

Índice

1	Introducción.....	1
1.1	Origen y taxonomía del tomate	1
1.2	Características de una planta de tomate y algunos genes que las controlan	3
1.3	Importancia económica y científica del tomate	9
1.4	La mutagénesis insercional	13
1.4.1	Transposones.....	15
1.4.2	T-DNA	16
1.4.3	Vectores específicos para la identificación de genes	18
1.5	Los estreses abióticos: sequía y salinidad	23
1.5.1	Respuestas al estrés osmótico	27
1.5.2	Respuesta al estrés iónico	30
1.6	Programa de mutagénesis insercional en <i>S. pennellii</i>	34
2	Objetivos	39
3	Material y Métodos	41
3.1	Material vegetal	41
3.2	Obtención de plantas transgénicas	42
3.2.1	Técnicas básicas	42
3.2.2	Transformación genética de <i>S. pennellii</i>	44
3.2.3	Determinación del nivel de ploidía en las plantas regeneradas mediante citometría de flujo	47

3.2.4 Aclimatación y trasplante	48
3.2.5 Cultivo de plantas de <i>S. pennellii</i> en el invernadero y obtención de las descendencias	48
3.3 Evaluación de la tolerancia a la salinidad	50
3.3.1 Evaluación de la tolerancia al estrés salino <i>in vitro</i>	50
3.3.2 Evaluación de la tolerancia al estrés salino <i>in vivo</i>	52
3.4 Evaluación de la expresión del gen delator	53
3.5 Técnicas de microscopía	55
3.5.1 Fijación de las muestras e inclusión en parafina	55
3.5.2 Tinción con azul de anilina	56
3.5.3 Tinción con floroglucinol	56
3.6 Caracterización genética del fenotipo mutante	56
3.7 Determinación del número de insertos T-DNA	57
3.7.1 Estimación del número de insertos mediante técnicas de cultivo <i>in vitro</i>	57
3.7.2 Determinación del número de insertos T-DNA mediante análisis moleculares	58
3.8 Determinación de la cosegregación entre inserto T-DNA y fenotipo mutante	60
3.8.1 Estimación de la cosegregación mediante técnicas de cultivo <i>in vitro</i>	60
3.8.2 Determinación de la cosegregación mediante PCR	61
3.9 Clonación del gen etiquetado mediante Anchor-PCR	62
4 Resultados	65
4.1 Generación de líneas T-DNA de <i>Solanum pennellii</i>	65
4.2 Detección de mutantes hipersensibles a estrés salino	67
4.3 Evaluación de la tolerancia al estrés salino <i>in vitro</i>	68
4.3.1 Evaluación con ápices meristemáticos sin enraizar	69
4.3.2 Evaluación con ápices meristemáticos enraizados	71
4.3.3 Caracterización del mutante 4165 ETSP	74
4.3.4 Caracterización del mutante 515 ETSP	76
4.4 Evaluación de la tolerancia al estrés salino <i>in vivo</i> : sistema hidropónico pasivo	77

4.4.1 Evaluación a corto plazo de la colección de líneas T-DNA de <i>S. pennellii</i> mediante un sistema hidropónico pasivo	79
4.4.2 Evaluación a corto plazo mediante un sistema hidropónico pasivo de la colección de líneas T-DNA de tomate	85
4.5 Detección de mutantes del desarrollo en la colección de líneas T-DNA de <i>S. pennellii</i> ...	95
4.5.1 4196 ETSP	95
4.5.2 4166 ETSP	99
4.5.3 4025 ETSP	105
5 Discusión	115
5.1 Obtención de una colección de plantas transgénicas de <i>Solanum pennellii</i>	116
5.2 Sistemas para la detección de mutantes afectados en su tolerancia a la salinidad	121
5.2.1 El cultivo <i>in vitro</i> como herramienta para el escrutinio y evaluación de mutantes afectados en su tolerancia al estrés salino	123
5.2.2 Nuevo sistema de cultivo <i>in vivo</i> para el escrutinio y evaluación de mutantes afectados en su tolerancia a estrés salino	126
5.3 Implicaciones de las alteraciones observadas en la tolerancia a la salinidad	130
5.3.1 Efectos de la salinidad sobre el desarrollo de los órganos vegetativo aéreos	131
5.3.2 Efecto de la salinidad sobre el sistema radicular	132
5.3.3 Floración temprana	133
5.3.4 Producción de antocianinas	135
5.3.5 Hiperhidratación	136
5.4 Los mutantes más relevantes	138
5.4.1 901 ET73	138
5.4.2 4196 ETSP	142
5.4.3 4166 ETSP	144
5.4.4 4025 ETSP	147
6 Conclusiones	151
7 Bibliografía	153