sola mutación, mientras el otro tiene dos mutaciones que segregan de forma independiente. Por tanto, se han detectado un total de 23 fenotipos mutantes diferentes.
2. Se han identificado cinco mutantes con alteraciones en el desarrollo radicular. Entre ellas hay mutantes afectados en la raíz embrionaria, en las raíces secundarias y/o en las raíces adventicias. Se ha analizado la influencia de la aplicación de auxinas exógenas en el fenotipo mutante.
3. Se han identificado seis mutantes con alteraciones en diferentes caracteres de la parte aérea. Entre ellas destaca una línea con alteraciones en la morfología foliar, de la que ya se ha clonado el gen afectado y otra, relacionada con los brasinosteroides, que exhibe cambios en múltiples caracteres.
4. Se ha identificado cuatro mutantes con fenotipo de muerte celular y necrosis y ya se ha clonado el gen alterado en una de estas líneas mutantes.
5. Se han identificado cinco mutantes afectados en la respuesta morfogenética. El abordaje utilizado para detectar este tipo de mutantes nos ha permitido identificar algunas líneas con alteraciones en diferentes fases del proceso de regeneración adventicia, como la formación de callo desorganizado, la diferenciación de yemas adventicias, o el desarrollo de las estructuras organogénicas hasta dar una nueva planta. La caracterización de estos mutantes ha abierto la posibilidad de encontrar genes específicos del proceso de organogénesis adventicia.
6. La mutación presente en la línea 2225 ETMM impide la formación de callo dependiendo de la composición de reguladores del crecimiento en

el medio de cultivo. La planta mutante no tiene afectado el desarrollo vegetativo tanto *in vivo* como *in vitro*, lo que indica que la mutación no afecta a los procesos de división celular *in planta*, sino que su efecto está restringido a la proliferación celular a partir de las zonas de corte de los explantes cultivados *in vitro*. Por otro lado, los callos de los explantes de la línea 1311 ETMM diferencian yemas pero no desarrollan brotes normales. Los análisis histológicos revelan que su anormal desarrollo se debe a un defecto en la organización de meristemas apicales adventicios. Lo más destacable es que las plantas mutantes no exhiben ninguna alteración fenotípica, lo que indica que el gen alterado cumple un papel específico en el desarrollo de meristemas adventicios.

7. Los análisis genéticos realizados en las 23 mutaciones detectadas en este Trabajo de Tesis Doctoral han indicado que en cinco de ellas existe cosegregación inserto T-DNA con *nptII* funcional y el fenotipo mutante con una probabilidad de fallo menor al 5%. En estos casos se puede abordar la clonación del gen afectado mediante Anchor-PCR. De hecho, gracias a la colaboración con el grupo del Dr. Lozano (Universidad de Almería) ya se han clonado los genes alterados en dos mutantes: el de la línea 1381 ET MM que codifica para una proteína de tipo lipasa con un dominio alpha-beta hidrolasa y el de la línea 2477 ET MM que codifica para una proteína de tipo UDP-glucosa pirofosforilasa.

# **Bibliografía**

- Achard P.; Gusti A.; Cheminant S.; Alioua M.; Dhondt S.; Coppens F. 2009.** Gibberellin signaling controls cell proliferation rate in *Arabidopsis*. *Current Biology*. 19: 1188–1193.
- Ahmad P.; Ashraf M.; Younis M.; Hu X.; Kumar A.; Akram N. A.; Al-Qurainy F. 2012.** Role of transgenic plants in agricultura and biopharming. *Biotechnology Advnces*. 30: 524-540.
- Ahmadi A.; Azadfar D.; Mofidabadi A. J. 2010.** Study of inter-generic hybridization possibility between *Salix aegyptica* and *Populus caspica* to achieve new hybrids. *International Journal of Plant Production*. 4(2): 143-147.
- Aida M.; Ishida T.; Fukaki H.; Fujisawa H.; Tasaka M. 1997.** Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: an analysis of the *cup-shaped cotyledon* mutant. *Plant Cell*. 9:841-857.
- Aida M.; Ishida T.; Tasaka M. 1999.** Shoot apical meristem and cotyledon formation during *Arabidopsis* embryogenesis: interaction among the *CUP-SHAPED COTYLEDON* and *SHOOTMERISTEMLESS* genes. *Development*. 126:1563-1570.
- Alonso J. M.; Stepanova A. N.; Lisse T. J.; Kim C. J.; Chen H.; Shinn P.; Stevenson D. K.; Zimmerman J.; Barajas P.; Cheuk R.; Gadrinab C.; Heller C.; Jeske A.; Koesema E.; Meyers C. C.; Parker H.; Prednis L.; Ansari Y.; Choy N.; Deen H.; Geralt M.; Hazari N.; Hom E., Karnes M.; Mulholland C.; Ndubaku R.; Schmidt I.; Guzman P.; Aquilar-Henonin L.; Schimd M.; Weigel D.; Carter D. E.; Marchand T.; Risseeuw E.; Brogden D.; Zeko A.; Crosby W. L.; Berry C. C.; Ecker J. R. 2003.** Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301: 653–657.
- André D.; Colau D.; Schell J.; Van Montagu M.; Hernalsteens J. P. 1986.** Gene tagging in plants T-DNA insertion mutagen that generates *APH* (3') II-plant gene fusions. *Molecular and General Genetics*. 204 (3): 512-518.
- Antal Z.; Rascle C.; Feyre M.; Bruel C. 2004.** Single oligonucleotide nested PCR: a rapid method for the isolation of genes and their flanking

regions from expressed sequence tags. *Current Genetics* 46(4): 240-246.

**Arikita F. N.; Azevedo M. S.; Scotton D. C.; Pinto M. S.; Figueira A.; Peres L. E. 2013.** Novel natural genetic variation controlling the competence to form adventitious roots and shoots from the tomato wild relative *Solanum pennellii*. *Plant Science*. 199- 200; 121-130.

**Arrowsmith D. A. de Silva J. 1995.** Characterization of two tomato fruit-expressed cDNAs encoding xyloglucan endotransglycosylase. *Plant Molecular Biology*. 28: 391–403.

**Atarés A.; Moyano E.; Morales B.; Schleicher P.; García-Abellán J. S.; Antón T.; García-Sogo B.; Perez-Martín F.; Lozano R.; Flores F. B.; Moreno V.; Bolarín M. C.; Pineda B. 2011.** An insertional mutagenesis programme with an enhancer trap for the identification and tagging of genes involved in abiotic stress tolerance in the tomato wild-related species *Solanum pennellii*. *Plant Cell Reports*. 30:1865-1879.

**Atta R.; Lieve L.; Boucheron-Dubuisson E.; Guivarc'h A.; Carnero E.; Giraudat-Pautot V.; Rech P.; Chriqui D. 2009.** Pluripotency of *Arabidopsis* xylem pericycle underlies shoot regeneration from root and hypocotyl explants grown in vitro. *Plant Journal*. 57:626-644.

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

**Bade J.; van Grinsven E.; Custers J.; Hoekstra S.; Ponstein A. 2003.** T-DNA tagging in *Brassica napus* as an efficient tool for the isolation of new promoters for selectable marker genes. *Plant Molecular Biology*. 52: 53–68.

**Bahurpe J. V.; Patil S. C.; Pawar B. D.; Chimote V. P.; Kale A. A. 2013.** Callus induction and plantlet regeneration in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of Cell & Tissue Research*. 2:3765–3768.

**Bai Y. and Lindhout P. 2007.** Domestication and breeding of tomatoes: what have we gained and what can we gain in the future? *Annals of Botany*. 100:1085–1094.

- Banno H.; Ikeda Y.; Niu Q. W.; Chua N. H. 2001.** Overexpression of Arabidopsis ESR1 induces initiation of shoot regeneration. *Plant Cell* 13:2609–2618.
- Bao F.; Shen J.; Brady S. R.; Muday G. K.; Asami T.; Yang Z. 2004.** Brassinosteroids interact with auxin to promote lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 134: 1624–1631.
- Barakat A.; Gallois P.; Raynal M.; Mestre-Ortega D.; Sallaud C.; Guiderdoni E.; Delseny M.; Bernardi G. 2000.** The distribution of T-DNA in the genomes of transgenic *Arabidopsis* and rice. *FEBS Letters*. 471: 161-164.
- Barberon M. and Geldner N. 2014.** Radial transport of nutrient: the plant root as a polarized epithelium. *Plant Physiology*. 166: 528-537.
- Barker C. L.; Talbot S. J.; Jones J. D. G.; Jones D. A. 2006.** A tomato mutant that shows stunting, wilting, progressive necrosis and constitutive expression of defense genes contains a recombinant Hcr9 gene encoding a autoactive protein. *The Plant Journal*. 46: 369-384.
- Barkoulas M.; Hay A.; Kougioumoutzi E.; Tsiantis M. 2008.** A developmental framework for dissected leaf formation in the *Arabidopsis* relative *Cardamine hirsuta*. *Nature Genetics*. 40: 1136–1141.
- Barton M. K. and Poethig R. S. 1993.** Formation of the shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana*: an analysis of development in the wild type and in the *shoot meristemless* mutant. *Development*. 119:823-831.
- Bassel G. W.; Mullen R. T.; Bewley J. D. 2008.** *procera* is a putative DELLA mutant in tomato (*Solanum lycopersicum*): effects on the seed and vegetative plant. *Journal of Experimental Botany*. 59: 585–593.
- Bauchet G. and Causse M. 2012.** Genetic diversity in tomato (*Solanum lycopersicum*) and its wild relatives. In: Caliskan M, editor. *Genetic diversity in plants*. p. 133–62.
- Bayer E. M.; Smith R. S.; Mandel T.; Nakayama N.; Sauer M.; Prusinkiewicz P.; Kuhlemeier C. 2009.** Integration of transport-based models for phyllotaxis and midvein formation. *Genes Development*. 23: 373–384.

- Beemster G. T. S. and Baskin T. I. 1998.** Analysis of cell division and elongation underlying the developmental acceleration of root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*. 116: 1515–1526.
- Behboodian B.; Ali Z. M.; Ismail I.; Zainal Z. 2012.** Postharvest analysis of lowland transgenic tomato fruits harbouring hpRNAi-ACO1 construct. *Scientific World Journal*. Volume 2012.
- Bellini C.; Pacurar D. I.; Perrone I. 2014.** Adventitious roots and lateral roots: similarities and differences. *Annual Review of Plant Biology*. 65: 639-666.
- Ben-Ari G. and Lavi U. 2012.** Marker-assisted selection in plant breeding. 2012. In *Plant Biotechnology and Agriculture Prospects of the 21st century*, Edited by Arie Altman and Paul Micheal Hasegawa. Pages: 163-184.
- Bendinger P. A.; Chetelat R. T.; McClure B.; Moyle L .C.; Rose J. K. C.; Stack S. M.; Van deer Knaap E.; Baek Y. S.; Lopez.Casado G.; Covey P. A.; Kumar A.; Li W.; Nunez R.; Cruz-Garcia.; Royer S. 2011.** Interspecific reproductive barriers in the tomato clade: opportunities to decipher mechanisms of reproductive isolation. *Sex Plant Reproduction*. 24: 171-187.
- Benková E. and Bielach A. 2010.** Lateral root organogenesis—from cell to organ. *Current Opinion in Plant Biology*. 13: 677–683.
- Benková E.; Michniewicz M.; Sauer M.; Teichmann T.; Seifertová D.; Jürgens G.; Friml J. 2003.** Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell*. 115: 591–602.
- Bennetzen J. L.; Springer P. S.; Cresse A. D.; Hendrickx M. 1993.** Specificity and regulation of the Mutator transposable element system in maize. *Critical Review in Plant Science*. 12 (1-2): 57-95.
- Benson E. E. 2000.** Special symposium: In vitro plant recalcitrance: An introduction. *In Vitro Cell & Development Biology*. 36:141-148.
- Bergognoux V. 2014.** The history of tomato: from domestication to biopharming. *Biotechnol Advances*. 32 (1): 170-189.
- Bernà G.; Robles P.; Micol J. L. 1999.** A mutational analysis of leaf morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*. 152: 729-742.

- Bhatia P.; and Ashwath N. 2004.** Comparative performance of micropropagated and seed-grown tomato plants. *Biologia Plantarum*. 48: 626-628.
- Bhatia P.; Ashwath N.; Senaratna; T. & David M. 2004.** Tissue culture studies of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 78:1-21.
- Bidzinki P.; Noir S.; Shahi S.; Reinstädler A.; Gratkowska D. M.; Panstruga R. 2014.** Physiological characterization and genetic modifiers of aberrant root thigmomorphogenesis in mutants of *Arabidopsis thaliana* MILDEW LOCUS 0 genes. *Plant, Cell & Environment*. 37: 2738-2753.
- Bielach A.; Podlesakova K.; Marhavy P.; Duclercq J.; Cuesta C.; Muller B. 2012.** Spatio temporal regulation of lateral root organogenesis in *Arabidopsis* by cytokinin. *Plant Cell*. 24: 3967–3981.
- Birnbaum K.; Shasha D. E.; Wang J. Y.; Jung J. W.; Lambert G. M.; Galbraith D. W. 2003.** A gene expression map of the *Arabidopsis* root. *Science*. 302: 1956–1960.
- Bishop G. J.; Harrison K.; Jones J. D. G. 1996.** The tomato *Dwarf* gene isolated by heterologous transposon tagging encodes the first member of a new cytochrome P450 family. *Plant Cell*. 8:959-969.
- Blanca J.; Montero-Pau J; Sauvage C.; Bauchet G.; Illa E.; Diez M. J.; Francis D.; Causse M.; van der Knaap E.; Cañizares J. 2015.** Genomic variation in tomato, from wild ancestors to contemporary breeding accessions. *BMC Genomics*: 16:257.
- Bleckmann A.; Weidtkamp-Peters S.; Seidel C. A. M.; Simon R. 2009.** Stem cell signaling in *Arabidopsis* requires CRN to localize CLV2 to the plasma membrane. *Plant Physiology*. 152: 166-176.
- Bolibok H and Rakoczy-Trojanowska M. 2006.** Genetic mapping of QTLs for tissue-culture response in plants. *Euphytica*. 149:73–83.
- Borevitz J. O.; Xia Y.; Blount J.; Dixon R. A.; Lamb C. 2000.** Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell*.12:2383-2394.

- Botstein D.; Whit R. L.; Skolnick M.; Davis R. W. 1980.** Construction of a genetic-linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*. 32: 314–331.
- Bouchez O.; Huard C.; Lorrain S.; Roby D.; Balagué C. 2007.** Ethylene is one of the key elements for cell death and defense response control in the Arabidopsis lesion mimic mutant vad1. *The Plant Physiology*. 145: 465–477.
- Brand A.; Shirding N.; Shleizer S.; Ori N. 2007.** Meristem maintenance and compound-leaf patterning utilize common genetic mechanisms in tomato. *Planta*. 226: 941-951.
- Brandwagt B. F.; Mesbah L. A.; Takken F. L.; Laurent P. L.; Kneppers T. J.; Hille J.; Nijkamp H. J. J. 2000.** A longevity assurance gene homolog of tomato mediates resistance to *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* toxins and fumonisin B1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 4961–4966.
- Brown D. C. W. and Thorpe T. A. 1995.** Crop improvement through tissue culture. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 11: 409-415.
- Bruening G. and Lyons J. M. 2000.** The case of the FLAVR SAVR tomato. *Calif Agriculture*. 54 (4): 6-7.
- Brunaud V.; Balzergue S.; Dubreucq B.; Aubourg S.; Samson F.; Chauvin S.; Bechtold N.; Cruaud C.; DeRose R.; Pelletier G.; Lepiniec L.; Caboche M.; Lechary A . 2002.** T-DNA integration into the Arabidopsis genome depends on sequences of pre-insertion sites. *EMBO Reports*. 12: 1152–1157.
- Busov V.; Yordanov Y.; Gou J.; Meilan R.; Ma C.; Regan S.; Strauss S. 2011.** Activation tagging is an effective gene tagging system in *Populus*. *Tree Genetics and Genomes*. 7: 91-101.
- Byrne M. E.; Barley R.; Curtis M.; Arroyo J. M.; Dunham M.; Hudson A.; Martienssen R. A. 2000.** Asymmetric leaves1 mediates leaf patterning and stem cell function in Arabidopsis. *Nature*. 408: 967–971.
- Cai S. and Lashbrook C. C. 2008.** Stamen abscission zone transcriptome profiling reveals new candidates for abscission control: enhanced retention

of floral organs in transgenic plants overexpressing Arabidopsis ZINC FINGER PROTEIN2. *Plant Physiology*. 146: 1305-1321.

**Campanoni P. and Nick P. 2005.** Auxin-dependent cell division and cell elongation. 1-Naphthaleneacetic acid and 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid activate different pathways. *Plant Physiology*. 137: 939–948.

**Campisi L.; Yang Y.; Yi Y.; Heilig E.; Herman B.; Cassista A. J.; Allen D. W.; Xiang H.; Jack T. 1999.** Generation of enhancer trap lines in *Arabidopsis* and characterization of expression patterns in the inflorescence. *The Plant Journal*. 17(6): 699–707.

**Carrera E.; Ruiz-Rivero O.; Peres L. E. P.; Atarés A.; Garcia-Martinez J. L. 2012.** Characterization of the procerato tomato mutant shows novel functions of the SIDEELLA protein in the control of flower morphology, cell division and expansion, and the auxin-signaling pathway during fruit-set and development. *Plant Physiology*. 160: 3 1581-1596.

**Carvalho R. F.; Campos M. L.; Pino L. E.; Crestana S. L.; Zsögön A.; Lima J. E.; Benedito V. A.; Peres L. E. P. 2011.** Convergence of developmental mutants into a single tomato model system: 'Micro-Tom' as an effective toolkit for plant development research. *Plant Methods*. 7:18.

**Cary A. J.; Che P.; Howell S. H. 2002.** Developmental events and shoot apical meristem gene expression patterns during shoot development in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 32: 867–877.

**Casimiro I.; Beeckman T.; Graham N.; Bhalerao R.; Zhang H. M.; Casero P. 2003.** Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *Trends in Plant Science*. 8: 165–171.

**Castle L. A.; Errampalli D.; Atherton T.; Franzmann L.; Yoon E.; Meinke D. W. 1993.** Genetic and molecular characterization of embryonic mutants identified following seed transformation in *Arabidopsis*. *Molecular Genetics and Genomics*. 241:504–514.

**Catterou M.; Dubois F.; Smets R.; Vaniet S.; Kichey T.; Van Onckelen H.; Sangwan-Norreel B.; Sangwan R. S. 2002.** hoc: an *Arabidopsis* mutant overproducing cytokinins and expressing high in vitro organogenic capacity. *The Plant Journal*. 30: 273–287.

- Causee M.; Damidaux R.; Rousselle P. 2007.** Traditional and enhanced breeding quality traits in tomato. In: Genetic improvement of solanaceous crops. Volume 2. Tomato. Edited by Razdan M. K. and Mattoo A. K. Enfield, NH. USA: *Science publishers*. Pp 153-192.
- Chalfun-Junior A.; Mes J. J.; Mlynárová L.; Aarts M.G. M.; Angenent G. C. 2003.** Low frequency of T-DNA based activation tagging in *Arabidopsis* is correlated with methylation of CaMV 35S enhancer sequences. *FEBS Letters*. 555:459-463.
- Chandler J. W. et al. 2007.** The AP2 transcription factors DORNRO" SCHEN and DORNRO" SCHEN-LIKE redundantly control Arabidopsis embryo patterning via interaction with PHAVOLUTA. *Development*. 134: 1653–1662.
- Chantreau M.; Grec S.; Gutierrez L.; Dalmais M.; Pineau C.; Demailly H.; Paysant-Leroux C.; Tavernier R.; Trouvé JP.; Chatterjee M.; Guillot X.; Brunaud V.; Chabbert B.; van Wuytswinkel O.; Bendahmane A.; Thomasset B.; Hawkins S. 2013.** PT-Flax (phenotyping and TILLing of flax): development of a flax (*Linum usitatissimum* L.) mutant population and TILLing platform for forward and reverse genetics. *BMC Plant Biology*. 13:159.
- Chapman E. J. and Estelle M. 2009.** Cytokinin and auxin intersection in root meristems. *Genome Biology*. 10: 210.
- Chatenet M.; Delage C.; Ripolles M.; Irely M.; Lockhart B. L. E.; Rott P. 2001.** Detection of sugarcane yellow leaf virus in quarantine and production of virus-free sugarcane by apical meristem culture. *Plant Disease*. 85(11): 1177-1180.
- Che P.; Gingerich D. J.; Lall S.; Howell S. H. 2002.** Global and hormone-induced gene expression changes during shoot development in Arabidopsis. *The Plant Cell*. 14: 2771–2785.
- Che P.; Lall S.; Nettleton D.; Howell S. H.. 2006.** Gene expression programs during shoot, root, and callus development in Arabidopsis tissue culture. *Plant Physiology*. 141:620–637.

- Che P.; Lall S.; Howell S. H. 2007.** Developmental steps in acquiring competence for shoot development in Arabidopsis tissue culture. *Planta*. 226: 1183–1194.
- Chen S.; Jin W.; Wang M.; Zhang F.; Zhou J.; Jia Q.; Wu Y.; Liu F.; Wu P. 2003.** Distribution and characterization of over 1000 T-DNA tags in the rice genome. *Plant Journal*. 36: 105–113.
- Child A. 1990.** A synopsis of *Solanum* subgenus *Potatoe* (G. Don) D' Arcy (Tuberatum (Du) Bitter (s. 1.)). *Feddes Reportorium*. 101: 209-235.
- Chivisa S.; Tomé D. F. A.; Slabas A. R. 2013.** UDP-Glucose Pyrophosphorylase is a novel plant cell death regulator. *Journal of Proteome Research*. 12: 1743-1753.
- Chun T.; Taketa S.; Tsurumi S.; Ichii M. 2003.** The effects of auxin on lateral root initiation and root gravitropism in a lateral rootless mutant *Lrt1* of rice (*Oriza sativa* L.). *Plant Growth Regulation*. 39: 161-170.
- Clark S. E.; Williams R. W.; Meyerowitz E. M. 1997.** The CLAVATA1 gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in Arabidopsis. *Cell*. 89: 575-585.
- Coego A.; Ramirez V.; Ellul P.; Mayda E.; Vera p. 2005.** The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-regulated Ep5C gene encodes a peroxidase required for bacterial speck susceptibility in tomato. *The Plant Journal*. 42: 283-293.
- Coffeen W. C. and Wolpert T. J. 2004.** Purification and characterization of serine proteases that exhibit caspase-like activity and are associated with programmed cell death in *Avena sativa*. *Plant Cell*. 16: 857–873.
- Cole M.; Chandler J.; Weijers D.; Jacobs B.; Comelli P.; Werr W. 2009.** DORN RÖSCHEN is a direct target of the auxin response factor MONOPTEROS in the Arabidopsis embryo. *Development*. 136: 1643–1651.
- Collard C. Y. B. and Mackill D. J. 2007.** Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Science*. 363(1491): 557–572.

- Collins N.; Drake J.; Ayliffe M.; Sun Q.; Ellis J.; Hulbert S.; Pryor T. 1999.** Molecular characterization of the maize Rp1-D rust resistance haplotype and its mutants. *Plant Cell*. 11(7): 1365–1376.
- Coudert Y.; Bès Martine.; Le T. V. A.; Pré M.; Guiderdoni E.; Gantet P. 2011.** Transcript profiling of crown rootless1 mutant stem base reveals new elements associated with crown root development in rice. *BMC Genomics*. 12:387.
- Cresse A. D.; Hulbert S.H.; Brown W. E.; Lucas J. R.; Bennetzen J. L. 1995.** Mu1-Related transposable elements of maize preferentially insert into low copy number DNA. *Genetics*. 140: 315-324.
- Dastidar M. G.; Jouannet V.; Maizel A. 2012.** Root branching: mechanisms, robustness and plasticity. *WIREs Developmental Biology*. 1: 329–343.
- David-Schwartz R.; Koenig D.; Sinha N. R. 2009.** LYRATE is a key regulator of leaflet initiation and lamina outgrowth in Tomato. *The Plant Cell*. 21: 3093–3104
- Davies P. J.1995.** “The plant hormones: their nature, occurrence and functions” in plant Hormones Physiology, Biochemistry and Molecular Biology, ed.P.J. Davies (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers) pp:1–12.
- Davis T. D. and Haissig B. E. 1994.** *Biology of Adventitious Root Formation*. New York: Plenum Press.
- De Block M.; Herrera-Estrella L.; Van Montagu M.; Schell J.; Zambryski P. 1984.** Expression of foreign genes in regenerated plants and in their progeny. *The EMBO Journal*. 3 (8) 1681-1689.
- De Buck S.; de Wilde C.; van Montagu M.; Depicker A. 2000.** T-DNA vector backbone sequences are frequently integrated into the genome of transgenic plants obtained by Agrobacterium-mediated transformation. *Molecular Breeding*. 6: 459–468.
- De Klerk G. J.; Van Der Krieken W.; De Jong J. C. 1999.** Review – The formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. *In Vitro Cellular & Development Biology Plant*. 35: 189–199.
- De Smet I. 2012.** Lateral root in itiation: one step at a time. *New Phytologist*. 193: 867–873.

- De Smet I.; Signora L.; Beeckman T.; Inze D.; Foyer C. H.; Zhang H. M. 2003.** An abscisic acid-sensitive check point in lateral root development of *Arabidopsis*. *Plant Journal*. 33: 543–555.
- De Veylder L.; Engler J. M.; Burssens S.; Manevski A.; Lescure B.; Van Montagu M.; Engler G.; Inzé D. 1999.** A new D-type clycin of *Arabidopsis thaliana* expressed during lateral root primordial formation. *Planta*. 2008: 453-462.
- Della Rovere F.; Fattorini L.; D'Angeli D.; Veloccia A.; Falasca G.; Altamura M. M. 2013.** Auxin and cytokine in control formation of the quiescent centre in the adventitious root apex of *Arabidopsis*. *Annual Botany*. 112: 1395–1407.
- Dellaporta S. L.; Wood J.; Hicks J. B. 1983.** A plant DNA miniprep preparation version II. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1: 19-21
- Dello Ioio R.; Linhares F. S.; Scacchi E.; Casamitjana-Martinez E.; Heidstra R.; Costantino P. 2007.** Cytokinins determine *Arabidopsis* root-meristem size by controlling cell differentiation. *Current Biology*. 17: 678–682.
- Dhaliwal H.S.; Ramesar-Fortner N. S.; Yeung E. C.; Thoper T. A. 2003.** Competence, determination, and meristemoid plasticity in tobacco organogenesis in vitro. *Canadian Journal of Botany*. 81: 611–621.
- Di Matteo A.; Rigano M. M.; Sacco A.; Frusciante L.; Barone A. 2011.** Genetic transformation in tomato: Novel tools to improve fruit quality and pharmaceutical production. In: Avarez M, editor. *Genetic transformation. InTech*. p. 55–80.
- Dietrich R. A.; Delaney T. P.; Uknes S. J.; Ward E. R.; Ryals J. A.; Dangl J. L. 1994.** *Arabidopsis* mutants simulating disease resistance response. *Cell*. 77: 565–577.
- Dietrich R. A.; Richberg M. H.; Schmidt R.; Dean C.; Dangl J. L. 1997.** A novel zinc finger protein is encoded by the *Arabidopsis* LSD1 gene and functions as a negative regulator of plant cell death. *Cell*. 88:685–694.
- Doebley J. F.; Gaut B.; Smith B. D. 2006.** The molecular genetics of crop domestication. *Cell*. 127:1309–21.

- Duclercq J.; Assoumou N. Y. P.; Guerineau F.; Sangwan R. S.; Catterou M. 2011.** Arabidopsis shoot organogenesis is enhanced by an amino acid change in the ATHB15 transcription factor. *Plant Biology*. 13: 317–324.
- Efroni I.; Han S. K.; Kim H. J.; Wu M. F.; Steiner E.; Birnbaum K. D.; Hong J. C.; Eshed Y.; Wagner D. 2013.** Regulation of leaf maturation by chromatin-mediated modulation of cytokinin responses. *Developmental Cell*. 24: 438–445.
- Emmanuel E. and Levy A. A. 2002.** Tomato mutants as tools for functional genomics. *Current Biology*. 5: 112-117.
- Engelmann F. 1991.** *In vitro* conservation of tropical plant germplasm. *Euphytica*. 57:227-243.
- Enoki H.; Izawa T.; Kawahara M.; Komatsu M.; Koh S.; Kyojuka J.; Shimamoto K. 1999.** Ac as a tool for the functional genomics of rice. *The Plant Journal*. 19 (5): 605-613.
- Evans D. A. and Bravo J. E. 1988.** Agricultural applications of protoplast fusion. In: *Marby TI, editor. Plant Biotechnology*. Austin: 51-91.
- Falasca G. and Altamura M. M. 2003.** Histological analysis of adventitious rooting in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh seedlings. *Plant Biosystems*. 137: 265–273.
- Falasca G.; Zaghi D.; Possenti M.; Altamura M. M. 2004.** Adventitious root formation in *Arabidopsis thaliana* thin cell layers. *Plant Cell Reports*. 23: 17–25.
- Fan M.; Xu C.; Xu K.; Hu Y. 2012.** LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN transcription factors direct callus formation in *Arabidopsis* regeneration. *Cell Research*. 22: 1169–1180.
- FAO World Bank. 2010.** Reducing Post-Harvest Losses in Grain Supply Chains in Africa. *Report of FAO–World Bank workshop*. 120 p.
- Faria R. T and Illg R. D. 1996.** Inheritance of *in vitro* plant regeneration ability in the tomato. *Brazilian Journal of Genetics*. 19:113-116.
- Fattorini L.; Falasca G.; Kevers C.; Rocca L. M.; Zadra C.; Altamura M. M. 2009.** Adventitious rooting is enhanced by methyl jasmonate in tobacco thin cell layers. *Planta*. 231: 155–168.

- Fedoroff N. and Smith D. L. 1993.** A versatile system for detecting transposition in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 3 (2): 273-289.
- Feldmann K. A. 1991.** T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: mutational spectrum. *The Plant Journal*. 1(1): 71-82.
- Feldmann K. A. 1992.** Methods in *Arabidopsis* Research. *World Scientific Pub Co Inc*. 496, ISBN 981-02- 0904-5.
- Filho A. R.; Dal Vesco L. L.; Nodari R. O.; Lischka R. W.; Müller C. V.; Guerra M. P. 2005.** Tissue culture for the conservation and mass propagation of *Vriesea reitzii* Leme and Costa, bromeliad threatened of extinction from the Brazilian Atlantic Forest. *Biodiversity & Conservation*. 14(8): 1799-1808.
- Foolad M. R. 2007.** Genome mapping and molecular breeding of tomato. *International Journal of Plant Genomics*. 52 pages.
- Franzman L. H.; Yoon E. S.; Meinke D. W. 1995.** Saturating the map of *Arabidopsis thaliana* with embryonic mutations. *Plant Journal*. 7(2): 341-350.
- Frary A. and Earle E. D. 1996.** An examination of factors affecting the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato. *Plant Cell Rep*. 16:235-240.
- Frindman E.; Carrari F.; Lju Y-S.; Fernie A. R.; Zamir D. 2000.** Zooming in on a quantitative trait for tomato yield using interspecific introgressions. *Science*. 305: 1786-1789.
- Fuentes A. D.; Ramos P. L.; Sanchez Y.; Callard D.; Ferreira A.; Tiel K.; Cobas K.; Rodriguez R.; Borroto C.; Doreste V.; Pujol M. 2008.** A transformation procedure for recalcitrant tomato by addressing transgenic plant-recovery limiting factors. *Biotechnology Journal*. 3:1088–1093.
- Fukaki H. and Tasaka M. 2009.** Hormone interactions during lateral root formation. *Plant Molecular Biology*. 69: 437–449.
- Fukaki H.; Tameda H.; Masuda H.; Tasaka M. 2002.** Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the SOLITARY-ROOT/IAA14 gene of *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 29 (2): 153-168.

- Furutani M.; Vernoux T.; Traas J.; Kato T.; Tasaka M.; Aida M. 2004.** PINFORMED1 and PINOID regulate boundary formation and cotyledon development in *Arabidopsis* embryogenesis. *Development*. 131: 5021–5030.
- Gaillochet C. and Lohmann J. U. 2015.** The never-ending story: from pluripotency to plant developmental plasticity. *Development*. 142: 2237-2249.
- Garcia-Gonzales R.; Quiroz K.; Carrasco B.; Caligari P. 2010.** Plant tissue culture: Current status, opportunities and challenges. *Ciencia e Investigación Agraria*. 37(3): 5-30.
- Gaussand G. M. D.J-M.; Jia Q.; van der Graaff E.; Lamers G. E. M.; Fransz P. F.; Hooykaas P. J. J.; de Pater S. 2011.** Programmed cell death in the leaves of the *Arabidopsis* spontaneous necrotic spots (sns-D) mutant correlates with increased expression of the eukaryotic translation initiation factor *eIF4B2*. *Front in Plant Science*. 2: 1-12.
- Gautheret R. J. 1966.** Factors affecting differentiation of plant tissues grown in vitro. En *Cell Differentiation and Morphogenesis* Eds W Beermann. pp 55-71.
- Gechev T. S.; Ferwerda M. A.; Mehterov N.; Laloi C.; Qureshi M. K.; Hille J. 2008.** *Arabidopsis* AAL-toxin-resistant mutant *atr1* shows enhanced tolerance to programmed cell death induced by reactive oxygen species. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 375: 639–644
- Gelvin S. B. 2000.** Agrobacterium and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Plant Molecular Biology*. 51:223-256.
- Gelvin S. B. 2003.** Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 67:16-37.
- Gidoni D.; Fuss E.; Burbidge A.; Speckmann G. J.; James S.; Nijkamp D.; Mett A.; Feiler J.; Smoker M.; de Vroomen M. J.; Leader D.; Liharska T.; Groenendijk J.; Coppoolse E.; Smit J. J. M.; Levin I.; de Both M.; Schuch W.; Jones J. D. G.; Taylor I. B.; Theres K.; van Haaren M. J. J. 2003.** Multi-functional T-DNA/Ds tomato lines designed for gene cloning

and molecular and physical dissection of the tomato genome. *Plant Molecular Biology*. 51: 83-98.

- Gilchrist E and Haugh G. 2010.** Reverse genetic techniques: engineering loss and gain of gene function in plants. *Briefing In Functional Genomics*. 9 (2): 103-110.
- Giovannoni J. J. 2001.** Fruit ripening mutants yield insights into ripening control. *Current Opinion in Plant Biology*. 10: 283–289.
- Giovannoni J. J. 2007.** Fruit ripening mutants yield insights into ripening control. *Current Opinion in Plant Biology*. 10: 283–289.
- Giulini A.; Wang J.; Jackson D. 2004.** Control of phyllotaxy by the cytokinin-inducible response regulator homologue ABPHYL1. *Nature*. 430: 1031–1034.
- Goel D.; Singh A. K.; Yadav V.; Babbar S. B.; Murata N.; Bansal K. C. 2011.** Transformation of tomato with a bacterial codA gene enhances tolerance to salt and water stresses. *Journal of Plant Physiology*. 11:1286–1294.
- Gonzalez N.; Beemster G. T.; Inzé D. 2009.** David and Goliath: what can the tiny weed *Arabidopsis* teach us to improve biomass production in crops?. *Current Opinion in Plant Biology*. 12 (2): 157-164.
- González-Carranza Z. H.; Rompa U.; Peters J. L.; Bhatt A. M.; Wagstaff C.; Stead A. D.; Roberts J. A. 2007.** Hawaiian skirt: an F-box gene that regulates organ fusion and growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 144: 1370-1382.
- Gordon S. P.; Heisler M. G.; Reddy G. V.; Ohno C.; Das P.; Meyerowitz E. M. 2007.** Pattern formation during de novo assembly of the *Arabidopsis* shoot meristem. *Development*. 134: 3539–3548.
- Gordon S. P.; Chickarmane V. S.; Ohno C.; Meyerowitz E. M. 2009.** Multiple feedback loops through cytokinin signaling control stem cell number within the *Arabidopsis* shoot meristem. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106: 16529–16534.
- Greenberg J. T. and Ausubel F. M. 1993.** *Arabidopsis* mutants compromised for the control of cellular damage during pathogenesis and aging. *Plant Journal*. 4: 327–341.

- Greenberg J. T.; Guo A.; Klessig D. F.; Ausubel F. M. 1994.** Programmed cell death in plants: a pathogen-triggered response activated co-ordinately with multiple defense functions. *Cell*. 77: 551–563
- Greenboim-Wainberg Y.; Maymon I.; Borochoy R.; Alvarez J.; Olszewski N.; Ori N.; Eshed Y.; Weiss D. 2005.** Crosstalk between gibberellin and cytokinin: the Arabidopsis GA response inhibitor SPINDLY plays a positive role in cytokinin signaling. *Plant Cell*. 17: 92–102.
- Grones P. and Friml J. 2015.** Auxin transporters and binding proteins at a glance. *Journal of Cell Science*. 128: 1–7.
- Groover A.; Fontana J. R.; Dupper G.; Ma C.; Martienssen R.; Strauss S.; Meilan R. 2004.** Gene and enhancer trap tagging of vascular-expressed genes in poplar trees. *Plant Physiology*. 134: 1742–1751.
- Guenot B.; Bayer E.; Kierzkowski D.; Smith R. S.; Mandel T.; Žádníková P.; Benková E.; Kuhlemeier C. 2012.** PIN1-independent leaf initiation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 159: 1501–1510.
- Guilfoyle T.J. and Hagen G. 2007.** Auxin response factors. *Current Opinion in Plant Biology*. 10: 453–460.
- Hammer K. 1984.** Das Domestikationssyndrom. *Kulturpflanze*. 32: 11–34.
- Hamza S. and Chupeau Y. 1993.** Re-evaluation of conditions for plant regeneration and Agrobacterium-mediated transformation from tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Journal of Experimental Botany*. 44:1837-1845.
- Harrison E. J.; Bush M.; Plett J. M.; McPhee D. P.; Vitez R.; O'Malley B.; Sharma V.; Bosnich W.; Séguin A.; MacKay J.; Regan S. 2007.** Diverse developmental mutants revealed in an activation-tagged population of poplar. *Canadian Journal of Botany*. 85 (11): 1071-1081.
- Hay A.; Barkoulas M.; Tsiantis M. 2006.** ASYMMETRIC LEAVES1 and auxin activities converge to repress BREVIPEDICELLUS expression and promote leaf development in Arabidopsis. *Development*. 133: 3955–3961.
- 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*. 258 (5086): 1350–1353.

- He Y.; Tang W.; Swaim J. D.; Green A. L.; Jack T. P.; Gan S. 2001.** Networking senescence- regulating pathways by using *Arabidopsis* enhancer trap lines. *Plant Physiology*. 126: 707-716.
- Hehl R and Baker B. 1990.** Properties of the maize transposable element activator in transgenic tobacco plants: a versatile inter-species genetic tool. *Plant Cell*. 2: 709–721.
- Heisler M. G.; Hamant O.; Krupinski P.; Uyttewaal M.; Ohno C.; Jönsson H.; Traas J.; Meyerowitz E. M. 2010.** Alignment between PIN1 polarity and microtubule orientation in the shoot apical meristem reveals a tight coupling between morphogenesis and auxin transport. *PLOS Biology*. 8: e1000516.
- Heisler M. G.; Ohno C.; Das P.; Sieber P.; Reddy G. V.; Long J. A.; Meyerowitz E. M. 2005.** Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the *Arabidopsis* inflorescence meristem. *Current Biology*. 15: 1899–1911.
- Herman L.; Jacobs A.; Montagu M. V. Depicker A. 1990.** Plant chromosome/marker gene fusion assay for study of normal and truncated T-DNA integrations event. *Molecular and General Genetics*. 224 (2): 248-256.
- Hiei Y.; Komari T.; Kubo T. 1997.** Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Molecular Biology*. 35:205-218.
- Hinchee M. A. W.; Corbin D. R.; Armstrong C. L.; Fry J. E.; Sato S. S.; Deboer D. L.; Petersen W. L.; Armstrong T. A.; Connor-Wand D. Y.; Layton J. G.; Horsch R. B. 1994.** Plant transformation in Plant Cell and Tissue Culture. In: Vasil LK, Thorpe TA, editors. Dordrecht: *Kluwer Academic*. 231-270.
- Hoisington D. A.; Neuffer M. G.; Walbot V. 1982.** Disease lesion mimics in maize. Effect of genetic background, temperature, developmental age, and wounding on necrotic spot formation with Les1. *Developmental Biology*. 93: 381–388.
- Hoth K. 2013.** Genetic analysis of root system development in the tomato crop model. BioResource Research. An undergraduate thesis submitted to Oregon State University.

- Hsieh T. H.; Lee J. T.; Yang P. T.; Chiu L. H.; Charng Y. Y.; Wang Y. C.; Chan M. T. 2002.** Heterology expression of the Arabidopsis C-repeat/dehydration response element binding factor 1 gene confers elevated tolerance to chilling and oxidative stresses in transgenic tomato. *Plant Physiology*. 129: 1086-1094.
- 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*. 125:573-584.
- Hunter C. T.; Suzuki M.; Saunders J.; Wu S.; Tasi A.; McCarty D. R.; Koch K. E. 2014.** Phenotype to genotype using forward genetic Mu-seq for identification and functional classification of maize mutants. *Frontiers in Plant Science*. 4: 545.
- Ikeda H.; Hiraga M.; Shirasawa K.; Nishiyama M.; Kanahama K.; Kanayama Y. 2013.** Analysis of a tomato introgression line, IL8-3, with increased Brix content. *Scientia Horticulturae*. 153: 103-108.
- Ikeda Y.; Banno H.; Niu Q. W.; Howell S. H.; Chua N. H. 2006.** The ENHANCER OF SHOOT REGENERATION 2 gene in Arabidopsis regulates CUP-SHAPED COTYLEDON 1 at the transcriptional level and controls cotyledon development. *Plant Cell Physiology*. 47: 1443–1456.
- Ilegems M.; Douet V.; Meylan-Bettex M.; Uyttewaal M.; Brand L.; Bowman J. L.; Stieger P. A. 2010.** Interplay of auxin, KANADI and Class III HDZIP transcription factors in vascular tissue formation. *Development*. 137: 975–984.
- Inukai Yoshiaki.; Sakamoto Tomoaki.; Ueguchi-Tanaka M.; Shibata Yohko.; Gomi K.; Umemura I.; Hasegawa Y.; Ashikari M.; Kitamo H.; Matsuoka M. 2005.** Crown rootless1, which is essential for crown root formation in rice, is a target of an AUXIN RESPONSE FACTOR in auxin signaling. *The Plant Cell*. 17: 1387-1396.
- Ito T.; Meyerowitz E. M. 2000.** Overexpression of a gene encoding a cytochrome P450, CYP78A9, induces large and seedless fruit in Arabidopsis. *Plant Cell*. 12:1541-1550.

- Ivanchenko M. G.; Coffeen W. C.; Lomax T. L.; Dubrovsky J. G. 2006.** Mutations in the Diageotropica (Dgt) gene uncouple patterned cell division during lateral root initiation from proliferative cell division in the pericycle. *Plant Journal*. 46: 436-447.
- Iwase A.; Mitsuda N.; Koyama T.; Hiratsu K.; Kojima M.; Arai T.; Inoue Y.; Seki M.; Sakakibara H.; Sugimoto K.; Ohme-Takagi M. 2011.** The AP2/ERF transcription factor WIND1 controls cell dedifferentiation in Arabidopsis. *Current Biology*. 21: 508–514.
- Jabs T.; Dietrich R. A.; Dangi J. L. 1996.** Initiation of runaway cell death in an Arabidopsis mutant by extracellular superoxide. *Science*. 273:1853–1856.
- James C. 2014.** Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2014. ISAAA Brief No. 49. ISAAA: Ithaca, NY. ISBN: 978-1-892456-59-1.
- Jehan S and Hassanein A. M. 2013.** Hormonal requirements trigger different organogenic pathways on tomato nodal explants. *American Journal of Plant Sciences*. 4:2118–2125.
- Jenkis J. A. 1948.** The origin of cultivated tomato. *Economy Botany*. 2: 379-39.
- Jeon J. S.; Lee S.; Jung K. H.; Jeong D. H.; Lee J.; Kim C.; Jang S.; Yang K.; Nam J.; An K.; Han M. J.; Sung R. J.; Choi H. S.; Yu J. H.; Cho S. Y.; Cha S. S.; Kim S. I.; An G. 2000.** T-DNA insertional mutagenesis for functional genomics in rice. *The Plant Journal*. 22:561-570.
- Jiang L.; Liu G. Q.; Han J. M.; Dong J. G.; Zhai W. X. 2003.** The progress on the studies of plant lesion mimic mutants and genes. *J Chin Biotechnol*. 23(1): 34–38. (in Chinese with English abstract).
- Jian-yang M.; Sun-lu C.; Jian-hui Z.; Yan-jun D.; Sheng T. 2012.** Identification and genetic mapping of a Lesion Mimic mutant in Rice. *Rice Science*. 19 (1) 1-7.
- Johnson K. L.; Kibble N. A. J.; Bacic A.; Schultz C. J. 2011.** A Fasciclin-Like Arabinogalactan-Protein (FLA) mutant of Arabidopsis thaliana, fla1, shows defects in shoot regeneration. *PIOS ONE*.
- Jung K-H.; An G.; Ronald P. C. 2008.** Towards a better bowl of rice: assigning function to tens of thousands of rice genes. *Nature Reviews Genetics*. 9:91–101.

- Kakimoto T. 1996.** CKI1, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. *Science*. 274:982-985.
- Kardailaky I.; Shukla V. K.; Ahn J. H.; Dagenais N.; Christensen S. K.; Nguyen J. T.; Chory J.; Harrison M. J.; Weigel D. 1999.** Activation tagging of the floral inducer *FT*. *Science*. 286:1962-1965.
- Keddie J. S.; Carroll B. J.; Thomas C. M.; Reyes M. E. C.; Klimyuk V.; Holtan H.; Grissem W.; Jones J. D. G. 1998.** Transposon tagging of the Defective embryo and meristems gene of tomato. *The Plant Cell*. 10: 877-887.
- Keddie J. S.; Carroll B.; Jones J. D. G.; Grissem W. 1996.** The *DCL* gene of tomato is required for chloroplast development and palisade cell morphogenesis in leaves. *The EMBO Journal*. 15:4208-4217.
- Khoudi H.; Nouri-Khemakhem A.; Gouiaa S.; Masmoudi K. 2009.** Optimization of regeneration and transformation parameters in tomato and improvement of its salinity and drought tolerance. *African Journal of Biotechnology*. 22:6068–6076.
- Kinoshita A.; Betsuyaku S.; Osakabe Y.; Mizuno S.; Nagawa S.; Stahl Y.; Simon R.; Yamaguchi-Shinozaki K.; Fukuda H.; Sawa S. 2010.** RPK2 is an essential receptor-like kinase that transmits the CLV3 signal in *Arabidopsis*. *Development*. 137: 3911-3920.
- Kirik V.; Simon M.; Huelskamp M.; Schiefelbein J. 2004.** The *ENHANCER OF TRY AND CPC1* gene acts redundantly with *TRYPTYCHON* and *CAPRICE* in trichome and root hair cell patterning in *Arabidopsis*. *Developmental Biology*. 268: 506–513.
- Kohli A.; Leech M.; Vain P.; Laurie D. A.; Christou P. 1998.** Transgene organization in rice engineered through direct DNA transfer supports a two-phase integration mechanism mediated by the establishment of integration hot spots. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 95: 7203-7208.
- Koka C. V.; Cerny R. E.; Gardner R. G.; Noguchi T.; Fujioka S.; Takatsuto S.; Yoshida S.; Clouse S. D. 2000.** A putative role for the tomato

genes DUMPY and CURL-3 in brassinosteroid biosynthesis and response. *Plant Physiology*. 122: 85-98.

**Kolesnik T.; Szeverenyi I.; Bachmann D.; Kumar C. S.; Jiang S.; Ramamoorthy R.; Cai Minnie.; Ma Z. G.; Sundaresan V.; Ramachandran S. 2004.** Establishing an efficient *Ac/Dc* tagging system in rice: large-scale analysis of *Ds* flanking sequence. *The Plant Journal*. 37(2): 301-314.

**Koleva Gudeva L.; Dedejski G. 2012.** In vivo and in vitro production of some genotypes of cherry tomato *Solanum lycopersicum* var. *Cerasiforme* (DUNAL). *International Journal of Farming and Allied Sciences*. 4: 91–96.

**Koncz C.; Martini N.; Mayerhofer R.; Koncz-Kalman Z.; Körber H.; Redei G. P.; Schell J. 1989.** High–frequency T-DNA-mediated gene tagging in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 86: 8467–8471.

**Koncz C.; Németh K.; Rédei G. P.; Schell J. 1992.** T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*. 20: 963-976.

**Kononov M. E.; Bassuner B.; Gelvin S. B. 1997.** Integration of T-DNA binary vector “backbone” sequences into the tobacco genome: evidence for multiple complex patterns of integration. *The Plant Journal*. 11: 945–957.

**Koornneef M.; Bade J.; Hanhart C.; Horsman K.; Schel J.; Soppe W.; Verkerk R.; Zabel P. 1993.** Characterization and mapping of a gene controlling shoot regeneration in tomato. *The Plant Journal*. 3 (1) 131-141.

**Koornneef M.; Hanhart C. J.; Martinelli L. 1987.** A genetic analysis of cell culture traits in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*. 74:633-641.

**Kramer M. G. and Redenbaugh K. 1994.** Commercialization of a tomato with antisense polygalacturonase gene: the FLAVR SAVR™ tomato story. *Euphyta*. 79: 293-297.

**Krieger U.; Lippman Z. B.; Zamir D. 2010.** The flowering gene SINGLE FLOWER TRUSS drives heterosis for yield in tomato. *Nature Genetics*. 42: 459–463.

**Kumpf R. P.; Shi C-L.; Larrieu A.; Stø I. M.; Butenko M. A.; Péter B.; Riiser E. S.; Be nnett M. J.; Aalen R. B. 2013.** Floral organ abscission peptide IDA and its HAE/HSL2 receptors control cell separation during lateral root

emergence. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 110: 5235-5240.

**Lam E. 2004.** Controlled cell death, plant survival and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 5: 305–315.

**Laskowski M.; Biller S.; Stanley K.; Kajstura T.; Prusty R. 2006.** Expression profiling of auxin-treated *Arabidopsis* roots: toward a molecular analysis of lateral root emergence. *Plant Cell Physiology*. 47: 788-792.

**Laux T.; Mayer K. F. X.; Berger J.; Jurgens G. 1996.** The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development*. 122:87-96.

**Lee C. Y.; Agrawal D. C.; Wang C. S.; Yu S. M.; Chen J. J.; Tsay H. S. 2008.** T-DNA activation tagging as a tool to isolate *Salvia miltiorrhiza* transgenic lines for higher yields of tanshinones. *Plant Medicine*. 74 (7): 780–786.

**Lee J. E.; Lampugnani E. R.; Bacic A.; Golz J. F. 2014.** SEUSS and SEUSS-LIKE 2 coordinate auxin distribution and KNOXI activity during embryogenesis. *The Plant Journal*. 80: 122-135.

**Lee M. K.; Kim H. S.; Kim J. S.; Kim S. H.; Park Y. D.. 2004.** *Agrobacterium* mediated transformation system for large-scale production of transgenic Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp *pekinensis*) plants for insertional mutagenesis. *Journal of Plant Biology*. 47: 300–306.

**Lee Y.; Rubio M. C.; Alassimonee J.; Geldner N. 2013.** A mechanism for localized lignin deposition in the endodermis. *Cell*. 153: 402-4012.

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

**Li-Jai Qu and Genjin Qin. 2013.** Generation and characterization of *Arabidopsis* T-DNA insertion mutants. *Method in Molecular Biology*. 1062:241-258.

**Lin W. C.; Lu C. F.; Wu J. W.; Cheng M. L.; Lin Y. M.; Yang N. S.; Black L.; Green S. K.; Wang J. F.; Cheng C. P. 2004.** Transgenic tomato plants overexpressing the *Arabidopsis* NPR1 gene display enhanced resistance to

- a spectrum of fungal and bacterial diseases. *Transgenic Research*. 13: 567-581.
- Liu Y.; Mitsukawa N.; Oosumi T.; Whittier R. 1995.** Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by terminal asymmetric interlaced PCR. *The Plant Journal* 8 (3): 457-463.
- Löbler M. and Klämbt D. 1985.** Auxin-binding protein from coleoptile membranes of corn (*Zeamays L.*). I. Purification by immunological methods and characterization. *The Journal of Biological Chemistry*. 260: 9848–9853.
- Locky R. D. 1983.** Callus formation and organogenesis by explants of six *Lycopersicon* species. *Canadian Journal of Botany*. 61:1072-1079
- Lombardi-Crestana S.; da Silva Azevedo M.; e Silva G. F. F.; Pino L. E.; Appezzato-da-Gloria B.; Figueroa A.; Nogueira T. S. Peres L. E. P. 2012.** The tomato (*Solanum lycopersicum* cv Micro-Tom) natural genetic variation *Rg1* and the DELLA mutant *procesa* control the competence necessary to form adventitious roots and shoot. *Journal of Experimental Botany*. 63: 15 5689-5703.
- Lorrain S.; Lin B.; Auriac M. C.; Kroj T.; Saindrenan P.; Nicole M.; Balagué C.; Roby D. 2004.** Vascular associated death1, a novel GRAM domaincontaining protein, is a regulator of cell death and defense responses in vascular tissues. *Plant Cell*. 16: 2217–2232.
- Lorrain S.; Vaillau F.; Balague C.; Roby D. 2003.** Lesion mimic mutants: keys for deciphering cell death and defense pathways in plants?. *Trends in Plant Science*. 8: 263–271.
- Luckwill L. C. 1943.** The genus *Lycopersicon*: a historical, biológica and taxonomical survey of the wild and cultivated tomatoes. *Aberdeen University Studies*. 120: 1-44.
- Ma H.; Song C.; Borth W.; Sether D.; Melzer M.; Hu J.; 2011.** Modified expression of alternative oxidase in transgenic tomato and petunia affects the level of tomato spotted wilt virus resistance. *BMC Biotechnology*. 11:96.

- Mamidala P.; Nanna R. S. 2011.** Effect of genotype, explants source and medium on in vitro regeneration of tomato. *International Journal of Genetics and Molecular Biology*. 3:45–50.
- Marchionni B. E.; Pratta G. R.; Zorzoli R. 2007.** Genetic analysis of the in vitro culture response in tomato. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 88:233-239.
- Marhavý P.; Vanstraelen M.; De Rybel B.; Zhaojun D.; Bennett M. J.; Beeckman T.; Benkova E. 2013.** Auxin reflux between the endodermis and pericycle promotes lateral root initiation. *The EMBO Journal*. 32: 149-158.
- Marino G and Battistini S. 1990.** Leaf-callus growth, shoot regeneration and somaclonal variation in *Actinidia deliciosa*: effect of media pH. *Acta Horticulturae*. 280: 37-44.
- Marsch-Martinez N.; Greco R.; Becker J. D.; Dixit S.; Bergervoet J. H.; Karaba A.; de Folter S.; Pereira A. 2006.** BOLITA, an Arabidopsis AP2/ERFLike transcription factor that affects cell expansion and proliferation/differentiation pathways. *Plant Molecular Biology*. 62: 825–843.
- Marsch-Martinez N.; Greco R.; Van Arkel G.; Herrera-Estrella L.; Pereira A. 2002.** Activation tagging using the EN-1 maize transposon system in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 129:1544-1556.
- Mathews H.; Clendennen S. K.; Caldwell C. G.; Lui X. L.; Connors K.; Matheis N.; Schuster D. K.; Menasco D. J.; Wagoner W.; Lightner J.; Wagner D. R. 2003.** Activation tagging in tomato identifies a transcriptional regulator of anthocyanin biosynthesis, modification, and transport. *Plant Cell*. 15: 1689-1703
- Mathieu M.; Winters E.; Kong F.; Wan J.; Wang S.; Eckert H.; Luth D.; Paz M.; Donovan C.; Zhang Z.; Somers D.; Wang K.; Nguyen H.; Shoemaker R. C.; Stacey G.; Clemente T. 2009.** Establishment of a soybean (*Glycine max* Merr. L) transposon-based mutagenesis repository. *Planta*. 279–89.
- Matsuo N.; Makino M.; Banno H. 2011.** Arabidopsis ENHANCER OF SHOOT REGENERATION (ESR)1 and ESR2 regulate in vitro shoot regeneration

and their expressions are differentially regulated. *Plant Science*. 181: 39–46.

**Mayer K. F. X.; Schoof H.; Haecker A.; Lenhard M.; Jürgens G.; Laux T. 1998.** Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the Arabidopsis shoot meristem. *Cell*. 95: 805-815.

**McElver J.; Tzafrir I.; Aux G.; Rogers R.; Ashby C.; Smith K.; Thomas C.; Schetter A.; Zhou Q.; Cushman M. A.; Tossberg J.; Nickle T.; Levin J. Z.; Law M.; Meinke D.; Patton D. 2001.** Insertional mutagenesis of genes required for seed development in Arabidopsis thaliana. *Genetics*. 159: 1751-1763.

**Meissner R.; Chagua 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: 265-274.

**Meissner R.; Jacobson Y.; Melamed S.; Levyatuv S.; Shalev G.; Ashri A.; Elkind Y.; Levy A. 1997.** A new model system for tomato genetics. *Plant Journal*. 12: 1465-1472.

**Minoia S.; Petrozza A.; D’Onofrio O.; Piron F.; Mosca G.; Sozio G.; Cellini F.; Bendahmane A.; Carriero F. 2010.** A new mutant genetic resource for tomato crop improvement by TILLING technology. *BMC Research Notes*. 3:69.

**Miyao A.; Tanaka K.; Murata K.; Sawaki H.; Takeda S.; Abe K.; Shinozuka Y.; Onosato K.; Hirochika H. 2003.** Target site specificity of the *Tos17* retrotransposon shows a preference for insertion within genes against insertion in retrotransposon-rich regions of the genome. *The Plant Cell*. 15: 1771-1780.

**Moeder W. and Yoshioka K. 2008.** Lesion mimic mutants: a classical, yet still fundamental approach to study programmed cell death. *Plant Signaling & Behavior*. 3: 764–767.

**Morrison R. A. and Evans D. A. 1998.** Haploid plants from tissue culture: New plant varieties in a shortened time frame. *Nature Biotechnology*. 6: 684-690.

- Mosher S.; Moeder W.; Nishimura N.; Jikumaru Y.; Joo S.-H.; Urquhart W.; Klessig D. F.; Kim S.-K.; Nambara E.; Yoshioka K. 2010.** The lesionmimic mutant *cpr22* shows alteration in abscisic acid signaling and abscisic acid insensitivity in a salicylic aciddependent manner. *Plant Physiology*. 152: 1901–1913.
- Mostageer A. and Elshihy O .M. 2003.** Establishment of salt tolerant somatic hybrid through protoplast fusion between rice and ditch reed. *Arab Journal Biotechnology*. 6(1): 01-12.
- Motte H.; Vereecke D.; Geelen D.; Werbrouck S. 2014.** The molecular path to *in vitro* shoot regeneration. *Biotechnology Advances*. 32:107–121.
- Moyroud E.; Kusters E.; Monniaux M.; Koes R.; Parcy F. 2010.** LEAFY blossoms. *Trends in Plant Science*. 15:346–352.
- Müller R.; Bleckmann A.; Simon R. 2008.** The receptor kinase CORYNE of Arabidopsis transmits the stem cell-limiting signal CLAVATA3 independently of CLAVATA1. *Plant Cell*. 20: 934-946.
- Nagawa S.; Xu T.; Lin D.; Dhonukshe P.; Zhang X.; Friml J.; et al. 2012.** ROP GTPase-dependent actin microfilaments promote PIN1 polarization by localized inhibition of clathrin-dependent endocytosis. *PLOS Biology*.
- Namitha K. K.; Negi P. 2013.** Morphogenetic potential of tomato (*Lycopersicon esculentum*) cv. Arka Ahuti to plant growth regulators. *Notulae Scientia Biologicae* 2:220–225.
- Nasser S.; Lee Y.; Lapierre C.; Franke R.; Nawrath C.; Geldner N. 2012.** Casparian strip diffusion barrier in Arabidopsis is made of a lignin polymer without suberin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109: 10101-10106.
- Navarre D. A. and Wolpert T. J. 1999.** Victorin induction of an apoptotic/senescencelike response in oats. *Plant Cell*. 11: 237–249.
- Nesbitt T. C. and Tanksley S. D. 2002.** Comparative sequencing in the genus *Lycopersicon*: implications for the evolution of fruit size in the domestication of cultivated tomatoes. *Genetics*. 162: 365-379.
- Nishimura A.; Ashikari M.; Lin S.; Takashi T.; Angeles E. R.; Yamamoto T.; Matsuoka M. 2005.** Isolation of a rice regeneration quantitative trait loci

gene and its application to transformation systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102:11940-11944.

**Noutoshi Y.; Kuromori T.; Wada T.; Hiroyama T.; Kamiya A.; Imura Y.; Yasuda M.; Nakashita H.; Shirasu K.; Shinozaki K. 2006.** Loss of *NECROTIC SPOTTED LESION 1* associates with cell death and defense responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*. 62: 29-42.

**Ogawa M.; Shinohara H.; Sakagami Y.; Matsubayashi Y. 2008.** Arabidopsis CLV3 peptide directly binds CLV1 ectodomain. *Science*. 319: 294.

**Ohtani M. and Sugiyama M. 2005.** Involvement of SRD2-mediated activation of snRNA transcription in the control of cell proliferation competence in *Arabidopsis*. *Plant Journal*. 43: 479–490.

**Ohtani M.; Demura T.; Sugiyama M. 2008.** Differential requirement for the function of SRD2, an snRNA transcription activator, in various stages of plant development. *Plant Molecular Biology*. 66: 303–314.

**Okada K.; Ueda J.; Komaki M. K.; Bell C. J.; Shimura Y. 1991.** Requirement of the auxin polar transport system in early stages of *Arabidopsis* floral bud formation. *Plant Cell*. 3: 677–684.

**Okazawa K.; Sato Y.; Nakagawa T.; Asada K.; Kato I.; Tomita E.; Nishitani K. 1993.** Molecular cloning and cDNA sequencing of endoxyloglucan transferase, a novel class of glycosyltransferase that mediates molecular grafting between matrix polysaccharides in plant cell walls. *The Journal of Biological Chemistry*. 268: 25364–25368.

**Okushima Y.; Overvoorde P. J.; Arima K.; Alonso J. M.; Chan A.; Chang C.; Ecker J. R.; Hughes B.; Lui A.; Nguyen D.; Onodera C.; Quach H.; Smith A.; Yu G.; Theologis A. 2005.** Functional genomic analysis of the AUXIN RESPONSE FACTOR gene family members in *Arabidopsis thaliana*: Unique and overlapping functions of ARF7 and ARF19. *Plant Cell*. 17(2) 444-463.

**Olmstead J. A.; Sweere R. E.; Spangler L. Bohes and J. D. Palmer. 1999.** Phylogeny and provisional classification of the *Solanaceae* based on chloroplast DNA. Nee D. E.; Symon R. N. Lester and J. P. Jessop (eds)

*Solanaceae* IV, Advances in Biology and Utilization. Royal Botanic Gardens, Kew. Pp 111-137.

- Oosumi T.; Gruszewski H. A.; Blischak L. A.; Baxter A. J.; Wadl P. A.; Shuman J. L.; Veilleux R. E.; Shulaev V. 2006.** High-efficiency transformation of the diploid strawberry (*Fragaria vesca*) for functional genomics. *Planta*. 223:1219–1230.
- Ozawa S.; Yasutani I.; Fukuda H.; Komamine A.; Sugiyama M. 1998.** Organogenic responses in tissue culture of *srd* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 125: 135–142.
- Palmer R. G.; Burzlaff J. D.; Shoemaker R. C. 2000.** Genetic analysis of two independent chlorophyll-deficient mutants identified among the progeny of a single chimeric foliage soybean plant. *The Journal of Heredity*. 91: 297-303.
- Park J. I.; Ishimizu T.; Suwabe K.; Sudo K.; Masuko H.; Hokozaki H.; Nou I. S.; Suzuki G.; Watanabe M. 2010.** UDP-glucose pyrophosphorylase is rate limiting in vegetative and reproductive phases in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*. 51(6): 981-996.
- Parnis A.; Cohen O.; Gutfinger T.; Hareven D.; Zamir D.; Lifschitz E. 1997.** The dominant development mutants of tomato, *Mouse-ear* and *Curl*, are associated with distinct modes of abnormal transcriptional regulation of a *Knotted* gene. *The Plant Cell*. 9: 2143-2158.
- Pasqualini S.; Piccioni C.; Reale L.; Ederli L.; Della Tore G.; Ferranti F. 2003.** Ozone-induced cell death in tobacco cultivar Bel W3 plants. The role of programmed cell death in lesion formation. *Plant Physiology*. 133: 1122–1134.
- Passarinho P.; Ketelaar T.; Xing M.; van Arkel J.; Malepaard C.; Hendriks M. W.; Joosen R.; Lammers M.; Herdies L.; den Boer B.; van der Geest L.; Boutilier K. 2008.** BABY BOOM target genes provide diverse entry points into cell proliferation and cell growth pathways. *Plant Molecular Biology*. 68: 225–237.
- Paterson A. H.; Lander E. S.; Hewitt J. D.; Peterson S.; Lincoln S. E. Tanksley S. D. 1988.** Resolution of quantitative traits into Mendelian factors

by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Nature*. 335: 721–726.

**Peralta I. E. and Spooner D. M. 2001.** Granule-boundstarch synthase (GBSSI) gene phylogeny of wild tomatoes (*Solanum* L. Section *Lycopersicon* (Mill.) Wettst. Subsection *Lycopersicon*). *American Journal of Botany*. 88 (10): 1888-1902.

**Peralta I. E. and Spooner D. M. 2007.** History, origin and early cultivation of tomato (Solanaceae). In: Rozdan MK, Matto AK (eds) Genetic improvement of solanaceous crops: tomato, vol 2. *Science Publishers*, Enfield, NH, pp 1–27.

**Perianez-Rodriguez J.; Manzano C.; Moreno-Risueno M. A. 2014.** Post-embryonic organogenesis and plant regeneration from tissues: two sides of the same coin?. *Frontiers in Plant Science*. 5:219.

**Péter B.; Middleton A. M.; French A. P.; Larrieu A.; Bishopp A.; Njo M.; Wells D. M.; Porco S.; Mellor N.; Band L. R.; Casimiro I.; Kleine-Vehn J.; Vanneste S.; Sairanen I.; Mallet R.; Sandberg G.; Ljung K.; Beeckman T.; Benkova E.; Friml J.; Kramer E.; King J. R.; De Smet I.; Pridmore T.; Owen M.; Bennett M. J. 2013.** Sequential induction of auxin efflux and influx carriers regulates lateral root emergence. *Molecular Systems Biology*. 9: 699.

**Poethig R. S. 1987.** Clonal analysis of cell lineage patterns in plant development. *American Journal of Botany*. 74:581-594.

**Poethig R. S. and Sussex I. M. 1985.** The cellular parameters of leaf development in tobacco: a clonal analysis. *Planta*. 165:170-184.

**Poethig R. S. and Sussex I. M. 1985.** The developmental morphology and growth dynamics of the tobacco leaf. *Planta*. 165:158-169.

**Pratta G.; Cánepa L. N.; Zorzoli R.; Picardi L. A. 2003.** Diallel analysis of in vitro culture traits in the genus *Lycopersicon*. *HortScience*. 38:110-112.

**Pulianmackal A.J.; Kareem A.V.K.; Durgaprasad K.; Trivediand Z.B.; Prasad K. 2014.** Competence and regulatory interactions during regeneration in plants. *Frontiers in Plant Science*. 5:142.

- Qiao Y. L.; Jiang W. Z.; Lee J. H.; Park B. S.; Choi M. S.; Piao R.; Woo M. O.; Roh J. H.; Han L. Z.; Paek N. C.; Seo H. S.; Koh H. J. 2010.** Spl28 encodes a clathrin-associated adaptor protein complex 1, medium subunit  $\mu$ 1 (AP1M1) and is responsible for spotted leaf and early senescence in rice (*Oryza sativa*). *New Phytologist*. 185: 258–274.
- Quint M.; Barkawi L. S.; Fan K-T.; Cohen J. D.; Gray W. M. 2009.** Arabidopsis IAR4 modulates auxin response by regulating auxin homeostasis. *Plant Physiology*. 150. 748-758.
- Radhamony R. S.; Prasad A. M.; Srinivasan R. 2005.** T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis*. A tool for functional genomics. *Electronic Journal of Biotechnology*. 8(1):83-106.
- Rai A. C.; Singh M.; Shah K. 2013.** Engineering drought tolerant tomato plants over-expressing BcZAT12 gene encoding a C2H2 zinc finger transcription factor. *Phytochemistry*. 85:44–50.
- Reinhardt D.; Mandel T.; Kuhlemeier C. 2000.** Auxin regulates the initiation and radial position of plant lateral organs. *Plant Cell*. 12: 507–518.
- Reinhardt D.; Pesce E. R.; Stieger P.; Mandel T.; Baltensperger K.; Bennett M.; et al. 2003.** Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature*. 426, 255–260.
- Ren B.; Liang Y.; Deng Y.; Chen Q.; Zhang J.; Yang X.; Zuo J. 2009.** Genome-wide comparative analysis of type-A Arabidopsis response regulator genes by overexpression studies reveals their diverse roles and regulatory mechanisms in cytokinin signaling. *Cell Research*. 19: 1178–1190.
- Rick C. M. 1974.** Potential genetic resources in tomato species: clues from observation in native hábitat. In: Srb AM, editor. Genes, enzymes and populations. *Basis life sciences US: Springer*. P. 255-269.
- Rick C. M. 1979.** Byosytematic study in *Lycopersicon* and closely related species *Solanum*. In: The biology and taxonomy of *Solanaceae*. Hawkes, J. G., Layster, R. N. and Skeling A. D. (eds). *Academic Press*. London, UK. Pp. 268-273.

- Rieu I. and Laux T. 2009.** Signaling pathways maintaining stem cells at the plant shoot apex. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 20: 1083–1088.
- Ríos G.; Lossow A.; Hertel B.; Breuer F.; Schaefer S.; Broich M.; Kleinow T.; Jásik J.; Winter J.; Ferrando A.; Farrás R.; Panicot M.; Henriques R.; Mariaux J. B.; Oberschall A.; Molnár G.; Berendzen K.; Shukla V.; Lafos M.; Koncz Z.; Rédei G. P.; Schell J.; Koncz C. 2002.** Rapid identification of Arabidopsis insertions mutants by non-radioactive detection of T-DNA tagged genes. *The Plant Journal*. 32, 243-253.
- Robert S.; Kleine-Vehn J.; Barbez E.; Sauer M.; Paciorek T.; Baster P.; Vanneste S.; Zhang J.; Simon S.; Covanová M.; Hayashi K.; Dhonokshe P.; Yang Z.; Bednarek S. Y.; Jones A. M.; Lusching C.; Aniento F.; Zazímalová E.; Friml J. 2010.** ABP1 mediates auxin inhibition of clathrin-dependent endocytosis in *Arabidopsis*. *Cell*. 143, 111–121.
- Rogg L. E.; Lasswell J.; Bartel B. 2001.** A gain-of-function mutation in IAA28 suppresses lateral root development. *The Plant Cell*. 13: 465-480.
- Rojo E.; Sharma V. K.; Kovaleva V.; Raikhel N. V.; Fletcher J. C. 2002.** CLV3 is localized to the extracellular space, where it activates the Arabidopsis CLAVATA stem cell signaling pathway. *Plant Cell*. 14: 969-977.
- Ruiz-Rojas J. J.; Sargent D. J.; Shulaev V.; Dickerman A. W.; Pattison J.; Holt S. H.; Ciordia A.; Richard E. V. 2010.** SNP discovery and genetic mapping of T-DNA insertional mutants in *Fragaria vesca* L. *Theoretical and Applied Genetics*. 121: 449-463.
- Salehin M.; Bagchi R.; Estelle M. 2015.** SCFTIR1/AFB-based auxin perception: mechanism and role in plant growth and development. *Plant Cell*. 27: 9–19.
- Sallaud C.; Gay C.; Larmande P.; Bès M.; Piffanelli P.; Piéqu B.; Droc G.; Regad F.; Bourgeois E.; Meynard D.; Périn C.; Sabau X.; Ghesquière A.; Glaszmann J. C.; Delseny M.; Guiderdoni E. 2004.** High throughput

T-DNA insertion mutagenesis in rice: a first step towards in silico reverse genetics. *The Plant Journal*. 39: 450–464.

**Sánchez-Sauceda S. 2016.** Generación de mutantes de inserción de tomate cultivado y Silvestre e identificación de genes implicados en procesos de desarrollo y tolerancia a estrés abiótico. Departamento de Biotecnología, Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas. Universitat Politècnica de València, Valencia.

**Sangwan R. S. and Harada H. 1975.** Chemical regulation of callus growth, organogenesis, plant regeneration, and somatic embryogenesis in *Antirrhinum majus* tissue and cell cultures. *Journal of Experimental Botany*. 26: 868–881.

**Sangwan R. S.; Bourgeois Y.; Brown S.; Vasseur G.; Sangwan-Norreel B. 1992.** Characterization of competent cells and early events of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*. 188: 439–456.

**Sanseverino W.; Roma G.; De Simone M.; Faino L.; Melito S.; Stupka E.; Frusciante L.; Ercolano M. R. 2010.** PRGdb: A bioinformatics platform for plant resistance gene analysis. *Nucleic Acids Research* 38: D814–21.

**Satina S.; Blakeslee A. F.; Avery A. G. 1940.** Demonstration of the three germ layers in the shoot apex of *Datura* by means of induced polyploidy in periclinal chimeras. *American Journal of Botany*. 27:895-905.

**Satoh H.; Takashina T.; Escalante A.; Egashira H.; Imanishi S. 2000.** Molecular markers mapped around the high shoot regeneration capacity gene Rg- 2 in *ycopersicon chilense*. *Breeding Science*. 50(4):251-256.

**Scarpella E.; Marcos D.; Friml J.; Berleth T. 2006.** Control of leaf vascular patterning by polar auxin transport. *Genes Development*. 20: 1015–1027.

**Scherr S. J. and McNeely J. A. 2008.** Biodiversity conservation and agricultural sustainability: towards a new paradigm of ‘ecoagriculture’ landscapes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Science*. 363, pp. 477–494.

**Scholte M.; d’Erfurth; Rippa S.; Mondy S.; Cosson V.; Durand P.; Breda C.; Trinh H.; Rodriguez-Llorente I.; Kondorosi E.; Schultze M.; Kondorosi**

- A.; Ratet P. 2002.** T-DNA tagging in the model legume *Medicago truncatula* allows efficient gene discovery. *Molecular Breeding*. 10: 203–215.
- Schupp J. M.; Price L. B.; Klevytska A.; Keim P. 1999.** Internal and flanking sequence from AFLP fragments using ligation-mediated suppression PCR. *Biotechniques*. 26: 905-908.
- Scott J. W.; Bryan H. H.; Ramos L. J. 1997.** High temperature fruit setting ability of large-fruited, jointless pedicel tomato hybrids with various combinations of heat-tolerance. *Florida State Horticulture Society*. 110:281–4.
- Sengar R.; Chaudhary R.; Tyagi S. K. 2010.** Present status and scope of floriculture developed through different biological tools. *Research Journal of Agricultural Sciences*. 1(4): 306-314.
- Settles A. M.; Latshaw S.; McCarty D. R. 2004.** Molecular analysis of high-copy insertion sites in maize. *Nucleic Acids Research*. 32: e54.
- Shani E.; Ben-Gera H.; Shleizer-Burko S.; Burko Y.; Weiss D.; Ori N. 2010.** Cytokinin regulates compound leaf development in tomato. *Plant Cell*. 22: 3206–3217.
- Sherkar H. D. and Chavan A. M. 2014.** Studies on callus induction and shoot regeneration in tomato. *Science Research Reports*. 1:89–93.
- Shou H.; Frame B. R.; Whitham S. A.; Wang K. 2004.** Assessment of transgenic maize events produced by particle bombardment or *Agrobacterium*-mediated transformation. *Molecular Breeding*. 13: 201-208.
- Sims W. L. 1980.** History of tomato production around the world. *Acta Horticulturae*. 100: 211-215.
- Sinclair T. R.; Purcell L. C.; Sneller C. H. 2004.** Crop transformation and the challenge to increase yield potential. *Trends in Plant Science*. 9: 70-75.
- Skoog F and Miller C. O. 1957.** Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symposia of the Society for Experimental Biology*. 11: 118–131.
- Smith C. and Simpson S. P. 1986.** The use of genetic polymorphisms in livestock improvement. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 103: 205–217.

- Spooner D. M.; Peralta I. E.; Knapp S. 2005.** Comparison of AFLPs with other markers for phylogenetic inference in wild tomato (*Solanum* L. Section *Lycopersicon* (Mill.) Wettst.). *Taxon* 54: 43-61.
- Springer P. S. 2000.** Gene traps: tools for plant development and genomics. *Plant Cell*. 12: 1007–1020.
- Steeves T. A. and Sussex I. M. 1989.** Patterns in Plant Development. New York: Cambridge University Press.
- Stepanova A. N. and Alonso J. M. 2006.** PCR-Based Screening for Insertional Mutants. *Methods in Molecular Biology*. 323:163–72.
- Sugimoto K.; Jiao Y.; Meyerowitz. 2010.** *Arabidopsis* regeneration from multiples tissues occurs via a root development pathway. *Developmental Cell*. 18: 463-471.
- Sundaresan V. 1996.** Horizontal spreads of transposon mutagenesis: new uses for old elements. *Trends in Plant Science*. 1 (6): 184-190.
- Sundaresan V.; Springer P.; Volpe T.; Haward S.; Jones J. D.; Dean C.; Ma H.; Martienssen R. 1995.** Patterns of gene action in plant development by enhancer trap and gene trap transposable elements. *Genes and Development*. 9: 1797–1810.
- Suzuki Y.; Uemura S.; Saito Y.; Murofushi N.; Schmitz G.; Theres K.; Yamaguchi I. 2001.** A novel transposon tagging element for obtaining gain of function mutants based on a self-stabilizing *Ac* derivative. *Plant Molecular Biology*. 45 (2): 123–131.
- Swarup K.; Benková E.; Swarup R.; Casimiro I.; Péret B.; Yang Y.; Parry G.; Nielsen E.; De Smet I.; Vanneste S.; Levesque M. P.; Carrier D.; James N.; Calvo V.; Ljung K.; Kramer E.; Roberts R.; Graham N.; Marillonnet S.; Petal K.; Jones J. D. G.; Taylor C. G.; Schachtman D. P.; May S.; Sandberg G.; Benfey P.; Friml J.; Kerr I.; Beeckman T.; Laplace L.; Bennett M. J.. 2008.** The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nature Cell Biology*. 10:946-954.
- Symon D. E. 1985.** The *Solanaceous* of New Guinea Journal of the Adelaide. *Botanic Gardens* 8: 1-177.

- Szabados L.; Kovacs I.; Oberschall A.; Abrahám E.; Kerekes I.; Zsigmond L.; Nagy R.; Alvarado M.; Krasovskaja I.; Gál M.; Berenete A.; Rédei G. P.; Haim A. B.; Koncz C. 2002.** Distribution of 1000 sequenced T-DNA tags in the Arabidopsis genome. *The Plant Journal*. 32: 232–242.
- Tada A.; Adachi F.; Kakizaki T.; Inaba T. 2014.** Production in viable seeds from the lethal mutant *ppi2-2* lacking the atToc159 Chloroplast protein import receptor using plastic containers, and characterization of the homozygous mutant progeny. *Frontiers in Plant Science*. 5: 243.
- Takahashi A.; Kawasaki T.; Henmi K.; Shil K.; Kodama O.; Satoh H.; Shimamoto K. 1999.** Lesion mimic mutants of rice with alterations in early signaling events of defense. *Plant Journal*. 17: 535–545.
- Tamaki H.; Konishi M.; Daimon Y.; Aida M.; Tasaka M.; Sugiyama M. 2009.** Identification of novel meristem factors involved in shoot regeneration through the analysis of temperature sensitive mutants of Arabidopsis. *The Plant Journal*. 57: 1027–1039.
- Tani H.; Chen X.; Nurmburg P.; Grant J. J.; SantaMaria M.; Chini A.; Gilroy A.; Birch P. R.; Loake G. J. 2004.** Activation tagging in plants: a tool for gene discovery. *Functional & Integrative Genomics*. 4:258–66.
- Taylor I. B. 1986.** Byosystematic of tomato. In: The tomato Crop. A cientific basis of improvement. Atherton and Rouch (edit). *Champan and Hall*. London, UK. Pp. 1-34.
- The Tomato Genome Consortium. 2012.** The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*. 485: 635-641.
- Thole V.; Alves S. C.; Worland B.; Bevan M. W.; Vain P. 2009.** A protocol for efficiently retrieving and characterizing flanking sequence tags (ESTs) in *Brachypodium distachyon* T-DNA insertional mutants. *Nature Protocols*. 4:650–61.
- Thomas S. G. and Franklin-Tong V. E. 2004.** Self-incompatibility triggers programmed cell death in *Papaver* pollen. *Nature*. 429: 305–309.
- Tilney-Bassett R. A. E. 1986.** Plant Chimeras. London: E Arnold.

- Topping J. F.; Agyeman F.; Henricot B.; Lindsey K. 1994.** Identification of molecular markers of embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* by promoter trapping. *Plant Journal*. 5(6): 895–903.
- Traas J. and Doonan H. 2001.** Cellular basis of shoot apical meristem development. *International Review of Cytology* 208: 161–206.
- Trieu A. T.; Burleigh S. H.; Kardailsky I. V.; Maldonado-Mendoza I. E.; Versaw W. K.; Blaylock L. A.; Shin H.; Chiou T. J.; Katagi H.; Dewbre G. R.; Weigel D.; Harrison M. J. 2000.** Transformation of *Medicago truncatula* via infiltration of seedlings of flowering plants with *Agrobacterium*. *The Plant Journal*. 22(6): 531-541.
- Trujillo-Moya C.; Gisbert C.; Vilanova S.; Nuez Fernando. 2011.** Localization of QTLs for in vitro plant regeneration in tomato. *BMC Plant Biology*. 11:140.
- Ühlken Christine; Hoth Stefan; Weingartner M. 2014.** MAIL1 is essential for development of the primary root but not of anchor roots. *Plant signaling & Behavior*. 9:11.
- Vain P.; Worland B.; Thole V.; McKenzie N.; Alves S. C.; Opanowicz M.; Fish L. J.; Bevan M. W.; Snape J. W. 2008.** *Agrobacterium*-mediated transformation of the temperate grass *Brachypodium distachyon* (genotype Bd21) for T-DNA inertional mutagenesis. *Plant Biotechnology Journal*. 6 (3): 236-245.
- Van Breusegem F. and Dat J. 2006.** Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiology*. 141: 384–390.
- van der Biezen E. A.; Brandwagt B. F.; van Leeuwen W.; Nijkamp H. J.; Hille J. 1996.** Identification and isolation of the *FEEBLY* gene from tomato by transposon tagging. *Molecular and General Genetics*. 251:267-280.
- Van der Fits L.; Hilliou F.; Memelink J. 2002.** T-DNA activation tagging as a tool to isolate regulators of a metabolic pathway from a genetically non-tractable plant species. *Transgenic Research*. 10:513-521.
- Van der Graaff E.; Hooykaas P. J.; Keller B. 2002.** Activation tagging of the two closely linked genes *LEP* and *VAS* independently affects vascular cell number. *Plant Journal*. 32 (5): 819 – 830.

- Van Lijsebettens M.; Vanderhaegen R.; Van Montagu M. 1991.** Insertional mutagenesis in *Arabidopsis thaliana*: isolation of a T-DNA-linked mutation that alters leaf morphology. *Theoretical and Applied Genetics*. 81: 277-284.
- Vermer J. E. M.; Wangenheim von D.; Barberon M.; Lee Y.; Stelzer E. H. K.; Maizel A.; Gledner N. 2014.** A spatial accommodation by neighboring cells is required for organ initiation in *Arabidopsis*. *Science*. 343: 178-183.
- Verpoorte R.; van der Heijden R.; Memelink J. 2000.** Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. *Transgenic Research*. Vol.9, pp. 323-343.
- Walden R.; Hayashi H.; Schell J. 1991.** T-DNA as a gene tag. *The Plant Journal*. 1(3). 281-288.
- Wan S.; Wu J.; Zhang Z.; Sun X.; Lv Y.; Gao G.; Ning Y.; Ma Y.; Zhang Q.; Zheng X.; Zhang C.; Ma Z.; Lu T. 2008.** Activation tagging, an efficient tool for functional analysis of the rice genome. *Plant Molecular Biology*. 69:69-80.
- Wang J. J.; Zhu X. D.; Wang L. Y. 2004.** Physiological and genetic analysis of lesion resembling disease mutants (lrd) of *Oryza sativa* L. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*. 30: 331–338.
- Wang L.; Pei Z.; Tian Y.; He C. 2005.** OsLSD1, a rice zinc finger protein, regulates programmed cell death and callus differentiation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 18: 375–384.
- Watson W. P. 1989.** The Matthioli woodblocks: a rare survival. In *The Matthioli woodblocks* (catalog with no pagination. London: B. Quaritch Ltd.
- Wayase U. R. and Shitole M. G. 2014.** Effect of plant growth regulators on organogenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cv. Dhanashri. *International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology*. 2:65–7.
- Webb K. J.; Skot L.; Nicholson M. N.; Jorgensen B.; Mizen S. 2000.** *Mesorhizobium loti* increases root-specific expression of a calcium-binding protein homologue identified by promoter tagging in *Lotus japonicus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 13: 606-616.

- Weigel D.; Ahn J. H.; Blazquez M. A.; Borevitz J. O.; Christensen S. K.; Frankhauser C.; Ferrandiz C.; Kardailsky I.; Malancharuvil E. J.; Neff M. M.; Nguyen J. T.; Sato S.; Wang Z. Y.; Xia Y.; Dixon R. A.; Harrison M. J.; Lamb C. J.; Yanofsky M. F.; Chory J. 2000.** Activation tagging in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 122:1003-1013.
- Wen J.; Lease K. A.; Walker H. C. 2004.** *DVL*, a novel class of small polypeptides: overexpression alters *Arabidopsis* development. *Plant Journal*. 37 (5): 668–677.
- Werner T.; Motyka V.; Laucou V.; Smets R.; VanOnckelen H.; Schmülling T. 2003.** Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations in dictating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell*. 15: 2532–2550.
- Wolter M.; Hollricher K.; Salamini F.; Schulze-Lefert P. 1993.** The *mlo* resistance alleles to powdery mildew infection in barley trigger a developmentally controlled defence mimic phenotype. *Molecular and General Genetics*. 239: 122–128.
- Wu C. Y.; Li X. J.; Yuan W. Y.; Chen G.; Kilian A.; Li J.; Xu C.; Li X.; Zhou D. X.; Wang S.; Zhang Q. 2003.** Development of enhancer trap lines for functional analysis of the rice genome. *The Plant Journal*. 35:418-427.
- Xu T.; Wen M.; Nagawa S.; Fu Y.; Chen J. G.; Wu M. J.; Perrot-Rechenmann C.; Friml J.; Jones A. M.; Yang Z. 2010.** Cell surface-and rho GTPase-based auxin signaling controls cellular interdigitation in *Arabidopsis*. *Cell* 143: 99–110.
- Xu W.; Campbell P.; Vargheese A. K.; Braam J. 1996.** The *Arabidopsis* XET-related gene family: environmental and hormonal regulation of expression. *Plant Journal*. 9: 879–889.
- Yadav R. K.; Perales M.; Gruel J.; Girke T.; Jönsson H.; Reddy G. V. 2011.** WUSCHEL protein movement mediates stem cell homeostasis in the *Arabidopsis* shoot apex. *Genes & Development*. 25: 2025-2030.
- Yadav S. R.; Bishopp A.; Helariutta Y. 2010.** Plant development: early events in lateral root initiation. *Current Biology*. 20: R843–R845.

- Yanai O.; Shani E.; Dolezal K.; Tarkowski P.; Sablowski R.; Sandberg G.; Samach A.; Ori N. 2005.** *Arabidopsis* KNOXI proteins activate cytokinin biosynthesis. *Current Biology*. 15: 1566–1571.
- Yanofsky M. F.; Ma H.; Bowman J. L.; Drews G. N.; Feldmann K. A.; Meyerowitz E. M. 1990.** The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. *Nature*. 6279: 35-39.
- Yasmeen A. 2009.** An improved protocol for the regeneration and transformation of tomato (cv. Rio Grande). *Acta Physiologiae Plantarum*. 31:1271–1277.
- Yasutani I.; Ozawa S.; Nishida T.; Sugiyama M.; Komamine A. 1994.** Isolation of temperature-sensitive mutants of *Arabidopsis thaliana* that are defective in the redifferentiation of shoots. *Plant Physiology*. 105: 815–822.
- Yoshida S.; Mandel T.; Kuhlemeier C. 2011.** Stem cell activation by light guides plant organogenesis. *Genes Development*. 25: 1439–1450.
- Zeng L. R.; Qu S. H.; Bordeos A.; Yang C.; Baraoidan M.; Yan H.; Xie Q.; Nahm B. H.; Leung H.; Wang G. L. 2004.** Spotted leaf11, a negative regulator of plant cell death and defense, encodes a U-Box/armadillo repeat protein endowed with E3 ubiquitinligase activity. *Plant Cell*. 16: 2795–2808.
- Zhang H. and Blumwald E. 2001.** Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nature Biotechnology*. 19: 765-768.
- Zhang S. B. and Lemaux P. G. 2004.** Molecular analysis of in vitro shoot organogenesis. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 23: 325–335.
- Zhao T.; Palotta M.; Langridge P.; Prasad M.; Graner A.; Schulze-Lefert P.; Koprek T. 2006.** Mapped Ds/T-DNA launch pads for functional genomics in Barley. *The Plant Journal*. 47 (5): 811-826.
- Zhao Y.; Christensen S. K.; Fankhauser C.; Cashman J. R.; Cohen J. D.; Weigel D.; Chory J. 2001.** A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. *Science*. 291: 306–309.
- Zubko E.; Adams C. J.; Machaekova I.; Malbeck J.; Scollan C.; Meyer P. 2002.** Activation identifies a gene from *Petunia hybrida* responsible for the production of active cytokinins in plants. *Plant Journal*. 29:797-808.

**Zupan J; Muth T. R.; Draper O.; Zambryski P. 2000.** The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *Plant Journal*. 23: 11-28.

**Zurek D. M.; Rayle D. L.; McMorris T. C.; Clouse S. D. 1994.** Investigation of gene expression, growth kinetics, and wall extensibility during brassinosteroid-regulated stem elongation. *Plant Physiology*. 104: 505–513.