



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA
Máster Biotecnología Industrial y Agroalimentaria

TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE TOMATE CON EL
GEN *FALSIFLORA*: CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA
Y MOLECULAR DE UN MUTANTE INSERCIONAL

Trabajo Fin de Master
Ana Fernández Montes

Tutora:
M^a Trinidad Angosto Trillo

RESUMEN

La introducción, mediante transformación genética, de genes de función desconocida en tomate pero que son homólogos a genes de *Arabidopsis* implicados en el proceso de floración, nos puede resultar de gran utilidad para esclarecer el papel funcional de estos genes en tomate. Es por ello que en este trabajo hemos obtenido una serie de cultivos transgénicos de tomate que sobreexpresan el gen *FALSIFLORA* (*FA*), y como un primer paso, las hemos caracterizado desde un punto de vista molecular y en cuanto a su desarrollo. Tras la caracterización, hemos seleccionado un mutante de desarrollo de alto interés en el desarrollo floral, P-7a, el cual se ha caracterizado molecularmente.

INTRODUCCION

El conocimiento de los mecanismos genéticos y moleculares implicados en procesos fisiológicos que hacen posible el desarrollo de las plantas y su adaptación a ambientes desfavorables constituyen objetivos de enorme interés, tanto en investigación básica como aplicada. Estos conocimientos proporcionan la base científica para abordar programas de mejora genética que permitan incrementar la productividad de los cultivos, y muy especialmente en el tomate (Stevens y Rick, 1986).

El desarrollo vegetal se define como el conjunto de eventos que contribuyen a la progresiva elaboración del cuerpo de la planta y la capacidad en sus funciones. La parte aérea de la planta puede considerarse como el resultado de la formación reiterada de una unidad estructural básica denominada fitómero, la cual está formada por una o más hojas, el nudo al cual éstas se encuentran unidas, el entrenudo dispuesto bajo el nudo y una o más yemas axilares (Steeves y Sussex, 1991; Schultz y Haughn, 1991).

Un proceso fundamental en el desarrollo es la transición floral, definida como el cambio de patrón de crecimiento vegetativo a otro reproductivo, es un proceso complejo cuyo control depende de factores genéticos, hormonales y ambientales, y dichas señales deben integrarse

en el meristemo apical (Martínez-Zapater y Salinas, 1993). En la mayoría de especies vegetales la fase transicional en el brote apical del meristemo puede dividirse en tres estadios: cambio del meristemo vegetativo al meristemo de inflorescencia, el mantenimiento del meristemo de inflorescencia y la diferenciación del meristemo de inflorescencia en meristemo floral (Meyerowitz y col., 1991; Ma, 1994), y representa uno de los puntos de control más importantes en el desarrollo de la planta (Kania y col., 1997).

En tomate (*Solanum lycopersicum* L.), el control de la transición floral no es todavía muy conocida desde el punto de vista genético y molecular (Atherton y Harris, 1986; Pnueli y col., 1998; Lozano y col., 2000). La transición floral tiene lugar de forma autónoma, con independencia de los factores externos (Picken y col., 1986) y ocurre de forma sucesiva en los distintos segmentos simpodiales (Sawhney y Greyson, 1972; Silvy, 1974; Atherton y Harris, 1986; Lozano y col., 2000). De manera que tras el desarrollo de un número discreto de hojas, variables según los genotipos (6-14 hojas), el meristemo apical de este primer segmento vegetativo se determina como un meristemo reproductivo e inicia la formación de la primera inflorescencia. Tras ella, el crecimiento de la planta de tomate se organiza en base a la reiteración de segmentos, denominados simpodiales, constituidos por 3 nuevas hojas que se forman a partir del meristemo situado en la axila de la última hoja del segmento precedente.

Se han clonado varios genes implicados en el control de la transición floral en tomate, entre los que se encuentra *FALSIFLORA* (*FA*). El gen *FA* constituye un promotor clave de la floración en tomate, como lo prueba el hecho de que mutaciones de este gen retrasan de forma severa el tiempo de floración, con independencia de las condiciones ambientales. La caracterización molecular y funcional de este gen puso de manifiesto el papel integrador de las señales inductoras de la floración procedentes de diferentes rutas (Molinero-Rosales y col., 1999).

El gen *FA* de tomate mantiene un alto grado de homología estructural y funcional con el gen *LFY* de *Arabidopsis* y *FLO* de *Antirrhinum*, lo que demuestra que se trata de genes ortólogos en genomas de diferentes especies. En tomate, a diferencia de lo que ocurre con los genes homólogos de *LFY* en otras especies, la expresión de *FA*, tanto en el meristemo floral como en los meristemos vegetativos, afecta a todas las regiones del meristemo excepto a la región interna. Estas diferencias de expresión podrían indicar la existencia de funciones adicionales respecto a las que *LFY* tiene en *Arabidopsis*. Al igual que *LFY*, controla la identidad del meristemo floral y el tiempo de floración, pero además muestra una función adicional durante el desarrollo vegetativo y concretamente en la formación de la hoja (Molinero-Rosales y col., 1999).

La biotecnología es el conjunto de técnicas que utilizan organismos vivos o partes de ellos para obtener productos o modificarlos, para mejorar plantas o animales, o para desarrollar microorganismos con fines bien determinados. Por su parte, la ingeniería genética comprende un conjunto de técnicas que permiten manipular el DNA, es decir, aislar genes, descifrarlos, modificarlos y devolverlos a una célula viva del mismo tipo o distinto al original. El desarrollo de la ingeniería genética ha dado origen a la nueva o moderna biotecnología, que en los últimos años ha adquirido actualidad e importancia, ya que ha evolucionado un gran número de sectores de producción que incluyen salud humana y animal, agricultura y alimentación, suministros industriales, energía y medio ambiente.

Una planta transformada genéticamente, o planta transgénica, es aquella a la que se ha introducido un fragmento de DNA foráneo en el genoma de sus células. Este DNA se expresa y confiere a la planta un carácter o caracteres nuevos que antes no poseía. En la transformación genética de plantas se persigue como objetivo la integración cromosómica, expresión y heredabilidad estable del transgén de interés.

Actualmente, existen dos formas básicas de introducir genes foráneos en el genoma de las plantas. La primera consiste en un método directo de transferencia sin necesidad de vectores biológicos (bombardeo de microproyectiles, electroporación y microinyección). El segundo método para la transferencia de DNA foráneo se puede realizar también aprovechando las propiedades biológicas de las bacterias *Agrobacterium tumefaciens* y *A. rhizogenes*. Este vector biológico es altamente eficiente para la transferencia de genes siempre y cuando existan garantías de que la célula transformada sea apta para la regeneración o que la célula que regenera sea competente para la integración de transgenes (Potrykus, 1991).

Un avance fundamental en el desarrollo de la tecnología transgénica se produjo en 1985, cuando Horsch y col. publicaron el procedimiento de transformación de discos de hoja con *Agrobacterium*. Con ello consiguieron regenerar eficazmente plantas transgénicas enteras a partir de explantes previamente cultivados con la bacteria. El principal inconveniente es que se ha descrito en muchas especies, y asociada a diferentes tipos de explantes, la regeneración de plantas no transgénicas junto a las que sí lo son. A estas plantas capaces de regenerarse en un medio de cultivo que contiene un agente de selección pese a no ser resistentes a dicho agente, se les llama “escapes”. Se producen por ineficacia del agente de selección o porque las células transgénicas detoxifican su entorno y protegen a las células no transgénicas de alrededor del agente de selección.

La integración de los genes foráneos en las células vegetales se produce en lugares al azar. Esto hace que el nivel de expresión de los transgenes varíe de una planta transgénica a otra y entre una planta transgénica y su progenie, ya que se ve directamente afectado por el contexto genómico en el que se integran. A esto se le llama “efecto posición”. El número de copias de los transgenes que se integra es también aleatorio. Además, se han descrito reorganizaciones del DNA foráneo en la célula vegetal, tanto antes de integrarse como en el momento de la integración en el DNA genómico, lo que conduce a la introducción de copias múltiples unidas

en todas las direcciones posibles, copias truncadas e, incluso, copias múltiples con segmentos de DNA de la planta entre ellas. Además, se ha observado que cuando se introduce un transgén en una planta que ya posee ese mismo gen como parte de su genoma, ambos se silencian. A este fenómeno se le llama cosupresión y es un tipo de silenciamiento postranscripcional, es decir, el RNA mensajero de ambos genes se degrada en el citoplasma. Al conseguir la cosupresión una inactivación casi completa del gen endógeno, resulta más eficaz que los genes en “antisentido” para bloquear la expresión de genes de la planta.

Desde un punto de vista metodológico, el estudio de los procesos de desarrollo puede ser abordados por diferentes vías, entre las cuales el análisis genético y molecular de mutantes constituye una de las más exitosas para identificar la función de los genes alterados. En el caso del tomate, la única colección disponible incluye 978 mutantes espontáneos y variantes naturales (correspondientes a 607 loci), que se mantiene en el Tomato Genetic Resource Center (TGRC, Univ. California, Davis: <http://tgrc.ucdavis.edu>) y que ha posibilitado el aislamiento de genes como *Ls* y *FA*, entre otros. No obstante, teniendo en cuenta la escasez de información genética disponible y el nivel incipiente de la genómica funcional en esta especie, clonar los genes en las colecciones antes descritas resulta técnicamente complicado, debiéndose recurrir a estrategias de mapeo posicional y/o genes candidatos. Alternativamente, la mutagénesis insercional por T-DNA, que en los últimos años se ha convertido en una metodología esencial para la identificación y etiquetado de genes, representa una de las alternativas más prometedoras para la identificación y caracterización funcional de los genes que regulan dichos procesos (Emmanuel y Levy, 2002). En efecto, la integración de un T-DNA en la secuencia codificante o en cualquier elemento de control de un gen endógeno puede ocasionar la anulación de función o la alteración del nivel de expresión de dicho gen, generando un fenotipo mutante. De esta forma, la caracterización del mutante de inserción proporciona una valiosa información sobre la función del gen mutado y, además, como el gen

queda etiquetado por el T-DNA, su aislamiento resulta mucho más asequible (Radhamony et al. 2005).

Por todo lo expuesto, en este trabajo nos propusimos realizar la caracterización fisiológica y molecular de un mutante de inserción obtenido en un experimento de transformación genética.

METODOLOGIA

Material vegetal

Para la realización de este trabajo se ha utilizado semillas y plántulas del cultivar de tomate P73 (*Solanum lycopersicum* L.) que manifiesta un crecimiento mixto (determinado-indeterminado).

Técnicas de cultivo *In Vitro*

Esterilización de semillas

Las semillas se desinfectan superficialmente por inmersión durante 30 min en una solución diluida al 50% de lejía comercial que contiene además 2 ó 3 gotas de Triton X-100, que ayuda a disminuir la tensión superficial. Seguidamente se elimina la solución desinfectante mediante 3 lavados sucesivos con agua destilada estéril (5, 10 y 15 min.).

Obtención de plántulas axénicas

Tras la desinfección de las semillas, se sembraron 2 de ellas en tubos de vidrio que contienen medio de germinación (MG): Sales MS 100%, Inositol 100 mg/l, Sacarosa 10 g/l, Agar 0,8%, pH 5,7. La incubación tiene lugar en condiciones controladas (fotoperiodo, temperatura y humedad) y a los 14-16 días están suficientemente desarrolladas para proceder a la extracción de los explantes de cotiledón y de hojas.

Enraizamiento de los brotes, aclimatación y trasplante

Los ápices aislados son sembrados en medio de enraizamiento (IA): Sales MS 100%, Inositol 100 mg/l, Sacarosa 20 g/l, Tiamina 1 mg/l, IAA 100 µg/l, Agar 0,8%, pH 5,7. A los

15-20 días las plantas alcanzan un estadio adecuado para realizar la aclimatación: tras extraer la planta del bote se lava la raíz para eliminar los restos de agar y a continuación se transplanta a una maceta que contiene turba estéril. Para mantener la humedad del sustrato se colocan vasos de plástico transparentes sobre las macetas. Seguidamente se trasladan al fitotrón en donde tiene lugar el proceso de aclimatación y a los 10-15 días, la planta es trasladada al invernadero.

Transformación, selección y regeneración de plantas transgénicas.

La técnica de transformación genética de tomate utilizada se basó en el co-cultivo de explantes con *Agrobacterium tumefaciens* y posterior regeneración *in vitro* de plantas transgénicas adaptado del método descrito por Ellul y col. (2003).

En nuestro trabajo se utilizaron plántulas de tomate de la línea P73 de de 14-16 días, obtenidas a partir de cultivo *in vitro* en un medio de germinación de semillas (MG). Los explantes de cotiledón se cortaron por sus bordes basal y apical y por la zona central para aumentar la superficie de infección, y los explantes de hojas se obtuvieron por la división de la hoja en cuadrados de aproximadamente 1 x 1 cm. Los explantes se inocularon sumergiéndolos en el cultivo de *Agrobacterium* (DO₆₀₀ de 0,2-0,4) durante 6 min. Tras la inoculación, los explantes se transfirieron a un medio de cocultivo, similar al de inducción (IK): Sales MS 100%, Sacarosa 30 g/l, Inositol 100 mg/l, Vitaminas RT 100%, IAA 1 mg/l, Kinetina 1 mg/l, Agar 0,8%, suplementado con acetosiringona a una concentración final de 200 µM. Este es un compuesto fenólico inductor de los genes de virulencia (*VIR*) de las cepas de *A. tumefaciens* (Stachel y col., 1985).

Las bacterias se incubaron con los explantes durante un periodo de 1-2 días, en oscuridad, a 28°C. Transcurrido este tiempo, los explantes se sumergieron en un medio de lavado (MB): Sales MS 100%, Sacarosa 20 g/l, Inositol 100 mg/l, Tiamina 1 mg/l, , suplementado con 500 mg/l de cefotaxima con el fin de limitar el crecimiento bacteriano, durante 10 min y se

transfirieron a medio de regeneración (IKCK), similar al medio de inducción IK, con kanamicina 100 mg/l para seleccionar las células transformadas y cefotaxima 300 mg/l para controlar el crecimiento de *Agrobacterium*. Se incubaron en cámaras de crecimiento a 25°C, bajo condiciones de fotoperiodo de día largo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad).

Los brotes regenerados que iban apareciendo se cortaban evitando el callo y se transferían a frascos con medio de enraizamiento (ME) selectivo con 50 µg/ml de kanamicina. Con los brotes enraizados podemos obtener nuevas plantas mediante la propagación clonal. La propagación se lleva a cabo por multiplicación de meristemos caulinares y yemas axilares. A partir de plantas crecidas durante 15-20 días en ME se aíslan segmentos que contienen el meristemo caulinar o segmentos de tallo con yemas axilares, y se subcultivan en el mismo medio. De las plantas obtenidas, una de ellas se utilizaba para mantener una réplica en cultivo *in vitro*, y las otras, una vez enraizadas, se transferían a contenedores con un sustrato esterilizado que consistía en una mezcla de turba: fibra de coco (3:1).

Extracción de DNA y análisis PCR

Para la extracción de DNA genómico se ha utilizado el kit plant DNAzol Reagent[®] de Invitrogen Corporation. En un mortero frío se macera la muestra con N₂ líquido. La muestra macerada se coloca en un tubo eppendorf, se le añaden 300 µl de reactivo DNAzol y se mezcla bien con vortex. Incubar a 25°C durante 5 min, añadir 300 µl de cloroformo e incubar de nuevo a 25°C durante 5 min. La muestra se centrifuga a 12.000 g durante 10 min y se recupera el sobrenadante. Para precipitar el DNA se le añaden 225 µl de Etanol (100%) al tubo eppendorf, se incuba a 25°C durante 5 min y se centrifuga a 5.000 g durante 4 min. En este caso se elimina el sobrenadante. Para lavar las muestras se prepara solución de lavado fresca (1 volumen DNAzol: 0,75 volúmenes Etanol 100%) y se añaden 300 µl a cada tubo, agitando bien en vortex (hasta que se desprenda el pellet). Se incuba a 25°C durante 5 min y centrifuga a 5.000g durante 4 min, eliminando con cuidado el sobrenadante. Se añaden 300 µl

de Etanol (75%) agitar y centrifugar a 5.000g durante 4 min. Los restos de etanol se eliminan por decantación y con pipeta y se deja secar el pellet al aire. Una vez seco, se añaden 70 μ l de TE Buffer 0,1 N (pH 8) ó agua (estéril), resuspendiendo el DNA calentado en el termoblock durante 10 min a 65°C. Centrifugar a 14.000 rpm durante 2 min. El sobrenadante se pasa a un nuevo tubo eppendorf y centrifugar a 14.000 rpm durante 2 min. En este momento se hacen diluciones seriadas: dilución 1:10 de la dilución stock y dilución 1:20 de la dilución 1:10.

La determinación de la concentración de DNA se lleva a cabo mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. La agarosa se disuelve en un volumen de amortiguador TBE 0,5x, calentándola en microondas por 45 seg. y se agita con movimientos circulares hasta que se disuelva. Cuando la agarosa alcanza los 50-60°C aproximadamente se vierte en el centro de la bandeja el gel evitando la formación de burbujas, se le colocan los peines y se deja reposar; tarda de 20-40 min en solidificar a T^a ambiente (Fig. 1).

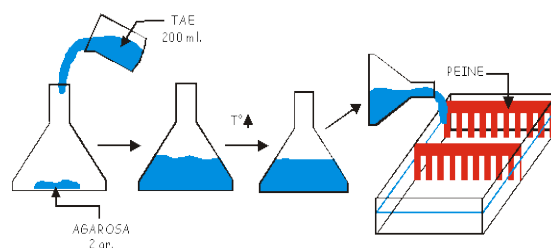


Figura 1. Preparación del gel de agarosa

El gel se traslada hasta la cubeta de electroforesis y se agrega TBE hasta sumergir el gel unos 2 a 6 mm. Las muestras a analizar se mezclan con el tampón de carga adecuado y un colorante (Ej.: azul de bromofenol) el cual indica el frente de la electroforesis. Cada muestra consta de: 1 μ l muestra y 4 μ l de buffer de carga y se cargan en los pocillos. La electroforesis se corre con el tampón SB 1x, a una intensidad de corriente constante a 100 V hasta que el azul de bromofenol esté aproximadamente, a 1 mm del extremo inferior del gel. Se desmonta el gel y se visualiza tiñendo el gel con un colorante fluorescente, bromuro de etidio, durante 30 min. Una vez acabado el revelado se procede a la visualización de los fragmentos de DNA mediante luz UV.

Secuenciación de DNA. Método Anchor PCR

La PCR (en inglés, Polymerase Chain Reaction) es un método enzimático que permite sintetizar numerosas copias de un fragmento concreto de DNA. El protocolo de la metodología Anchor PCR consta de varios pasos: digestión, ligación y amplificación. Para la digestión se prepara una mezcla según aparece en la Tabla 1 y se incuban los tubos durante 3 h a 37°C.

Tabla 1. Mezcla de compuestos para la digestión del ADN.

Elementos	Volumen(1x)	Volumen(9x)
Buffer multicore	4 µl	36 µl
Enzima (5µl): <i>Alu I</i> , <i>Dra I</i> , <i>Eco RI</i> , <i>Hind II</i> , <i>Pvu II</i> , <i>Sca I</i> , <i>Sma I</i> , <i>Stu I</i>	X µl	(0,33-0,66) µl
DNA (500 ng)— en nuestro caso 200 ng	2,5 µl	22,5 µl
Agua	33 µl	297 µl
Total de volumen	40 µl	39,50 µl a cada tubo

Donde, X es volumen de cada enzima utilizado: *Eco RI* = 15 U/ µl = 0,33 µl; *Dra I* = 15 U/ µl = 0,33 µl; *Pvu II* = 15 U/ µl = 0,33 µl; *Sca I* = 8 U/ µl = 0,66 µl; *Hind II* = 8 U/ µl = 0,66 µl; *Stu I* = 10 U/ µl = 0,55 µl; *Alu I* = 10 U/ µl = 0,55 µl; *Sma I* = 10 U/ µl = 0,55 µl.

Para la ligación se prepara la mezcla descrita en la Tabla 2 y se incuban los tubos durante 1 h a 37°C.

Tabla 2. Mezcla de compuestos para la reacción de ligación al ADN.

Elementos	Volumen(1x)	Volumen(9x)
Buffer multicore	1 µl	9 µl
ATP (10 nm)	1 µl	9 µl
Genome Walker (Adaptador)	1 µl	9 µl
Agua	6,6 µl	59,4 µl
T ₄ DNA ligasa	0,4 µl	3,6 µl
Total de volumen	10 µl	90 µl. Adicionar 10 µl por tubo

Para la amplificación se realizan tres PCRs: **PCR 1** – Se añade 1µl del ADN digerido a cada tubo de PCR, se prepara la mezcla descrita en la Tabla 3 y se hace la reacción de PCR durante 2 h a 55°C.

Tabla 3. Mezcla de compuestos para la reacción PCR1 de amplificación del ADN.

Elemento	LB 9X	RB 9X
Buffer 10x	27 µl	27 µl
DNTP _s	21,60 µl	21,60 µl
Cl ₂ Mg	13,50 µl	13,50 µl
LITA-A	–	9 µl
Ad-1	–	9 µl
LB-2	9 µl	–
Ad-1	9 µl	–
<i>Taq polimerasa</i>	9 µl	9 µl
DNA	1 µl	1 µl
Agua	171,9 µl	171,9 µl

Para la **PCR 2** se realiza una dilución 1/50 DNA (0,02 µl) y se hace la mezcla y la reacción igual a la descrita para PCR1 a 58°C. En la **PCR 3** la dilución es de 1/100 DNA (0,01 µl) a 60°C.

Para realizar la reacción de secuenciación del DNA (en 10 µl) lo primero es determinar la cantidad de DNA mediante electroforesis en base a la Tabla 4. Se prepara una solución de cebadores a utilizar a una concentración de 2,5 µM, de forma que al final se añaden 2,5 µmoles en 1 µl para la mezcla de reacción (Tabla 5).

Tabla 4. Cantidad de DNA según el producto de PCR

Molde (producto de PCR)	Cantidad
100-200 bp	1-3 ng
200-500 bp	3-10 ng
500-1000 bp	5-20 ng
1000-2000 bp	10-40 ng
> 2000 bp	20-50 ng
Plásmido cadena doble	150-300 ng
Cósmido, BAC.	0,5-1 µg
DNA genómico bacteriano	2-3 µg

Tabla 5. Mezcla de la reacción

Elementos	Volumen
Cebador 2,5 pmol	1 µl
DNA molde	4 µl
5 x BigDey sequencing Buffer	2 µl
Ready Reaction Mix	1 µl
Agua estéril	2 µl
Volumen final	10 µl

Se realiza la precipitación para lecturas cerca del cebador para lo que añadimos a cada muestra 1 µl de EDTA 125 mM, 1 µl de Acetato sódico 3 M pH 5,2 y 25 µl EtOH 95%. Se mezcla, se mantiene a temperatura ambiente durante 15 min y centrifugamos a 14.000 rpm durante 15 min. Se elimina el sobrenadante y se añaden 35 µl de EtOH 70%, mezclar brevemente y centrifugar 10 min a 14.000 rpm. Eliminar los restos de etanol y se añaden 10 µl de Formamida.

El siguiente paso es cuantificar el DNA genómico mediante fluorimetría. Consiste en marcar las moléculas que servirán de cebador con un fluorocromo (SYBR Green). A 2 µl de muestra en cada pocillo se le añaden 198 µl de solución de SYBR y se introduce la placa en el equipo para posterior análisis.

Hibridación Southern blot

Para la digestión del DNA se utiliza la mezcla descrita en la Tabla 6 y los tubos se colocan en el termociclador a 37°C.

Tabla 6. Mezcla de la reacción de digestión para Southern blot

Elementos	Volumen (1x)
Buffer 10x	15 µl
<i>Eco RI , Hind II</i>	6,66 µl
DNA- Agua	124,34 µl
RNAsa	1 µl
Espermidina (100mM)	4 µl
Total	150 µl

Para precipitarlo al DNA digerido se le añade 1/10 de Acetato sódico 3 M pH 5,2 y 2 volúmenes de EtOH 100% y se mantiene a -80°C durante un tiempo mínimo de 20 min ó 2 h a -20°C. Pasado este tiempo se centrifuga a 4°C a 12.000 rpm durante 15 min y se elimina el sobrenadante. Al precipitado se le añaden 100 µl de EtOH 75°C para lavar el DNA, se agita vigorosamente y se centrifuga en frío (12.000 rpm) ó T^a ambiente (14.000 rpm) durante 10 min. Eliminar el sobrenadante y volver a darle una centrifugación durante 10-15 seg. para retirar los restos de etanol y dejar secar. Para resuspender la muestra se añaden 25 µl de agua. Para la separación utilizamos un gel de agarosa al 0,8%, se preparan las muestras y realiza la electroforesis.

La transferencia Southern se realiza en varios pasos. Depurinización, lavar el gel con HCl 0,25 M (10-20 min) y se eliminan los restos de HCl enjuagando el gel con agua destilada. Desnaturalización, lavar el gel con buffer de desnaturalización en agitación durante 30 min y lavar con agua destilada. Neutralización, lavar el gel con buffer de neutralización y mantener en agitación durante 30 min y lavar con agua destilada. Lavar el gel con SSC 20x y montar la transferencia como se muestra en la Figura 2, utilizando membranas de hibridación y

múltiples capas de papel Whatmann y de filtro. La transferencia se mantiene durante 12 h, momento en el que se lava la membrana con 200 ml de SSPE 5x, pasando suavemente la mano por ambas caras para eliminar las sales pegadas. Para secarla se coloca entre 2 papeles Whatmann y entre dos cristales y se pone a 80°C durante 2 h.

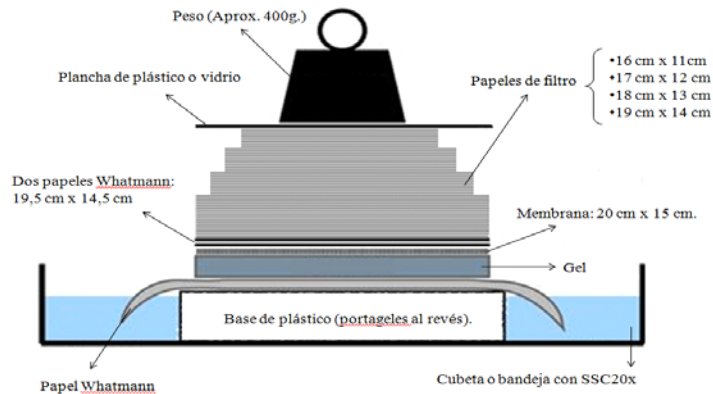


Figura 2. Montaje de transferencia del DNA a la membrana de hibridación

Para prehidratar la membrana se moja con 25 ml buffer SSPE 5x, enrollarla e introducirla en un tubo de hibridación e incubar 1 h a 65°C girando a 10 rpm en el horno de hibridación. Se prepara la sonda radiactiva y se realiza la hibridación en el horno durante toda la noche a 65°C. Para el lavado se añaden 25 ml de buffer de lavado de baja astringencia durante 15 min a 65°C en el horno con agitación, repitiendo esta operación dos veces más. Se vuelve a lavar de igual modo con el buffer de lavado de media astringencia 3 veces más. Y ya en una bandeja se lava con buffer de lavado (200 ml) de altas astringencias otras 3 veces. Posteriormente, se plastifica la membrana y se coloca dentro del cassette con pantalla intensificadora y con dos películas autorradiográficas encima de la membrana dentro del cassette y colocar a -80° C. Los resultados se obtienen tras el revelado de las películas.

RT-PCR (cuantitativa): análisis de expresión

Es una de las principales variantes de la técnica PCR y consiste simplemente en la realización de un primer paso de transcripción reversa seguido por los ciclos de PCR. Básicamente, lo que se hace es extraer RNA total y realizar una incubación con la enzima transcriptasa inversa (o transcriptasa reversa), la cual transforma el RNA en una cadena complementaria de DNA (se lo nombra como DNAc); una vez obtenido el DNAc se procede con un PCR normal.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Transformación genética de tomate con el gen *FALSIFLORA*

Para abordar el experimento de transformación genética en el tomate se ha seleccionado el cultivo de tomate P73, por su buena capacidad de transformación (Ellul y col., 2003). Utilizamos dos tipos de explantes primarios: cotiledones que tienen una alta capacidad regenerativa, y explantes de hojas ya que presentan menores niveles de poliploidía en las plantas regeneradas *in vitro*. La eficacia de este método de transformación, medida como número de callos resistentes a kanamicina respecto al número total de explantes inoculados (EET ó eficacia estricta de transformación) fue del 4,3% con cotiledones y un 4,8% con hojas en la línea P73 (Tabla 7).

Otra estima de la eficacia de transformación vendría determinada por la proporción del número total de plantas resistentes a kanamicina (caracterizadas mediante el test de enraizamiento en medio selectivo) respecto al total de explantes inoculados (ET o eficacia de transformación). En nuestro caso, la eficacia de transformación fue algo menor cuando se utilizaron los explantes de hoja que cuando los explantes fueron cotiledones.

Tabla 7. Resultados de la transformación genética de la línea P73 de tomate con la construcción del gen *FA*. **EET**(eficacia estricta de transformación) = número de callos resistentes a kanamicina que producen al menos una planta transgénica respecto al número total de explantes inoculados; **ET** (eficacia de transformación) = número de plantas resistentes a kanamicina en relación al número total de explantes inoculados.

Construcción 35S::FA sentido	Número explantos inoculados	Número de callos organogénic.	Número de callos (plántulas)	EET (%)	N°de ápices aislados	Plantas transformadas	
						N	ET(%)
P73 cot.	209	20	9	4,3	111	55	26,3
P73 hoja	168	21	8	4,8	72	35	20,8

Caracterización fenotípica de los transformantes primarios (TG1)

El tiempo de floración es un carácter que define el tiempo requerido para el cambio de una fase de desarrollo vegetativo a otra de desarrollo reproductivo. Dicho cambio tiene su inicio en la adquisición de un nuevo programa de desarrollo en el meristemo apical y depende de la interacción de factores genéticos y ambientales (Martínez-Zapater y Salinas, 1993). Este carácter puede ser evaluado a partir del número de hojas verdaderas que la planta requiere para iniciar la floración (Koorneef, 1991), que se conoce como tiempo ontogénico de floración, y desde el punto de vista del desarrollo vegetal es considerado el más exacto, porque es poco variable y no es dependiente de las condiciones ambientales.

El tiempo de floración en los testigos y las plantas transformadas se analizó en las plantas en invernadero. Tal y como puede observarse en la Figura 3, los resultados obtenidos para el número de hojas formadas hasta la aparición de la primera inflorescencia, demuestran que la introducción del gen *FA* produce efectos muy variables en este carácter, de tal forma que observamos algunos genotipos en los que se adelanta el tiempo de floración, mientras que en otros se retrasa (Fig. 3). En P73, de las 10 líneas TG1 estudiadas 6 presentan un retraso en la floración, siendo el más acusado el del genotipo 1^a (16 hojas), y 2 tienen un ligero adelanto. Esto podría explicarse por los distintos niveles de expresión génica observados en cada una de las líneas que pueden, en los casos en los que se observa un retraso acusado en el tiempo de floración, producir efectos de silenciamiento génico por mecanismos de cosupresión debido a la gran cantidad de copias de RNAs formados,

como ha sucedido en otros experimentos de transformación en tomate (Han y col., 2004). El adelanto en la floración es el efecto que esperaríamos por el incremento en los niveles de la proteína FA, como ocurre con el gen *LFY* (Nilsson y col., 1998), ya que controla, al menos parcialmente, la transición floral (Molinero-Rosales y col., 1999).

Una vez que la planta ha iniciado la floración, el crecimiento vegetativo continúa por medio de una yema axilar que adquiere dominancia apical (meristemo simpodial), y formará 2 ó 3 hojas hasta que se determina una nueva inflorescencia (Atherton y Harris, 1986), momento en el que de nuevo el crecimiento continúa por la yema axilar de la hoja más próxima, así, el crecimiento simpodial persiste de forma indeterminada. El número de fitómeros (formados por una hoja, un nudo y un entrenudo) que cada yema axilar produce antes de determinarse en inflorescencia y define el patrón de crecimiento de cada genotipo. Este carácter se evaluó como el número de hojas formadas entre 2 inflorescencias consecutivas (Fig. 3).

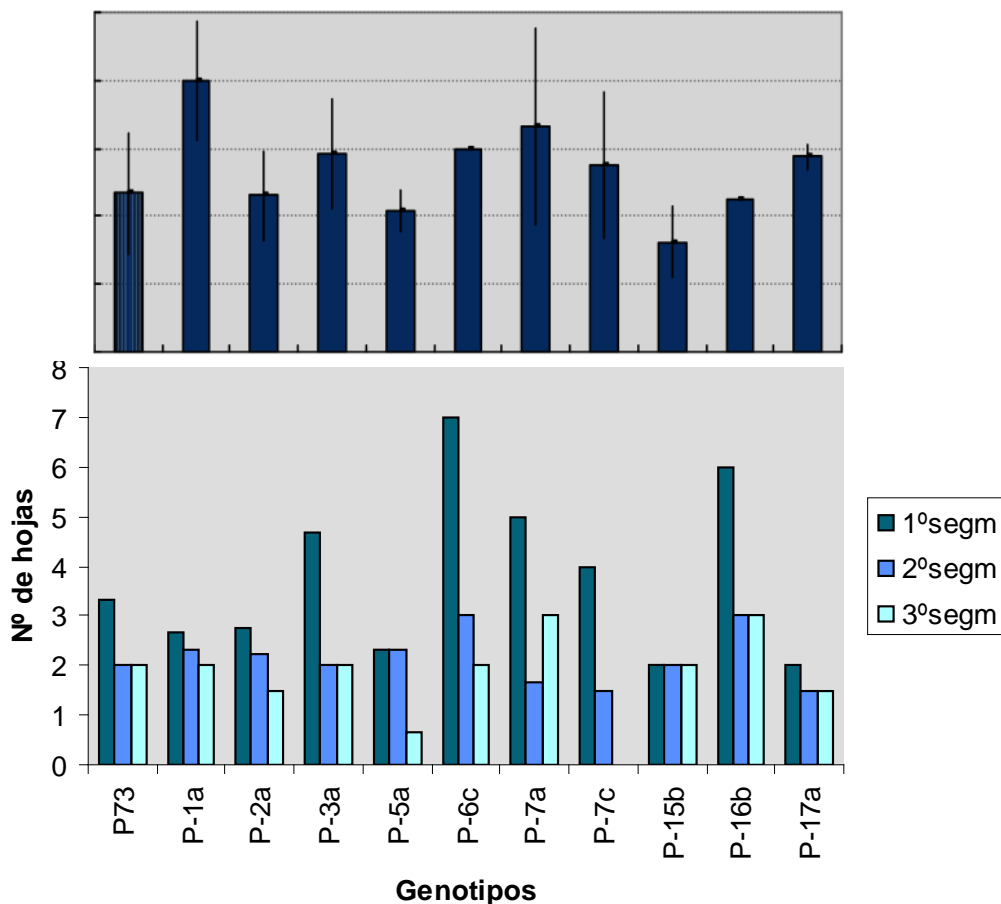


Figura 3.- Variación en el número de hojas desarrolladas: Arriba -hasta la 1ª inflorescencia (tiempo de floración) y Abajo - entre la 1ª y 2ª inflorescencia (1^{er} segmento simpodial), entre la 2ª y 3ª inflorescencia (2º segmento simpodial) y entre la 3ª y 4ª inflorescencia (3^{er} segmento simpodial) en las plantas control P73 y en la líneas TG1.

Comparando los valores obtenidos para el cultivo transgénico P73 con las plantas control encontramos un valor medio de 2,44 hojas entre inflorescencias. Las plantas transgénicas muestran un descenso en el número de fitómeros desde el primer segmento simpodial al resto, de forma que en el primer segmento se ha formado hasta 7 hojas (P-6c) (Fig. 3). En este conjunto de genotipos, en las que la planta control de las 3 ensayadas una se determinó, hemos encontrado 3 genotipos que muestran un hábito de crecimiento indeterminado (P-1 a , P-3 a y P-16 b), 4 que se determinan (P-5 a, P-7 a, P-7 c y P-17 a) y 2, al igual que el control, con una de las copias se determinada y la otra no (P-2 a y P-15 b).

El número de hojas por segmento simpodial resulta ser un carácter importante ya que influye en el número de inflorescencias. Este factor puede ser interesante al permitir obtener una mayor producción en menos tiempo, aunque hay que considerar que esto también depende de otros condicionantes, como puede ser el número de flores, el cuajado, el tamaño de los frutos, el manejo del cultivo, etc.

El potencial reproductivo por inflorescencia definido como el número de flores que produce la planta, que en este caso fue calculado como el valor medio por inflorescencia, y que puede dar una idea de la producción que se puede obtener de cada planta. En este trabajo hemos contabilizado el número de flores totales producidas hasta la 5ª inflorescencia. La línea P73 presentó potenciales reproductivos muy bajos, con solo 4,6 flores. Por ello, en algunas de las líneas derivadas de ella hemos encontrado un incremento en la producción de flores. En concreto, la línea P- 6c, 9,8 flores, más del doble que el testigo. Solo hemos encontrado un descenso en la formación de flores en la línea P-7c, con

la formación media de 2,6 flores (datos no mostrados). Por lo tanto, como valor aproximado de la capacidad de producir frutos, y según este, el cultivo P73 no es un cultivo con alto potencial reproductivo, pero la introducción del gen *FA* ha permitido mejorar este carácter en alguna de las líneas TG1.

Hemos evaluado la morfología o estructura de la inflorescencia desarrollada por estas plantas. Para analizar este carácter se evaluó la capacidad de división, estableciendo para ello 3 tipos de inflorescencia: racimo sencillo, racimo dividido y racimo complejo. Este factor también puede influir en el potencial reproductivo de la especie, así cuando este es elevado suele estar asociado a estructuras más divididas, aunque en ocasiones las inflorescencias sencillas también cuentan con un alto potencial reproductivo (Atherton y Harris, 1986).

El tipo de inflorescencias presentes en cada una de las plantas TG1 es muy variado, encontrando los 2 o 3 tipos de racimos (sencillo, dividido y/o complejo) (Tabla 8). La clasificación se ha hecho teniendo en cuenta el tipo de inflorescencia más frecuente en cada una de ellas, de tal forma que hemos encontrado, de forma general, la coexistencia de varios tipos en una misma planta. Esto indica que es un factor bastante influenciado por las condiciones ambientales, más que estar determinado genéticamente. No obstante, queda patente que la sobreexpresión del gen *FA* no afecta al desarrollo de la estructura de la inflorescencia.

Tabla 8.- Estructura de la inflorescencia de las líneas P73 y TG1. Se ha considerado en tipo de racimos (R) más frecuente de cada uno de ellos.

Genotipo	Tipo inflorescencia
P 73, P-5 a, P-6 c, P-15 b, P- 17 a	R. dividido
P-2 a, P-3 a, P-7 a, P-7 c	R. sencillo
P-1 a, P-16 b	R. complejo

Durante el desarrollo reproductivo se desarrollan las flores, dentro de las que se diferencian cuatro verticilos: dos verticilos más externos que están formados por sépalos y pétalos, cuya forma y estructura ha evolucionado en relación a la estrategia reproductiva de la especie, y dos verticilos internos, donde se forman los órganos reproductivos, estambres y carpelos. El estudio de los genes que controlan la identidad de los órganos florales se ha venido realizando mediante el análisis de mutantes homeóticos, los cuales presentan alteraciones en la identidad de los órganos situados en dos verticilos adyacentes de la flor. Es por ello que estos genes se les denominan genes homeóticos, habiéndose demostrado su papel clave en la regulación del desarrollo vegetal (Bowman y col., 1989; Weigel y Meyerowitz, 1994).

El tomate posee una flor con simetría radial, en la que se disponen cuatro verticilos concéntricos que están formados por cinco o más sépalos, cinco o más pétalos, un número similar de estambres que se sitúan de forma alterna a los pétalos, y un ovario bi- o plurilocular (Atherton y Harris, 1986) (Fig. 4A). Las flores P73 tienen un diámetro en antesis de aproximadamente 38 mm.

En el estudio del desarrollo floral en las plantas TG1 obtenidas a partir de P73, hemos encontrado algunas que presentan flores con morfología similar a su fondo genético (Fig. 4A), sin que se haya encontrado ninguna alteración ni en la identidad ni en el número de los órganos florales. Estas líneas son: P-2a, P-5a, P-6c, P-15b y P-16b; en casi todas ellas, a excepción de P-5a, hemos encontrado cierto grado de reversión de la inflorescencia de crecimiento determinado a crecimiento indeterminado (20-60% de las cinco primeras inflorescencias), con la aparición de un brote tras el desarrollo de las flores.

Las líneas P-7a y P-7c tienen una estructura similar tanto en el desarrollo de la planta como en el aspecto de la flor. Las plantas son enanas, de tal forma que alcanzan una altura media máxima, tras 3 meses de cultivo, de 94,3 cm, mientras que P73 supera los 3 m. Junto

a ello, desarrollan flores muy curiosas, con sépalos totalmente transformados en hojas, pétalos de color verde en la parte central, poco desarrollados y los estambres en mayor número del normal y no están elongados (Fig. 4 A y B). Los carpelos también aparecen en mayor número y se aprecia la falta de elongación de los estilos (Fig. 4B).



Figura 4.- Morfología floral de la planta P-7a. A) Flor P-7a comparada con la flor de su fondo genético (P73).B) Detalle de los verticilos internos de la flor.

Dentro de las plantas TG1 también hemos encontrado el desarrollo de flores sin estambres y con los sépalos alargados con aspecto de hojas y los pétalos sepaloideos. Prácticamente, en todas estas plantas descritas se observa la transformación de los órganos del segundo y el tercer verticilo floral, con alguna alteración del primer verticilo. La formación de pétalos y estambres está determinada por la combinación de las actividades de los genes tipo A y B y B y C en el segundo y tercer verticilo respectivamente. Así, mutaciones en estos genes produce transformaciones homeóticas en 2 verticilos adyacentes. En *Arabidopsis*, por ejemplo, las mutaciones en los genes de la clase B (*APETALA3* o *PISTILLATA*) producen la conversión de pétalos en sépalos y de estambres en carpelos (Bowman y col., 1989; Hill y Lord, 1989). De forma similar, las mutaciones de los genes de la clase B en *Antirrhinum* (*DEFICIENS* o *GLOBOSA*) originan las mismas transformaciones homeóticas (Sommer y col., 1990; Schwarz-Sommer y col., 1992; Tröbner y col., 1992).

El crecimiento y el tamaño del fruto maduro están determinados por el desarrollo del ovario que, a su vez, está influido por factores genéticos y por las condiciones medioambientales que ocurren durante la formación de la flor. El desarrollo del fruto depende principalmente de los acontecimientos que tienen lugar antes de la formación del fruto (durante el desarrollo de la flor, el desarrollo del ovario y la polinización), durante los procesos de división y expansión celular del fruto, durante el inicio de la maduración y de los requerimientos y disponibilidad de carbono y agua durante todo el proceso.

La línea P73 produjo frutos con un peso medio de 86,1 g. Las líneas TG1 derivadas de ella formaron frutos de un peso similar, a excepción de P-1 a, P-16 b y P-17 a que producen frutos de tamaño pequeño (Fig. 5). Las líneas P-6 c, P-7 a y P-7 c no ha desarrollado frutos. La variación en el tamaño del fruto en el tomate está íntimamente relacionada con el locus *fw2.2*, así como de las interacciones de este con otros locis implicados en este carácter (Nesbitt y Tanksley, 2002). Por lo que, de alguna forma, la sobreexpresión de *FA* y/o silenciamiento génico afecta a este locus, alterando el tamaño del fruto

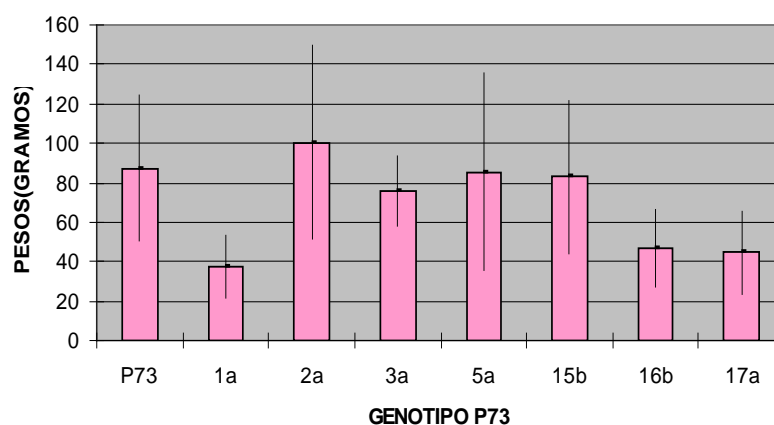


Figura 5.- Peso medio de los frutos de las plantas TG1 y de P73. Las barras representan el error estándar.

Caracterización molecular de la planta P-7a

Al objeto de identificar el fragmento del transgén en las plantas transformadas (TG1), así como en las plantas utilizadas como testigo, se llevaron a cabo reacciones de PCR utilizando el DNA genómico procedente de las hojas más jóvenes de las plantas mantenidas en invernadero. Para ello, se utilizaron como cebadores específicos a *LeFA*-for y *LBpROKII*, los cuales amplifican un fragmento de aproximadamente 1.300 pb. Los resultados obtenidos indicaron la presencia del transgén *FA* en el 70% de las plantas que habían sido seleccionadas en los test de enraizamiento con kanamicina (datos no mostrados) y en concreto, en el mutante seleccionado P-7a. Esto indica que en el 30% de plantas en las que no se ha introducido el transgén, si han incorporado el gen *nptII*, que le confiere la resistencia a la kanamicina, ya que este se sitúa en el borde derecho del T-DNA y está de acuerdo con el modelo de transferencia unidireccional propuesto por Wang y col. (1984) o pueden ser posibles escapes.

El segundo objetivo de la caracterización molecular del mutante P-7a fue analizar mediante Southern blot el número de inserciones del transgén que contenía en su genoma. El T-DNA usado para generar ésta planta transgénica posee el gen *NPTII* que le confiere, a la planta transformada, resistencia al antibiótico Kanamicina, usado como marcador de selección en los medios de cultivo. Por este motivo, la sonda utilizada en el ensayo de Southern blot fue una sonda quimérica obtenida de la fusión de los genes *FA* y *NPTII* (sonda *FA-NPTII*). El uso del gen *FA* en esta sonda nos permitió tener un control endógeno de la hibridación, puesto que está descrito en la bibliografía que el gen *FA* es de copia única en el genoma de tomate.

Como podemos observar en la figura 6 en la digestión *EcoRI* y *HindIII* observamos 5 señales de hibridación pertenecientes al fragmento *NPTII*, y una señal de hibridación que corresponde a nuestro control endógeno, el gen *FA*.

A tenor de los resultados obtenidos y habiendo estudiado el patrón de restricción del T-DNA, donde los enzimas de restricción: *EcoRI* y *HindIII* no cortan en la secuencia codificante del gen *FA*, por tanto, cada fragmento hibridado corresponde a una inserción independiente, podemos concluir que el mutante P-7a posee 5 inserciones independientes.

A pesar del alto número de copias del transgen, la importancia fenotípica y agronómica de este mutante insercional, justifica los esfuerzos realizados por intentar averiguar cuál de esas inserciones es la causante de las alteraciones fenotípicas observadas. Al tratarse de un mutante partenocárpico y de naturaleza dominante no podemos obtener progenies segregantes mediante autofecundación. Por tanto, la clonación de las regiones adyacentes a los T-DNAs, llevada a cabo mediante la metodología Anchor PCR (Liu et al, 1995; Gidoni et al, 2003), aportó una información crucial para abordar la caracterización funcional del mutante.

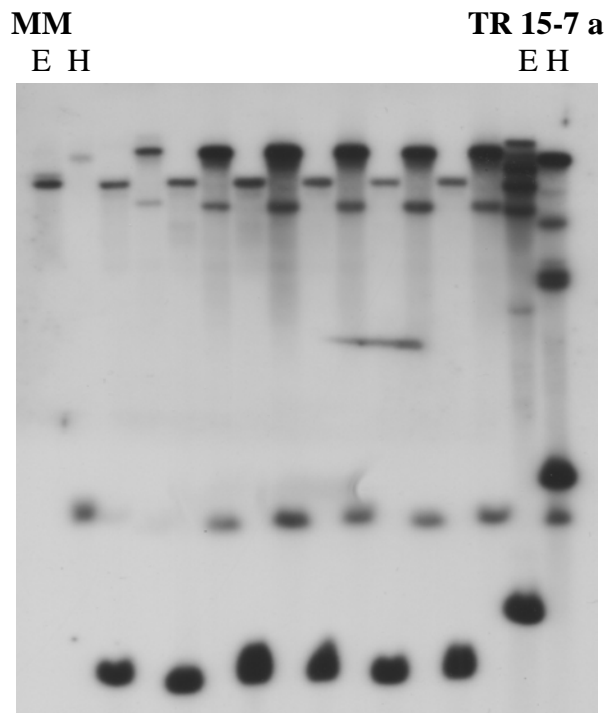
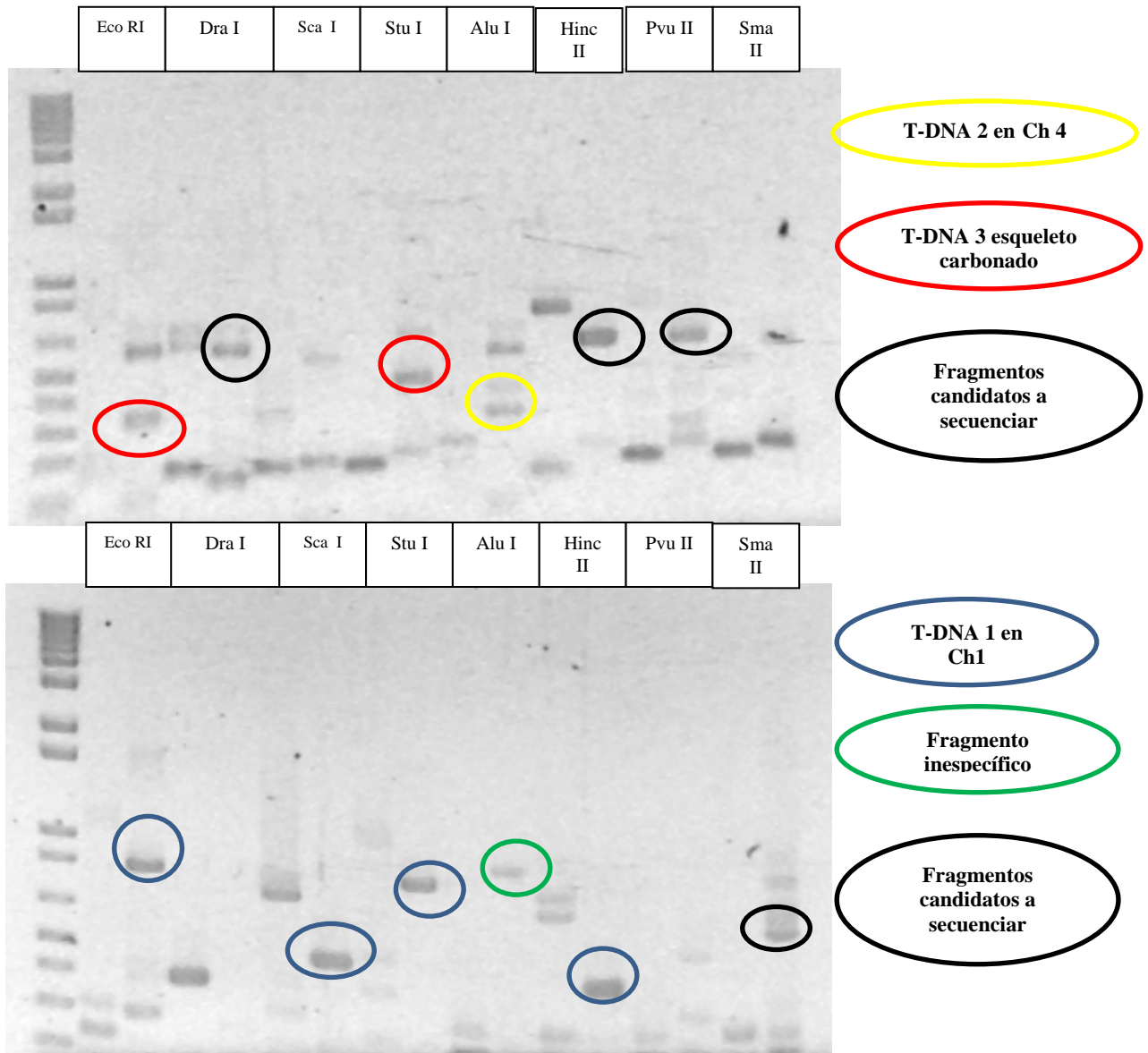


Figura 6.- Hibridación tipo Southern para determinar el número de copias. E = *EcoRI* y H= *HindIII*.

Obtuvimos fragmentos de amplificación tanto por el RB, como por el LB (Fig. 7). Estos amplicones fueron secuenciados y el análisis bioinformático de dichas secuencias arrojó la siguiente información:

Por el Left Border, el fragmento amplificado de la digestión AluI pertenecía a un T-DNA localizado en el cromosoma 4. Además, el análisis de la secuencia del fragmento de amplificación StuI reveló la existencia de una integración de T-DNA anormal, puesto que a continuación del Left Border se encuentra parte de la estructura del plásmido binario que porta al T-DNA. Tras realizar el estudio comparativo de las secuencias amplificadas en las Anchor PCR con respecto a las secuencias depositadas en las bases de datos (SGN y NCBI), pudimos observar que el fragmento de la digestión AluI del Left Border se encuentra interrumpiendo un gen que codifica para una enzima UDP-Xylosil transferasa, que participa en la formación de la pared celular.

Anchor PCR-LB



Anchor PCR-RB

Figura 7.- Anchor-PCR del mutante P-7a

Por el Right Border logramos secuenciar dos fragmentos distintos, a saber, en la digestión AluI se amplificó un artefacto de la reacción de PCR, resultando ser un fragmento de amplificación inespecífico puesto que no portaba las secuencias del T-DNA. Y en las digestiones EcoRV, ScaI, StuI y HincII amplificamos un mismo fragmento, el cual flanqueaba un T-DNA ubicado en el cromosoma 1, en una región de muy baja densidad génica.

Para corroborar que la presencia del T-DNA en el cromosoma 4 afecta a la expresión del gen adyacente que codifica una UDP-Xylosil transferasa, se llevó a cabo un experimento de PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR). Los niveles de expresión de nuestro gen fueron referenciados a un gen de expresión constitutiva, la ubiquitina, y a su vez los resultados fueron comparados entre el mutante y su fondo genético (Wild type).

Como podemos observar en la Figura 8, el nivel de expresión del gen UDP-Xylosil transferasa es sensiblemente menor en el mutante que en el WT, debido a la mutación posicional que ha generado la inserción del T-DNA.

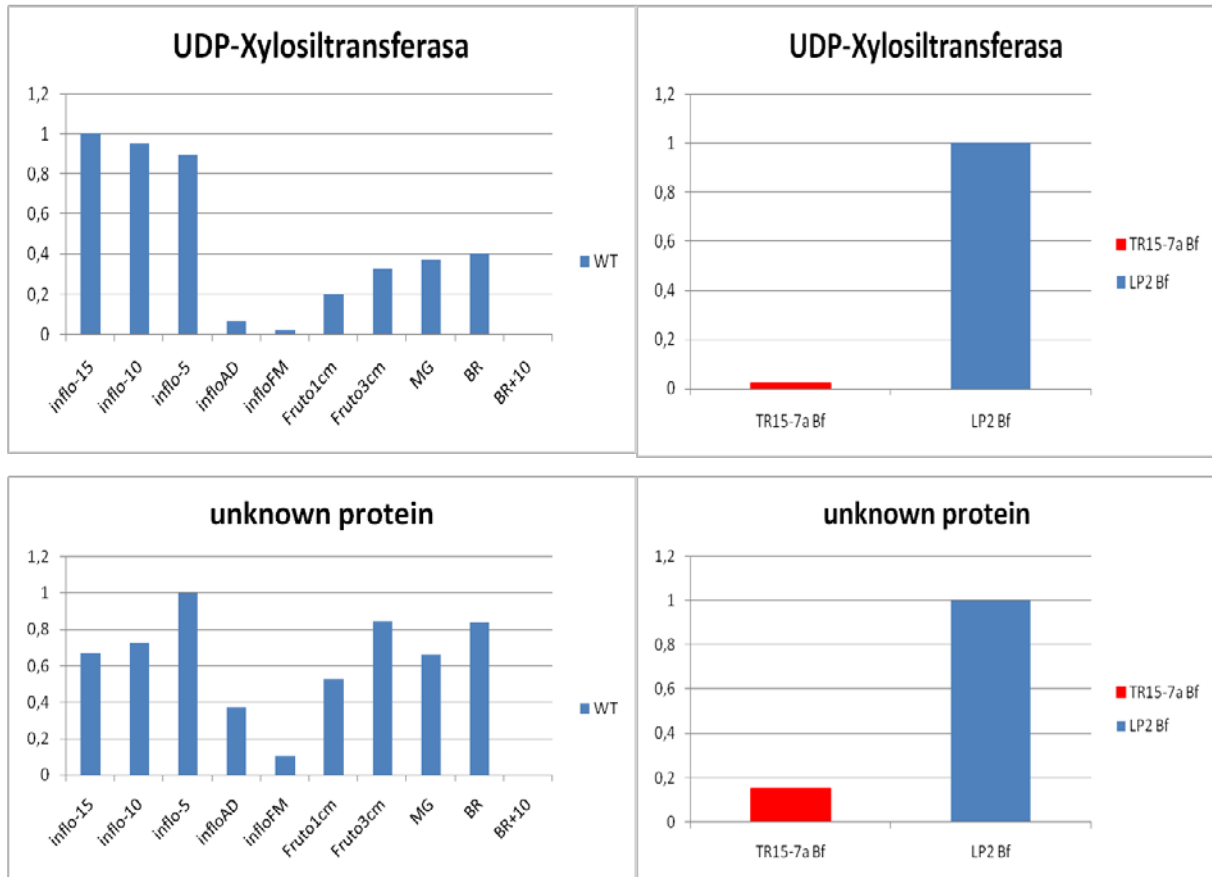


Figura 8.- Análisis cuantitativo (RT-qPCR) de la expresión de los genes clonados en el mutante P-7^a y en el WT.

Con el fin de demostrar que el gen mutado por la integración del T-DNA es el responsable de las alteraciones fenotípicas observadas en el transgénico P-7a, se llevarán a

cabo construcciones de silenciamiento génico y sobreexpresión, con el propósito de caracterizar funcionalmente dicho gen.

BIBLIOGRAFIA

Angarita Díaz M.P, 2009. Generación de líneas T-DNA de tomate e identificación de mutantes de inserción. Tesis doctoral. Universidad politécnica de Valencia.

Benavides F.J. y Jean-Louis Guénet. 2003. Manual de genética de roedores de laboratorio: principios básicos. Universidad de Alcalá.

Benfey P.N. and Chua N-H. 1989. Regulated genes in transgenic plants. Science. 244 (4901): 174-181.

Blázquez M.A. and Weigel D.2000. Integration of floral inductive signals in Arabidopsis. Nature.404: 889-892.

Bouchez D. and Höfte H. 1998. Functional genomics in plants. Plant Physiology. 118:725-732.

Ellul P., Angosto T., García-Sogo B., García- Hurtado N., Martín-Trillo M., Salinas M., Moreno V., Lozano L., Martínez- Zapater J.M. 2004. Expression of Arabidopsis *APETALA 1* in tomato reduces its vegetative cycle without affecting plant production. Molecular Breeding. 13: 155-163.

García Hurtado N. 2001. Introducción en tomate de dos genes de Arabidopsis thaliana (AP1 y LD) relacionados con el desarrollo floral y análisis fenotípico de plantas transgénicas de tomate que expresan el gen AP1. Trabajo fin de carrera. Universidad politécnica de Valencia.

Izquierdo Rojo M. 2001. Ingeniería genética y transferencia genética. Editorial pirámide.

Krysan P.J.,Young J.C.,Sussman M.R.1999.T-DNA as an Insertional Mutagen in Arabidopsis. Plant Cell.11: 2283:2290.

Molinero- Rosales N., Latorre A., Jamilena M., Zurita S., Gómez P., Capel J., Lozano R.1999. Falsiflora, the tomato orthologue of Floricaula and Leafy, controls flowering time and floral meristem identity. *Plant Journal* 20(6):685-693.

Peña L. (2000). Biotecnología vegetal: Transformación genética de plantas. En: *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Azcón- Bieto J y Talón M (eds.) Mc Graw-Hill, Interamericana.

Piñeiro M. y Coupland G.1998. The control of flowering time and floral identity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 117:1-8.

Rick C.1978. El tomate. *Investigación y Ciencia*. Octubre: 45-55.

Tinland, B.1996. The Integration of T-DNA into Plant Genomes. *Trends in Plant Science*. 1(6): 178-183.