



## **TRABAJO FIN DE GRADO**

# Caracterización fenotípica y molecular del mutante insercional de tomate *1600-etmm*

**Autor:** Felipe Gómez Rodríguez

**Tutores:** María Trinidad Angosto Trillo

Abraham Samuel Quevedo Colmena

### **Grado en Biotecnología**

Departamento de Biología y Geología

Grupo de Genética y Fisiología del Desarrollo Vegetal, AGR-176

Facultad de Ciencias Experimentales

UNIVERSIDAD DE ALMERIA

Curso Académico: 2020/2021

Almería, Julio 2021

## RESUMEN

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es uno de los cultivos hortícolas más importantes a nivel mundial en cuanto a su relevancia económica y producción, además de ser un excelente modelo de estudio de frutos carnosos. Hoy día, existen colecciones de mutantes disponibles para la mejora genética y el estudio de la función de genes relevantes desde un punto de vista agronómico. La mutagénesis insercional es una de las herramientas biotecnológicas muy útil para aislar e identificar dichos genes y se basa en la inserción de una construcción génica de secuencia conocida en una región al azar del genoma alterando la función del gen o genes en los que se inserta. El Grupo de Genética y Fisiología del Desarrollo Vegetal de la Universidad de Almería, AGR176, cuenta con una colección de mutantes insercionales con objeto de identificar los genes esenciales que regulan el desarrollo y maduración del fruto, así como los procesos fisiológicos implicados en el crecimiento de la planta. En este trabajo se ha llevado a cabo la identificación y caracterización del mutante *1600-etmm*, cuyo fenotipo muestra un claro retraso en el desarrollo del porte vegetativo y clorosis en las hojas, indicativo del inicio de senescencia prematura en las mismas. Utilizando la estrategia Anchor-PCR se ha conseguido aislar e identificar el gen etiquetado y, con estos datos, se ha caracterizado *in silico*. Mediante un análisis bioinformático del gen se determinó que el inserto de T-DNA se encontraba en el extremo 3'UTR de un gen que codifica para un dominio funcional de un factor de transcripción de la superfamilia BSD. Se llevó a cabo un estudio de co-segregación entre el inserto de T-DNA y el fenotipo mutante *1600-etmm* mediante PCR, demostrando que dicho inserto era el responsable del fenotipo mutante. Por último, se realizó un análisis *in silico* y se determinó que los factores de transcripción que presentan dominios BSD se encuentran altamente conservados en multitud de especies. Sin embargo, por distintos procesos de especiación, la función de dichos factores es distinta en cada especie. En tomate, resultan de elevada importancia en la regulación de la calidad del fruto y de distintos procesos fisiológicos, como el crecimiento vegetativo y la senescencia de las hojas.

Palabras clave: *Solanum lycopersicum*, mutagénesis insercional, anchor-PCR, crecimiento vegetal y senescencia, factor de transcripción familia BSD.

## ABSTRACT

Tomato (*Solanum lycopersicum*) is one of the most important horticultural crops worldwide in terms of economic relevance and production, as well as being an excellent model for the study of fleshy fruits. Nowadays, there are collections of mutants available for genetic improvement and the study of the function of relevant genes from an agronomic point of view. Insertional mutagenesis is a very useful biotechnological tool to isolate and identify these genes. This method is based on the insertion of a gene construct whose sequence is known in a random region of the genome, altering gene expression. The Group of Genetics and Physiology of Plant Development of the University of Almeria, AGR176, has a collection of insertional mutants in order to isolate essential genes that regulate the development and maturation of the fruit, as well as the physiological processes involved in the growth of the plant. In this work we have carried out the isolation and *in silico* characterization of the gene labeled in the *1600-etmm* mutant, whose phenotype shows a clear delay in the development of vegetative growth and leaf chlorosis, indicating premature leaf senescence. Gene isolation was carried out using the anchor-PCR strategy, and bioinformatic analysis of the gene determined that the T-DNA insert was located in the 3'UTR end of a gene that codes for a functional domain of a transcription factor of the BSD superfamily. A co-segregation study between the T-DNA insert and the *1600-etmm* mutant phenotype was carried out by PCR, which supports that this insert is responsible for the mutant phenotype. *In silico* analysis performed and that transcription factors that present BSD domains are highly conserved in a multitude of species. However, due to different speciation processes, the function of these factors is different in each species. In tomato, they are of great importance in the regulation of fruit quality and different physiological processes, such as vegetative growth and leaf senescence.

Key words: *Solanum lycopersicum*, insertional mutagenesis, anchor-PCR, plant growth and senescence, transcription factor BSD family.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

1. El tomate.....	1
1.1. Importancia económica y nutricional.....	1
1.2. Taxonomía y descripción botánica.....	3
1.3. Centro de origen, domesticación y distribución.....	5
1.4. El tomate como especie modelo.....	7
2. Mutagénesis y agentes mutágenos.....	9
2.1. Mutagénesis insercional.....	10
2.2. Trampas génicas.....	12
3. Relevancia de los factores de transcripción en el crecimiento y desarrollo vegetal.	14
I. OBJETIVOS .....	17
II. MATERIAL Y MÉTODOS .....	18
1. Material vegetal.....	18
2. Extracción y cuantificación del ADN.....	19
3. Identificación de las secuencias que flanquean al inserto de T-DNA .....	19
4. Análisis de co-segregación inserto T-DNA y el fenotipo mutante.....	22
5. Análisis <i>in silico</i> del gen.....	23
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	24
1. Caracterización fenotípica y análisis genético del mutante <i>1600-etmm</i> .....	24
2. Identificación del gen responsable del fenotipo mutante .....	25
3. Análisis de co-segregación entre el inserto de T-DNA y el fenotipo mutante .....	27
4. Caracterización <i>in silico</i> del gen.....	29
IV. CONCLUSIONES.....	33
V. PERSPECTIVAS FUTURAS .....	34
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	35

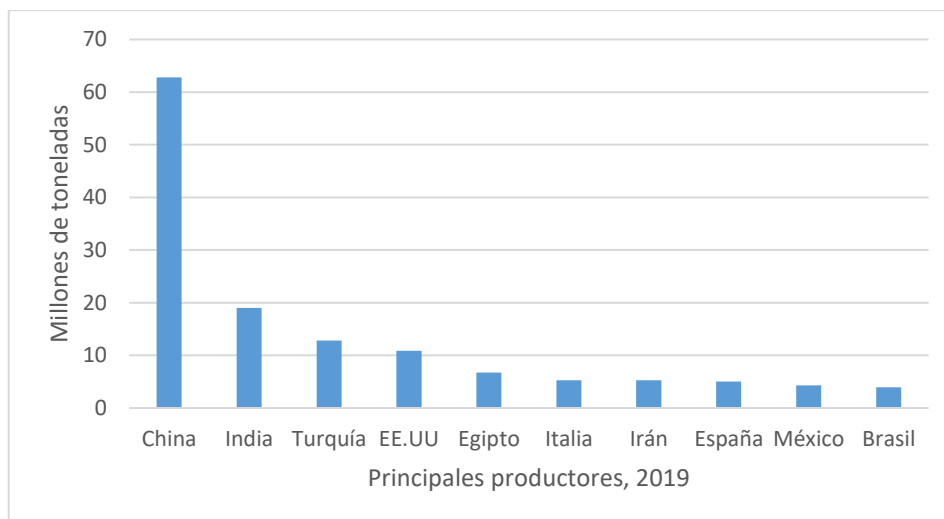
# INTRODUCCIÓN

## 1. El tomate

### 1.1. Importancia económica y nutricional

El tomate cultivado, *Solanum lycopersicum* L. constituye uno de los cultivos hortícolas más relevantes a nivel mundial. Pertenece a la familia *Solanaceae*, que incluye a más de 3.000 especies entre las que destacan aparte del tomate, la patata (*S. tuberosum* L.), el pimiento (*Capsicum annuum* L.) y la berenjena (*S. melongena* L.), que concentran la mayor parte de la producción de hortalizas en el mundo, junto al tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) y las petunias (*Petunia x hybrida* E. Vilm.), cultivos de gran interés desde el punto de vista económico y ornamental (Knapp y Peralta, 2016). Entre todos, destaca el tomate por su importancia económica, debido a que en las últimas décadas ha aumentado su producción, siendo ésta, en el año 2019, de 180.766.329 toneladas a nivel global, empleando para ello una superficie cultivada de 5.030.545 hectáreas (FAOSTAT, 2020). España ocupa el octavo puesto de entre los principales productores de tomate a nivel mundial en 2019, produciendo el 2,76% del total: 5.000.560 de toneladas, empleando para ello 56.940 de hectáreas (Fig. 1). Este alto porcentaje se debe al incremento de su producción en los últimos años gracias, fundamentalmente, al desarrollo de variedades híbridas más productivas y al elevado rendimiento de la producción intensiva bajo cubierta. También han contribuido la mejor manipulación y durabilidad del almacenamiento, así como la calidad del cultivo, la resistencia a plagas, y las nuevas técnicas de procesamiento del tomate (Watson y Preedy, 2008).

El tomate es un cultivo que ha adquirido gran popularidad en las últimas décadas por la demostración de la actividad antioxidante y anticancerígena del licopeno (Gerszberg *et al.*, 2015). Algunos estudios consideran que el licopeno está directamente relacionado con una disminución en la incidencia de las enfermedades cardiovasculares (Arab y Steck, 2000). El elevado valor nutritivo del fruto se basa en que es fuente de licopeno, además de  $\beta$ -caroteno (pro-vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C), flavonoides y otros compuestos fenólicos, e incluso contienen unas cantidades considerables de otras vitaminas (tiamina, riboflavina y niacina) (Naika *et al.*, 2005; Sainju y Dris, 2006).



**Figura 1.** Producción de tomate fresco de los diez principales productores a nivel mundial en 2019. Fuente: FAOSTAT (2020).

Actualmente se cultivan una gran cantidad de variedades con diferentes formas, tamaños, color, textura y sabor, que dependen del mercado y del uso al que estén destinados (Fig. 2), que se han ido desarrollando como respuesta a la diversidad de la demanda (Leonardi *et al.*, 2000). Se utilizan en alimentación, tanto como producto fresco como su uso en alimentos procesados.



**Figura 2.** Variedades to tomate cultivadas en las que se demuestra la gran biodiversidad en los frutos de esta especie. Fuente: <https://agriculturers.com/variedades-de-tomates/>

Por lo tanto, sus cualidades organolépticas, la existencia de un gran número de variedades, su rapidez de cultivo y la capacidad de cultivarlo en un amplio rango de ambientes, ratifica su importancia a nivel económico y el porqué de su elevada explotación.

## 1.2. Taxonomía y descripción botánica

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una angiosperma dicotiledónea plurianual que pertenece a la familia de las Solanáceas (Peralta *et al.*, 2008). Esta familia está compuesta por 98 géneros y alrededor de 3.000 especies (Olmstead y Bohs, 2006), muchas de ellas tienen una elevada importancia económica y social. Estas especies presentan una amplia variedad genética gracias a lo cual crecen en una gran diversidad de hábitats, encontrándose distribuidas por toda la superficie terrestre (Jenkins, 1948). La clasificación actual del tomate cultivado, según el ITIS (Integrated Taxonomic Information System), es la siguiente:

Reino: Plantae

Subreino: Viridiplantae

Infrareino: Streptophyta

Superdivisión: Embryophyta

División: Tracheophyta

Subdivisión: Spermatophyta

Clase: Magnolopsida

Superorden: Asteranae

Orden: Solanales

Familia: Solanaceae

Género: *Solanum* L.

Especie: *Solanum lycopersicum* L.

El tomate es una planta de porte arbustivo y de tipo perenne, aunque su cultivo se realiza de forma anual. Su desarrollo suele ser de forma erecta o semierecta, aunque también puede darse de forma rastrera. El tallo principal tiene un grosor de entre 2 y 4 cm de diámetro, de color verde y con entrenudos de 1 a 6 cm de largo, sobre el que se desarrollan las hojas y en sus axilas los tallos secundarios y las inflorescencias. Las hojas son de tipo compuestas imparpinnadas, con un foliolo terminal de mayor tamaño y con 7-11 foliolos lobulados, peciolados y con bordes enteros o dentados dispuestos de forma alterna sobre el tallo (Fig. 3). Tanto los tallos como las hojas están recubiertos de tricomas que pueden ser de tipo glandular o no glandular, siendo los responsables del olor característico del tomate. El meristemo apical vegetativo se localiza en el extremo más distal del tallo y es donde se inician los primordios foliares.

El sistema radicular de la planta de tomate, que está formado por una raíz principal de la que parten un elevado número de raíces secundarias y raíces adventicias que surgen de la

parte inferior del tallo principal (Fig. 3). La raíz principal no suele profundizar más de 0,5 m bajo tierra, pero las raíces secundarias pueden alcanzar hasta 1,5 m alrededor de la planta y suelen desarrollarse sobre los 0,2 m de profundidad. El tomate es capaz de adaptarse a un elevado rango de suelos y climas, aunque prefiere un clima cálido y puede de crecer en suelos moderadamente salinos (Ochoa-Reyes *et al*, 2013).

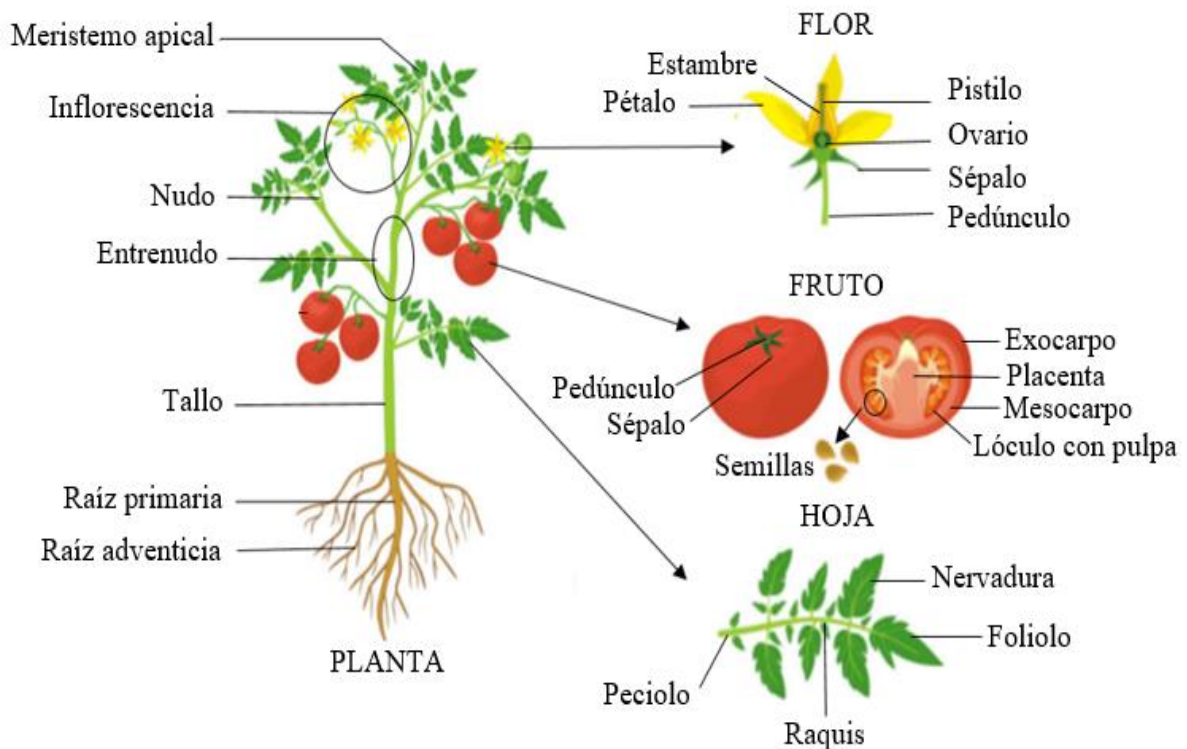
Según la variedad, el hábito de crecimiento puede ser determinado (monopodial) o indeterminado (simpodial) (Argerich, 1995). La diferenciación de la primera inflorescencia en plantas de crecimiento determinado ocurre entre la 5ª y 7ª hoja, a partir de este momento se reduce el número de hojas para formar la siguiente inflorescencia terminando en un racimo floral. Sin embargo, en plantas de crecimiento indeterminado, tras la formación de 6 o más hojas verdaderas, según genotipo, el meristemo apical sufre una transición floral dando lugar a una primera inflorescencia, mientras que a través del meristemo axilar (meristemo simpodial) situado inmediatamente bajo la inflorescencia continúa el crecimiento y desarrollo de la planta, pues adquiere dominancia apical. Este meristemo da lugar a una inflorescencia de tipo dicasio cada tres hojas y cuya yema terminal da lugar a otra inflorescencia, repitiéndose este patrón de forma indefinida (Lozano *et al.*, 2009).

La inflorescencia es compuesta, de tipo racemoso, que contiene un número variable de flores, generalmente de 7 a 12. Se produce a partir del meristemo de inflorescencia que da lugar a un meristemo floral que formará la primera flor, a partir de un nuevo meristemo floral, se producirá la segunda flor y así sucesivamente. La flor del tomate es perfecta, actinomorfa, hermafrodita, con ovario súpero que puede ser bi o plurilocular, con 5-6 sépalos, pétalos y estambres, insertados en forma helicoidal, envolviendo al gineceo (Argerich, 1995). El gineceo contiene al ovario con un delgado pistilo acabado en el estigma, que favorece la autopolinización, al estar dentro del cono estaminal formado por la fusión lateral de los estambres (Fig. 3), lo que hace del tomate una especie autógena (Lozano *et al.*, 2009).

El fruto del tomate es una baya carnosa con una superficie lisa o lobulada que varía en forma, tamaño, color, composición y consistencia dependiendo de la variedad (Chamarro, 1995). En general, su forma es globular u ovoide y su interior está compartimentado en lóculos (de 2 a 12 o más), dependiendo principalmente del genotipo y factores externos o ambientales (Jones-Jr, 2007), que se originan tras la fecundación a partir del engrosamiento de las paredes del ovario (Fig. 3). Principalmente es de color rojo al madurar, aunque también existen cultivares con frutos verdes, rosados, anaranjados o amarillos. En los lóculos se



forman las semillas, de forma lenticular, compuestas por la cubierta seminal y el embrión rodeadas de una matriz gelatinosa (Argerich, 1995).



**Figura 3.** Anatomía de la planta, flor, fruto y hoja de tomate.

### 1.3. Centro de origen, domesticación y distribución

El centro de origen del tomate es la región Andina que actualmente comparten Colombia, Bolivia, Perú, Chile y Ecuador. Existen distintos estudios genéticos que tienen como objetivo determinar el origen de la domesticación del tomate, los cuales sostienen que la domesticación se ha llevado a cabo en dos etapas: una predomesticación en América del Sur seguido de una domesticación en Mesoamérica (Blanca *et al.*, 2012). La primera etapa se llevó a cabo en Ecuador y Perú, de forma que se obtuvo la especie *S. lycopersicum* variedad *cerasiforme* (SLC) a partir de *S. pimpinellifolium* (SP), que presenta frutos pequeños tipo cherry. Ambas especies comparten características con la especie actualmente cultivada. En la segunda etapa se realizó una selección adicional, la cual dio lugar a la especie de fruto grande actual (Blanca *et al.*, 2015). Sin embargo, estudios recientes de secuenciación masiva apoyan que hace unos 78.000 años se originó en Ecuador la especie SLC sin intervención humana (Razifard *et al.*, 2020). En cualquier caso, dichos estudios sostienen que la especie SLC es el punto intermedio entre SP y la especie actualmente cultivada *Solanum lycopersicum* L. variedad *lycopersicum*. La especie SLC fue exportada a México en primer

lugar como una mala hierba, allí alcanzó un elevado grado de domesticación (Peralta *et al.*, 2006). Evidencias lingüísticas, históricas y genéticas apoyan que el centro de domesticación más probable del tomate es México a partir de la especie SLC, donde crece de manera silvestre en regiones tropicales y subtropicales (Nuez, 1995).

En el siglo XVI tras el descubrimiento de América, el tomate fue importado a Europa convirtiéndose en un cultivo de gran importancia económica (Gerszberg *et al.*, 2015). En las primeras importaciones probablemente solo unas pocas semillas de tomate fueron transportadas de México a Europa, continente en el que posteriormente *S. lycopersicum* encontraría su centro secundario de diversificación (García-Martínez *et al.*, 2006; Bauchet y Causse, 2012). En Europa, en los siglos XVIII y XIX, se consiguió una mayor e intensa domesticación en el momento en el que pasó a formar parte de la alimentación europea e inició su distribución a nivel global (Sims, 1980; Nuez, 1995), siendo actualmente uno de los principales cultivos hortícolas del mundo.

La aceptación del tomate en Europa ocurrió de manera muy desigual. En España, Portugal e Italia pasó a formar parte de la gastronomía popular mientras que en el resto de Europa en las primeras referencias del siglo XVI se detalla el uso del tomate como ornamental, debido a su cercanía botánica con otras solanáceas tóxicas ricas en alcaloides ya presentes en Europa, como la Belladona (*Atropa belladonna*) (Bauchet y Causse, 2012). Este pensamiento perduró en ciertas zonas del centro y norte de Europa hasta finales del siglo XIX.

Desde el siglo XX, la mejora genética ha permitido que se obtengan una gran variedad de cultivares y formas morfológicamente diferentes a partir de la especie *S. lycopersicum*. La elevada presión de selección ha ido reduciendo la variación genética del tomate, lo que queda comprobado al comparar los escasos polimorfismos existentes en los cultivos de tomate de Europa respecto al número de polimorfismos que se encuentran en Centro América y Sur América. Esta selección de caracteres otorgó al tomate un crecimiento más compacto, reducción o pérdida de la dispersión de semillas y de la dormancia, gigantismo, aumento de la dominancia apical y mayor diversidad del fruto (Frary y Doganlar, 2003).

La mayoría de los avances en la domesticación del tomate se realizaron mediante el fenotipado de la morfología de sus frutos con el fin de aumentar la variabilidad del tamaño y forma de los mismos. Estudios basados en marcadores moleculares sugieren que estos caracteres morfológicos podrían estar controlados por nueve locis entre los que destacan *FRUIT WEIGHT* (otorgando una diferencia del 30% en el tamaño del fruto entre especies

silvestres y domesticadas), *SUN*, *OVATE*, *FASCIATED (FAS)* y *LOCULE NUMBER (LC)* (encargados de modificar el número de lóculos y la forma del fruto) (Bai y Lindhout, 2007; Rodríguez *et al.*, 2011). Se ha propuesto que los cambios ocurridos en el tamaño del fruto durante su domesticación se deben principalmente a mutaciones en *LC* y *FAS*, ortólogos de los genes de *Arabidopsis* *WUSCHEL (WUS)* (Muños *et al.*, 2011) y *CLAVATA3 (CLV3)* (Xu *et al.*, 2015), respectivamente. De modo que las mutaciones *lc* y *fas* ocasionan un incremento en el tamaño del meristemo floral y producen un aumento del número de carpelos en el ovario durante la organogénesis floral.

A su vez, estudios recientes del grupo de investigación AGR176, donde se ha llevado a cabo este trabajo, han permitido identificar un nuevo regulador del tamaño del fruto de tomate, *EXCESSIVE NUMBER OF FLORAL ORGANS (ENO)*, el cual codifica un factor de transcripción de la superfamilia APETALA2/Ethylene Responsive Factor (AP2/ERF) que es capaz de unirse a una región específica del promotor de *SIWUS* (Yuste-Lisbona *et al.*, 2020). ENO es un nuevo componente regulador del tamaño del fruto, cuya falta de función incrementa significativamente el tamaño del meristemo floral, dando lugar a frutos de mucho mayor calibre (Fernández-Lozano *et al.*, 2015). Asimismo, el análisis de la historia evolutiva de la región genómica donde se ubica *ENO* en más de 600 accesiones de tomate ha mostrado que en el ancestro salvaje del tomate (*S. pimpinellifolium*) existen diferentes variantes genéticas de este *locus*, una de las cuales representa una delección de 85 pb en la región promotora del gen, la cual está asociada con un mayor número de lóculos en el fruto y fue seleccionada durante la domesticación, estableciendo así el fondo genético propicio para aumentar el tamaño del fruto en los tomates modernos (Yuste-Lisbona *et al.*, 2020).

En la actualidad, los caracteres con más repercusión comercial son el sabor y el valor nutricional (influenciados por gran cantidad de QTLs), la maduración (gen *RIN*), la heterosis (para aumentar el vigor), y la resistencia a plagas o enfermedades y estreses abióticos.

#### **1.4. El tomate como especie modelo**

*Arabidopsis thaliana* es, por excelencia, la especie modelo en plantas dicotiledóneas. Sin embargo, es necesario el uso de otras especies para el estudio del crecimiento y desarrollo de los frutos carnosos. La importancia económica del tomate, así como sus características biológicas, que relacionan la fisiología de la planta y su genética, le han convertido en la especie más estudiada en el ámbito de las ciencias agrarias, la mejora genética y la biotecnología vegetal, y representa un excelente modelo de estudio. Adicionalmente, suple

características que otras plantas modelo no poseen, como frutos carnosos, un desarrollo simpodial y hojas compuestas (Kimura y Sinha, 2008; Gerszberg *et al.*, 2015). Sobre todo, ha sido fundamental para la disección genética del desarrollo de frutos carnosos en la mejora de los cultivos de solanáceas, la integración de herramientas genómicas, el estudio de la diversidad evolutiva y en estudios fisiológicos, celulares y bioquímicos (Moyle, 2008). Del mismo modo, representa un buen modelo para el estudio de la interacción planta-patógeno, debido a su susceptibilidad para ser infectada por un gran número de enfermedades causadas por hongos, bacterias, virus, viroides y nematodos (Arie *et al.*, 2007). Inclusive, actúa como especie modelo en el estudio del papel del etileno en la maduración, la senescencia y la respuesta a estreses abióticos (Alexander y Grierson, 2002).

Algunas de las características biológicas del tomate que favorecen su relevancia a nivel científico derivan del hecho de que es una planta autógena, con un ciclo de vida relativamente corto, capaz de adaptarse bien a distintos tipos de suelos y condiciones ambientales, tiene insensibilidad al fotoperiodo, por lo que puede florecer y producir semillas tanto en ciclos de días largos como en cortos, es fácil realizar una polinización de manera dirigida y generar híbridos, entre otras (Foolad, 2007). Gracias a su capacidad de regeneración y aptitud para la transformación genética es posible seleccionar y clonar plantas transformadas mediante distintas técnicas de cultivo *in vitro* (Bergougnoux, 2014). Junto a esto se suma que es una especie diploide ( $2n = 24$ ), con un genoma relativamente pequeño, aproximadamente 900 megabases, organizado en 12 cromosomas (Michaelson *et al.*, 1991), que ha sido secuenciado y publicado (The Tomato Genome Consortium, 2012). Asimismo, se dispone de un elevado número de recursos fitogenéticos en el banco de germoplasma *Tomato Genetic Resource Center (TGRC)*, con una colección de especies que abarca a representantes de las especies de todas las secciones, además de mutantes monogénicos (mutaciones espontáneas e inducidas) y líneas de introgresión, entre otras reservas genéticas. Esta colección es un material excelente para la mejora genética y el estudio de la función e interacción de distintos genes implicados en la regulación del crecimiento y desarrollo de la planta de tomate (Lozano *et al.*, 2009).

El tomate se afianza como planta modelo con la publicación de su genoma en 2012, así como la cantidad de recursos genéticos disponibles (mapas físicos y genéticos saturados) y una completa base de datos (SolGenomics Network, SGN, <https://solgenomics.net/>). La plataforma SGN pone a disposición una amplia gama de herramientas bioinformáticas, además de colecciones de EST (*Expressed Sequence Tag*) y marcadores moleculares.

Asimismo, estudios derivados de la secuenciación del genoma han permitido la predicción de 34.727 genes codificantes (The Tomato Genome Consortium, 2012). La continua mejora en el proceso de anotación del genoma por parte del International Tomato Annotation Group (ITAG) ha promovido la existencia de bases de datos con información útil de nuevos genes y funciones génicas (<http://ted.bti.cornell.edu/>) y patrones de expresión en diferentes tejidos y órganos deducidos del análisis transcriptómico realizado (<http://tomexpress.toulouse.inra.fr/>).

## **2. Mutagénesis y agentes mutágenos**

El término mutación engloba tanto a cambios puntuales producidos en un único gen por sustitución o delección de un nucleótido como aquellos que afectan a segmentos cromosómicos o cromosomas completos (Cubero-Salmerón, 2003). Las mutaciones consisten en cualquier modificación heredable de la secuencia de ADN. Por tanto, las mutaciones son responsables de la variabilidad genética en una población (Guízar-Vázquez, 1994), puesto que dan lugar a los distintos alelos que caracterizan a la multitud de fenotipos observados para un determinado carácter.

Según su origen, las mutaciones se clasifican en espontáneas o inducidas. Las mutaciones espontáneas son la base de la evolución, ocurren de forma natural generalmente debido a errores en la maquinaria celular durante el proceso de replicación del ADN y son responsables de la selección natural. Las mutaciones inducidas se producen de forma artificial al aplicar distintos agentes mutagénicos que modifican el ADN y se clasifican en tres grupos (Fernando, 2012):

- a) Mutágenos físicos: radiaciones que alteran la estructura y secuencia del ADN al elevar la probabilidad de un evento de mutación provocando roturas, distorsiones y/o rearrreglos en la cadena de ADN. La radiación ultravioleta da lugar a dímeros de pirimidina, los cuales están implicados en la mutagénesis y muerte celular, y para los que existen distintos mecanismos de reparación celular. Cabe destacar el papel de las radiaciones ionizantes por su capacidad de provocar aberraciones cromosómicas como roturas o translocaciones cromosómicas.
- b) Mutágenos químicos: son compuestos que cambian químicamente las bases produciendo errores de apareamiento entre las mismas, alterando la estructura del ADN al ocasionar inestabilidad. Los agentes alquilantes, como el etil metano sulfonato (EMS) o el diepoxibutano, son un grupo de compuestos químicos que

alquilan los ácidos nucleicos dando lugar a distintos productos. Esto es debido a que todos los oxígenos y nitrógenos de las bases de los ácidos nucleicos pueden ser alquilados. Otros mutágenos químicos, como la ciclofosfamida, la colchicina o los análogos de base como la 6-mercaptapurina, inducen distintos tipos de alteraciones: aneuploidías, roturas cromosómicas e inserciones, entre otras.

- c) Mutágenos biológicos: cualquier organismo capaz de alterar la secuencia del material genético de su hospedador se considera un mutágeno biológico. Dentro de este grupo se incluyen transposones, bacterias, virus y hongos. Los virus presentan enzimas de restricción capaces de insertarse en el ADN hospedador, rompiendo la secuencia y produciendo inserciones y deleciones. Los transposones son secuencias de ADN que presentan la capacidad de insertarse en una nueva localización del genoma, generando una mutación por inserción.

## 2.1. Mutagénesis insercional

La mutagénesis insercional es una herramienta biotecnológica en la que se asocia el análisis genético tradicional con las técnicas modernas de genética molecular, a fin de identificar genes responsables del fenotipo observado en las plantas mutantes (Jeon *et al.*, 2000). Este método fue empleado por primera vez en *Drosophila melanogaster* (Ballinger y Benzer, 1989; Kaiser y Goodwin, 1990) y se ha utilizado con éxito en diferentes sistemas vegetales como petunia, maíz, *Arabidopsis* y tomate (Koes *et al.*, 1995; Bensen *et al.*, 1995; Mckinney *et al.*, 1995; Pérez-Martin *et al.*, 2017). El método se basa en la inserción de una construcción génica de la que se conoce su secuencia, como puede ser un transposón o un T-DNA (Martinessens, 1998; Feldman, 1980), en una región al azar del genoma alterando la expresión génica. Es decir, estos elementos actúan como agentes mutágenos que se integran en regiones codificantes o reguladoras modificando la expresión génica, o bien generando mutantes insercionales de ganancia o pérdida de función (Martinessens, 1998).

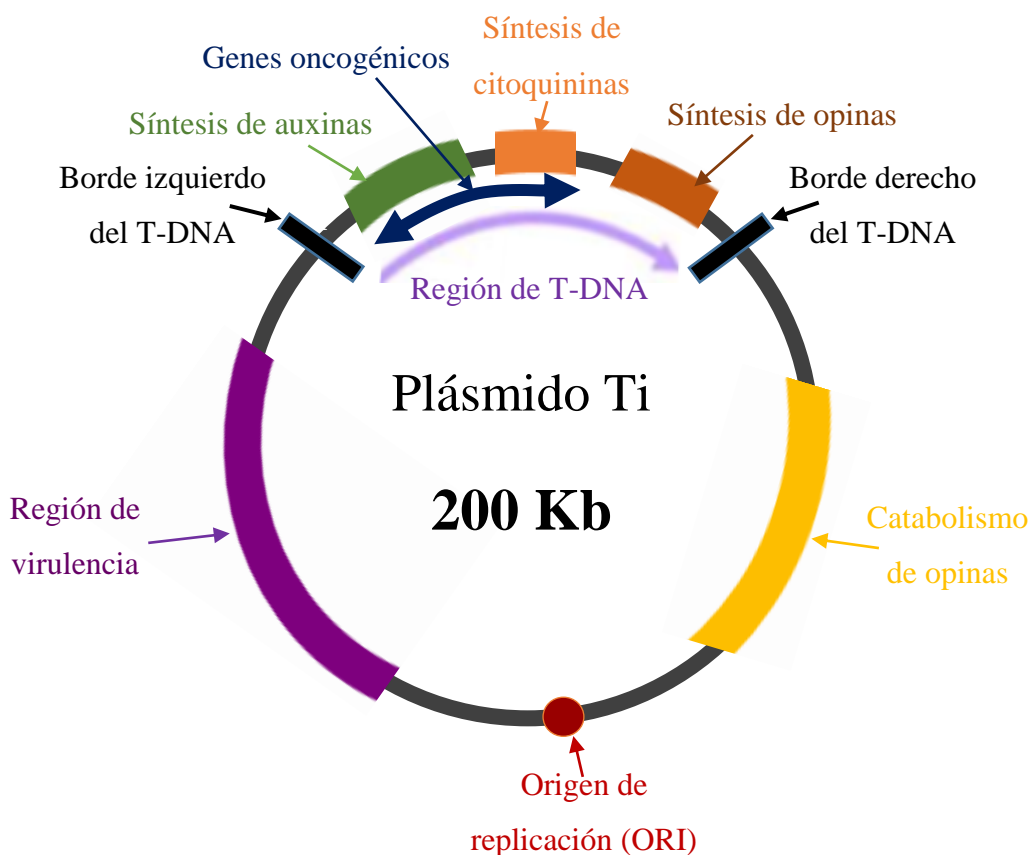
- a) Mutagénesis mediante transposones

Los transposones son elementos génicos móviles que pueden desplazarse de una localización del genoma a otra gracias a una proteína denominada transposasa, que reconoce secuencias repetidas cortas que flanquean a los transposones, promoviendo la inserción del transposón en un lugar nuevo del genoma (transposición), dejando o no una copia en el lugar de origen. Los transposones se dividen en dos clases, retrotransposones o transposones de ADN, según si el intermediario de la transposición es ARN (Clase I) o ADN (Clase II). En los transposones de clase I el

ADN se transcribe a ARN, seguido de una retrotranscripción a ADN y es esta nueva copia la que se inserta en la nueva localización del genoma. En los transposones de clase II es el propio ADN el que se transpone a la nueva localización (Rico, 2005).

b) Mutagénesis mediante T-DNA

La bacteria *Agrobacterium tumefaciens* presenta un plásmido inductor de tumores, el plásmido Ti (Fig. 4), que tiene la capacidad de integrar parte de dicho plásmido (T-DNA) a las células de las plantas. En el plásmido Ti también se localizan los genes de virulencia y las proteínas encargadas de transportar e integrar el T-DNA en el genoma de la planta de forma estable (Bundock *et al.*, 1999). Dentro del T-DNA, sólo requieren los bordes para la transferencia, lo que ha permitido diseñar y construir plásmidos desarmados, eliminando los genes del T-DNA e integrando nuevos genes de interés junto con sus elementos reguladores para transformar plantas (Valderrama *et al.*, 2005). Esta característica ha servido para la mejora de plantas con nuevas características de interés hortofrutícola, a la vez que para estudiar la función y expresión de distintos genes (Gelvin, 2003).



**Figura 4.** Representación gráfica del plásmido inductor de tumores de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*.

Al conocerse la secuencia de los elementos insertados, estos actúan como marcadores moleculares que dejan etiquetado al gen, se pueden utilizar distintas técnicas basadas en la PCR para clonar las secuencias que flanquean al inserto combinadas con otras técnicas genómicas conocidas como trampas génicas. Al combinar ambas herramientas se evitan ciertos problemas, como son el de la identificación de genes redundantes con fenotipos difícilmente reconocibles o de genes letales que se expresan en distintos estadios de desarrollo y que pueden dar lugar a la muerte temprana de la planta, al monitorizar los patrones de expresión del gen mutado (Kuromori *et al.*, 2009; Springer, 2000).

## 2.2. Trampas génicas

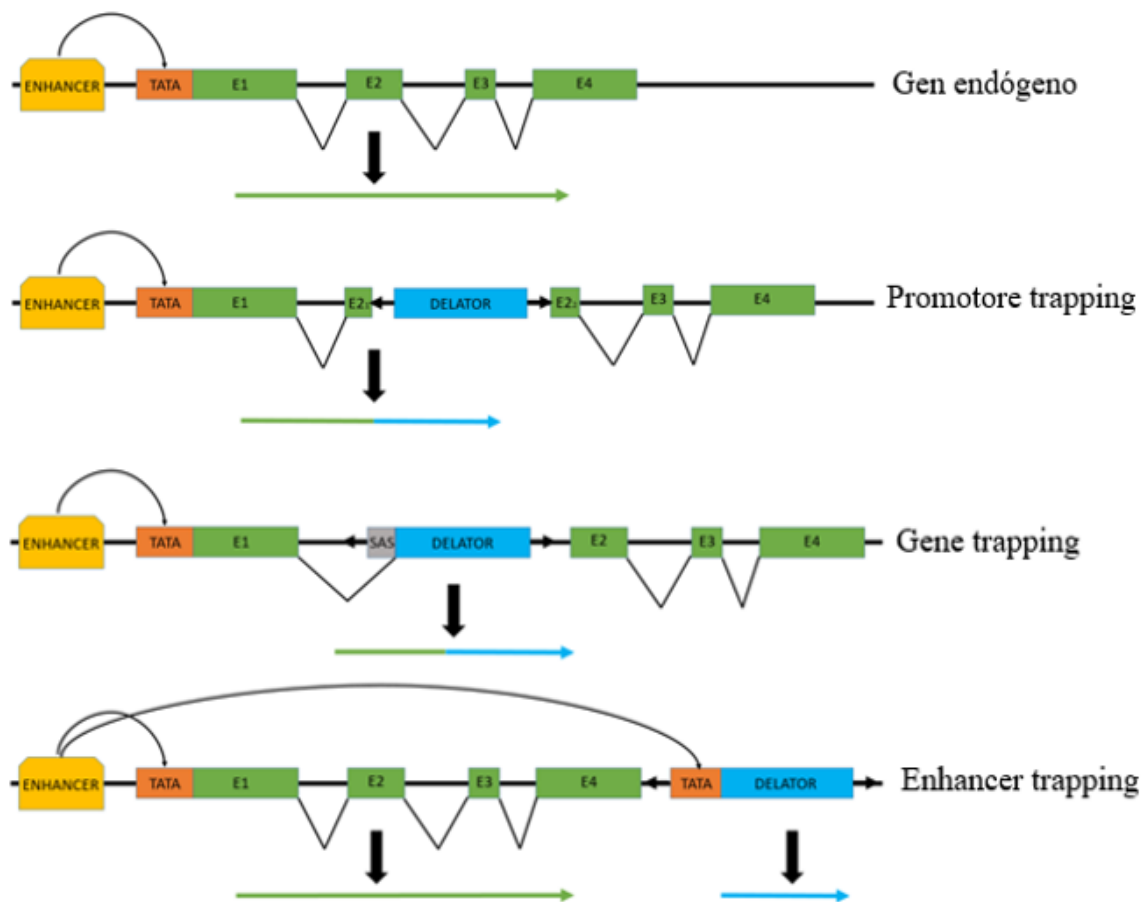
El sistema de trampas génicas para la identificación de genes es una herramienta muy poderosa gracias a que no se requiere de un fenotipo mutante para la identificación del gen responsable, aunque la inserción de la construcción génica puede dar lugar a un fenotipo mutante reconocible al interrumpir la función del gen. Esto permite la identificación de dos clases de genes que otras herramientas no permiten analizar: los genes con función redundante y los genes con funciones esenciales en distintos estadios de desarrollo (Trejo-Saavedra *et al.*, 2015). El sistema se basa en la monitorización de la actividad del gen gracias a un gen delator que se inserta en el ADN, quedando etiquetado para su posterior aislamiento. El delator más utilizado en plantas es el gen bacteriano *gusA* (*uidA*) que codifica la proteína  $\beta$ -glucuronidasa, gracias a que GUS es una proteína estable que presenta actividad cuando se fusiona a otras proteínas (Springer, 2000). Esta actividad puede detectarse fácilmente con técnicas de tinción histoquímica empleando gran variedad de sustratos, además de ser una tinción muy sensible que puede detectarse en una única célula (Campisi *et al.*, 1999; Springer, 2000; Trejo-Saavedra *et al.*, 2015). El gen delator puede emplearse para construir tres tipos básicos de trampas génicas (Springer, 2000):

- a) Trampa de promotores (promoter trapping): el gen delator no contiene ningún elemento promotor propio, de forma que la expresión del gen delator solamente se produce cuando el T-DNA se integra próximo a un promotor y en la orientación adecuada (Fig. 5). Es decir, el promotor del gen mutado determina la transcripción del gen delator.
- b) Trampa de genes (gene trapping): el gen delator carece de elemento promotor, pero presenta un sitio aceptor del procesamiento de exones justo antes de la región estructural del gen delator (Fig. 5). Así pues, la expresión del delator solamente



ocurre si el T-DNA se integra en la región transcrita de un gen, en la orientación adecuada y de su posterior procesamiento.

- c) Trampa de intensificadores (enhancer trapping): el gen delator está fusionado a un promotor mínimo, presenta la caja TATA y el inicio de la transcripción, de manera que el gen delator no puede expresarse por sí mismo. Para que el delator se exprese el T-DNA debe integrarse en un sitio transcripcionalmente activo del genoma y que, por tanto, esté bajo la influencia de un promotor o, al menos, un intensificador (Fig. 5).



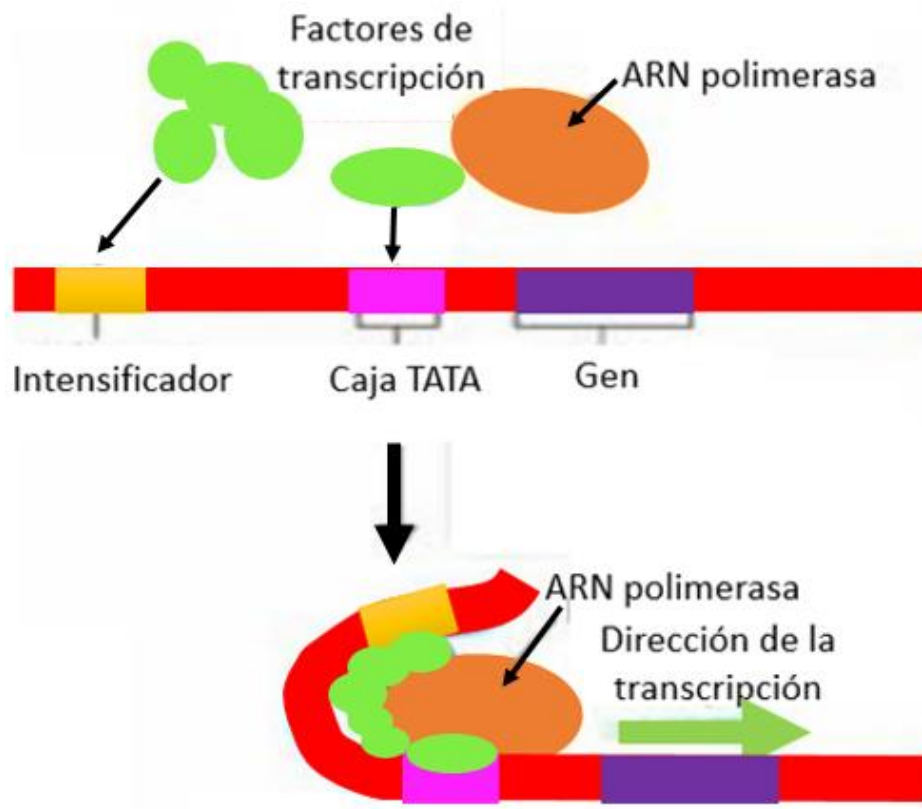
**Figura 5.** Representación esquemática de las distintas construcciones de sistemas trampa y sus transcritos.

Cada tipo de trampa génica presenta una serie de ventajas e inconvenientes. En el caso de las trampas de promotores y de genes, se suelen producir mutantes de falta de función (mutaciones knock-out) al integrarse el gen delator en una región promotora o un gen, mientras que en las trampas de intensificadores se pueden detectar genes complicados de detectar (genes redundantes y letales) al no encontrarse un fenotipo mutante claramente diferenciado (Pérez-Martín, 2018).

### **3. Relevancia de los factores de transcripción en el crecimiento y desarrollo vegetal**

El crecimiento de las plantas conlleva una multitud de procesos bioquímicos y fisiológicos que provocan un incremento irreversible en volumen y masa de las células, tejidos u órganos. El crecimiento viene acompañado del desarrollo de nuevos órganos, que adquieren nuevas funciones en la planta. Durante el crecimiento y desarrollo de las plantas se requiere de una reprogramación masiva de la expresión génica, por lo que muchos factores de transcripción (FTs) actúan como reguladores clave a través de la activación o represión de muchos genes. Los FTs regulan la expresión de muchos genes en diferentes tejidos y se clasifican de acuerdo a los dominios funcionales y especificidad de unión (Yamasaki *et al.*, 2013). Entre sus muchos objetivos, regulan la transcripción de genes implicados en la respuesta al estrés ambiental (Joshi *et al.*, 2016; Khan *et al.*, 2018), la respuesta a patógenos (Amorim *et al.*, 2017) y en los procesos claves del desarrollo (Chen *et al.*, 2004; Ito, 2016).

Los FTs se caracterizan por albergar en su estructura proteica regiones denominadas dominios que son los que aportan funcionalidad y especificidad al complejo de inicio de la transcripción (García-Morales *et al.*, 2013). Cualquier FT está compuesto por uno o más dominios, el clásico FT lo forman dos dominios: el dominio de unión a ADN, el cual se une a elementos específicos (*cis*) que actúan sobre el promotor; y el dominio regulador, el cual se une a la maquinaria de transcripción. Varios FTs interactúan con los elementos en *cis* que actúan sobre las regiones promotoras y que dan lugar al complejo de inicio de la transcripción sobre la caja TATA, aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción (García-Morales *et al.*, 2013). De esta forma se regula la expresión génica al inducir o reprimir la actividad de la polimerasa (Fig. 6) (Saibo *et al.*, 2009).



**Figura 6.** Regulación de la expresión génica mediada por los FTs sobre la ARN polimerasa.

Los FTs presentan gran variedad de motivos estructurales que reconocen al ADN, muchos de estos son comunes, lo cual permite clasificar a los FT en diferentes familias (Mosquera, 2014):

- a) Hélice-Giro-Hélice (HTH, del inglés Helix-Turn-Helix): consiste en tres hélices que forman una estructura globular compacta. Las hélices I y II son paralelas y se encuentran casi perpendicularmente a la hélice III, esta última es la que se une al surco mayor del ADN y, por tanto, la que proporciona especificidad de secuencia. El motivo HTH aparece de forma frecuente en procariontas interactuando con otros FT en forma de oligómeros. En eucariotas, este tipo de motivos se denominan homeodominios y generalmente reconocen secuencias que participan en la regulación del desarrollo.
- b) Proteínas de cremallera de leucinas (bZIP): este dominio es estructuralmente muy simple, consiste en homo- o heterodímeros helicoidales no covalentes que se pliegan en presencia de secuencias de ADN específicas en forma de  $\alpha$  hélices. Dichas hélices presentan dos regiones: la región básica, pues es rica en residuos básicos, que se une al surco mayor del ADN y se localiza en el extremo N-terminal; mientras que en el

extremo C-terminal se encuentra la cremallera de leucinas, cuyo patrón de residuos de Leu e Ile cada siete aminoácidos permite la dimerización. Así pues, la dimerización es un proceso que ocurre secuencialmente tras la unión de la región básica al ADN (Kohler y Schepartz, 2001). Una variante del bZIP es el motivo Hélice-Lazo-Hélice (HLH, del inglés Helix-Loop-Helix), el cual está formado por dos hélices separadas por un lazo no helicoidal y unidas a la cremallera de leucinas y la región básica (Mosquera, 2014).

- c) Dedos de zinc (Zinc Finger Protein): consisten en una serie de dominios independientes dispuestos en tándem y cuyos residuos de las cadenas laterales se unen a un ión Zn (II) de forma tetraédrica, el cual juega un papel clave estabilizando la estructura del FT (Dhanasekaran *et al.*, 2006). Los dedos de zinc forman una hilera que interacciona con el surco mayor de ADN en forma de oligómeros (10 o más dominios) gracias a la inserción de las hélices de reconocimiento (Kuldell, 2005).

Hace algunos años se descubrió que en los FTs básicos estaba presente un nuevo dominio, BSD (factores de transcripción similares a **BTF2**, proteínas asociadas a **Sinapsis** y proteínas similares a **DOS2**) (Doerks *et al.*, 2002). El dominio BSD presenta tres  $\alpha$ -hélices, probablemente involucradas en la unión del ADN, con dos residuos de triptófano y fenilalanina adyacentes altamente conservados, ubicados en el extremo C-terminal (Doerks *et al.*, 2002). Se ha sugerido que las proteínas que contienen BSD están involucradas en diversos procesos fisiológicos en prácticamente todas las especies. En plantas, se han identificado factores de transcripción que contienen BSD en *Arabidopsis thaliana* (Park *et al.*, 2009) y plátano (*Musa acuminata*; Wang *et al.*, 2013). Esta familia se caracteriza por la presencia de un dominio muy conservado, cuya función no ha sido dilucidada con claridad. Estudios recientes muestran que dicha familia regula de forma positiva el crecimiento vegetativo y la calidad del fruto, mientras que actúa de forma negativa en la senescencia de las hojas (Fan *et al.*, 2020).

## I. OBJETIVOS

La identificación y el conocimiento de la función de genes de importancia agronómica de las especies cultivadas es uno de los retos de la genómica funcional. El grupo de Genética y Fisiología del Desarrollo Vegetal de la Universidad de Almería participa en un programa que utiliza la mutagénesis insercional como herramienta para identificar y etiquetar genes de tomate implicados en el control del desarrollo vegetativo y reproductivo, además del control del desarrollo y maduración del fruto. Para llevar a cabo este programa, el grupo cuenta con una colección de mutantes insercionales de tomate. El análisis fenotípico de estas líneas mutantes ha permitido identificar al mutante *1600-etmm* el cual presenta un retraso en el crecimiento. El objetivo de este Trabajo Fin de Grado (TFG) es identificar y caracterizar molecularmente el gen etiquetado en el mutante *1600-etmm*, siendo los objetivos específicos de este trabajo de investigación los siguientes:

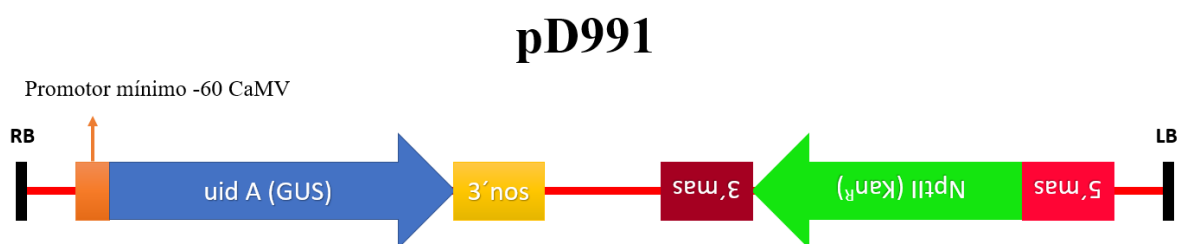
1. Evaluar fenotípicamente las líneas segregantes TG2 y TG3 de la línea 1600-ETMM.
2. Estudiar el patrón de herencia del fenotipo mutante *1600-etmm*.
3. Clonar las regiones adyacentes al T-DNA para identificar el gen cuya alteración es responsable del fenotipo mutante *1600-etmm*.
4. Llevar a cabo un estudio de co-segregación entre el fenotipo mutante *1600-etmm* y el inserto de T-DNA mediante genotipado por PCR convencional.
5. Realizar una caracterización *in silico* del gen etiquetado en el mutante *1600-etmm*.

## II. MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Material vegetal.

Este Trabajo Fin de Grado (TFG) se ha llevado a cabo con la línea mutante 1600-ETMM (1600-*etmm*) de la colección de mutantes insercionales de T-DNA generados, a partir de la variedad comercial de tomate *MoneyMaker*, por el grupo de investigación de Genética y Fisiología del Desarrollo Vegetal de la Universidad de Almería, AGR-176. *MoneyMaker* presenta un hábito de crecimiento indeterminado y unos frutos redondos de calibre mediano, lisos, sin hombros y con una elevada productividad.

La colección de mutantes insercionales se obtuvo mediante transformación genética con la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, la cual contenía el vector binario pD991 (Campisi *et al.*, 1999). Dicho vector contiene una trampa de intensificadores cuyos componentes principales del "cassette" del T-DNA son los siguientes (Fig. 7): i) el gen *NptII* (*Neomicina fosfotransferasa II*) que confiere resistencia a la kanamicina ( $\text{kan}^R$ ), un antibiótico aminoglicósido, y cuya expresión está controlada por el promotor y terminador de la maponina sintasa (5' mas y 3' mas, respectivamente); ii) el gen delator *uidA* (GUS), el cual codifica la proteína  $\beta$ -glucuronidasa. Su expresión está controlada por el promotor mínimo -60CaMV, una versión truncada del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (35SCaMV), que requiere ser activado por los elementos reguladores del genoma del tomate debido a que no es capaz de inducirse por sí mismo, y finalmente, el terminador de la nopalina sintasa (3' NOS).



**Figura 7.** – Representación esquemática del inserto de T-DNA que contiene el vector binario pD991.

Tanto para identificar las regiones que flanquean al inserto de T-DNA como para el análisis de co-segregación se han utilizado plantas de las progenies TG2 (1600-*etmm*) y TG3 (1600-5-*etmm*). Las semillas se pre-germinaron en placas Petri con papel de filtro estéril al que se le añadió agua destilada ( $\text{dH}_2\text{O}$ ). Tras una semana en oscuridad, las semillas germinadas se sembraron en maceteros pequeños con una mezcla esterilizada en autoclave de turba, fibra de coco y vermiculita en una proporción de 2:1:1, respectivamente. Las

plantas se mantuvieron cuatro semanas en el fitotrón de la universidad de Almería antes de ser trasplantadas a la finca experimental de Anecoop. Tras dos semanas en la finca se tomaron muestras de hojas como material vegetal para realizar la extracción de ADN. Pasadas 4-6 semanas desde el trasplante las plantas ya estaban lo suficientemente desarrolladas para poder distinguir el fenotipo mutante respecto de las plantas con fenotipo silvestre o WT (del inglés *wild type*).

## **2. Extracción y cuantificación del ADN**

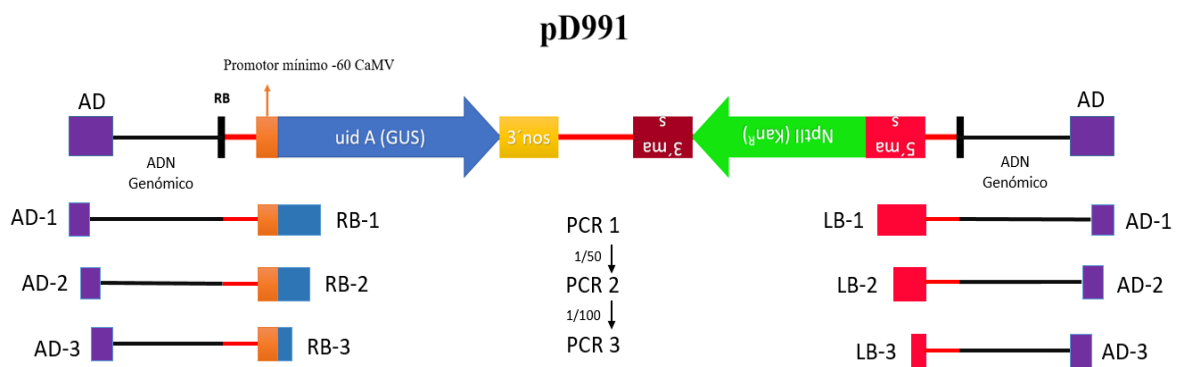
La extracción de ADN se llevó a cabo a partir de las hojas más próximas al ápice caulinar de 32 plantas, de las cuales 22 plantas pertenecen a una población segregante TG2 y 10 plantas a una población segregante TG3. Las hojas se cortaron y fueron introducidas en tubos eppendorf previamente rotulados, que contenían una bola de tungsteno para su posterior maceración, e inmediatamente se introdujeron en nitrógeno líquido para su conservación. Para macerar las hojas se utilizó el molino mezclador RESTSCH MM301. Todo el material genético se extrajo siguiendo el protocolo del kit Plant DNAzol® Reagent (Invitrogen). El material genético extraído se resuspendió en 50 µL de dH<sub>2</sub>O y se cuantificó empleando 1 µL de ADN en un espectrofotómetro NanoDrop 2000. Además, se realizó una cuantificación de electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) con objeto de evaluar la integridad y calidad del material genético extraído. El gel fue teñido con GelRed (Biotium Inc.) en una cubeta durante 1 hora y visualizado en un transiluminador de luz ultravioleta (FireReader XS, UVItec Cambridge).

## **3. Identificación de las secuencias que flanquean al inserto de T-DNA**

Para identificar las regiones adyacentes al inserto de T-DNA se ha empleado la estrategia anchor-PCR (Schupp *et al.*, 1999; Spertini *et al.*, 1999). Esta estrategia consiste en la digestión del ADN con distintas enzimas de restricción a cuyo producto, fragmentos de distintos tamaños, se le liga una serie de adaptadores de secuencia conocida. De esta forma se pueden realizar una serie de PCRs "solapantes" o "anidadas" donde un cebador utiliza como molde el adaptador y el otro cebador el T-DNA.

Primero se realizó una digestión con una batería enzimas de restricción de ADN genómico durante 3 horas a 37°C. La batería de enzimas está formada por 8 endonucleasas de corte romo: *EcoRV*, *Dra I*, *Sca I*, *Alu I*, *Hinc II*, *Sma I*, *Pvu II*, *Stu I*. Para cada reacción de digestión se añadieron 500 ng de ADN, 4 µL de buffer multicore 10X + BSA, 5 U de enzima y un volumen de dH<sub>2</sub>O hasta completar un volumen final de 40 µL. Los fragmentos

generados se ligaron a un adaptador sintético formado por una doble cadena parcial de ADN de secuencia conocida (Schupp *et al.*, 1999). La ligación del adaptador se llevó a cabo a 37°C durante 1 hora en un termociclador Eppendorf Mastercycler ep gradient S añadiendo los siguientes componentes en cada reacción a cada producto de digestión: 1 µL de adaptador sintético (5 µmol), 0,2 µL de T4 DNA ligasa de Takara Bio (350U/ µL), 1µL de ATP (10mmol), 1 µL de 10X multicore buffer + BSA, 6,8 µL dH<sub>2</sub>O. El producto obtenido de la digestión con el adaptador ligado se utiliza para llevar a cabo tres PCRs “anidadas” (Fig. 8) para cada extremo del T-DNA, *Right Border* (RB) o *Left Border* (LB), empleando una serie de oligonucleótidos que actúan como cebadores (Tabla 1).



**Figura 8.** Esquema de la estrategia anchor-PCR utilizada para determinar las secuencias del ADN genómico adyacentes al inserto de T-DNA.

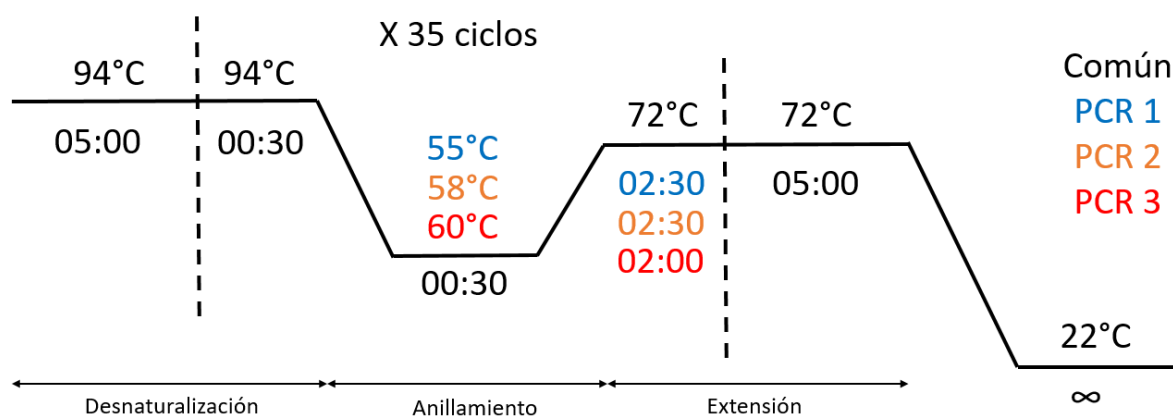
**Tabla 1.** Secuencia de oligonucleótidos empleadas como cebadores para llevar a cabo las PCRs correspondientes a la estrategia anchor-PCR (Fig. 8) y al genotipado (Fig. 12).

CEBADORES	SECUENCIA DE OLIGONUCLEÓTIOS
AD-1	5'-CTAATACG ACTCACTATAGGC-3'
AD-2	5'-CTATAGGGCTCGAGCGGC-3'
AD-3	5'-AGCGGCGGGGAGGT-3'
RB-1	5'-ACAGTTTTTCGCGATCCAGAC-3'
RB-2	5'-GGTCTTGCGAAGGATAGTGG-3'
RB-3	5'-CTGGCGTAATAGCGAAGAGG-3'
LB-1	5'-GTAGCCGGATCAAGCGTATG -3'
LB-2	5'-CGTGCAATCCATCTTGTTCA-3'
LB-3	5'-TTGGCGTGTTCAGCGTATC TA-3'
g1600G-R	5'-TGGTTCGTGCATGTTAGGCT-3'
g1600G-F	5'-CTGATCCCCGTTACGAAGCA-3'
gRB-R	5'-TCCACAGTT TTCGCGCGATCCA-3'
gWT-F	5'-GTGTCAGTTGGTAACTATGACCCT-3'
gWT-R	5'-CCGTGCCCTGTAAGCTGTAA-3'

ANCHOR-PCR  
GENOTIPADO



El procedimiento se lleva a cabo para ambos extremos, pero solamente se va a describir el que se ha llevado a cabo para el extremo LB. La diferencia con el extremo RB radica únicamente en el cebador que se une al T-DNA, pero la metodología es la misma y se hace de forma simultánea al extremo LB. Para ello se lleva a cabo la primera amplificación, PCR primaria, del producto de la digestión-ligación empleando para cada reacción 1  $\mu$ L de dicho producto, 19,6  $\mu$ L de agua destilada, 3  $\mu$ L de Buffer10X Taq Polimerasa, 2,4  $\mu$ L de dNTPs (2,5 mM), 1,8  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub>, 0,2  $\mu$ L de BIOTAQ™ DNA Polimerasa (5 U/ $\mu$ L) y 1  $\mu$ L de cada uno de los cebadores (10  $\mu$ M), AD-1 y LB-1. Cada reacción de PCR primaria presenta un volumen final de 30  $\mu$ L y se lleva a cabo en un termociclador Eppendorf Mastercycler ep gradient S con las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial de 5 min a 94°C; 35 ciclos de 30 s a 94°C (desnaturalización), 30 s a 55°C (anillamiento) y 2,5 min a 72°C (extensión); y una extensión final de 5 min a 72°C (Fig. 9).



**Figura 9.** Esquema de las distintas condiciones utilizadas en el termociclador Eppendorf Mastercycler ep gradient S para llevar a cabo las PCRs. En negro aparecen las condiciones comunes utilizadas en todas las reacciones de PCR. En azul, naranja y rojo aparecen, respectivamente, las condiciones específicas utilizadas para las reacciones de PCR 1, PCR 2 y PCR 3 de la anchor-PCR.

El producto obtenido en la PCR primaria (pPCR1) se diluyó con agua destilada 50 veces y se usó como ADN para realizar la PCR secundaria empleando los cebadores AD-2 y LB-2. Los componentes y las condiciones de la PCR fueron las mismas que en la PCR primaria, a excepción de la temperatura de anillamiento que fue de 58°C (Figura 8). El método de anchor-PCR descrito por Schupp *et al.* (1999) solo contempla las PCRs primaria y secundaria, pero ha sido modificado añadiendo una PCR terciaria para conseguir una mayor especificidad de los fragmentos amplificados. Para llevar a cabo esta PCR terciaria se realiza una dilución 1/100 del producto obtenido en la PCR secundaria (pPCR-2) y se utiliza como molde de los cebadores AD-3 y LB-3. Esta PCR se realizó en las mismas condiciones que las PCRs primaria y secundaria, pero la temperatura de anillamiento se aumentó a 60°C (Fig.

9), obteniéndose el producto de la PCR terciaria (pPCR-3). Las parejas de cebadores que se utilizaron para llevar a cabo la estrategia de anchor-PCR por el *Righth Border* se encuentran en la Tabla 1 y fueron: AD-1 y RB-1, AD-2 y RB-2, AD-3 y RB-3.

Mediante electroforesis se analiza un gel de agarosa al 1% donde se cargaron 5  $\mu$ L de las muestras pPCR-2 y pPCR-3. Para analizar el gel, y así poder seleccionar los fragmentos de interés, se tiñe con GelRed (Biotium Inc.) durante 1 hora y se visualiza en un transiluminador de luz UV (FireReader XS, UVitec Cambridge). Se prepara un nuevo gel de agarosa al 0,8% y se carga todo el pPCR-3 (25  $\mu$ L) donde se encuentran las bandas correspondientes a los fragmentos de ADN de interés seleccionados para recortarlos, precipitarlos y purificarlos mediante el protocolo descrito en *Methods in Molecular and Cellular Biology* 3:190-192 (1992). Una vez purificados los fragmentos de ADN se cuantificaron en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™), y se usaron como molde para llevar a cabo una reacción de secuenciación. Cada reacción se preparó con los reactivos de BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) empleando: 30 ng de producto de PCR purificado, 1,5  $\mu$ L de Buffer Big Dye 5X, 1  $\mu$ L de enzima Big Dye, 1 uL de cebador (AD-3, LB-3 ó RB-3, según el producto de PCR) y una cantidad de agua destilada hasta completar un volumen final de 10  $\mu$ L por reacción de secuenciación. La secuenciación se llevó a cabo en los Servicios Centrales de Investigación de la Universidad de Almería mediante el método de secuenciación de Sanger *et al.* (1977). Finalmente, se analizaron las secuencias y se compararon con las secuencias que se encuentran en la base de datos Sol Genomics Networks (SGN, <https://solgenomics.net/tools/blast>). De esta manera se logró conocer la secuencia del ADN genómico adyacente al T-DNA, así como la posición y orientación del inserto de T-DNA en el genoma de la planta de tomate.

#### **4. Análisis de co-segregación inserto T-DNA y el fenotipo mutante**

A partir de las secuencias adyacentes al T-DNA, ahora conocidas, se pueden diseñar una serie de cebadores para comprobar mediante distintas reacciones de PCR si el alelo mutante (con el inserto de T-DNA) se encuentra en heterocigosis, homocigosis o acigosis en las plantas de las progenies segregantes TG2 y TG3. Para el diseño de los cebadores se utilizó la herramienta web Primer-Blast de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Para llevar a cabo el genotipado se usó una primera PCR para amplificar el alelo silvestre utilizando los cebadores gWT-F y gWT-R (Tabla 1). Para el alelo mutante se llevaron a cabo dos PCRs, la primera que amplifica por el RB y otra que amplifica LB. Los

cebadores empleados para el RB fueron g1600-F y gRB-R (Tabla 1), y los cebadores para el LB fueron LB-3 y g1600-R (Tabla1). Cada reacción de PCR se ha llevado a cabo en un volumen final de 10  $\mu$ L, empleando para ello 1  $\mu$ l con 10 ng ADN genómico, 1  $\mu$ L de 10X Key Buffer, 0,8  $\mu$ L de dNTPs (2,5 mM), 0,6  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub>, 0,06  $\mu$ L de BIOTAQ™ DNA Polimerasa (5 U/ $\mu$ L), 0,5  $\mu$ L de cada uno de los cebadores (10  $\mu$ M) y 5,54  $\mu$ L de agua destilada estéril. Las condiciones del programa empleado en el termociclador Eppendorf Mastercycler ep gradient S para el alelo mutante, tanto por el extremo LB como por el RB, fueron las siguientes: una desnaturalización inicial de 5 min a 94°C; 35 ciclos de 30 s a 94°C (desnaturalización), 30 s a 62°C (anillamiento) y 1 min a 72°C (extensión); y una extensión final de 5 min a 72°C. Para el alelo WT solo se cambió la temperatura de anillamiento, la cual fue de 58°C. El producto de PCR obtenido se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% (p/v). El gel se tiñe con GelRed (Biotium Inc.) durante 1 hora y se visualiza en un transiluminador de luz UV (FireReader XS, UVitec Cambridge). Las plantas cuyo ADN se ha empleado como molde en las PCRs en las que solamente el alelo mutante ha amplificado se clasifican como homocigotas para el inserto de T-DNA, si amplifican tanto el alelo mutante como el silvestre serán hemicigotas y si únicamente amplifica el alelo silvestre serán catalogadas como acigotas. De esta manera se consigue establecer si el inserto de T-DNA co-segrega con el fenotipo mutante observado y, por tanto, corroborar si es el responsable de este.

## 5. Análisis *in silico* del gen

En la base de datos SGN (<https://solgenomics.net>) se obtuvo la secuencia aminoacídica, a partir de la cual se identificó el dominio funcional de un factor de transcripción de la superfamilia BSD al analizarla con la herramienta web *Conserved Domain Database* de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/>). Además, se realizó un análisis tBLASTn frente a la base de datos “Tomato Genome cDNA (ITAG release 2.40)” con la secuencia aminoacídica de este factor de transcripción con objeto de identificar homólogos del gen en el genoma de tomate y Arabidopsis, para esta última se empleó la base de datos de TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>). También se obtuvo el patrón de expresión del factor de transcripción de la superfamilia BSD con la información recogida en la base de datos de TomExpress (<http://tomexpress.toulouse.inra.fr/query>) y con la herramienta ePlant de la base de datos *The BAR and other Data Analysis Tools for Plant Biology* ([http://bar.utoronto.ca/eplant\\_tomato/](http://bar.utoronto.ca/eplant_tomato/)).

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 1. Caracterización fenotípica y análisis genético del mutante *1600-etmm*

El mutante *1600-etmm* presenta un fenotipo característico, retraso en el crecimiento y en el desarrollo de la planta si se compara con la planta normal (WT) (Fig. 10). Además, las hojas de las plantas de fenotipo mutante (M) presentan un ligero tono de color verde más suave respecto a las plantas WT (Fig. 10), posible indicador del inicio de la senescencia prematura en hojas. El fenotipo M puede diferenciarse de forma clara, respecto al fenotipo WT, alrededor de las 8-10 semanas desde la germinación. No existe ninguna diferencia de morfología en frutos, flores u hojas entre las plantas mutantes y las plantas WT (Fig. 10).



**Figura 10.** Plantas con fenotipo WT (izquierda) y fenotipo mutante (derecha) de una población segregante TG2 de *1600-etmm*.

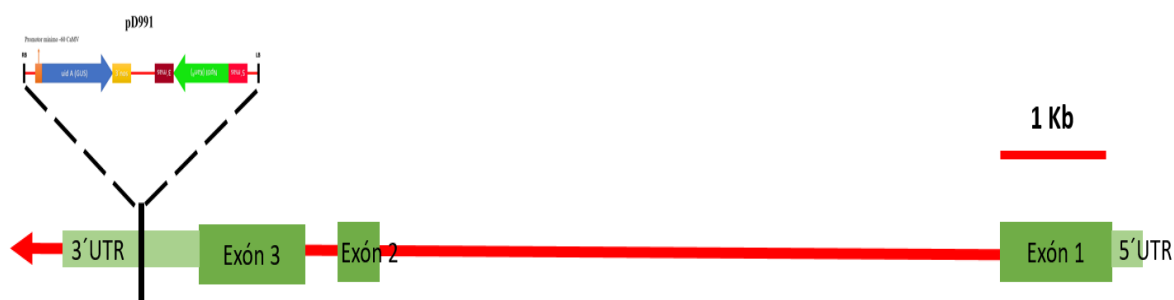
Para conocer la naturaleza de la mutación que da lugar al fenotipo mutante *1600-etmm* se llevó a cabo la evaluación de 22 plantas de una progenie segregante TG2, observándose 16 plantas con fenotipo WT y 6 plantas con fenotipo M. Mediante autofecundación se obtuvo una progenie TG3, de la que se estudiaron 10 plantas, cuya segregación observada fue de 6 plantas WT y 4 plantas M. Las segregaciones observadas para la TG2 y TG3 muestran un patrón de herencia para una mutación monogénica autosómica y recesiva ( $X^2 = 0,667$ ; P value = 0,414)(Tabla 2).

**Tabla 2.** Cálculo del patrón de herencia a partir de los fenotipos observados y esperados mediante  $\chi^2$ .  $\chi^2_{\text{experimental}} (3:1) = 0,667 < \chi^2_{\text{teórica}} 1 \text{ gl} (5\%) = 3,84$ .

Fenotipos TG2 + TG3	WT	M	Total
Observados	16 + 6	6 + 4	32
Esperados	24	8	32

## 2. Identificación del gen responsable del fenotipo mutante

Mediante la estrategia anchor-PCR se consiguieron identificar las secuencias que flanquean el inserto de T-DNA. Para ello se llevaron a cabo una serie de reacciones de PCR que amplifican la región del ADN genómico adyacente al T-DNA. El producto de la PCR terciaria presentaba fragmentos de ADN de un tamaño aproximado de 600 pares de bases (pb). Estos fragmentos de interés fueron purificados, mediante un protocolo de extracción de fragmentos de ADN en geles de agarosa, y posteriormente secuenciados. El análisis de secuenciación mostró, únicamente por el extremo LB, una homología con el T-DNA de 266 pb. El resto, 342 pb, se utilizó para hacer una búsqueda frente al genoma de referencia de *S. lycopersicum* depositado en la base de datos Sol Genomics Network (<https://www.solgenomics.net/>). El análisis bioinformático de dicha secuencia mostró que el inserto de T-DNA se localiza en la región 3'UTR del gen *SIBSD1* (Fig. 11), que codifica para un factor de transcripción que contiene un dominio funcional de la familia BSD, el cual se encuentra en el cromosoma 4 y cuyo identificador es *Solyc04g077600* (Fan *et al*, 2020).



**Figura 11.** Representación esquemática de la organización genómica del gen etiquetado por el T-DNA en el mutante *1600-etmm*. Las cajas verdes oscuro representan los exones, las verdes claro las regiones codificantes que no se traducen (5'UTR y 3'UTR, del inglés *untranslated region*) y la flecha roja representa el sentido de la transcripción. El T-DNA se localiza en la región 3'UTR.

La región 3'UTR es importante en la regulación de los procesos que ocurren a nivel postranscripcional. Dicha región controla la expresión génica a través de interacciones con los denominados elementos reguladores en *cis*, que son secuencias adyacentes a un gen que regulan la tasa de transcripción de dicho gen, y los elementos reguladores en *trans*,

secuencias que no son capaces de regular la velocidad de transcripción por sí mismas, si no que requieren de otras proteínas para llevar a cabo dicha regulación. Las mutaciones que ocurren sobre la región 3'UTR o sobre las secuencias reguladoras de dicha región, por lo general, tienen un efecto negativo sobre la tasa de transcripción (López de Sillanes *et al.*, 2007). Además, estudios de mutagénesis y de delección muestran que la región 3'UTR presenta un papel determinante en la localización del ARNm en la célula, hasta el punto de que polimorfismos de un solo nucleótido de la región 3'UTR influyen de forma drástica en la regulación génica, teniendo efectos funcionales y fisiológicos importantes (Hesketh *et al.*, 2004). Las proteínas reguladoras de vida corta implicados en procesos tales como la regulación del ciclo celular, modulación de los canales iónicos o los factores de transcripción siguen la ruta de degradación de la ubiquitina-proteosoma. Esta vía participa en el recambio intracelular de las proteínas mediante una cascada enzimática en las que las moléculas de ubiquitina se unen covalentemente al sustrato. Una vez que el proceso de poliubiquitización ocurre, la proteína pasa al interior del proteosoma para ser degradada (Cascales-Angosto, 2005). La alteración del mutante *1600-etmm* presente en la región 3'UTR supone la incapacidad de llevar a cabo los procesos postranscripcionales adecuados que darán lugar a un factor de transcripción que presenta una conformación espacial mal plegada que, por tanto, perderá su funcionalidad y que, probablemente, será degradado en el proteosoma.

En el estudio de Fan *et al.* (2020) se ha identificado un factor de transcripción de tomate, *SIBSD1*, el cual se localiza fundamentalmente en el núcleo y proponen que está ligado a una mayor calidad del fruto. En dicho estudio, el análisis de los fenotipos de las plantas transgénicas de sobreexpresión y silenciamiento génico indican que, de algún modo, *SIBSD1* es un regulador positivo de la calidad del fruto de tomate y del crecimiento vegetativo, mientras que regula negativamente la senescencia de las hojas (Fan *et al.*, 2020). La fotosíntesis induce la fuente de fotoasimilados, razón por la cual el retraso de la senescencia de las hojas puede aumentar la calidad y el rendimiento de los frutos (Ali *et al.*, 2018). La sobreexpresión de *SIBSD1* promueve el retraso de la senescencia de las hojas y un incremento de sólidos solubles muy evidente, lo que apoya a la hipótesis expuesta previamente (Fan *et al.*, 2020). Con los datos de este estudio y el patrón de expresión de tomate se puede hipotetizar que el gen *SIBSD1* participa de forma significativa en la acumulación de fotoasimilados en el fruto.

El mutante *1600-etmm* presenta clorosis en las hojas, indicativo del inicio de la senescencia de las mismas. Este proceso suele ocurrir en la última etapa de desarrollo de las

hojas y se relaciona con procesos asociados a la degradación de clorofilas y movilización de macromoléculas para activar el crecimiento de otros órganos como hojas jóvenes o el desarrollo de semillas y frutos (Lim *et al.*, 2007). Es decir, se trata de un proceso fisiológico esencial que ocurre durante el desarrollo de las plantas para reutilizar los nutrientes de las hojas en otros órganos en desarrollo (Ma *et al.*, 2018). Distintas condiciones ambientales, estrés hídrico o carencia de ciertos nutrientes, pueden inducir la senescencia precoz de las hojas al afectar a distintas rutas de aquellos genes esenciales implicados en el correcto funcionamiento de la actividad cloroplastidial (Fan *et al.*, 2020).

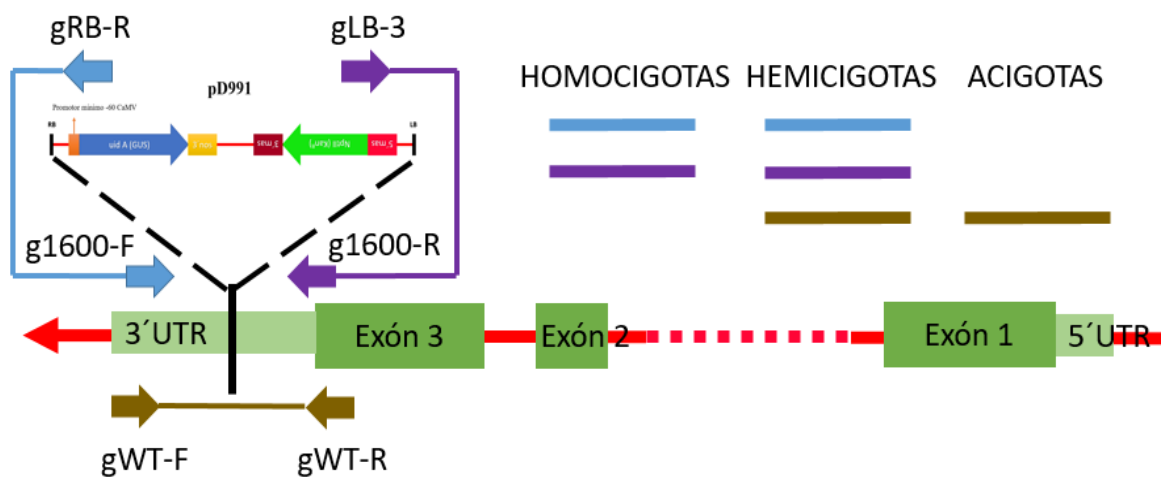
Considerando el fenotipo del mutante *1600-etmm* que tiene un crecimiento vegetativo limitado y muestra una incipiente clorosis, podrías especular que el factor de transcripción SIBSD1 funciona principalmente en el control de la senescencia durante el crecimiento y desarrollo de la planta, actuando en la prevención de la senescencia precoz, lo que es fundamental para la productividad y calidad de la planta, al evitar el envejecimiento prematuro. Aunque es igualmente posible que SIBSD1 pueda estar regulado a la baja a nivel de proteína, como a través de la degradación mediada por ubiquitinación, al inicio de la senescencia.

Existen muchos factores de transcripción clave que regulan, al activar y/o reprimir, distintos genes asociados a la senescencia de las hojas. En tomate, los genes *SIORIS02*, *SIORIS03* y *SIORIS06* regulan positivamente la senescencia de las hojas y son ortólogos de *ORE1* de Arabidopsis, un factor de transcripción de la familia NAC (NAM, ATAF1/2 y CUC) (Ma *et al.*, 2018). Otros factores de transcripción de esta familia son *NOR* (NON-RIPENING) y *SINAP2*, éste último activa la expresión de *NOR* en tomate y a su vez, ambos juntos, regulan a *SISAG113* y *SISGR1* acelerando la senescencia de las hojas (Fan *et al.*, 2020). En maíz se ha encontrado recientemente un factor de transcripción de tipo NAC, *ZmNAC126*, el cual es responsable de la senescencia de las hojas al promover la degradación de la clorofila cuando se une a la región promotora de genes que la catalizan (Yang *et al.*, 2020).

### **3. Análisis de co-segregación entre el inserto de T-DNA y el fenotipo mutante**

Para determinar si las plantas analizadas del mutante *1600-etmm* son portadoras del inserto de T-DNA (homocigotas, heterocigotas o acigotas) se diseñaron una serie de cebadores específicos a partir de las secuencias flanqueantes al T-DNA (Fig. 12). El fenotipo mutante solo se debería observar cuando el inserto se encuentra en homocigosis, pues se trata de una

mutación autosómica, monogénica y recesiva. El genotipado se lleva a cabo mediante tres reacciones de PCR sobre 32 plantas pertenecientes a las poblaciones segregantes TG2 y TG3, respectivamente. Para identificar la presencia del alelo mutante sobre dichas poblaciones se emplearon dos parejas de cebadores que fueron diseñados sobre la secuencia de ADN genómico y sobre el inserto del T-DNA, la primera pareja amplifica por el extremo RB (gRB-R y g1600-F) y la segunda pareja por el extremo LB (gLB-3 y g1600-R); mientras que para amplificar el alelo WT se diseñó una pareja de cebadores (gWT-F y gWT-R) a partir de la secuencia genómica del gen *Solyc04g077600* (Fig. 12). De este modo se espera que aquellas plantas mutantes amplifiquen solamente por los extremos RB y LB sean homocigotas, hemicigotas si además amplifica el alelo WT o acigotas si únicamente amplifica el alelo WT respecto del inserto de T-DNA (Fig. 12).

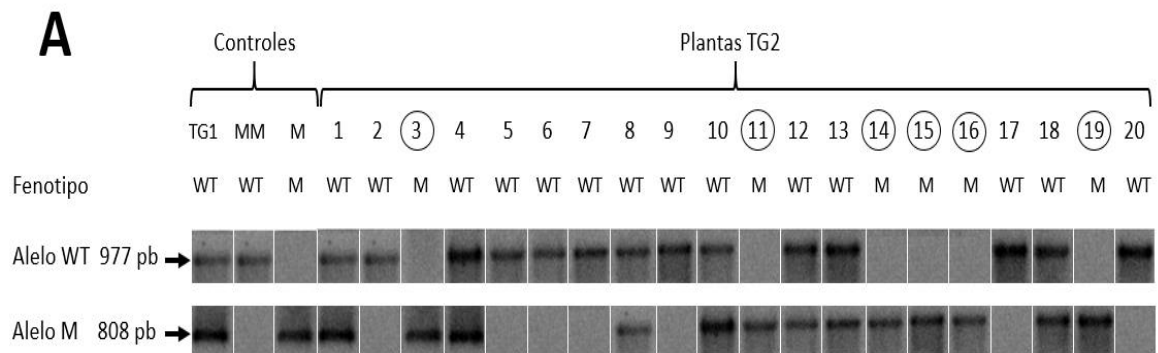


**Figura 12.** Representación de los cebadores diseñados para genotipar las plantas y la clasificación de las mismas según los resultados de las PCRs: homocigotas, hemicigotas y acigotas.

Los resultados del genotipado mostraron que únicamente el alelo mutante amplificó en las 10 plantas que presentaban el fenotipo mutante, y por tanto homocigotas para el inserto de T-DNA (Fig. 13). En la figura se muestran 20 plantas de las 32, 6 plantas con fenotipo mutante y homocigotas para el inserto de T-DNA (3, 11, 14, 15, 16 y 19), 7 plantas WT y hemicigotas para el inserto de T-DNA (1, 4, 8, 10, 12, 13 y 18), y 7 plantas WT y acigotas para el inserto de T-DNA (2, 5, 6, 7, 9, 17 y 20). En total, de las 22 plantas con fenotipo WT, 7 plantas portaban solamente el alelo WT, razón por la cual fueron catalogadas como acigotas para el alelo inserto de T-DNA. En las 15 plantas restantes amplificaron ambos alelos, es decir, son plantas hemicigotas para el inserto de T-DNA. Así pues, la segregación observada se ajusta a la esperada para un carácter de herencia monogénica y recesiva (7 acigotas: 15 hemicigotas: 10 homocigotas;  $X^2 = 0,688$ ; P value = 0,709). Estos resultados



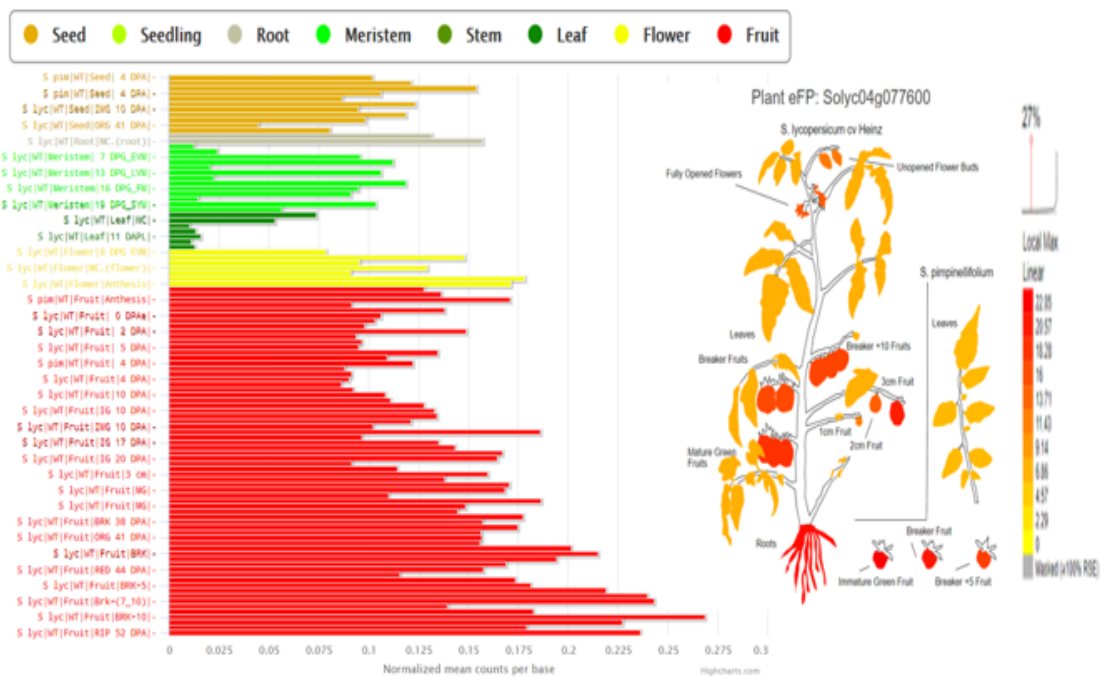
indican que existe cosegregación entre el fenotipo mutante observado y el inserto de T-DNA, y por tanto dicho T-DNA es la causa más probable del fenotipo mutante observado.



**Figura 13.** Análisis de co-segregación entre el inserto de T-DNA y el fenotipo mutante llevado a cabo sobre las poblaciones segregantes TG2 y TG3. El tamaño del fragmento de ADN para el alelo WT es de 977 pb y en el mutante 808 pb. Los controles utilizados son una planta de la población TG1, una planta Moneymaker (MM) y una planta con fenotipo mutante (M).

#### 4. Caracterización *in silico* del gen

El patrón de expresión obtenido con la información existente en la base de datos de TomExpress (<http://tomexpress.toulouse.inra.fr/query>), en los distintos tejidos de tomate del gen perteneciente al dominio funcional de un factor de transcripción de la superfamilia BSD muestran que la expresión es mayor en los frutos y flores, seguido de la raíz, semillas y meristemas (Fig. 14). En las hojas también se expresa, aunque en menor medida (Fig. 14). Los datos del patrón de expresión se visualizan gráficamente con la herramienta web ePlant de la base de datos *The BAR and other Data Analysis Tools for Plant Biology* ([http://bar.utoronto.ca/eplant\\_tomato/](http://bar.utoronto.ca/eplant_tomato/)).

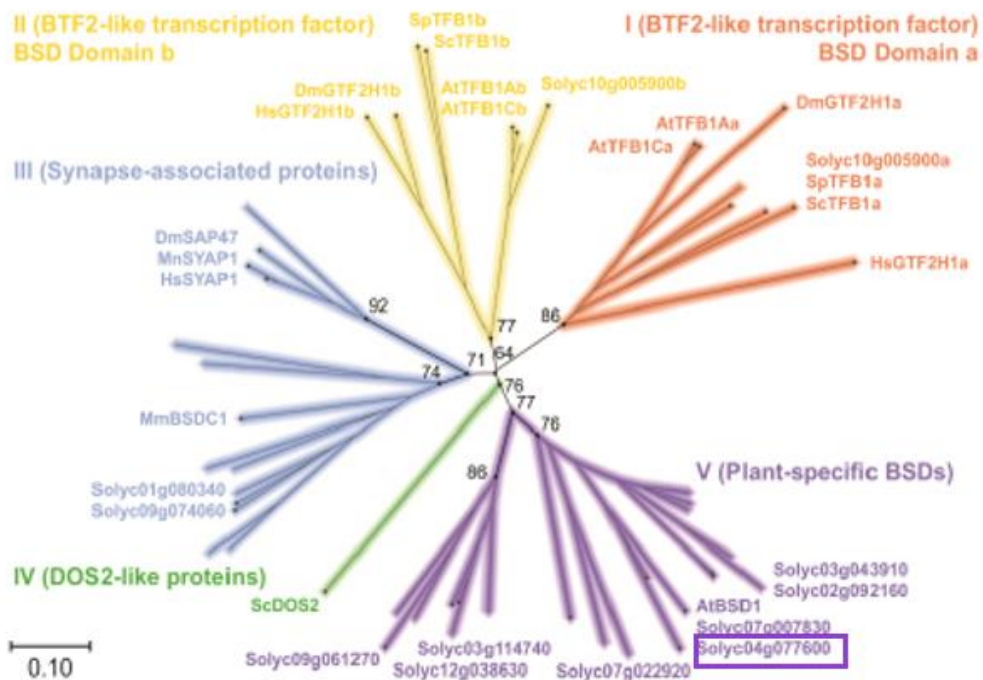


**Figura 14.** Patrón de expresión del gen *SIBSD1* y representación gráfica de la localización y niveles transcritos en la planta de tomate. Fuentes: TomExpress (Izquierda) y The BAR and other Data Analysis Tools for Plant Biology (Derecha).

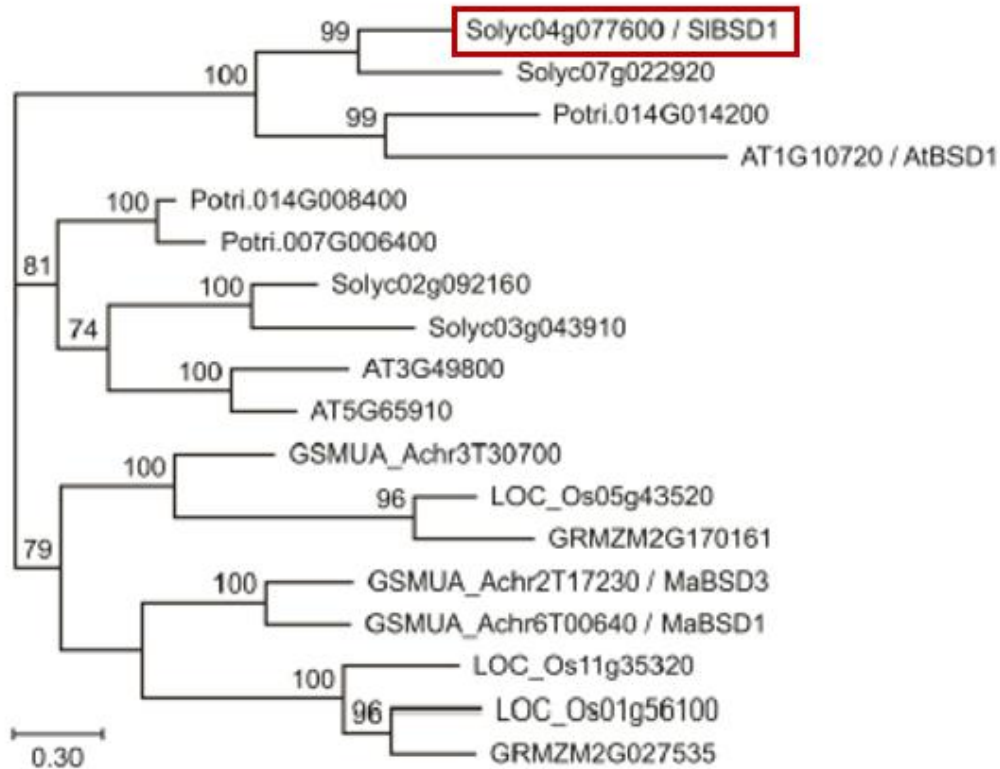
A partir de la secuencia proteica predicha, que se encuentra depositada en la base de datos de SGN (<https://solgenomics.net>), se identificaron sus dominios conservados empleando la herramienta *Conserved Domain Database* de la base de datos del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>). Los resultados del análisis mostraron que dicha secuencia codifica para una proteína de 440 aminoácidos, presentando un dominio perteneciente a la superfamilia BSD entre las posiciones 195 y 250. Dicho dominio de unión al ADN que se caracteriza por presentar tres  $\alpha$ -hélices que tienen residuos de triptófano y fenilalanina altamente conservados, cuya localización se encuentra en el extremo C-terminal (Doerks *et al.*, 2002). Las proteínas que contienen dominios BSD, tienen un elevado grado de conservación, lo que sugiere que este tipo de dominios podrían presentar una función relevante, aunque en plantas no existe suficiente información sobre la función que desempeñan estos factores de transcripción. En plátano se han encontrado cuatro factores de transcripción que contienen dominios BSD (*MaBSD*, *MaBSD1*, *MaBSD2*, *MaBSD3*) que regulan ciertos genes de la pared celular (*MaEXP1* y *MaEXP2*) involucrados en la maduración del fruto (Ba *et al.*, 2014) y en la multiplicación celular durante la embriogénesis somática (Shivani *et al.*, 2017). En tomate se especula que regulan de forma significativa la senescencia de las hojas y el crecimiento vegetal de la planta, este es el caso del factor de transcripción *SIBSD1* (Fan *et al.*, 2020). Líneas knockout del factor de

transcripción *AtBSD1* en plantas de *Arabidopsis*, ortólogo de *SIBSD1* de tomate, muestran que no resulta en un factor limitante en el crecimiento y desarrollo de la planta, posiblemente por la redundancia funcional de otros genes homólogos a BSD presentes en *Arabidopsis* (Park *et al.*, 2009). Todo sugiere que los factores de transcripción pertenecientes a la superfamilia BSD presentan funciones específicas de cada especie de planta, aunque no todas las proteínas que tienen dominios tipo BSD son factores de transcripción (Fan *et al.*, 2020).

Por último, Fan *et al.* (2020) realizaron una búsqueda de los homólogos al gen *SIBSD1* que aparece en la base de datos de SGN (<https://solgenomics.net/>). En el estudio se llevó a cabo un análisis filogenético enfrentando la secuencia nucleotídica del gen *SIBSD1*, mismo gen identificado en este TFG, y sus homólogos identificados en otras especies (Fig. 15 y 16). La construcción del árbol filogenético de dicho gen muestra que *SIBSD1* y *Solyc07g022920* son genes parálogos, a causa de eventos de duplicación génica, y se encuentran relativamente distantes el uno del otro al existir un porcentaje de identidad que se aproxima al 50%. Al mismo tiempo, estos genes parálogos son ortólogos de *AtBSD1*, es decir que comparten el último ancestro común y han divergido por un evento de especiación. Por todo ello, los diferentes nodos del análisis filogenético (Fig. 15 y 16) muestran las distintas funciones que presentan los factores de transcripción BSD en cada especie.



**Figura 15.** Análisis filogenético de los genes homólogos al gen *Solyc04077600* elaborado con el método de Neighbour-joining en el que cada clado se identifica con un color distinto. Fuente: Fan *et al.*, 2020.



**Figura 16.** Árbol filogenético de los genes homólogos al gen *Solyc04077600* elaborado con el método de Máxima verisimilitud y el modelo JTT + G + F. Fuente: Fan *et al.*, 2020.

En definitiva, se ha conseguido identificar un mutante insercional cuyo gen etiquetado, *SIBSDI*, resultó pertenecer a una familia pobremente estudiada en plantas. Dicho gen pone en evidencia las diferencias que existen en distintos organismos, en cuanto a relevancia funcional, como pueden ser *Arabidopsis* y tomate al estar implicado en procesos de acumulación de fotoasimilados, y por tanto en la calidad del fruto, lo cual solo se aprecia en el fruto carnoso de tomate. Por todo ello, y a pesar de que hay genes descritos en otras especies que presentan elevada homología, resulta de gran ayuda conocer su función en cada uno de los distintos organismos durante la evolución.

## IV. CONCLUSIONES

En este TFG se ha abordado la caracterización fenotípica y molecular del mutante insercional *1600-etmm*, y en base a los resultados obtenidos se pueden extraer las siguientes conclusiones:

PRIMERA.- El mutante *1600-etmm* se caracteriza por tener un retraso en el crecimiento vegetativo, siendo las plantas de menor tamaño, si bien no se ve afectado el desarrollo reproductivo, y por presentar un cierto grado de clorosis en las hojas, siendo un indicador del inicio de una senescencia precoz en plantas.

SEGUNDA.- El análisis genético llevado a cabo en las líneas segregantes TG2 y TG3 demuestran que la mutación responsable del fenotipo *1600-etmm* tiene un patrón de herencia monogénico, autosómico y recesivo.

TERCERA.- La mutación responsable del fenotipo *1600-etmm* ha sido identificada por la clonación de las regiones adyacentes al T-DNA, lo que ha permitido conocer la posición y orientación del inserto en el genoma de la planta. El T-DNA se ha insertado en la región 3'UTR del gen *Solyc04g077600*, el cual codifica para un factor de transcripción de la familia BSD, identificado como SIBSD1.

CUARTA.- El análisis de co-segregación, mediante genotipado por PCR, entre el fenotipo observado y el inserto de T-DNA, confirma que dicho inserto es el responsable del fenotipo mutante.

QUINTA.- La caracterización *in silico* muestra un modelo de expresión del gen *SIBSD1* preferente en frutos, flores y raíz y con una actividad media en hojas. La expresión de los factores de transcripción con dominios funcionales BSD están altamente conservados y participan en procesos del desarrollo y senescencia en plantas.

## V. PERSPECTIVAS FUTURAS

Una vez conocida la alteración fenotípica que genera la mutación del gen *SIBSD*, el siguiente paso es realizar un análisis funcional del gen basado en el diseño de construcciones de complementación o silenciamiento génico. Además, para reforzar la hipótesis de que la mutación de este gen es la responsable del fenotipo observado resulta necesaria la obtención de nuevos alelos mutantes del gen empleando la técnica de edición génica CRISPR-Cas. Estas construcciones nos permitirían conocer los fenotipos asociados a la sobreexpresión y represión de la expresión del gen *SIBSDI*. Además, de las líneas TG2 editadas, tras su autofecundación, se obtendrán líneas editadas sin T-DNA, las cuales, probablemente representen el salto de la aplicación de transgénicos en la agricultura. Por otro lado, el estudio del transcriptoma mediante RNA-seq de hojas y frutos de plantas con fenotipo mutante y WT nos permitirían definir la compleja red de señalización molecular del factor de transcripción durante el desarrollo vegetal de la planta de tomate, a la vez que nos permitirá identificar genes estrechamente relacionados y/o genes que interaccionen con el gen *SIBSDI*.

## VI. BIBLIOGRAFÍA

- Amorim ARDS (2017).** Caracterização de óleos essenciais e atividade antifúngica para patógenos de doenças na pós-colheita de mamão (*Carica papaya* L.). *AGRONOMIA Monografías*.  
<http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/37556>
- Alexander L, Grierson D (2002).** Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. *Journal of Experimental Botany*, 53(377), 2039-2055.
- Ali A, Gao X, Guo Y. 2018.** Initiation, Progression, and Genetic Manipulation of Leaf Senescence. *Methods in Molecular Biology 1744*, 9-31.
- Arab L, Steck S (2000).** Lycopene and cardiovascular disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71(6), 1691S-1695S.
- Argerich C (1995).** Manual de producción de semillas hortícolas. *Tomate.[En línea]. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina.*
- Arie T, Takahashi H, Kodama M, Teraoka T (2007).** Tomato as a model plant for plant-pathogen interactions. *Plant Biotechnology*, 24(1), 135-147.
- Ba LJ, Shan W, Xiao YY, Chen JY, Lu WJ, Kuang JF (2014).** A ripening-induced transcription factor MaBSD1 interacts with promoters of MaEXP1/2 from banana fruit. *Plant Cell Reports*, 33(11), 1913-1920.
- Bai Y, Lindhout P (2007).** Domestication and breeding of tomatoes: what have we gained and what can we gain in the future?. *Annals of Botany*, 100(5), 1085-1094.
- Ballinger DG, Benzer S (1989).** Targeted gene mutations in Drosophila. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(23), 9402-9406.
- Bauchet G, Causse M (2012).** Genetic diversity in tomato (*Solanum lycopersicum*) and its wild relatives. *Genetic Diversity in Plants*, 8, 134-162.
- Bensen RJ, Johal GS, Crane VC, Tossberg JT, Schnable PS, Meeley RB, Briggs SP (1995).** Cloning and characterization of the maize An1 gene. *The Plant Cell*, 7(1), 75-84.
- Bergougnoux V (2014).** The history of tomato: from domestication to biopharming. *Biotechnology Advances*, 32(1), 170-189.
- Blanca J, Cañizares J, Cordero L, Pascual L, Díez MJ, Nuez F (2012).** Variation revealed by SNP genotyping and morphology provides insight into the origin of the tomato. *PLoS ONE*, 7(10), e48198.
- Blanca J, Montero-Pau J, Sauvage C, Bauchet G, Illa E, Díez MJ, 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(1), 1-19.
- Bundock P, Mroczek K, Winkler AA, Steensma HY, Hooykaas, PJJ (1999).** T-DNA from *Agrobacterium tumefaciens* as an efficient tool for gene targeting in *Kluyveromyces lactis*. *Molecular and General Genetics MGG*, 261(1), 115-121.

- Campisi L, Yang Y, Yi Y, Heilig E, Herman B, Cassista AJ, Allen D, 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.
- Cascales-Angosto M (2005).** Vía de la ubiquitina-proteosoma. *An. R. Acad. Farm*, 45-82.
- Chamarro J (1995).** Anatomía y fisiología de la planta. In *El cultivo del tomate* (pp. 43-91). Mundi-Prensa.
- Chen E, Hermanson S, Ekker SC (2004).** Syndecan-2 is essential for angiogenic sprouting during zebrafish development. *Blood*, 103(5), 1710-1719.
- Cubero-Salmerón JI (2003).** *Introducción a la mejora genética vegetal* (No. 631.53). Mundi-Prensa,.
- Dhanasekaran M, Negi S, Sugiura Y (2006).** Designer zinc finger proteins: tools for creating artificial DNA-binding functional proteins. *Accounts of Chemical Research*, 39(1), 45-52.
- Doerks T, Huber S, Buchner E, Bork P (2002).** BSD: a novel domain in transcription factors and synapse-associated proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 27(4), 168-170.
- Fan Y, Niu X, Huang L, Gross R, Lu H, Hawkins M, Yuan Y, Miao M, Liu Y, Xiao F (2020).** A novel BSD domain-containing transcription factor controls vegetative growth, leaf senescence, and fruit quality in tomato. *Journal of Experimental Botany*, 71(22), 6945-6957.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2020).** FAOSTAT-Producción agrícola [online]. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>
- Feldmann KA (1991).** T-DNA insertion mutagenesis in Arabidopsis: mutational spectrum. *The Plant Journal*, 1(1), 71-82.
- Fernández-Lozano A, Yuste-Lisbona FJ, Pérez-Martín F, Pineda B, Moreno V, Lozano R, Angosto T (2015).** Mutation at the tomato EXCESSIVE NUMBER OF FLORAL ORGANS (ENO) locus impairs floral meristem development, thus promoting an increased number of floral organs and fruit size. *Plant Science*, 232, 41-48.
- Fernando LGJ (2012).** *Agentes mutagénicos y su daño en el ADN*. (Investigación y estudios de posgrado, Universidad de Guadalajara)  
<http://repositorio.cucba.udg.mx:8080/xmlui/handle/123456789/5800>.
- Foolad MR (2007).** Genome mapping and molecular breeding of tomato. *International Journal of Plant Genomics*, 2007.
- Frary A, Doğanlar S (2003).** Comparative genetics of crop plant domestication and evolution. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 27(2), 59-69.
- García-Martínez S, Andreani L, Garcia-Gusano M, Geuna F, Ruiz JJ (2006).** Evaluation of amplified fragment length polymorphism and simple sequence repeats for tomato germplasm fingerprinting: utility for grouping closely related traditional cultivars. *Genome*, 49(6), 648-656.



- García-Morales S, Gómez-Merino FC, Trejo-Téllez LI, Herrera-Cabrera ÉB (2013).** Factores de transcripción involucrados en respuestas moleculares de las plantas al estrés osmótico. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 36(2), 105-115.
- Gelvin SB (2003).** Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(1), 16-37.
- Gerszberg A, Hnatuszko-Konka K, Kowalczyk T, Kononowicz AK (2015).** Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the service of biotechnology. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 120(3), 881-902.
- Guízar-Vázquez JJ (1994).** Asesoramiento Genético. Genética Clínica. Diagnóstico y manejo de las enfermedades hereditarias. 2nd. ed. México: Manual Moderno, 649-62.
- Hesketh J (2004).** 3'-Untranslated regions are important in mRNA localization and translation: lessons from selenium and metallothionein. *Biochemical Society Transactions*, 32(6), 990-993.
- Ito Y (2016).** Regulation of tomato fruit ripening by MADS-Box transcription factors. *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ*, 50(1), 33-38.
- Jenkins JA (1948).** The origin of the cultivated tomato. *Economic Botany*, 2(4), 379-392.
- Jeon JS, Lee S, Jung KH, Jun SH, Jeong DH, Lee J, An G (2000).** T-DNA insertional mutagenesis for functional genomics in rice. *The Plant Journal*, 22(6), 561-570.
- Jones-Jr JB. (2007).** *Tomato plant culture: in the field, greenhouse, and home garden.* CRC press.
- Joshi R, Wani SH, Singh B, Bohra A, Dar ZA, Lone AA, Pareek A, Singla-Pareek SL (2016).** Transcription factors and plants response to drought stress: current understanding and future directions. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1029.
- Kaiser K, Goodwin SF (1990).** " Site-selected" transposon mutagenesis of *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(5), 1686-1690.
- Khan SA, Li MZ, Wang SM, Yin HJ (2018).** Revisiting the role of plant transcription factors in the battle against abiotic stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6), 1634.
- Kimura S, Sinha N (2008).** Tomato (*Solanum lycopersicum*): a model fruit-bearing crop. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2008(11), pdb-emo105.
- Knapp S, Peralta IE (2016).** The tomato (*Solanum lycopersicum* L., Solanaceae) and its botanical relatives. In *The tomato genome* (pp. 7-21). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Koes R, Souer E, Van Houwelingen A, Mur L, Spelt C, Quattrocchio F, Wing J, Oppedijk S, Maes T (1995).** Targeted gene inactivation in petunia by PCR-based selection of transposon insertion mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(18), 8149-8153.

- Kohler JJ, Schepartz A (2001).** Effects of nucleic acids and polyanions on dimer formation and DNA binding by bZIP and bHLHZip transcription factors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 9(9), 2435-2443.
- Kuldell N (2005).** *Zinc Finger Proteins: From Atomic Contact to Cellular Function*. Medical Intelligence Unit. Springer.
- Kuromori T, Takahashi S, Kondou Y, Shinozaki K, Matsui M (2009).** Phenome analysis in plant species using loss-of-function and gain-of-function mutants. *Plant and Cell Physiology*, 50(7), 1215-1231.
- Leonardi C, Ambrosino P, Esposito F, Fogliano V (2000).** Antioxidative activity and carotenoid and tomatine contents in different typologies of fresh consumption tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10), 4723-4727.
- Lim PO, Kim HJ, Gil-Nam H. (2007).** Leaf senescence. *Annual Review of Plant Biology* 58, 115-136.
- López de Silanes I, Paz-Quesada M, Esteller M (2007).** Aberrant regulation of messenger RNA 3'-untranslated region in human cancer. *Analytical Cellular Pathology*, 29(1), 1-17.
- Lozano R, Giménez E, Cara B, Capel J, Angosto T (2009).** Genetic analysis of reproductive development in tomato. *International Journal of Developmental Biology*, 53(8-9-10), 1635-1648.
- Ma X, Zhang Y, Turečková V, Xue GP, Fernie AR, Mueller-Roeber B, Balazadeh S (2018).** The NAC transcription factor SINAP2 regulates leaf senescence and fruit yield in tomato. *Plant Physiology*, 177(3), 1286-1302.
- Martienssen RA (1998).** Functional genomics: probing plant gene function and expression with transposons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(5), 2021-2026.
- McKinney EC, Ali N, Traut A, Feldmann KA, Belostotsky DA, McDowell JM, Meagher RB (1995).** Sequence-based identification of T-DNA insertion mutations in Arabidopsis: actin mutants act2-1 and act4-1. *The Plant Journal*, 8(4), 613-622.
- Michaelson MJ, Price HJ, Ellison JR, Johnston JS (1991).** Comparison of plant DNA contents determined by Feulgen microspectrophotometry and laser flow cytometry. *American Journal of Botany*, 78(2), 183-188.
- Mosquera, JM (2014).** *Modulación de la interacción de péptidos derivados de factores de transcripción con secuencias específicas de ADN* (Doctoral dissertation, Universidad de Santiago de Compostela). <https://dialnet.unirioja.es/servlet/dctes?codigo=125142>.
- Moyle LC (2008).** Ecological and evolutionary genomics in the wild tomatoes (Solanum sect. Lycopersicon). *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, 62(12), 2995-3013.
- Muños S, Ranc N, Botton E, Bérard A, Rolland S, Duffé P, Carretero Y, Le-Paslier MC, Delalande C, Bouzayen M, Brunel D, Causse M (2011).** Increase in tomato locule number is controlled by two single-nucleotide polymorphisms located near WUSCHEL. *Plant Physiology*, 156(4), 2244-2254.

- Naika S, De-Jeude JVL, De-Goffau M, Hilmi M (2005).** *AD17E Cultivation of tomato* (No. 17). Agromisa Foundation.6-7.
- Nuez F (1995).** El cultivo del tomate. *Mundi-Prensa. Madrid, España.*
- Ochoa-Reyes E, Ornelas-Paz JJ, Ruiz-Cruz S, Ibarra-Junquera V, Pérez-Martínez JD, Guevara-Arauz JC, Aguilar CN (2013).** Tecnologías de deshidratación para la preservación de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Biotecnia*, 15(2), 39-46.
- Olmstead RG, Bohs L (2006, July).** A summary of molecular systematic research in Solanaceae: 1982-2006. In *VI International Solanaceae Conference: Genomics Meets Biodiversity* 745 (pp. 255-268).
- Park J, Kim MJ, Jung SJ, Suh MC (2009).** Identification of a novel transcription factor, AtBSD1, containing a BSD domain in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Biology*, 52(2), 141-146.
- Peralta IE, Knapp S, Spooner DM (2006).** Nomenclature for wild and cultivated tomatoes. *Tomato Genetics Cooperative Report*, 56, 6-12.
- Peralta IE, Spooner DM, Knapp S (2008).** Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (*Solanum* sect. *Lycopersicoides*, sect. *Juglandifolia*, sect. *Lycopersicon*; Solanaceae). *Systematic Botany Monographs*, 84.
- Pérez-Martín F, Yuste-Lisbona FJ, Pineda B, Angarita-Díaz MP, García-Sogo B, Antón T, Sánchez S, Giménez E, Atarés A, Fernández-Lozano A, Ortiz-Atienza A, García Alcázar M, Castañeda L, Fonseca R, Capel C, Goergen G, Sánchez J, Quispe JL, Capel J, Angosto T, Moreno V, Lozano R (2017).** A collection of enhancer trap insertional mutants for functional genomics in tomato. *Plant Biotechnology Journal*, 15(11), 1439-1452.
- Pérez-Martín F (2018).** *La mutagénesis insercional como herramienta genómica en tomate: aislamiento y análisis funcional del pod1, un regulador clave para el desarrollo del polen.* (Doctoral dissertation, Universidad de Almería)  
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=222088>.
- Razifard H, Ramos A, Della-Valle AL, Bodary C, Goetz E, Manser EJ, Li X, Zhang L, Visa S, Tieman D, van der Knaap E, Caicedo AL (2020).** Genomic evidence for complex domestication history of the cultivated tomato in Latin America. *Molecular Biology and Evolution*, 37(4), 1118-1132.
- Rick CM (1978).** The tomato. *Scientific American*, 239(2), 76-89.
- Rico CL (2005).** *Nuevos retrotransposones de naranjo. Desarrollo de marcadores basados en retrotransposones para la evaluación de la biodiversidad de los críticos* (Tesis de doctorado. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona. España).  
<https://www.tdx.cat/handle/10803/1046#page=1>.
- Rodríguez GR, Muños S, Anderson C, Sim SC, Michel A, Causse M, Gardener BBM, Francis D, van der Knaap E (2011).** Distribution of SUN, OVATE, LC, and FAS in the

tomato germplasm and the relationship to fruit shape diversity. *Plant physiology*, 156(1), 275-285.

**Saibo NJ, Lourenço T, Oliveira MM (2009).** Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses. *Annals of Botany*, 103(4), 609-623.

**Sainju UM, Dris R (2006).** Sustainable production of tomato. *Europe*, 703(21,423,287), 26-7.

**Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463-5467.

**Schupp JM, Price LB, Klevytska A, Keim P (1999).** Internal and flanking sequence from AFLP fragments using ligation-mediated suppression PCR. *Biotechniques*, 26(5), 905-912.

**Shivani, Awasthi P, Sharma V, Kaur N, Kaur N, Pandey P, Tiwari S (2017).** Genome-wide analysis of transcription factors during somatic embryogenesis in banana (*Musa* spp.) cv. Grand Naine. *PLoS ONE*, 12(8), e0182242.

**Sims WL (1980).** History of tomato production for industry around the world. *Acta Horticulture* 100, 25–26.

**Spertini D, Béliveau C, Bellemare G (1999).** Screening of transgenic plants by amplification of unknown genomic DNA flanking T-DNA. *Biotechniques*, 27(2), 308-314.

**Springer PS (2000).** Gene traps: tools for plant development and genomics. *The Plant Cell*, 12(7), 1007-1020.

**Tomato Genome Consortium (2012).** The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, 485(7400), 635-641.

**Trejo-Saavedra DL, Rodríguez-Negrete EA, Vielle-Calzada JP, Rivera-Bustamante RF (2015).** Trampas génicas como herramienta para identificar genes en plantas que responden a la infección por virus. *Agrociencia*, 49(6), 593-612.

**Valderrama AM (2005).** Transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*: "Ingeniería genética natural aplicada". *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 58(1), 2569-2585.

**Wang Z, Huang S, Jia C, Liu J, Zhang J, Xu B, Jin Z (2013).** Molecular cloning and expression of five glutathione S-transferase (GST) genes from Banana (*Musa acuminata* L. AAA group, cv. Cavendish). *Plant Cell Reports*, 32(9), 1373-1380.

**Watson RR, Preedy VR (Eds.) (2008).** *Botanical medicine in clinical practice*. CABI.

**Xu C, Liberatore KL, MacAlister CA, Huang Z, Chu YH, Jiang K, Brooks C, Ogawa-Ohnishi M, Xiong G, Pauly M, Eck JV, Matsubayashi Y, van der Knaap E, Lippman ZB (2015).** A cascade of arabinosyltransferases controls shoot meristem size in tomato. *Nature Genetics*, 47(7), 784-792.

**Yamasaki K, Kigawa T, Seki M, Shinozaki K, Yokoyama S (2013).** DNA-binding domains of plant-specific transcription factors: structure, function, and evolution. *Trends in Plant Science*, 18(5), 267-276.

**Yang Z, Wang C, Qiu K, Chen H, Li Z, Li X, Song J, Wang X, Gao J, Kuai B, Zhou X (2020).** The transcription factor ZmNAC126 accelerates leaf senescence downstream of the ethylene signalling pathway in maize. *Plant, Cell & Environment*, 43(9), 2287-2300.

**Yuste-Lisbona FJ, Fernández-Lozano A, Pineda B, Bretones S, Ortíz-Atienza A, García-Sogo B, Muller NA, Angosto T, Capel J, Moreno V, Jiménez-Gómez JM, Lozano R (2020).** ENO regulates tomato fruit size through the floral meristem development network. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(14), 8187-8195.