

UNIVERSIDAD DE ALMERÍA



FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

MASTER EN BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL Y AGROALIMENTARIA.
ESPECIALIDAD: BIOAGRONOMÍA Y BIOTECNOLOGÍA DE ALIMENTOS.

Trabajo de Investigación

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE UN MUTANTE
INSERCIONAL DE TOMATE



Laura Castañeda Cruz

Septiembre, 2011.

Tutores:

Dr. D. Rafael Lozano Ruíz.

Dr. Dña Maria Salinas Navarro

RESUMEN

La mutagénesis insercional ha supuesto en los últimos años una herramienta biotecnológica básica para la identificación y etiquetado de genes que controlan caracteres implicados en el desarrollo con elevado interés agronómico, como son la arquitectura de la planta, precocidad, androsterilidad, partenocarpia o la maduración y conservación post-cosecha del fruto. El aspecto más relevante de esta aproximación es que, tras la identificación de un mutante con fenotipo de interés, el gen causante de dicho fenotipo queda etiquetado por el T-DNA, lo que facilita su clonación. La utilidad de la mutagénesis insercional se puede incrementar utilizando trampas génicas que además de generar mutaciones por inserción del T-DNA, permiten identificar los elementos de regulación de un gen y llevar a cabo el análisis funcional. Por ello se están utilizando trampas de intensificadores (*enhancer trapping*) y de promotores (*promoter trapping*) con gran profusión en especies modelo como *Arabidopsis thaliana* donde han comenzado a generarse una ingente cantidad de resultados positivos.

Sin embargo, no podemos obviar que tras la transformación de las células vegetales durante la estrategia de mutagénesis insercional, existe un proceso de regeneración in-vitro en el que dichas células se ven sometidas a un gran estrés, entrando además en contacto con componentes mutagénicos propios de los medios de cultivo. Estas condiciones en ocasiones desencadenan la aparición de mutaciones conocidas con el nombre de variaciones somaclonales que pueden resultar ser las responsables del fenotipo observado en las plantas regeneradas.

En la actualidad se está aplicando la estrategia de mutagénesis insercional también en tomate (*Solanum lycopersicum* L.), en la que se están obteniendo prometedores resultados. A partir de una colección de mutantes de T-DNA en tomate obtenidos utilizando una trampa de intensificadores se ha seleccionado una familia cuyo fenotipo alterado tiene alto interés agronómico. Se ha descartado la influencia del ambiente sobre el fenotipo realizando dos evaluaciones agronómicas en diferentes ciclos de cultivo: primavera-verano y otoño-invierno. Además, la familia mutante seleccionada se ha caracterizado molecularmente mediante experimentos Southern blot, reacciones de PCR y PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR).

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El tomate

El tomate cultivado (*Solanum lycopersicum* L.), es una especie incluida dentro de la familia de las Solanáceas. Las Solanáceas son la tercera familia en importancia económica dentro de los cultivos vegetales y entre ellas se incluyen además del tomate otras especies ampliamente utilizadas en agricultura como la patata, el tabaco, la berenjena, el pimiento o especies ornamentales como la petunia. Esta familia incluye más de 3000 especies de las cuales muchas se originaron en las regiones del Amazonas y los Andes. Posteriormente colonizaron multitud de hábitats dentro de la selva, el desierto y alta montaña, lo cual justifica la enorme diversidad genética acumulada por las especies de esta familia. *Solanum lycopersicum*, se originó en la región de los Andes, y es descendiente de la variedad cerasiforme. Esta variedad se introdujo por primera vez a Europa en el siglo XV, cuando ya había alcanzado un avanzado estado de domesticación en México.

1.1.1. Taxonomía

El tomate cultivado es una especie dicotiledónea incluida en la familia de las Solanáceas, y aunque recientemente se ha introducido alguna modificación, la taxonomía generalmente aceptada es la siguiente (Esquinas-Alcázar et al., 1995):

Clase: Dicotiledóneas

Orden: Solanales

Suborden: Solanineae

Familia: Solanaceae

Subfamilia: Solanoideae

Tribu: Solaneae

Género: *Solanum*

Especie: *Solanum lycopersicum* L.

1.1.2. Descripción botánica de la especie

La planta de tomate es una planta perenne, de porte arbustivo, que se cultiva como anual. Puede desarrollarse de forma rastrera, semirrecta o erecta. Su sistema radicular está compuesto por una raíz principal corta y débil, raíces secundarias (numerosas y potentes) y raíces adventicias. En el tallo principal, de 2 a 4 cm de diámetro se desarrollan hojas, tallos secundarios de ramificación simpodial e inflorescencias. La hoja es compuesta e imparipinnada, con folíolos peciolados, lobulados y borde dentado. La flor es simétrica, regular e hipogina y consta de 5 o más sépalos y el mismo número de pétalos, estos últimos de color amarillo. Los estambres, unidos lateralmente, forman un cono estaminal que envuelve el gineceo, este último portador de un ovario bi o plurilocular. Las flores se agrupan en inflorescencias de tipo racemoso (dicasio) y se unen al tallo de la inflorescencia por medio de un pedicelo articulado que contiene la zona de abscisión, distinguible como un engrosamiento con un pequeño surco originado por una reducción del espesor del córtex. El fruto es una baya bi o plurilocular, constituido por el pericarpo, el tejido placentario y las semillas (Salinas, 2006).

1.1.3. Biología reproductiva del tomate

El desarrollo de las plantas de tomate sigue un patrón simpodial. Este tipo de desarrollo se caracteriza porque el meristemo apical, después de desarrollar un número variable de hojas (entre 6 y 8 en la mayoría de los genotipos cultivados), se determina como meristemo floral y origina una flor terminal (Figura 1). El desarrollo de la planta continúa a partir del meristemo axilar de la última hoja del segmento, que da lugar a un nuevo segmento simpodial (Atherton y Harris, 1986).

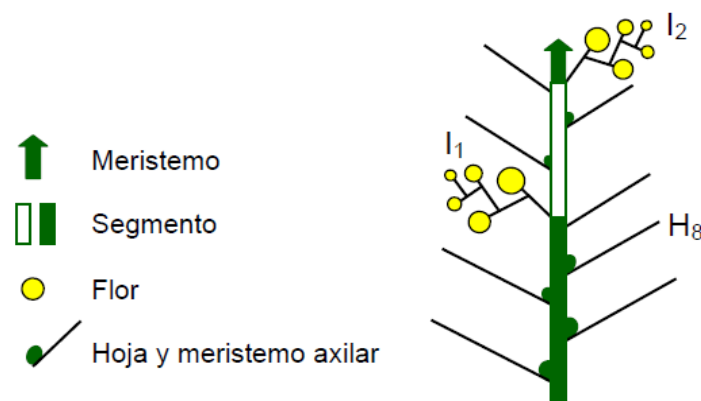


Figura 1. Representación esquemática del hábito de crecimiento simpodial, característico del patrón de desarrollo de tomate. H = hoja; I = inflorescencia.

En el desarrollo de tomate se observan 3 etapas, la etapa inicial comienza con la germinación de la semilla y el desarrollo de la plántula. La etapa vegetativa se inicia a partir de los 21 días tras de la germinación y dura entre 25 a 30 días. En ella el meristemo apical desarrolla un segmento inicial que produce de 6 a 8 hojas dependiendo del genotipo y concluye con el desarrollo de una inflorescencia, que marca el inicio del desarrollo reproductivo. En la última etapa o etapa reproductiva, el meristemo axilar de la última hoja produce un nuevo segmento simpodial.

1.1.4. Genómica del tomate

Solanum lycopersicum no sólo constituye uno de los productos más importantes de la agricultura intensiva sino que además es una de las especies cultivadas que está experimentando en los últimos años mayores avances en los ámbitos de genética, genómica y mejora. Actualmente, es el sistema modelo para estudiar la biología del desarrollo de los frutos carnosos así como las interacciones planta-patógeno. Esto se debe a que el tomate es una especie diploide, el tiempo de generación es corto y se dispone de protocolos rutinarios de transformación así como recursos genéticos y genómicos. Entre estos recursos se incluyen las colecciones de mutantes, una extensa base de EST, mapas, microarrays, poblaciones genéticas caracterizadas fenotípicamente y un genoma recientemente secuenciado (Bouchez et al, 1998).

1.2. Mutación y tipos de mutaciones

Una mutación es una alteración en la secuencia de ADN que puede implicar desde la modificación de un solo nucleótido hasta la ganancia o pérdida de cromosomas enteros. La mutación es una fuente de nuevos alelos y por tanto es responsable de gran parte de la variación existente entre poblaciones. En función a su origen, las mutaciones pueden clasificarse en mutaciones espontáneas y mutaciones inducidas.

Mutaciones espontáneas son aquellas que ocurren de manera natural. Se cree que la mayoría de las mutaciones espontáneas se producen durante el proceso enzimático de la replicación del ADN. Una vez se produce un error en el código genético, éste puede reflejarse en la composición de aminoácidos de la proteína que codifica. Si el aminoácido alterado se encuentra en una parte esencial de la molécula para su estructura o actividad bioquímica, puede producirse una alteración de su función.

En contraste a estos sucesos espontáneos, encontramos las mutaciones inducidas como aquellas provocadas artificialmente. La primera demostración de inducción artificial de mutaciones se produjo en 1927, cuando Herman J. Muller publicó que los rayos X pueden provocar mutaciones en *Drosophila*.

Para inducir las mutaciones se usan métodos físicos como la irradiación con luz ultravioleta (UV) o la biobalística, agentes químicos como etilmetanosulfonato (EMS) o nitrosoguanidina (NG) o mutación insercional provocada por la integración de un T-DNA o transposones, como por ejemplo, el elemento Ac/Ds de maíz (Emmanuel y Levy, 2002).

1.2.1. Mutagénesis insercional

Una herramienta esencial que permite llevar a cabo el análisis funcional de una secuencia genómica, es la posibilidad de producir mutaciones, fenómeno conocido como mutagénesis, que anulen la función de aquellos genes de interés agronómico. Entre las aproximaciones existentes para llevar a cabo mutagénesis en poblaciones de plantas, destaca la mutagénesis insercional, que se ha convertido en los últimos años en una herramienta básica para la identificación y etiquetado de genes. Esta técnica consiste en la utilización de elementos genéticos capaces de insertarse aleatoriamente en el genoma de la planta, esto son, los transposones (Martienssen, 1998) y el T-DNA de *Agrobacterium* (Azpiroz-Leehan and Feldmann, 1997). Hasta hace poco, la mayoría de programas de mutagénesis se han llevado a cabo mediante los transposones de maíz en especies como *Arabidopsis*, maíz y tomate pero las amplias expectativas, el fácil manejo y detección de la mutagénesis mediante T-DNA, hacen que este sea el método más utilizado en la actualidad.

1.2.1.1. Mutagénesis insercional mediante transposones

Los transposones son elementos genéticos móviles que pueden moverse de una localización genómica a otra, gracias a la presencia de secuencias repetidas cortas que lo flanquean y que son capaces de replicar e insertar una copia en un lugar nuevo en el genoma. Gracias a estas características, los transposones son herramientas muy útiles para la manipulación genética. Los primeros transposones fueron descubiertos en maíz por Barbara McClintock, hallazgo por el cual fue galardonada con el premio Nobel en 1983.

Los transposones han revolucionado la investigación genética en organismos modelo como *Drosophila* y *Arabidopsis thaliana* (Spradling et al., 1995; Parinov y Sundaresan, 2000).

McClintock describió el sistema Ac/Ds en maíz, que hoy día se emplea como herramienta de mutagénesis en plantas para caracterizar genes de función desconocida. Este sistema consta del elemento autónomo Ac, que es capaz de transponerse por si solo y el elemento no autónomo Ds, que necesita la presencia de algún elemento autónomo para transponerse. El sistema Ac/Ds no depende de factores de transposición específicos del organismo hospedador y además, los factores implicados en el mecanismo de movilidad se encuentran ampliamente conservados en las distintas especies, lo que ha hecho posible el uso de este sistema en organismos heterólogos. Además, es importante destacar que las mutaciones introducidas por el sistema Ac/Ds pueden reactivarse en la presencia de la enzima transposasa, lo que permite la mutagénesis de genes estrechamente relacionados o ligados (Smith et al., 1996; Machida et al., 1997).

1.2.1.2. Mutagénesis insercional mediante T-DNA

Este tipo de mutagénesis está restringida a aquellas especies de plantas que puedan ser transformadas mediante T-DNA. Este es el caso del tomate, para el cual existen protocolos de transformación rutinarios y en donde la eficiencia de la técnica es bastante alta.

1.2.1.2.1. Transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Los vectores que se utilizan para producir plantas transgénicas derivan de una bacteria del suelo, *Agrobacterium tumefaciens*. Esta bacteria causa la “enfermedad de la agalla del cuello” que provoca un crecimiento descontrolado (tumor o agalla) en la base de la planta. El responsable de la inducción de tumores es un plásmido de ADN circular de 200kb, denominado Ti (“tumor induction”). Cuando la bacteria infecta una célula de la planta, una parte del plásmido Ti, denominado T-DNA se transfiere e inserta al azar en el genoma de la planta. El plásmido Ti porta dos componentes necesarios para la transformación genética, estos son, la región TRA (genes de virulencia – vir) y la región T-DNA. De modo que, mediante la acción combinada de los genes vir se consigue la integración en el genoma vegetal de una copia del T-DNA, lo que a su vez ocasiona un proceso neoplásico donde las células vegetales diferenciadas se convierten en células tumorales, debido a que se altera el metabolismo de la planta sintetizando auxinas, citoquininas y opinas. Las auxinas y citoquininas alteran el metabolismo hormonal en la célula vegetal, de forma que la planta no puede controlar la división celular, lo que provoca tumores.

El comportamiento natural del plásmido Ti lo hace muy adecuado para su uso como vector. Si un fragmento de ADN de interés pudiera insertarse en el T-DNA, entonces el ADN recombinante se insertaría de forma estable en el genoma de la planta. Los plásmidos Ti son demasiado grandes para ser manipulados fácilmente y es difícil reducir su tamaño porque contienen pocos sitios de restricción únicos. Por consiguiente, el inserto de interés inicialmente se introduce en un vector más pequeño junto con otros genes y segmentos necesarios para la recombinación, replicación y resistencia a antibióticos. Este vector intermediario entonces se integra en el plásmido Ti, originando lo que se denomina un vector binario. En los años 80 comenzó el desarrollo de estos sistemas, los cuales se caracterizan por tener dos orígenes de replicación, para multiplicarse tanto en *E. coli* (que es el hospedador más usado para la manipulación genética) como en *A. tumefaciens*, portan genes de resistencia a antibióticos usados para seleccionar la presencia del vector binario en la bacteria, no contienen genes de síntesis de auxinas, citoquininas ni de opinas, los cuales son sustituidos por el gen de interés, son plásmidos de menor tamaño y poseen sitios únicos de restricción localizados en un sitio de clonación múltiple (polilinker) (Lee y Gelvin, 2008).

1.2.1.2.2. Trampas génicas

Otra aplicación de la mutagénesis insercional por T-DNA estriba en la detección de elementos de regulación mediante el empleo de los denominados “sistemas trampa” (trapping), que permiten detectar secuencias reguladoras y asignar una función a partir de datos de expresión génica. En ambos casos, el gen queda etiquetado por el T-DNA, facilitando la clonación del mismo.

1.2.1.2.2.1. Trampa de promotores

Se caracteriza por llevar el gen delator sin ningún elemento promotor que promueva su transcripción, es por lo que necesita para la expresión del delator que la integración del T-DNA sea en la región promotora de un gen que se transcriba y que esté en “sentido”, pues los promotores ejercen su influencia en una sola dirección.

1.2.1.2.2.2. Trampa de genes

Igual que en el caso anterior, no porta ningún elemento promotor para el gen delator, pero si una secuencia conocida como Sitio Aceptor de Exones (SA), que restringe la expresión del delator a que se integre dentro de un gen, que el T-DNA se encuentre en “sentido” y además, tenga la pauta de lectura del gen. Cuando el gen se transcriba hasta ARNm el SA será reconocido por la maquinaria de procesamiento de mensajeros y tratará al gen delator como un exón más del gen donde se ha integrado, dando como resultado un mensajero quimérico.

1.2.1.2.2.3. Trampa de intensificadores

Al contrario que las anteriores, la trampa de intensificadores (*enhancer trapping*) porta un promotor mínimo para el gen delator, que por sí solo no es capaz de promover la transcripción del gen, por lo que se necesita que la integración ocurra en un sitio transcripcionalmente activo del genoma, es decir, en un gen, en un promotor o influenciado por elementos intensificadores o potenciadores que pueden actuar a mucha distancia del gen sobre el que ejercen su acción. La evaluación del patrón de expresión de la trampa de intensificadores puede conducir a la identificación de genes difíciles de detectar en mutantes de pérdida de función. Por ejemplo, podemos detectar mutaciones en genes redundantes o genes que expresan su función en distintas etapas del desarrollo, por ejemplo, un gen que juegue un papel importante en el desarrollo temprano del embrión y después intervenga en un estado tardío del desarrollo (Jack et al., 1999; Stanford et al., 2001).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material vegetal y condiciones de cultivo

La especie utilizada en este trabajo de investigación es tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Como parte de un proyecto de investigación previo se generó una colección de plantas mutagenizadas con el T-DNA de plásmido binario pD991 (Figura 2).

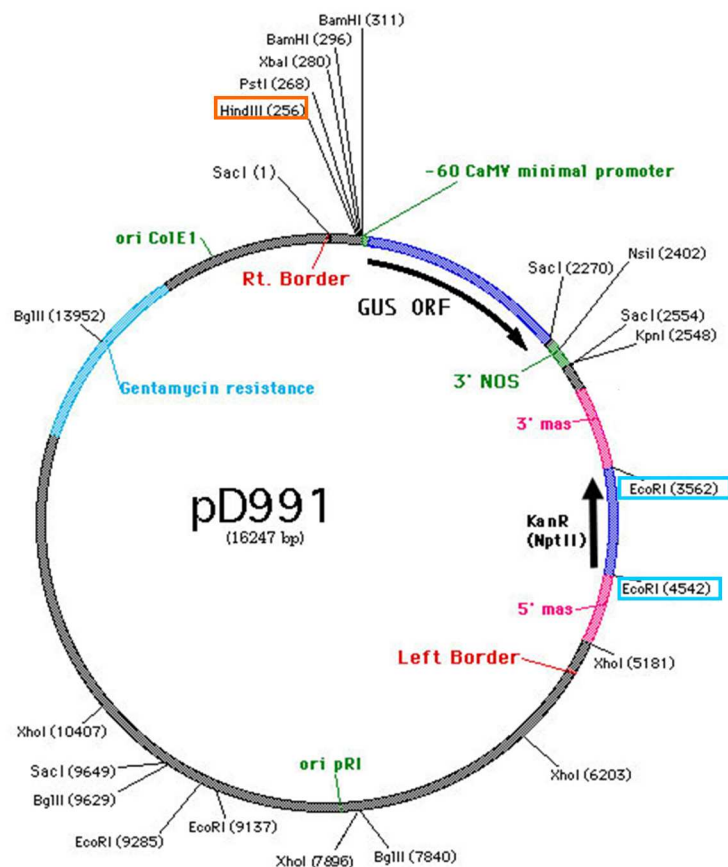


Figura 2 .- Representación esquemática del vector binario pD991. Los cuadros en naranja y azul incluyen las dianas de HindIII y EcoRI, respectivamente.

Las semillas se sembraron en bandejas de polipropileno de 150 alvéolos con una mezcla de turba:fibra de coco:vermiculita (2:1:1) y se mantuvieron en este medio hasta que las plantas desarrollaron entre 7 y 9 hojas. En ese momento, las plántulas se trasladaron a un invernadero localizado en la finca experimental de la Fundación UAL-ANECOOP, donde se llevaron a cabo los cultivos.

2.2. Caracterización molecular del mutante. seleccionado

La caracterización molecular de los mutantes seleccionados por estar alterados en algún proceso del desarrollo consistió en determinar el tipo de mutación responsable del fenotipo mutante.

Como primera opción comprobamos que el fenotipo mutante esta causado por la estrategia de mutagénesis insercional llevada a cabo. Para ello:

- Comprobamos que existe correlación entre la inserción de T-DNA y el fenotipo mutante observado mediante experimentos de Southern Blot y reacciones de PCR.

Al descartar la primera opción, estudiamos la posibilidad de que el fenotipo mutante sea causa de una variación somaclonal. Para ello:

- Seleccionamos posibles genes que alterados, puedan dar lugar al fenotipo observado y medimos sus niveles de expresión.

2.2.1. Determinar el tipo de mutación responsable del fenotipo mutante

2.2.1.1. Determinación del número de inserciones del transgen

Al generar una colección de mutantes utilizando una estrategia de mutagénesis insercional, esperamos que los fenotipos mutantes seleccionados sean causa de dicha estrategia. Si es así, debe haberse integrado al menos una inserción del T-DNA en el genoma de la planta. Es muy importante conocer el número de inserciones de T-DNA que se han integrado, ya que, este número delimita la dificultad de la caracterización funcional y clonación del gen o genes etiquetados por el T-DNA.

El vector binario utilizado para la generación de líneas transgénicas fue el pD991 (Jack et al., 1999). El T-DNA de pD991 posee el gen *uidA* (*GUS*) bajo el control de un promotor mínimo incapaz de promover por sí solo la transcripción de este gen, necesitando la intervención de elementos promotores o intensificadores propios del ADN de la planta, característica por la que este T-DNA es una “trampa de intensificadores”. Además contiene el gen *NPTII*, gen que confiere resistencia a los antibióticos tipo “neomicinas” como por ejemplo, la kanamicina, antibiótico utilizado para la selección de callos transgénicos. Como podemos observar en la figura 2, resaltamos del mapa de restricción del T-DNA las dianas *EcoRI* y *HindIII*, utilizadas

en la digestión del ADN genómico para la realización de Southernblots. Para detectar el número de inserciones de T-DNA en cada línea mutagenizada usamos como sonda el producto de PCR purificado perteneciente a la amplificación completa de los genes *NPTII* y *FALSIFLORA* (FA). Al digerir el genoma de la planta transgénica con *EcoRI* se generan multitud de fragmentos, pero los que hibridan con nuestra sonda (genes *FA-NPTII*) será, en el caso del gen *NPTII*, el fragmento formado en la digestión del T-DNA cuyas dianas flanquean a dicho gen, es decir, coinciden en este caso la sonda y el fragmento de digestión a hibridar. Por tanto, las señales de hibridación detectadas son consecuencia de la presencia del T-DNA en la planta analizada, pero no se puede diferenciar el número de copias, solamente la presencia de uno o varios T-DNAs. En el caso de *HindIII*, sólo hibridarán aquellos fragmentos que contengan desde la diana respectiva en el T-DNA hasta la siguiente diana que debe de encontrarse en el genoma de tomate. De este modo se diferencian el número de inserciones que porta la planta. El gen *FALSIFLORA* es un gen de copia única en el genoma de *Solanum lycopersicum*, por esto nos sirve como control positivo en la hibridación y además nos puede orientar sobre si el T-DNA esta en homocigosis o hemicigosis según la intensidad de la señal.

Las tareas realizadas para determinar el número de copias del T-DNA han sido:

1) Extracción de ADN genómico

Se ha llevado a cabo la puesta a punto de la extracción y purificación de ADN siguiendo el protocolo de Dellaporta et al., 1983 con algunas modificaciones, tal y como se muestra a continuación:

- Macerar con Nitrógeno líquido 10-15 g de material fresco, previamente ultracongelados con la ayuda de morteros previamente autoclavados.
- Añadir 11ml de tampón de extracción (100 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM EDTA pH 8,0; 500 mM NaCl; 10 mM de β -mercaptoetanol) a la muestra antes de que empiece a descongelarse.
- Homogeneizar la muestra y añadir 1 ml de dodecilsulfato sódico (SDS) 10 % para romper las células y liberar sus componentes al medio.
- Incubar 10 min a 65 °C en agitación (75 rpm), para inactivar las ADNasas.
- Añadir 5 ml de acetato potásico 5 M para precipitar los restos celulares y parte de las proteínas de la mezcla, mezclar por inversión e incubar en hielo 30 min.

- Centrifugar a 12000 rpm durante 15 min a 4 °C. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio de 25 ml a través de un filtro Miracloth (Albiochem), con ayuda de un embudo.
- Añadir 10 ml de isopropanol frío para precipitar el ADN y mezclar por inversión. Incubar 30 min a -20 °C.
- Centrifugar a 12000 rpm durante 10 min a 4 °C. Eliminar el sobrenadante y dejar secar a temperatura ambiente.
- Una vez seco, añadir 400 µl de TE (50 mM Tris ClH 1 M pH 8, 10 mM EDTA 0,5 M pH 8) a el pellet e incubar durante toda la noche a 4 °C para facilitar la resuspensión.

2) Lavado y precipitación del ADN

- Añadir 1 volumen de cloroformo isoamílico (24:1) frío por cada volumen de muestra y mezclar por inversión.
- Centrifugar 5 min a 9500 rpm y transferir la fase acuosa (la superior) a un tubo limpio.
- Añadir 1/10 del volumen recuperado de AcNa 3 M y 2 volúmenes de etanol absoluto a la muestra para precipitar las sales. Mezclar por inversión posteriormente.
- Incubar 20 min a – 80 °C y centrifugar a 12.000 rpm, durante 15 min a 4 °C. Desechar el sobrenadante.
- Lavar el pellet con 150 µl de EtOH 70%.
- Centrifugar a 12000rpm durante 10 min y eliminar el sobrenadante.
- Dejar secar el pellet a temperatura ambiente y resuspender en 200 µl de TE 0,1 N (10 mM Tris ClH 1 M pH 8, 0,1 mM EDTA 0,5 M pH 8). Incubar toda la noche a 4 °C o 15 min a 65 °C.

3) Eliminación del ARN

- Añadir 1 µl de RNAasa a una concentración de 10 µg/ml e incubar 1 h a 37 °C.

Con esta modificación del protocolo original, se ha conseguido purificar entre 200-400 ng de ADN genómico por muestra.

4) Digestión con endonucleasas de restricción

El paso previo necesario para realizar una transferencia tipo Southern es la digestión enzimática del ADN genómico previamente aislado y purificado. En nuestro caso, el mapa de restricción del T-DNA nos ha conducido a utilizar las enzimas de restricción *EcoRI* (Takara) y *HindIII* (Takara).

Se utilizaron entre 10-20 µg de ADN genómico para cada digestión, realizada en un volumen final de 150 µl que contenía 15 µl del Buffer 10X correspondiente a cada enzima, 60 U de cada una de las dos enzimas elegidas, 1 µl de una solución de ARNasa (10 mg/ml), 4 µl de spermidine y el volumen necesario de agua destilada estéril hasta completar el volumen final. Las reacciones se incubaron 8 h a 37 °C con *EcoRI* y *HindIII*. Las digestiones se precipitaron mediante la adición de 1/10 del volumen de Acetato de sodio 3 M pH 5,2 y a continuación 2 volúmenes de etanol absoluto. Después de centrifugar y lavar el pellet, el ADN se resuspendió en 20 µl de TE 0,1 N (10 mM Tris HCl 1 M pH 8, 0,1 mM EDTA 0,5 M pH 8).

5) Southern Blot

El Southern Blot se realiza mediante transferencia alcalina a una membrana de nylon cargada positivamente (Hybond-N+, Amersham Biosciences), la cual adhiere al ADN fuertemente, ya que el ADN es una molécula con carga negativa.

El ADN digerido y precipitado se carga en un gel de agarosa al 0,8 %. La electroforesis se realiza a 60 V durante 14 h. A continuación, se hacen unos tratamientos al gel, primero se realiza una depurinización con una solución de HCl 0,125 M. A continuación desnaturalizamos el gel con el Buffer de Desnaturalización, solución de NaCl y NaOH (87,66 g NaCl y 20 g NaOH al 99 % de riqueza en 1 l). Después neutralizamos las cargas utilizando el Buffer de Neutralización (87,66 g NaCl 60,5 g Trizma base en 1 l a pH7,5).

Una vez está preparado el gel, montamos la cubeta para llevar a cabo la transferencia capilar. Sobre una bandeja colocamos el portageles del revés, y encima de éste el gel. A continuación se pone la membrana, 2 papeles Whatman®, y sobre estos se coloca una torre de papel y un cristal o soporte para una pesa de 400 g (Figura 3). La torre de papel ejerce una fuerza de capilaridad, hace subir el Buffer de Transferencia (88,23 g Citrato sódico, 175,32 g NaCl en 1 l a pH 7-8) desde la bandeja y arrastra consigo el ADN del gel, hasta quedar atrapado fuertemente en la membrana. Se deja transcurrir la transferencia durante 8-14 h.



Figura 3. Representación esquemática de la transferencia capilar tipo Southern Blot.

6) Hibridación con sonda radioactiva

El último paso metodológico es la hibridación con una sonda marcada radiactivamente con P^{32} . En nuestro caso usamos una sonda quimérica del gen *NPTII* fusionado a un fragmento de un gen endógeno como es *FALSIFLORA* (*FA*), lo que permite tener un control adecuado de la hibridación.

En un primer paso ponemos la membrana a pre-hibridar a 65 °C en el horno de hibridación, agitándose y con el buffer comercial, Perfecthyb™ Plus (Sigma Aldrich, Inc.), el cual aumentará la señal de hibridación. La pre-hibridación debe ser de al menos 5 min, por ello, mientras transcurre este tiempo se procede a marcar la sonda radiactivamente.

Se desnaturaliza la sonda por calor, calentando una solución de la misma durante 5 min en agua hirviendo. A continuación se coloca en hielo para evitar que el ADN se renaturalice. A este ADN se le añade 50 μ Ci de P^{32} (dCTP) y una alícuota del kit Rediprime II Random Prime Labelling System (GE Healthcare), que contiene la DNA polimerasa, el tampón y el resto de reactivos necesarios para la síntesis de la sonda radiactiva. Se incuba a 37 °C durante 10 minutos. Después, el producto de la reacción se hace pasar por una columna (illustra™ MicroSpin Columns, GE Healthcare) para eliminar el exceso de radioactividad, así como polimerasa, cebadores aleatorios, dejando solo pasar a la sonda marcada con radioactividad. Por último, se desnaturaliza la sonda y se echa al tubo de hibridación, donde estará incubando a 65 °C 8-10 h.

Tras la hibridación se procede al lavado de la membrana con SSPE (0.2 M buffer fosfato, pH aprox. 7.4, contiene 2,98 M NaCl y 0,02 M de EDTA) en orden decreciente de concentración,

3 lavados de SSPE 5X, 3 lavados de SSPE 2,5X, 3 de 1X y 1 lavado de 0,1X. De este modo se aumenta la astringencia, para eliminar la radioactividad inespecífica pegada a la membrana. La membrana lavada se plastifica y se introduce en un casete junto con una película autoradiográfica, donde se deja una semana exponiendo para un posterior revelado.

2.2.1.2. Determinar la existencia de algún fragmento truncado de T-DNA

En ocasiones durante la inserción de T-DNA mediada por *Agrobacterium tumefaciens* pueden ocurrir errores que lleven a la inserción de un fragmento truncado del T-DNA. Para comprobar si existía correlación entre el fenotipo mutante y la inserción de algún fragmento de T-DNA se llevaron a cabo una batería de reacciones de PCR. Esta batería de reacciones esta diseñada de forma que se cubren distintas regiones del T-DNA.

1) Preparación de las muestras:

Para llevar a cabo la amplificación por PCR utilizamos ADN genómico de las muestras de interés y además, se utilizó ADN genómico de plantas de genotipo Money Maker como control negativo y ADN genómico de dos plantas que habían sido evaluadas previamente, las cuales portaban una inserción del T-DNA completo como controles positivos a una concentración de 10 ng/ μ l.

2) Amplificación por PCR

El ADN genómico fue utilizado como molde para la amplificación. Para cada reacción de PCR se usó 1 μ l de ADN, 1 U REDTaq® DNA polimerasa (SIGMA-Aldrich) y 0,33 μ M de cada uno de los miembros de la pareja de cebadores utilizados en cada caso. El programa utilizado en el termociclador (Eppendorf Mastercycler ep gradient S) comenzó con una desnaturalización de 5min a 94 °C, seguido por 35 ciclos de 30 seg a 94 °C, 30 seg a 60 °C y 2 min 30 seg a 72 °C y por último, una extensión final de 5 min a 72 °C.

La totalidad del volumen de la reacción fue analizado por electroforesis en gel de agarosa y teñido con Bromuro de Ethidium al 1 %.

2.2.1.3. Medir niveles de expresión de los genes candidatos

Para descartar la relación entre la existencia de una inserción de T-DNA y el fenotipo mutante se seleccionaron tres genes candidatos y se procedió a analizar su expresión. Los genes candidatos en este caso fueron genes de clase B, involucrados en el desarrollo de la flor.

Para analizar la expresión de estos genes, partimos botones florales y flores en anthesis de plantas de fenotipo mutante y plantas hermanas wild type (WT) como controles.

1) Extracción de ARN

Se ha llevado a cabo la puesta a punto de la extracción y purificación de ARN utilizando Trizol® Reagent (Invitrogen), de acuerdo al siguiente protocolo:

- Macerar con Nitrógeno líquido material fresco, previamente ultracongelado.
- Añadir 1 ml de Trizol® Reagent (Invitrogen) e incubar 5 min a temperatura ambiente.
- Añadir 200 µl de cloroformo, para hacer posible la extracción de la fase orgánica. Incubar 3min a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 12000 g durante 15 min a 4 °C.
- Pasar la fase acuosa a tubos limpios con 500 µl de isopropanol y mezclar por inversión para precipitar el ADN la fase acuosa. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 12000 g durante 10 min a 4 °C para precipitar el ADN.
- Eliminar el sobrenadante y añadir 1 ml de etanol 75 % con H₂O DEPC. Homogeneizar la muestra.
- Centrifugar a 7500 g durante 5 min a 4 °C. Descartar el sobrenadante y dejar secar el pellet.
- Resuspender en 44 µl de H₂O DEPC e incubar 10 min a 60 °C para que quede totalmente resuspendido.
- Añadir 5 µl de 10X DNase Buffer-free (Ambion) y 1 µl de rDNase1 DNA-free (Ambion) e incubar a 37 °C durante 1 hora para eliminar cualquier molécula de ADN.
- Añadir 10 µl de DNase Inactivation Reagent (Ambion) para inactivar las ADNasa que se añadieron en el paso anterior. Incubar durante 2 min a temperatura ambiente.
- Centrifugar durante 10 min a 10000 g. Pasar el sobrenadante, que contiene el ARN disuelto, a un tubo limpio.

Con esta modificación del protocolo original, se ha conseguido purificar muestras con una concentración de ARN entre 2-2,5 µg/µl.

2) Síntesis de cDNA

Una vez hemos obtenido el ARN debemos sintetizar el cDNA para medir los niveles de expresión del gen en el tejido estudiado. Para ello se usaron los componentes y protocolo de First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas)

3) Reacciones RT-PCR

A partir del cDNA sintetizado se analizaron los niveles de expresión de los genes candidatos de tomate *APETALA3 (TAP3)*, *MADS-BOX GENE6 (TM6)* y *PISTILLATA (TPI)* mediante PCR cuantitativa a tiempo real. Como control positivo se amplificó simultáneamente un fragmento específico del gen endógeno *Ubiquitina* de expresión constitutiva que se expresa en la misma medida en células del mutante y del control. Como control negativo se amplificó un fragmento específico de un intrón del gen de desarrollo reproductivo del tomate *ARLEQUIN (ALQ)*, por lo que no debería verse expresión. Los cebadores utilizados fueron:

- TAP3: SL-Fx (5'-ACTTACGCCTTCAACCCAAC-3') y SL-Rx (5'-ATCAGAGCCACCTCCACTGT-3')
- TPI: TPI-Fz (5'-CAAAGAGAAAGGGATTATGAGT-3') y TPI-Rz (5'-TTGGCTGATGAACTCGTAGG-3')
- TM6: TM6-F2z (5'-CTTCAATCTTTCTTTTCCCG-3') y TM6-R2z (5'-AAAGAGAGGAAAAAGTGAAGAG-3')
- UBI: Le ubi3-Rz (5'-AAATCAAACGCTGCTGGTCT-3') y Le ubi3-Fz (5'-CCAAGATCCAGGACAAGGAA-3')
- ALQ: ALQpro-Fz (5'-GGGAAGGTTCCCTACAATG-3') y ALQpro-Rz (5'-GGGGTTGCTCATCCATTA-3').

Los datos obtenidos fueron analizados mediante el Método de Cuantificación Relativa o del $\Delta\Delta Ct$.

3. RESULTADOS

3.1 Análisis genético

3.1.1 Caracterización fenotípica

Durante la campaña de primavera-verano 2010 se evaluaron 300 familias TG2. De entre las familias alteradas en su fenotipo vegetativo, reproductivo o ambos, se seleccionó 1 familia para ser objeto del presente estudio. La familia de interés, de fondo genético p73, constaba de 12 plantas, con una segregación de 11 plantas wild type (WT) y 1 planta mutante (mut) (11:1). Sabiendo que las proporciones esperadas para una mutación recesiva son $\frac{1}{4}$ de plantas mutantes y $\frac{3}{4}$ de plantas WT realizamos la prueba estadística χ^2 y obtuvimos un valor de 1,777 ($p > 0,001$), comprobándose así que se trata de una mutación recesiva.

El fenotipo de la planta mutante estaba alterado a nivel vegetativo y reproductivo. Se trataba de una planta de menor tamaño, aproximadamente dos tercios respecto a plantas WT, menor vigor y foliolos más pequeños (Figura 4A). Además, a nivel reproductivo, el desarrollo de los órganos de la flor estaba alterado en el segundo y tercer verticilo. En una planta WT la flor es simétrica, regular e hipogina y consta de cuatro verticilos. El más externo está formado por 5 o 6 sépalos verdes, que se alternan con un número similar de pétalos amarillos en el segundo verticilo, los cuales se disponen alrededor de 6 estambres fusionados lateralmente formando un cono estaminal alrededor del estilo, y un número variable de carpelos en el verticilo más interno (Lozano et al., 2009). Sin embargo, en las flores de la planta mutante el segundo y tercer verticilo estaban alterados, presentando pétalos sepaloides y estambres carpeloides con falta de fusión del cono estaminal (Figura 4B). Los frutos que desarrollaba eran deformes y partenocárpicos, y además, no se observaba abscisión de los pétalos (Figura 4C).

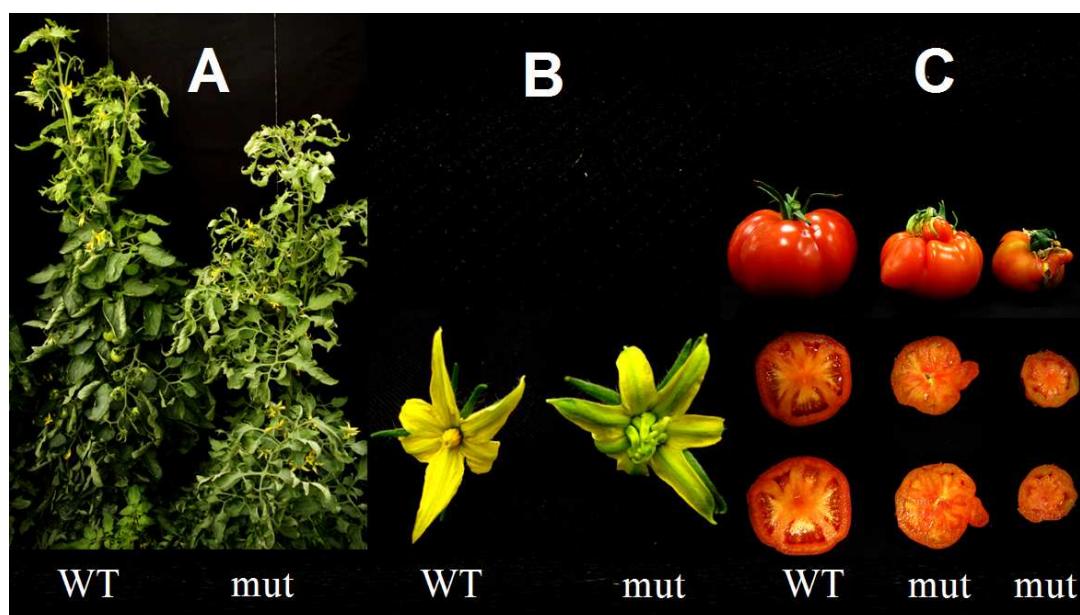


Figura 4. A- Fenotipo vegetativo de la planta mutante y la planta hermana WT. B- Fenotipo floral de la planta mutante y la planta hermana WT. C- Fenotipo de los frutos de la planta mutante y la planta hermana WT.

Durante el ciclo de cultivo otoño-invierno 2010-2011 volvió a evaluarse 1 familia TG2 y 2 familias TG3 descendientes de 2 plantas hermanas TG2 de fenotipo WT, para diferenciar los condicionantes ambientales frente a la constitución genética de la planta, corroborar el fenotipo y proceder a la caracterización molecular.

Durante este segundo ciclo de cultivo se pudo observar que los dos fenotipos, vegetativo, al que hemos llamado fenotipo 1, y reproductivo, al que hemos llamado fenotipo 2, segregaban de manera independiente (Tabla 1).

Familia	TG2 (12 plantas)	TG3-1 (10 plantas)	TG3-2 (12 plantas)
Fenotipo WT	7	7	7
Fenotipo 1	4	3	1
Fenotipo 2	1	0	3
Fenotipos 1 y 2	0	0	1

Tabla 1. Segregación de las familias TG2, TG3-1 y TG3-2 durante el ciclo de cultivo de otoño-invierno 2010-2011. Se indican el número de plantas totales, plantas con fenotipo WT, plantas con fenotipo 1, plantas con fenotipo 2 y plantas con ambos fenotipos (Fenotipos 1 y 2)

A la vista de la Tabla 1, se consideró la familia TG3-2 como la más interesante ya que tenía plantas con fenotipos 1, 2, y 1 y 2. Se extrajo el ADN genómico de individuos de esta familia para los ensayos posteriores de caracterización molecular.

3.2 Caracterización molecular

3.2.1 Correlación genotipo-fenotipo

La caracterización molecular de la familia mutante seleccionada se inició comprobando la correlación existente entre el genotipo y el fenotipo. Las plantas con fenotipo mutante deberían tener al menos una inserción de T-DNA en su genoma que ocasione la modificación de un gen, dando lugar así al fenotipo mutante. Para comprobar esta relación se hicieron experimentos Southern blot y reacciones de PCR.

Se llevaron a cabo experimentos tipo Southern blot con un pool de ADN proveniente de las 12 plantas de la familia TG3-2 y con ADN extraído individualmente de las que presentaban los distintos fenotipos mutantes. De este modo fue posible conocer el número total de inserciones y cuál o cuales de ellas eran responsables de cada uno de los fenotipos. En la Figura 5 puede observarse que la hibridación con la sonda *FA-NPTII* ha sido satisfactoria ya que podemos ver los fragmentos correspondientes al gen FA digeridos con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*, respectivamente. Sin embargo, no observamos ningún fragmento correspondiente al gen de resistencia a kanamicina, *NPTII*, en ninguna de las muestras ensayadas. Por tanto, podemos concluir que no existe una inserción responsable de los fenotipos observados que porte el gen *NPTII*.

En ocasiones, durante el proceso de transformación de células de tomate mediada por *Agrobacterium tumefaciens* pueden ocurrir errores que lleven a la inserción de un fragmento truncado del T-DNA que no porte el gen *NPTII*. Por esto, que no se haya detectado ninguna inserción con la sonda *FA-NPTII* no implica que no se haya insertado algún fragmento de T-DNA del plásmido binario pD991.

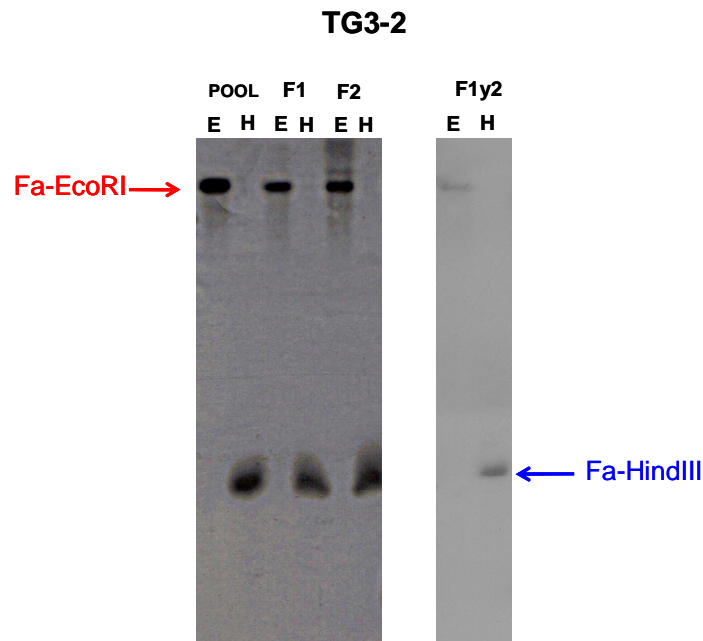


Figura 5. Película de Southern-blot. Se puede observar de izquierda a derecha las muestras de un pool de ADN de las 12 plantas TG3-2, ADN de una planta de fenotipo1 (F1), ADN de una planta de fenotipo 2 (F2) y ADN de una planta de fenotipo 1y2 (F1y2). Cada una de las muestras de ADN las encontramos por duplicado, digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*, respectivamente.

Con el fin de comprobar si el fenotipo mutante estaba causado por la inserción de algún fragmento del inserto de T-DNA se llevó a cabo una batería de reacciones PCR. Con cada pareja de oligonucleótidos se pretendía amplificar alguna región del T-DNA del plásmido binario pD991 (Figura 6).

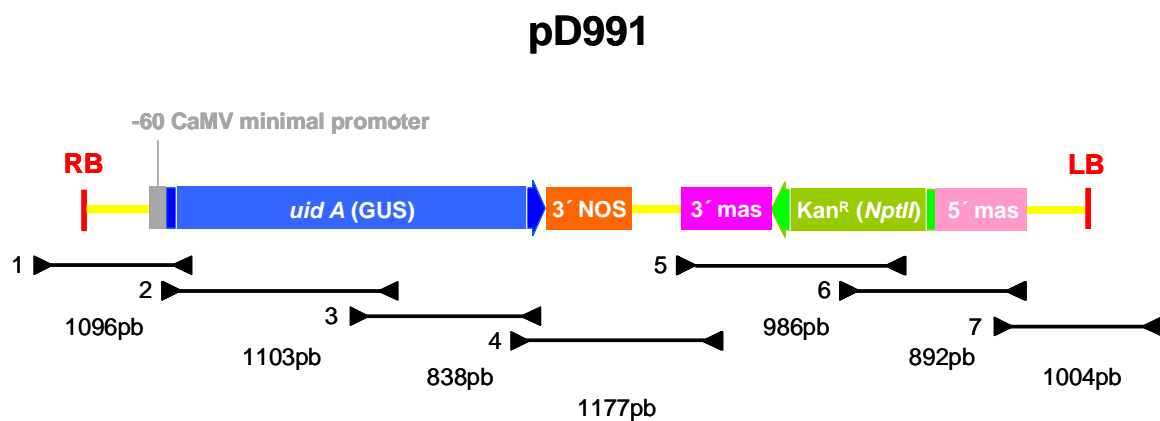


Figura 6. Fragmento de T-DNA completo del plásmido binario pD991 en la parte superior, y en la parte inferior se representa la superficie del fragmento que se amplifica en cada una de las 7 parejas de cebadores.

Se llevaron a cabo 7 reacciones de PCR, cada una con una pareja de cebadores diferente. Para todas las reacciones se partió de ADN extraído individualmente de plantas TG3 que presentaban los distintos fenotipos. Además, se utilizó ADN de una planta de genotipo Money Maker como control negativo y ADN de dos plantas que poseían al menos una inserción como controles positivos. Los resultados fueron negativos para las 7 combinaciones de cebadores, es decir, sólo se observó amplificación en el caso de los controles positivos. En la figura 7 podemos observar el patrón de amplificación que se repitió en cada una de las 7 reacciones.

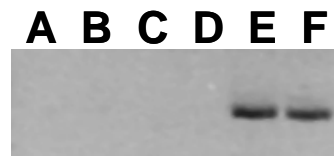


Figura 7. Resultado de la batería de reacciones de PCR. Las letras A, B, C, D, E y F representan cada una de las muestras ensayadas: A ADN genómico de una planta de fenotipo 1, B ADN genómico de una planta de fenotipo 2, C ADN genómico de una planta de fenotipo 1y2, D ADN genómico de una planta de fenotipo Money Maker que se utilizó como control negativo, y E y F ADN genómico de plantas con al menos una inserción de T-DNA que utilizamos como controles positivos. En las 7 reacciones se observó el mismo patrón de amplificación.

Esta estrategia descartó que cualquiera de los dos fenotipos mutantes estuvieran causados por la estrategia de mutagénesis insercional. Los resultados indicaban que el fenotipo mutante podía estar causado por una variación somaclonal de algún o algunos genes involucrados en el desarrollo de la flor en tomate.

3.2.2 Posibles genes alterados causantes del fenotipo mutante

Atendiendo al fenotipo mutante de las plantas a nivel reproductivo, se consideró que el o los genes que podrían estar alterados y causar así tal fenotipo debían ser genes de clase B según el modelo ABC.

El modelo ABC se formuló a principios de la década de los 90 a partir del análisis de tres clases de mutantes homeóticos florales con defectos en la identidad de los órganos en dos verticilos adyacentes de la flor. Es importante destacar que se han descrito mutantes similares tanto en *Arabidopsis* como en *Antirrhinum*, lo que sugiere que la regulación de la identidad de los órganos florales se ha conservado a lo largo de la evolución (Coen et al., 1991, Weigel et al., 1994, Causiera et al., 2010). De acuerdo con el modelo, la diferenciación de los órganos

florales esta controlada por la expresión de genes de clase A en el primer verticilo, clase A y B en el segundo verticilo, clase B y C en el tercero, y clase C en el cuarto (Weigel et al., 1994). Otras funciones han sido descritas como genes de clase D, que son esenciales para la identidad del óvulo (Colombo et al., 1995) y genes de clase E (*SEPALLATA*, *SEP*) que interviene en la especificidad de todos los órganos excepto los sépalos (Honma et al., 2001, Ditta et al., 2004, Olimpieri et al., 2008). Los mutantes con defectos en el segundo y tercer verticilo, que se traducen en la conversión de pétalos en sépalos y los estambres en carpelos, definen la función de los genes de clase B. Los genes de clase B incluyen *PISTILLATA* (*PI*) y *APETALA3* (*AP3*) en *Arabidopsis thaliana* y *GLOBOSA* (*GLO*) y *DEFICIENS* (*DEF*) en *Antirrhinum* (Causiera et al., 2010). En tomate encontramos los genes ortólogos, es decir, genes con la misma función que pertenecen a especies diferentes pero con un antepasado común: *TOMATO AP3* (*TAP3*) y *TOMATO PISTILLATA* (*TPI*).

Dentro del clado de las angiospermas tuvo lugar, hace 125 millones años, un importante evento de duplicación en el linaje del gen *AP3* que desencadenó en dos linajes de genes parálogos *TAP3* y *TM6* (Magallón et al., 1999, Kramer et al., 1998; Kramer e Irish, 1999). Dos genes parálogos son aquellos que tienen distinta función o al menos cierto grado de especialización, se encuentran en el mismo organismo, y su semejanza revela que proceden uno de la duplicación del otro. Diversos ensayos han demostrado que *TAP3* y *TM6* tienen diferentes funciones (de Martino et al., 2006). *TAP3* es necesario para la identidad de pétalos y estambres, mientras que *TM6* parece desempeñar un papel predominante en la diferenciación de los estambres (de Martino et al., 2006). Con todo lo anterior, *TAP3*, *TPI* y *TM6* fueron los genes seleccionados como candidatos a causar el fenotipo mutante.

3.2.3. Niveles de expresión de genes candidatos

Al medir los niveles de expresión de los genes *TAP3*, *TPI* y *TM6* en plantas con fenotipo WT y mutante a nivel reproductivo en botón floral y flor en antésis, mediante una reacción de PCR a tiempo real se obtuvieron los resultados que se muestran en la Figura 8.

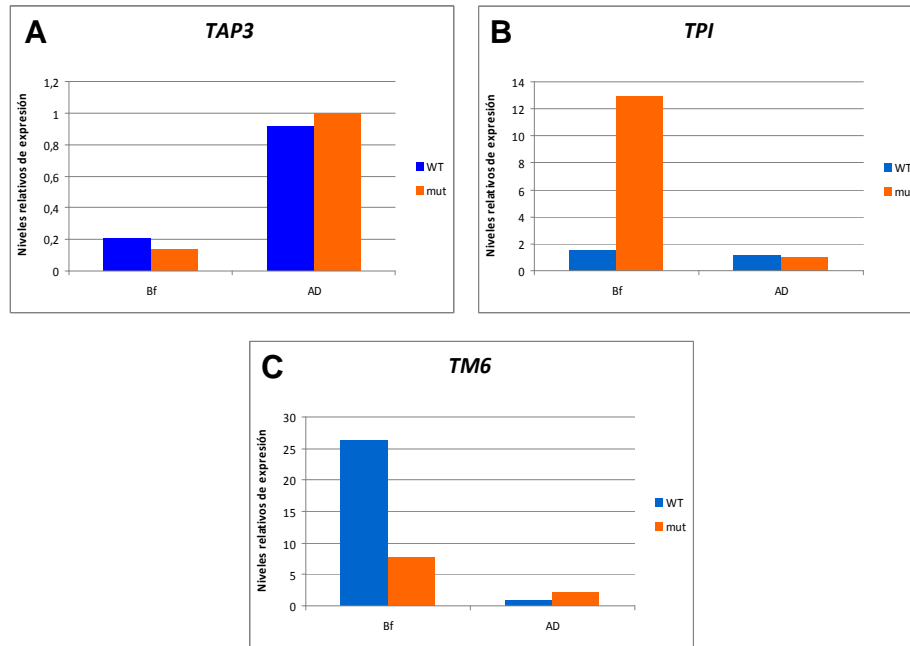


Figura 8. Niveles de expresión de los genes de clase B en flores en distintos estadios de desarrollo, botón floral, Bf y flor en antésis ,(anthesis day, AD) de plantas mutantes para el Fenotipo 2 (de color rojo) y plantas hermanas WT (en color azul). **A-** Niveles de expresión relativa del gen *TAP3*. **B-** Niveles de expresión relativa del gen *TPI*. **C-** Niveles de expresión relativa del gen *TM6*.

No se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de los genes *TAP3*, *TM6* y *TPI* entre plantas de fenotipo WT y mutante de fenotipo 2 en estadio de antésis (Anthesis Day, AD). Sin embargo, en botón floral (Bf), el gen *TPI* está sobreexpresado en plantas con fenotipo mutante con respecto a plantas WT, mientras que *TM6* está inhibido y *TAP3* no se encuentra alterado.

4. DISCUSION

Los resultados obtenidos en los experimentos de Southern blot y las reacciones de PCR sugieren que el fenotipo mutante no está causado por una mutación de tipo insercional. Sin embargo, podría deberse a una mutación producida durante la regeneración de la planta en cultivo *in-vitro*. El cultivo *in-vitro* de células vegetales puede resultar un ambiente muy estresante para estas últimas y puede involucrar procesos mutagénicos durante el establecimiento del explante, la inducción de callo, la formación de embriones o la regeneración de plantas. A las mutaciones genéticas que se observan en plantas regeneradas por cultivo *in vitro* se les denomina variaciones somaclonales. Las variaciones somaclonales generalmente son espontáneas y los cambios pueden ser heredables (Kaepler et al., 2000; Sahijram et al., 2003; Anu et al., 2004). Cuando la variación somaclonal es heredable se le asocia con reestructuraciones cromosomales, deleciones o mutaciones (Noro et al., 2007). Además, se ha encontrado que la variación somaclonal es mucho más frecuente que otras mutaciones espontáneas (Tabares et al., 1991). Por todo esto, barajamos la hipótesis de que el fenotipo observado en las plantas mutantes sea debido a una variación somaclonal.

El fenotipo mutante observado consistente en la conversión parcial de pétalos en sépalos y estambres en carpelos, es similar al que se observa en los mutantes de clase B *stamenless* (*sl*) y *pistillate* (*tpi*) y en líneas de silenciamiento del gen *TM6* generadas mediante técnica de RNA interferente RNAi (Gómez et al., 1999; Olimpieri et al., 2008; de Martino et al., 2006). Por ello se procedió a medir sus niveles de expresión en botón floral y flor en antésis de plantas de fenotipo mutante y los correspondientes controles. De acuerdo con el modelo ABC, la diferenciación de los cuatro tipos de órganos florales está controlada por la expresión de genes de clase A en el primer verticilo floral, clase A y B en el segundo verticilo, clase B y C en el tercero, y clase C en el cuarto (Weigel et al., 1994). De este modo al reducirse la expresión del gen *TM6* de clase B (Figura 8C), los genes *MACROCALIX* (*MC*) de clase A y *TOMATO AGAMOUS-1* (*TAG1*) de clase C podrían determinar la identidad de sépalos y carpelos en pétalos y estambres, respectivamente. Así el fenotipo que se ha observado en las flores mutantes podría estar causado por la inhibición de *TM6*.

En estudios previos se obtuvieron líneas transgénicas, de fondo genético cv Micro-Tom, en las que se silenció el gen *TM6* mediante una estrategia de RNAi. Estas líneas mostraron un fenotipo que consistía en la conversión de estambres en carpelos dando lugar a una mala

fusión del cono estaminal (de Martino et al., 2006) tal y como observamos en nuestro mutante. Sin embargo y pese al menor tamaño de los pétalos, no se observó ninguna anomalía en la identidad de los éstos (de Martino et al., 2006) como observamos en nuestro mutante, donde los pétalos están parcialmente convertidos en sépalos. Esta diferencia podría deberse al distinto nivel de silenciamiento o inhibición del gen o al distinto fondo genético utilizado en cada estudio cv Micro-Tom vs cv p73.

Por otro lado, la sobreexpresión del gen *TPI* que observamos en el fenotipo mutante (Figura 8B) podría interpretarse como respuesta a la inactivación parcial de *TM6* para mantener la identidad de pétalos y carpelos. Sin embargo, *TM6* y *TPI* actúan de manera independiente y no existe autorregulación entre ellos (de Martino et al., 2006). Este comportamiento podría explicarse con la existencia de un regulador común a ambos genes de clase B. Según esta hipótesis el regulador común de *TM6* y *TPI*, ante la ausencia del gen *TM6*, activaría en mayor grado la expresión de *TPI*. La hipótesis del regulador común encuentra su base en diferentes estudios. En la especie modelo *Arabidopsis thaliana* se ha descrito que el gen de identidad de meristemo floral *LEAFY (LFY)* regula a los genes *AP3* y *PI* (Kato et al., 2005). También, se ha determinado en recientes estudios que el gen ortólogo de *LFY* en tomate, *FALSIFLORA (FA)*, regula a *TM6* (Lozano et al., 2009). Según los resultados obtenidos en este estudio y los antecedentes descritos, un posible regulador común que actúe sobre *TM6* y *TPI* sería *FA*.

Otra característica que observamos en el fenotipo es la falta de escisión de los pétalos en las flores, lo que se detecta en frutos maduros. Esto podría ser debido a la identidad sepaloidea de los pétalos, por lo que éstos no senecen y quedan adheridos al fruto maduro.

Se ha comprobado que en los programas de mutagénesis insercional con T-DNA existe un cierto porcentaje de generación de variantes somaclonales, por lo que la identificación de la mutación se vuelve más compleja en dichos mutantes. De este modo, el gen mutado no queda etiquetado por el T-DNA y se necesitan de otras estrategias más costosas para su identificación. En nuestro caso, hemos podido comprobar que el genotipo seleccionado no se trata de un mutante insercional y dado su alto interés agronómico se abordará la clonación del gen mutado mediante clonaje posicional o secuenciación masiva de su genoma. Además, los estudios de expresión génica nos han aportado información muy valiosa respecto a genes identificados como posibles candidatos a estar mutados. En concreto, la disminución significativa de los transcritos de *TM6*, induce a pensar que éste pueda ser el gen el afectado en el mutante seleccionado. Por ello, en primer lugar se procederá a secuenciar el gen *TM6* para identificar alguna posible mutación alélica.

5. CONCLUSIONES

En este trabajo de investigación se ha llevado a cabo la caracterización fenotípica y molecular de un mutante de inserción de tomate. Las conclusiones obtenidas del trabajo realizado han sido:

- 1) El mutante seleccionado mostró dos fenotipos bien diferenciados. A nivel vegetativo, presenta menor tamaño y vigor que las plantas WT. Además, a nivel reproductivo, sus flores presentan alteraciones en el segundo y tercer verticilo, mostrando pétalos sepaloides y estambres carpeloides, así como falta de fusión del cono estaminal.
- 2) La caracterización fenotípica de las familias TG2 y TG3 reveló que los dos fenotipos observados, vegetativo y reproductivo, segregan de manera independiente.
- 3) La caracterización molecular descartó que cualquiera de los dos fenotipos mutantes observados estuvieran causados por la estrategia de mutagénesis insercional. Los resultados indicaron que el fenotipo mutante puede estar causado por una variación somaclonal de algún o algunos genes involucrados en el desarrollo vegetativo y reproductivo del tomate.
- 4) Los niveles de expresión de los genes candidatos, *TAP3*, *TM6* y *TPI*, sugirieron que *TM6* podría ser el gen responsable del fenotipo observado a nivel reproductivo en el mutante seleccionado.

6. REFERENCIAS

- Anu, A; Babu, KN; Peter, KV.** (2004). Variations among somaclones and its seedling progeny in *Capsicum annuum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 76: 261–267.
- Atherton J.G. and Harris, G.P.** (1986). Flowering. En: "the tomato crop". Eds. Atherton, J.G and Rudich, J. Chapman and Hall, University Press, Cambridge: 167-200
- Azpiroz-Leehan R, Feldmann KA.** (1997). T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: going back and forth. *Trends Genet* 13: 152–156
- Bouchez, D and Höfte, H.** (1998). Functional Genomics in Plants. *Plant Physiol* 118: 725–732.
- Coen ES, Meyerowitz EM.** (1991). The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* 353:31–7.
- Causiera B, Schwarz-Sommerb Z, Daviesa B.** (2010). Floral organ identity: 20 years of ABCs. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 21 (2010) 73–79.
- Colombo L, Franken J, Koetje E, van Went J, Dons HJM, Angenent GC, van Tunen AJ.** (1995). The petunia MADS box gene FBP11 determines ovule identity. *Plant Cell* 7:1859-1868
- de Martino, G., Pan, I., Emmanuel, E., Levy, A., and Irish, VF.** (2006). Functional Analyses of Two Tomato APETALA3 Genes Demonstrate Diversification in Their Roles in Regulating Floral Development. *The Plant Cell* 18:1833–1845.
- Ditta G, Pinyopich A, Robles P, Pelaz S, Yanofsky MF.** (2004). The SEP4 gene of *Arabidopsis thaliana* functions in floral organ and meristem identity. *Curr Biol* 14:1935-1940
- Emelyanov A, Gao Y, Isaak N-N and Parinov S.** (2006) Trans-kingdom Transposition of the Maize Dissociation Element. *Genetics* 174: 1095–1104.
- Emmanuel E. and Levy A.** (2002). Tomato mutants as tools for functional genomics. *Current Opinion in Plant Biology*, Vol. 5, 112-117.
- Esquinas-Alcázar, J. y Nuez, F.** (1995). Situación taxonómica, domesticación y difusión del tomate. *El cultivo del tomate*(ed). Madrid, Mundi-Prensa: 13–42.
- Gomez P, Jamilena M, Capel J, Zurita S, Angosto T and Lozano R.** (1999) *Stamenless*, a tomato mutant with homeotic conversions in petals and stamens. *Planta* 209:172-179.

- Honma T, Goto K.** (2001). Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature* 409:525-529
- Jack T et al.** (1999). Generation of enhancer trap lines in *Arabidopsis* and characterization of expression patterns in the inflorescence. *Plant Journal* 17(6), 699-707.
- Kaeppler, SM; Kaeppler, HF; Rhee, Y.** (2000). Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology* 43: 179–188.
- Kato, K., Ohta, K., Komata, Y., Araki, T., Kanahama, K., Kanayama, Y.** (2005). Morphological and molecular analyses of the tomato floral mutant leafy inflorescence, a new allele of *falsiflora*. *Plant Science* 169:131-138.
- Kramer, E.M., Dorit, R.L., and Irish, V.F.** (1998). Molecular evolution of petal and stamen development: Gene duplication and divergence within the *APETALA3* and *PISTILLATA* MADS-box gene lineages. *Genetics* 149, 765–783.
- Kramer, E.M., and Irish, V.F.** (1999). Evolution of genetic mechanisms controlling petal development. *Nature* 399:144–148.
- Lee L-Y. and Gelvin S.B.** (2008). T-DNA binary vectors and systems. *Plant Physiology*, Vol. 146, 325-332).
- Lozano, R., Gimenez, E., Cara, B., Capel, J., Angosto, T.** (2009). Genetic analysis of reproductive development in tomato. *Int J Dev Biol* 59(8-10):1635-48.
- Machida, C., H. Onouchi, J. Koizumi, S. Hamada, E. Semiarti et al.** (1997). Characterization of the transposition pattern of the *Ac* element in *Arabidopsis thaliana* using endonuclease I-SceI. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 8675–8680.
- Magallon, S., Crane, P.R., and Herendeen, P.S.** (1999). Phylogenetic pattern, diversity, and diversification of eudicots. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 86:297–372.
- Martienssen RA** (1998) Functional genomics: probing plant gene function and expression with transposons. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 2021–2026
- Noro, Y; Takano-Shimizu, T; Syono, S; Kishima, Y; Sano, Y.** (2007). Genetic variations in rice *in vitro* cultures at the *EPSPs-RPS20* region. *Theoretical and Applied Genetics* 114: 705–711.
- Olimpieri I, Mazzucato A.** (2008) Phenotypic and genetic characterization of the pistillate mutation in tomato. *Theor Appl Genet* 118(1):151-63

Parinov, S., and V. Sundaresan. (2000). Functional genomics in Arabidopsis: large-scale insertional mutagenesis complements the genome sequencing project. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11: 157–161.

Sahijram, L; Soneyi, JR; Bollamma, KT. (2003). Analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (*Musa spp.*). *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 39: 551–556.

Salinas, M. (2006). Resistencia a araña roja en tomate: análisis genético y mapeo de QTLs. Tesis doctoral – Universidad de Almería.

Smith, D., Y. Yanai, Y. G. Liu, S. Ishiguro, K. Okada et al. (1996) Characterization and mapping of Ds-GUS-T-DNA lines for targeted insertional mutagenesis. *Plant J.* 10: 721–732.

Spradling, A. C., D. M. Stern, I. Kiss, J. Roote, T. Laverty et al. (1995). Gene disruptions using P transposable elements: an integral component of the *Drosophila* genome project. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 10824–10830.

Stanford et al. (2001). Gene-trap mutagenesis: past, present and beyond. *Nat Rev Genet.* 2(10), 756-68.

Tabares, E., J. Pachón, W. Roca. (1991). Variación somaclonal y su aplicación al mejoramiento de cultivos. In: *Cultivo de tejidos en la agricultura*. W. Roca y L. Mroginski (eds). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Colombia. 969 p.

Weigel D, Meyerowitz EM. (1994). The ABCs of floral homeotic genes. *Cell* 78:203-9.