



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

**ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR Y FACULTAD DE
CIENCIAS EXPERIMENTALES**

**“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE
LÍNEAS DE SILENCIAMIENTO GÉNICO EN
TOMATE”**

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

**MÁSTER DE BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL Y
AGROALIMENTARIA**

Alumno: Rocío Fonseca Rodríguez

Tutor: Juan Capel Salinas

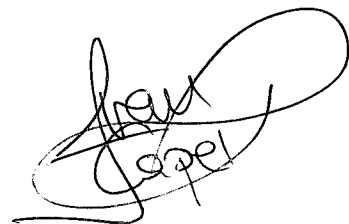
Septiembre, 2013

Firmado

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Rocío' followed by a stylized surname.

Rocío Fonseca Rodríguez

VºBº del tutor

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Juan Capel' with a large, decorative flourish at the end.

Dr. Juan Capel Salinas

Índice

Resumen.....	1
1. Introducción.....	3
2. Materiales y Métodos	8
2.1. Material Vegetal.....	8
2.2. Extracción de ADN	9
2.3. Genotipado mediante PCR.....	9
2.4. Extracción de ARN	10
2.5 Síntesis de cDNA	12
2.6 PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)	12
3. Resultados y Discusión	15
3.1 Cultivo de las plantas TG ₁ y obtención de plantas TG ₂	15
3.2 Caracterización molecular de las plantas TG ₁	16
3.3 Caracterización molecular de familias TG ₂ seleccionadas.....	20
3.4 Caracterización fenotípica de familias TG ₂ seleccionadas	25
4. Bibliografía.....	31

Resumen

La araña roja *Tetranychus urticae* constituye una de las plagas que más pérdidas ocasiona en el tomate cultivado *Solanum lycopersicum*. Para mejorar la resistencia del tomate a araña roja se ha recurrido a la Mejora Genética como alternativa más viable, introgressando genes de resistencia provenientes de especies cercanas como la entrada TO-937 de *S. pimpinellifolium*, resistente a la plaga por la presencia de tricomas de tipo IV. Para hacer más eficiente ese programa de Mejora Genética es necesario conocer la base genética de la resistencia a la plaga. Por ello, se procedió al estudio de la misma que permitió identificar dos QTL implicados en la resistencia, *Rtu 2.1* y *Rtu 2.2* localizados en el cromosoma 2, que son los que controlan el carácter. A continuación se procedió a la búsqueda de genes candidatos en estos QTL para generar líneas de silenciamiento génico en *S. lycopersicum* cultivar MoneyMaker y *S. pimpinellifolium* genotipo TO-937, susceptible y resistente a plaga respectivamente. Caracterizar estas líneas y determinar la implicación de esos genes en la resistencia es el objetivo principal de este trabajo.

Se han caracterizado las líneas de silenciamiento de 4 genes: *SIMixta*, *SIGlabra*, *SIExost* y *SIEPF*. Las líneas TG₁ se han cultivado y se obtuvieron semillas TG₂ de todas ellas, a excepción de líneas que mostraban ejerción estigmática que se han multiplicado vegetativamente. La caracterización molecular de las líneas TG₁ se realizó mediante PCR cuantitativa a Tiempo Real una vez optimizadas las condiciones para dichos genes. De esa forma se observó que el silenciamiento de los genes fue más efectivo en unos casos que en otros. En cuanto a las líneas TG₂ se procedió al genotipado mediante PCR de dos familias, seleccionadas por sus características fenotípicas y por el elevado número de semillas TG₂ de que se disponía. Previamente se ajustaron los parámetros de la PCR optimizando Temperatura de anillamiento y concentración de cebadores. Si bien en una de las familias analizadas el transgen segrega de forma mendeliana, en la otra línea la segregación está muy alejada de lo esperado. En cualquier caso, el silenciamiento parece funcionar en las líneas TG₂ portadoras de construcciones de silenciamiento mediante RNAi.

Por último se procedió a la caracterización fenotípica mediante el recuento de los tricomas presentes tanto en *S. pimpinellifolium* TO-937 como en 4 familias TG₂ de esta especie, dos familias de silenciamiento del gen *SIGlabra* y dos de silenciamiento

del gen *SIMixta*. El recuento de tricomas demostró que al silenciar el gen *SIMixta* se incrementa la densidad de tricomas de tipo IV en las líneas TG₂, mientras que en el caso del gen *SIGlabra* aparecen mayor número de tricomas de tipo VI. Por tanto estos genes parecen estar implicados en la formación y densidad de tricomas, lo que les convierte en candidatos a ser responsables de la resistencia a araña roja que muestra TO-937.

1. Introducción

La familia de las solanáceas comprende alrededor de 3000 especies, muchas de ellas de interés agronómico, cuyo origen se encuentra en la región andina que comprende desde el sur de Colombia hasta el norte de Chile (Nuez, 1995). Entre las especies de mayor importancia económica y social de la familia podríamos destacar a patata, pimiento, berenjena y, con una mención especial, a tomate, *Solanum lycopersicum* L, cuyo cultivo constituye el de mayor relevancia de la familia entre las hortalizas.

Si bien el centro de diversificación de la especie se corresponde con la región andina antes mencionada, su domesticación ocurrió en México y de allí pasó a Europa, donde se introdujo en la gastronomía popular (Diez y Nuez, 2008). Hoy día su cultivo está muy extendido por todo el mundo por ser fuente de minerales, vitaminas y otros compuestos de interés. Además de su adaptabilidad a distintos entornos, el tomate presenta también caracteres agronómicos muy interesantes, como por ejemplo una elevada tolerancia a algunos tipos de estrés abióticos, como la salinidad y el estrés hídrico (Grime, 1979). Sin embargo, como consecuencia de la disminución de variabilidad genética resultado de la domesticación, las variedades comerciales son susceptibles a numerosas plagas y enfermedades que diezman su producción y provocan la pérdida de cosechas. Por todo ello es necesario recurrir a fuentes alternativas con el objeto de introducir caracteres de resistencia en los cultivares susceptibles.

La solución a estos problemas agronómicos se ha encontrado en las especies silvestres emparentadas con *S. lycopersicum*. Tal es el caso de *S. pimpinellifolium*, a partir de la cual se han introgresado genes de resistencia como *Pto* (Martin y col., 1993) y *Cf-X* (Jones y col., 1994) que confieren resistencia a *Pseudomonas syringae* pv *tomato* y *Cladosporium fulvum*, respectivamente. De *S. peruvianum* se han introgresado los genes *Tm2* (Young y Tanksley, 1989) y *Sw5* (Stevens y col., 1995) de resistencia al virus del mosaico del tomate (ToMV) y de resistencia al virus del bronceado (TSWV) respectivamente. De forma similar se han utilizado otras especies como *S. habrochaites* y *S. chilense*, especie esta última de la cual se han introgresado los genes *Ty-1* y *Ty-3* que confieren resistencia a “Tomato Yellow Leaf Curl Virus” (TYLCV) (Verlaan y col., 2013), vulgarmente conocido como virus de la cuchara. Estos avances han sido posibles porque los cruzamientos interespecíficos dentro del género entre especies silvestres y la cultivada son factibles y los híbridos son fértiles. Entre las plagas que atacan a *S.*

lycopersicum una de las más importantes por las pérdidas que ocasiona es la araña roja *Tetranychus urticae* Koch. Se trata de ácaros polívoros que se alimentan succionando el contenido celular a través de un estilete, lo que provoca una deshidratación de los tejidos y genera clorosis y la posterior aparición de cicatrices en forma de manchas amarillentas (Tomczyk y Kropczynska, 1985). Aún en los casos menos severos, las manchas afectan la calidad de los frutos y disminuyen su valor comercial. Como resultado de infestaciones severas de la plaga se producen pérdidas del rendimiento o de cosechas enteras, bastando para ello la infestación de un tercio de las hojas de la planta (Berlinger, 1986).

Se ha intentado eliminar la plaga mediante control biológico basado en el uso de especies de ácaros depredadores, especialmente *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot, pero el coste de la cría del depredador en cautividad es elevado y los resultados no son siempre los deseados, además de que no funciona como medida preventiva ya que para utilizarlo se requiere que esté presente la plaga (Nihoul y Van Impe, 1992). También es difícil el control químico de araña roja mediante el uso de plaguicidas debido a que la plaga ha desarrollado mecanismos de resistencia (Van Leeuwen y col., 2005) y por los riesgos que supone para el medio ambiente y la salud. En consecuencia la mejora genética constituye la herramienta más eficaz para desarrollar variedades resistentes (Johnson, 1992).

En cuanto a los mecanismos de defensa implicados en la resistencia a plagas se ha demostrado que son fundamentales los denominados mecanismos pasivos, dentro de los que encontramos factores físicos como los tricomas (Fernández Muñoz y col., 2003). Los tricomas son células epidérmicas diferenciadas que cubren la superficie de tallos, hojas y meristemas. Pueden ser glandulares, es decir poseen una cabeza membranosa secretora, o no glandulares. Los tricomas no glandulares actúan como barrera física para el movimiento y diseminación de la plaga (Simmons y Gurr, 2004), mientras que los tricomas glandulares secretan sustancias pegajosas y/o tóxicas que inmovilizan o envenenan a las plagas (Ferré, 2004).

Luckwill, (1943) fue el primer autor que examinó los tricomas del género *Solanum*, clasificándolos de acuerdo a su morfología y funcionalidad. La clasificación incluye siete tipos de tricomas:

- Tricomas tipo I: tienen una longitud de entre 1,5 y 2,5 mm, de base multicelular y cabeza glandular.

- Tricomas tipo II: longitud entre 0,2-1,0 mm, de base multicelular y sin cabeza globular.
- Tricomas tipo III: entre 0,4-1,0 mm, se asientan sobre una base unicelular y sin cabeza glandular.
- Tricomas tipo IV: de cabeza glandular, con un tamaño de 0,2-0,4 mm.
- Tricomas tipo V: con una longitud de entre 0,1-0,3 mm, de base multicelular y cabeza multilobular.
- Tricomas tipo VI: glandulares, con una longitud de entre 0,1-0,5 mm, de base multicelular y cabeza multilobular.
- Tricomas tipo VII: son muy cortos (0,05-0,1 mm) y poseen una cabeza multilobular.

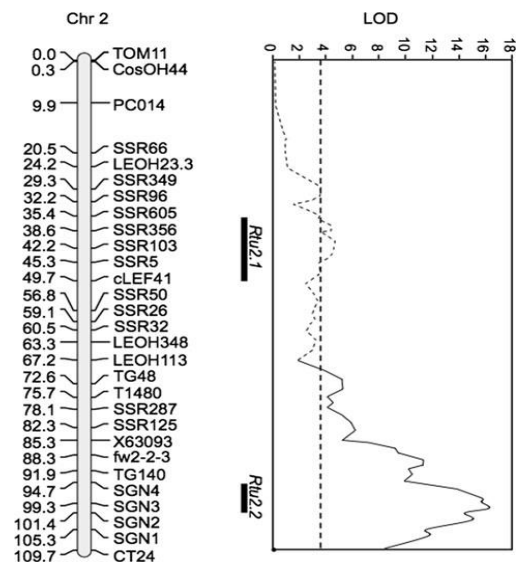
Los tricomas de mayor importancia en el caso de la resistencia a araña roja son los de tipo IV, puesto que son de tipo glandular y secretan acilazúcares, sustancias implicadas en la resistencia a varios tipos de plagas. Estos tricomas se encuentran en especies silvestres como *S. habrochaites*, donde la resistencia se asocia a la densidad de tricomas tipo IV (Carter y col., 1985) y en otras especies como *S. pennelli*, donde la resistencia a araña roja se ha relacionado con los niveles de acilazúcares secretados por estos tricomas (Goffreda y col., 1990). Pero estas dos especies se encuentran muy alejadas filogenéticamente del tomate cultivado, por lo que utilizarlas como fuente de dicha resistencia sería muy complejo debido a la elevada cantidad de caracteres negativos para la producción que muestran las plantas de esas especies.

El Grupo de Investigación “Mejora Vegetal” de la Estación Experimental del CSIC La Mayora de Málaga encontró una entrada de *S. pimpinellifolium*, denominada TO-937 que muestra resistencia a araña roja (Fernández Muñoz y col., 2000). Se ha demostrado además que la resistencia del genotipo TO-937 se debe a la presencia de tricomas de tipo IV y la secreción de acilazúcares en los mismos (Alba y col., 2009). *S. pimpinellifolium* no posee caracteres agronómicos negativos, a excepción del pequeño tamaño de sus frutos. Además es una especie cercana filogenéticamente al tomate cultivado, lo cual constituye una ventaja como donador de caracteres de resistencia.

Fernández Muñoz y col., (2000) estudiaron el modo de herencia de la resistencia a araña de TO-937 generando poblaciones segregantes partiendo del cruce entre plantas sensibles del cultivar MoneyMaker y TO-937. De este modo demostraron que la herencia de la resistencia a la plaga es dominante y que el carácter debía estar controlado por pocos

genes. Posteriormente, Salinas y col., (2013), haciendo uso de una población segregante compuesta por líneas consanguíneas F₈ o RIL (“Recombinant Inbred Lines”), con la que habían obtenido un mapa genético de elevada densidad de marcadores, realizaron un análisis cuantitativo de la resistencia a araña roja. De esa forma fue posible identificar 2 QTL mayores en el cromosoma 2 (Figura 1) que controlan la herencia de la resistencia a la plaga de araña roja, por lo que los denominaron *Rtu2.1* y *Rtu2.2*, por “Resistencia a *Tetranychus urticae*”.

Figura 1: Localización cromosómica de los QTL implicados en la resistencia a araña roja. A la izquierda se muestra el mapa de ligamiento del cromosoma 2 con la distancia entre marcadores representada en cM. A la derecha los QTL *Rtu2.1* (línea discontinua) y *Rtu2.2* (línea continua).



Una vez identificados los QTL *Rtu* se procedió a la identificación de los genes implicados en la herencia de la resistencia utilizando una estrategia de genes candidatos localizados en las regiones cromosómica *Rtu2.1* y *Rtu2.2*. La elección de uno de los genes candidatos a participar en la resistencia a araña roja ubicado en el QTL *Rtu2.2* se realizó en el Proyecto Fin de Máster “Análisis genómico funcional de la resistencia a araña roja en tomate” (López-Gómez, 2011). En todos los casos, utilizando la base de datos “Solgenomics Network”, donde se encuentra depositada y anotada la secuencia del genoma de tomate, se seleccionaron un grupo de genes que por su secuencia podrían estar implicados en la formación y densidad de tricomas. Los genes elegidos fueron el gen *SlExost*, potencialmente implicado en la síntesis de acilazúcares, así como 3 genes de tomate homólogos a genes de *Arabidopsis* que se ha demostrado que están implicados en la formación y en la densidad de los tricomas, que son los genes *EPF*, *GLABRA* y *MIXTA* (Serna y Martin, 2006).

A continuación se determinó si existían polimorfismos en las secuencias genómicas de dichos genes entre la especie cultivada (susceptible a la plaga) y dos entradas de la especie *S. pimpinellifolium*, una resistente y una susceptible a la plaga.

Cuando se encontraba un polimorfismo específico de la entrada resistente, se consideraba que el gen podía ser un candidato a participar en la resistencia a la plaga y para demostrarlo, se generaron construcciones de silenciamiento del gen mediante una estrategia RNAi. Los plásmidos así obtenidos se han utilizado posteriormente para la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* de *S. lycopersicum* cultivar Moneymaker y de *S. pimpinellifolium* TO-937.

Los objetivos de este Proyecto de Fin de Máster han sido la caracterización en las plantas TG₁ de dichas líneas RNAi, comenzando con el análisis del nivel de expresión de los genes silenciados y comprobando así la efectividad de las construcciones de silenciamiento. También se ha analizado la segregación de los correspondientes transgenes en la TG₂ mediante su genotipado y la determinación del nivel de expresión de los genes silenciados. De igual modo se analizó el fenotipo de estas líneas con el objetivo de determinar la presencia de tricomas tipo IV lo que permitirá dilucidar su implicación en la resistencia a araña roja.

2. Materiales y Métodos

2.1. Material Vegetal

En el presente trabajo se han utilizado plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) del cultivar Moneymaker (MM) y plantas de la especie silvestre resistente a araña roja *S. pimpinellifolium* genotipo TO-937. A partir de ellas se generaron plantas transgénicas TG₁ en las que se pretende silenciar mediante una estrategia RNAi uno de los 4 genes candidatos a participar en la resistencia a araña roja. Para cada gen se generaron un número variable de eventos de transformación (plantas TG₁) y mediante cultivo *in vitro*, cada una de esas plantas se duplicó. En total se han generado, en el fondo genético *S. pimpinellifolium*, 14 eventos del gen *SIMixta*, ocho del gen *SlGlabra* y siete del gen *SExost*. En MM se han obtenido dos eventos para el gen *SIMixta* y seis del gen *SIEPF*. En la actualidad se están generando las líneas RNAi para el gen *SIEPF* en *S. pimpinellifolium* y para los genes *SExost* y *SlGlabra* en MM.

Una vez crecidas las plantas se procedió a autofecundarlas para obtener semillas TG₂. Con tal fin, las plantas se cubrieron con bolsas de papel que impedían la llegada de insectos polinizadores. Cuando fue necesario forzar la autofecundación se recogió polen de flores que se depositó sobre los estigmas de las flores usadas como madre. Las flores se volvieron a cubrir con bolsas de papel hasta que desarrollaron frutos. Una vez maduros, a los frutos se les extrajeron las semillas que se mantuvieron 16 horas en ácido clorhídrico al 4% y luego se lavaron y secaron. Antes de sembrarlas, las semillas se esterilizaron mediante un tratamiento con lejía al 50% y Tritón X-100 al 0,1% durante 30 minutos, seguido de varios pasos de lavado con agua destilada. Luego se sembraron en placas Petri sobre papel de filtro estéril. Una vez germinadas, las plántulas se pasaron a bandejas en el invernadero hasta que alcanzaron un tamaño óptimo para ser trasplantadas a maceteros en los que se cultivaron siguiendo las técnicas culturales típicas de la zona.

La determinación de la presencia y el número de cada uno de los distintos tipos de tricomas en las hojas de las plantas, tanto controles como plantas transgénicas TG₂, se realizó utilizando una lupa estereoscópica Nikon SMZ-2T, provista de una cámara digital Nikon DXM1200C. El recuento se realizó en cotiledones, primera hoja y segunda hoja y se obtuvo cortando secciones de 1,0 x 0,2 cm (ancho x largo) que se fijaban a un portaobjetos con pegamento de carbono coloidal.

2.2. Extracción de ADN

Las muestras consistieron en discos de folíolos de las plantas TG₁ así como de las plantas TG₂ analizadas. Los discos se colocaron dentro de tubos Eppendorf que contenían bolas de acero y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. El material vegetal se pulverizó sin descongelar utilizando un molino Retsch MM301.

La extracción de ADN se realizó utilizando el reactivo “Plant DNAzol Reagent” (Invitrogen) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante, que consistía en la adición de 300 µl de DNAzol hasta descongelar la muestra vegetal, seguido de 300 µl de cloroformo. Después de mezclar bien, se centrifugó a 12.000g durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante del cloroformo y de los restos vegetales y se pasó a tubos limpios. A continuación se procedió a la precipitación del ADN añadiendo 225 µl de etanol al 100%, se centrifugó a 7500g 4 minutos y se eliminó esta vez el sobrenadante. Luego se lavó el pellet utilizando 300 µl de solución de lavado compuesta de DNAzol y etanol en proporción 4:3 vol, respectivamente. Se centrifugó (7500g, 4 minutos) y el pellet se lavó con 300 µl de etanol al 70%, seguido de otra centrifugación (7500 g, 4 minutos). Luego se eliminó todo el etanol utilizando una pipeta y se dejó dejar secar el pellet al aire dentro de una campana extractora de gases durante aproximadamente 30 minutos. Una vez seco, el pellet se disolvió en 50 µl de agua destilada estéril.

Antes de proceder a su análisis, se cuantificó la cantidad de ADN de cada muestra utilizando un gel de agarosa al 0,8% en tampón SB 1X (Brody y Kern, 2004), utilizando el marcador de tamaño y cantidad λ /HindIII. Una vez cuantificado se prepararon alícuotas de 10 ng/µl de ADN para proceder al genotipado mediante PCR.

2.3. Genotipado mediante PCR

El objetivo de este experimento fue la puesta a punto de la PCR para la detección de cada transgen y, de esa forma, dilucidar la segregación del mismo en las familias TG₂ analizadas. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en tubos de 0,2 ml en una mezcla que estaba compuesta por 1 µl de ADN (10 ng/µl); 20 µl de agua destilada autoclavada; 3 µl de Buffer NH₄ 10X; 2,4 µl de dNTP 2,5 mM; 1,5 µl de MgCl₂ 50 mM; 0,10 µl de BIOtaq Pol (Bioline); 1 µl de cebador forward y 1 µl de cebador reverse, para un volumen final de 30 µl.

Los cebadores se diseñaron utilizando el programa Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) y se muestran en la Tabla 1. Eran cebadores específicos de elementos genéticos contenidos en las construcciones de silenciamiento mediante RNAi tales como el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (35S), el terminador *nos* (*nos*), el gen *nptII* o *neomicina fosfotransferasa II* que confiere resistencia al antibiótico Kanamicina, así como el gen *Poligalacturonasa* utilizado como control de las reacciones. En el caso del promotor 35S se utilizaron tres parejas de cebadores: 35Spro que amplifica un fragmento de 357 bp, 35S-500 que amplifica un fragmento de 500 pb y 35S-800 que amplifica un fragmento de 800 pb, todos ellos específicos de la secuencia del promotor del 35S.

Tabla 1: Cebadores utilizados para el genotipado mediante PCR. Se muestra el nombre del cebador, su secuencia y la Temperatura de fusión (T_m) teórica

Forward	Secuencia 5'-3'	T _m	Reverse	Secuencia 5'-3'	T _m
35SproF	GCTCCTACAAATGCCATC	52,2°C	35SproR	GATAGTGGGATTGTGCGTCA	54,0°C
35S-500F	TTACAGAGGCAAGAGCAGCA	57,6°C	35S-500R	GAAGCAAGCCTTGAATCGTC	55,1°C
35S-800F	TGCTGACCCACAGATGGTTA	54,4°C	35S-800R	TTGCTTTGAAGACGTGGTTG	53,9°C
nosF	GAATCCTGTTGCCGGTCTTG	55,6°C	nosR	TTATCCTAGTTTGC GCGCTA	56,2°C
nptIIF	CTCACCTTGCTCCTGCCGAGA	61,8°C	nptIIR	CGCCTTGACCCTGGCGAACAG	64,1°C
pgF	GGATCCTTAGAAGCATCTAGT	52,6°C	pgR	CGTTGGTGCATCCCCTGCATGG	60,4°C

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador “Mastercycler® Pro S” (Eppendorf) y las siguientes condiciones: un primer paso de desnaturalización a 94°C durante 5 minutos; 35 repeticiones del siguiente ciclo de tres pasos: desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, un segundo paso de anillamiento a temperatura entre 50-65°C durante 30 segundos y un paso final de extensión a 72° durante 1 minuto. Al final de estos 35 ciclos el programa incluía un último paso de extensión a 72°C 5 minutos.

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa preparados al 2% en tapón SB 1X y utilizando como marcador de tamaño el denominado “1kb Ladder” (Invitrogen). El gel se tiñó en bromuro de etidio y se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta, para ser posteriormente fotografiado.

2.4. Extracción de ARN

La extracción de ARN para las reacciones de PCR cuantitativa a Tiempo Real (QPCR) se llevaron a cabo utilizando el reactivo “Trizol” (Invitrogen). El material vegetal

consistió en foliolos que se congelaron en nitrógeno líquido y se pulverizan sin descongelar utilizando morteros. La extracción consistió en añadir 1 ml de Trizol a 0,1 g de material pulverizado, mezclar mediante vórtex e incubar 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se añadieron 200 µl de cloroformo y se centrifugó a 12,000g durante 15 minutos y a 4°C. El sobrenadante se transfirió a tubos preparados previamente que contenían 500 µl de isopropanol, se incubó esta mezcla durante 10 minutos a temperatura ambiente para posteriormente centrifugar la mezcla a 12,000g, 4°C, durante 10 minutos para precipitar el ARN. A continuación se eliminó el sobrenadante y se añadió 1 ml de etanol al 75% preparado con agua tratada con DEPC al 0,1% (Dietilpicrocarbonato) para lavar el pellet y se centrifugó a 7500g y a 4°C durante 5 minutos. Por último se eliminó el sobrenadante de etanol y se dejó secar el pellet al aire aproximadamente durante 1 hora. Una vez seco se resuspendió en 44 µl de agua DEPC.

Una vez resuspendidas a las muestras se les realizó un tratamiento con DNAsa para evitar la contaminación por DNA utilizando el Kit de Ambion (Life Technologies). Para ello se añadieron 5 µl de Buffer *DNAsa*I 10X y 1 µl de *rDNAsa*I a cada muestra, incubando durante 1 hr a 37°C. Por último se añadieron 5 µl del inactivador de DNAsa “DNase inactivation Reagent” para detener la reacción, se incubó durante 2 min a T^a ambiente y se centrifugó a 10000g 2 min. Finalmente se recuperó el sobrenadante.

A continuación se compruebo la calidad del RNA extraído en un gel de agarosa al 1% preparado en tampón MOPS 1X (0,02M, pH 7,0) y agua DEPC. Las muestras se prepararon añadiendo a 1 µl de muestra 9 µl de tampón de carga preparado en un mix al que se añade 1 µl de Bromuro de Etidio. El tampón de carga se preparó con 500 µl de formamida, 166 µl de formaldehído, 100 µl de MOPS 10X y 160 µl de Loading Buffer 6X.

Una vez verificada la calidad del RNA se procedió a su cuantificación utilizando el espectrofotómetro “Gene Quant pro DNA/RNA calculator”. Se realizaron diluciones 1/50 y 1/100 del RNA en un volumen final de 10 µl. Se midió la absorbancia a 230, 260, 280 y 320 nm para determinar la concentración de ARN mediante la absorbancia a 260 nm y la pureza del mismo mediante las relaciones $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ y $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$, puesto que en el ARN puro estas relaciones deben ser ≥ 2 .

2.5 Síntesis de cDNA

Una vez comprobada la calidad del RNA y cuantificado éste, se realizó la síntesis de cDNA utilizando el kit “First Strand cDNA Synthesis” (Thermo Scientific). Una vez calculada la cantidad de RNA necesaria para una concentración de 0,5-1 µg/µl, se le adicionó 1 µl de oligo (dT)18 primer 100µM y 1 µl de Random Hexamer Primer 100µM. Se completa con agua DEPC hasta un volumen de 11 µl y se incuba a 65°C durante 5 min. Luego a cada muestra se añaden los siguientes reactivos y en el siguiente orden: 4 µl de Tampón de reacción 5X, 1 µl de “Ribolock RNase Inhibitor”, 2 µl de 10 mM dNTP Mix y 2 µl de M-MLV RT 20U/µl, la retrotranscriptasa empleada para la síntesis del cDNA. Todo ello se incubó a 25°C durante 5 min, luego a 37°C durante 1 h y a 70°C durante 5 min.

2.6 PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)

Con el objetivo de cuantificar de forma relativa la expresión génica en las TG₁ y TG₂ se realizó una PCR cuantitativa utilizando un termociclador “7300 Real Time PCR System” (Applied Biosystems). El mix utilizado fue “SYBR Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems), optimizado para estas reacciones y que contiene el fluorocromo específico de ADN de cadena doble “SYBR Green”, la polimerasa AmpliTaq Gold, dNTP’s incluyendo dUTP, el fluorocromo Rox utilizado como referencia pasiva y buffer para estabilizar la reacción.

La reacción tuvo lugar sobre un volumen final de 10 µl y se compone de 1 µl de la alícuota Forward/Reverse de cebadores, 5 µl de “SYBR Green PCR Master Mix”, 3 µl de agua destilada estéril y 1 µl de cDNA. La concentración de cebadores se optimizó mediante reacciones realizadas con cDNA control. Se han utilizado también cebadores específicos para el promotor del gen de tomate *Arlequín* y para el gen de expresión constitutiva *Ubiquitina3*. La presencia en la reacción de productos de amplificación usando los cebadores para el promotor de *Arlequín* indicaría contaminación con DNA genómico de la muestra de ARN, mientras que el gen *Ubiquitina3* es el marcador endógeno que se incluye para comparar su nivel de expresión con el del gen a estudiar para poder referenciar las muestras durante el procesamiento de los datos (Gimenez y col., 2010).

Tabla 2: Cebadores utilizados para la PCR cuantitativa a Tiempo Real

Forward	Secuencia	Tm	Reverse	Secuencia	Tm
GI2F1	TTTGATGGATGTGAACCAATG	51,0°C	GL2R2	CATCACTTGCAATGCTCCAT	54,3°C
GL2F2	TTCTCCGCGATGAGAACTCTA	57,3°C	GL2R2	TGTTCCAGTATTGACACGGAG	55,4°C
MixtaF1q	GGTACCACAACCTCCTACAATTAAA	53,5°C	MixtaR1q	ATCGACCCATCGACGAAAT	53,5°C
MixtaF2q	TCCAAGAACATGGTCATGGTA	55,2°C	MixtaR2q	CACCTGAGCCTGCAACTCTT	57,6°C
MixtaF3q	TGGTAAGAGTTGCAGGCTCA	56,0°C	MixtaR3q	CTATGGCCGACCACCTATTC	54,4°C
EPF2F1q	GCAACCAACAATTACCTCT	52,2°C	EPF2R1q	TTTTCTTCCTTCAGCGTGGA	54,6°C
EPF2F2q	TTCAAGCTTATCCCACTTCACA	54,8°C	EPF2R2q	TCTCTATCTCATTATCCCCGTGA	56,0°C
ExostF1z	TCCCCTTTCCCTTTCTCAGT	53,9°C	ExostR1z	CGCCGAAGGGATAAATTACA	53,4°C
ExostF2z	ACCGCACCAGTCTATTACC	55,3°C	ExostR2z	ACCGTTAGAGCAGGGAATCA	55,3°C
ExostF3z	AATGCTCCGCAACATTCTTC	54,5°C	ExostR3z	TGTACTTCAACGGCTCTCCA	55,4°C

Los datos obtenidos se procesaron utilizando el programa de Excel de Microsoft Office utilizando el valor Ct obtenido de la PCR. El valor Ct se refiere al número de ciclos requeridos para que se produzca la amplificación exponencial del fragmento de ADN específico de nuestros cebadores, que es inversamente proporcional a la cantidad de cDNA específico. Por lo tanto cuantos más ciclos transcurran hasta que aparece la señal de amplificación menos cDNA hay en la muestra y mayor es el grado de silenciamiento del gen.

El método de cuantificación usado en este trabajo es el denominado de “expresión relativa” (Pfaffl, 2004), en el que la expresión de nuestro gen en una muestra dada se referencia a la expresión de un gen endógeno de expresión constitutiva en la misma muestra y a la expresión de nuestro gen en una muestra “control”. Por ello, en primer lugar se calcula la desviación estándar, ya que las muestras se ponen por duplicado, y la media del valor Ct del gen en estudio y, simultáneamente, del gen *Ubiquitina3* en la misma muestra. A continuación se calcula la media del valor Ct del gen menos la media del valor Ct del gen *Ubiquitina3*, lo que nos permite obtener la denominada ΔCt . Luego se calcula el valor de $\Delta\Delta Ct$ que se obtiene restando al ΔCt de cada muestra el valor ΔCt del gen observado en la muestra usada como control. Como en cada ciclo de PCR se duplica la cantidad de ADN, la diferencia entre las muestras se calcula mediante la fórmula $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

3. Resultados y Discusión

3.1 Cultivo de las plantas TG₁ y obtención de plantas TG₂

Cuando se obtienen plantas transgénicas de tomate (generación TG₁), esas plantas son hemicigotas para cada transgén que porten, lo que significa que de cada evento de inserción únicamente tienen una copia que se habrá insertado en uno de los dos cromosomas de la planta, por ser estas diploides. A ello hay que unir el hecho de que esas plantas se han generado por cultivo *in vitro*, lo que ocasiona mutaciones denominadas “variación somaclonal”. Por ello, para demostrar que un fenotipo dado es debido a un transgen y no a variaciones somaclonales, es necesario disponer de semillas de los descendientes TG₂ en los que sea posible identificar plantas acigotas, carentes del transgen pero portadoras de las variaciones somaclonales de ese evento concreto de transformación, y plantas hemicigotas y homocigotas para la presencia del transgen que deberían ser las que muestren el fenotipo generado por el transgen.

Con el fin de obtener poblaciones TG₂, se procedió a la autofecundación de cada una de las plantas TG₁ analizadas en este trabajo cubriendo las flores con bolsas de papel que impidiese la llegada de insectos polinizadores que produjesen la fecundación cruzada de las plantas. Esta técnica, de uso rutinario en el grupo de investigación, dio los resultados esperados en la mayoría de las plantas TG₁ estudiadas en este TFM. Sin embargo, observamos que en algunas plantas TG₁ de *S. pimpinellifolium* portadoras de construcciones de silenciamiento para los genes *SIMixta* y *SlGlabra* cuajaban frutos partenocárpicos, esto es, frutos sin semillas. El análisis detallado de la morfología de las flores de esas plantas permitió descubrir que presentaban exéresis estigmática, es decir, el estigma sobresalía por encima del cono estaminal (Figura 2), por lo que la autofecundación era imposible por medios naturales. Si bien el fenotipo de exéresis estigmática es relativamente frecuente en algunas especies silvestres, no se ha observado en las plantas de *S. pimpinellifolium* TO-937 durante todos los años que el grupo de investigación lleva cultivando las mismas. También se ha descrito que las condiciones ambientales pueden ocasionar esa fisiopatía (Chamarro, 1995). Cabe la posibilidad de que el cultivo *in vitro* o la aclimatación, ocasionase la aparición de esa condición particular de las flores de esas plantas TG₁. Sin embargo, la exéresis estigmática fue patente en todas las flores de únicamente dos tipos de líneas de silenciamiento, las de los genes *SIMixta* y *SlGlabra*,

por lo que también es posible que esos dos genes participen en el control de ese carácter, lo que sería muy interesante por su potencial aplicación a la mejora genética de tomate. En cualquier caso, es necesario disponer de poblaciones TG₂ de esas plantas en las que corroborar y comprobar estas hipótesis.



Figura 2: Inflorescencia y flores de plantas con ejerción estigmática. Todas las flores de una inflorescencia (A) mostraban ejerción estigmática. En B se aprecia con detalle como sobresale el estigma del cono estaminal.

Con las plantas que mostraban ejerción estigmática fue necesario forzar la autofecundación como si de un cruzamiento se tratase, con el objetivo de obtener frutos con semillas TG₂. Usando esta estrategia fue posible obtener semillas TG₂ de todas las plantas TG₁, a excepción de las líneas de *S. pimpinellifolium* portadoras de la construcción de silenciamiento del gen *SIMixta* 1b, 1d, 2b, 4a, 4b y 6d. Con el fin de que esas plantas no se pierdan, se procedió a su multiplicación vegetativa mediante esquejado. Para ello, se cortaron tallos sanos de esas plantas que se colocaron en solución nutritiva con aireación forzada para evitar que se pudran los tallos y favorecer la formación de raíces. En estos momentos, estos tallos están en pleno proceso de desarrollo de nuevas raíces de forma que puedan ser considerados esquejes y cultivados en una próxima campaña de cultivo de otoño.

3.2 Caracterización molecular de las plantas TG1

Las plantas TG₁ analizadas en este trabajo son portadoras de construcciones de silenciamiento génico mediante RNAi de genes candidatos a participar en la resistencia a araña roja. Se ha demostrado que el silenciamiento por RNAi es del tipo postranscripcional y que se extiende a lo largo del desarrollo de la planta de forma similar a como lo hace una infección por un patógeno (Baulcombe, 2004). Por ello,

una vez que las plantas TG₁ habían alcanzado suficiente nivel de desarrollo, procedimos al análisis de expresión del transgen que portaban mediante la técnica de PCR cuantitativa a Tiempo Real, para, de esa forma, determinar el nivel de silenciamiento de los genes y la efectividad de las construcciones utilizadas.

Inicialmente se realizaron reacciones de PCR cuantitativa para ajustar la concentración de cada pareja de cebadores. En la Figura 3 se muestra el resultado observado al usar los cebadores específicos para los genes *SIMixta* y *SIGlabra* y utilizando tres diferentes concentraciones 300/300, 600/600 y 900/900 nM de los cebadores Forward/Reverse. Partiendo de cDNA de una muestra de una planta control, no transgénica, y usando en todos los casos la misma concentración de cDNA como molde, se puede apreciar que no existían diferencias significativas en los valores C_t de las tres concentraciones (Figura 3), por lo que se eligió la concentración 300/300 nM como más ahorrativa y porque los cebadores utilizados para la detección de los genes control *Arlequín* y *Ubiquitina3* se encuentran optimizados para esta concentración.

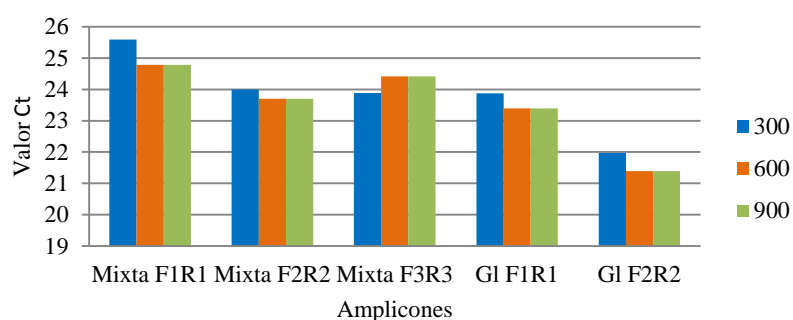


Figura 3: PCR cuantitativa para ajustar la concentración de cebadores específicos de los genes *SIMixta* y *SIGlabra*. Para el gen *SIMixta* se utilizaron 3 combinaciones de cebadores (F1R1, F2R2 y F3R3) y para el gen *SIGlabra* se usaron dos combinaciones (F1R1y F2R2). Se probaron 3 concentraciones distintas de cada pareja de cebadores (300/300, 600/600 y 900/900 nM) que se han representado en color azul, naranja y verde respectivamente.

Una vez optimizadas las condiciones de las reacciones de PCR cuantitativa a Tiempo Real se procedió al análisis de las plantas TG₁. En la Figura 4 se muestra el resultado observado en las plantas portadoras de la construcción de silenciamiento para el gen *SIGlabra* obtenido al utilizar la pareja de cebadores GI2F2R2. Los resultados muestran que el nivel de expresión de gen *SIGlabra* en la línea TG₁ GIPi2a era superior al de las plantas no transformadas de TO-937. Además, los niveles de expresión del gen en las líneas GIPi2b, GIPi3b y GIPi4a fueron muy similares a los que muestran las plantas no transformadas. Por el contrario, las otras cuatro líneas analizadas GIPi2c, GIPi2e, GIPi3a y GIPi3c muestran niveles de expresión relativa del gen *SIGlabra* menores que los de las

plantas control TO-937. Cuando se utilizó la pareja de cebadores G12F1R1 los resultados obtenidos fueron muy similares y por ello no se muestran.

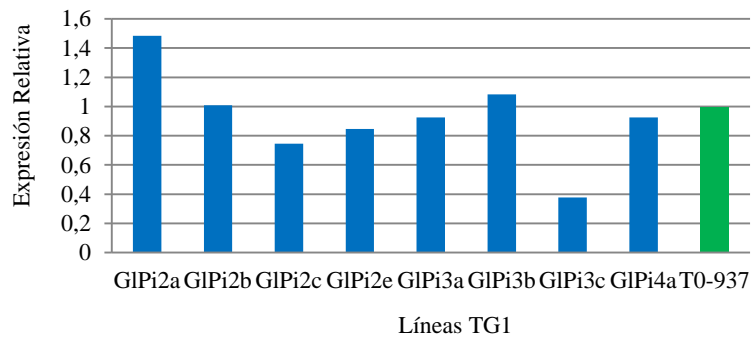


Figura 4: Expresión relativa del gen *SIGlabra* en las líneas de silenciamiento. Para este experimento se utilizó la combinación de cebadores G12F2R2. Se muestran los niveles de expresión de cada planta TG₁ (representadas por barras azules) relativa a las plantas de TO-937 no transformadas (barra verde).

Los resultados observados en la planta GIPi2a, así como en las plantas GIPi2b y GIPi3b, no son los esperados en líneas de silenciamiento por RNAi. Sin embargo hay que tener en cuenta varios factores como que el gen *SIGlabra* tiene unos niveles de expresión relativamente bajos, lo que implica que detectar su silenciamiento podría ser más complicado que el de genes con mayores niveles de expresión. Por otro lado, tal y como se ha comentado, el silenciamiento por RNAi (Baulcombe, 2004) puede tardar en producirse, pero una vez que se inicia se extiende por la planta como si de una infección de tratase y, una vez iniciado, se transmite a la descendencia de la planta. Por ello, cabe la posibilidad de que aún no se hubiese iniciado el silenciamiento en esas plantas. Por último, este resultado se ha observado en una planta transgénica en la que la inserción de T-DNA o las mutaciones somaclonales que se han producido durante su generación podrían hacer que los niveles de expresión del gen *SIGlabra* sean más altos que en las plantas sin transformar. Para esclarecer este resultado se requiere analizar la expresión en las TG₂ descendientes de estas plantas, donde esperaríamos que las plantas acigotas tuviesen un nivel de expresión del gen mayor y que las plantas transgénicas muestren un nivel de expresión menor, lo que demostraría que el silenciamiento por RNAi está funcionando.

Por lo que respecta al análisis de la expresión del gen *SIMixta* en las líneas de silenciamiento TG₁ para ese gen, hay que indicar que se realizó de forma similar a la antes descrita para el gen *SIGlabra* y que los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5. Puede observarse que en las líneas MixtaPi3a y MixtaPi3c la expresión relativa

del gen *SIMixta* es superior a la observada en TO-937. Además, hay tres líneas, MixtaPi1c, MixtaPi3b y MixtaPi3d que muestran un nivel de expresión similar al de las plantas no transformadas de TO-937. En el resto de líneas, el nivel de expresión del gen *SIMixta* es inferior al observado en las plantas control, lo que indica que el silenciamiento del gen estaría siendo efectivo en esas líneas. Teniendo en cuenta que el nivel de expresión del gen *SIMixta* es muy similar al del gen *SIGlabra*, las hipótesis para explicar el resultado observado en la planta MixtaPi3c son las antes expuestas para la línea GIPi2a.

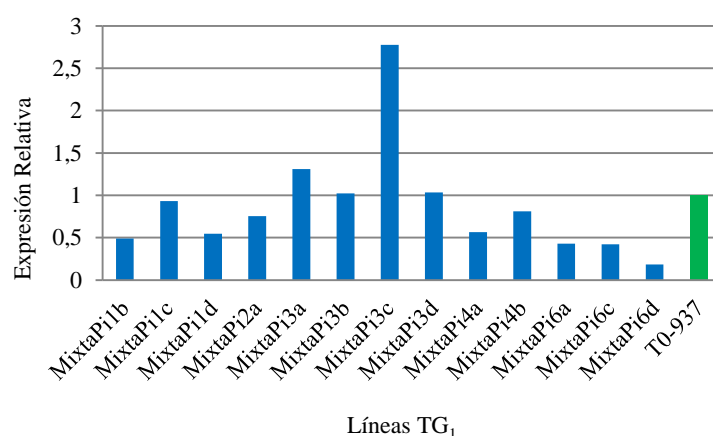


Figura 5: Expresión relativa del gen *SIMixta* en líneas TG₁ portadoras de una construcción de silenciamiento por RNAi específica para ese gen. Se ha utilizado la combinación de cebadores MixtaF2R2q.

Por lo que respecta al análisis de la expresión del gen *SIExost* en las líneas TG₁ portadoras de la construcción de silenciamiento específica para ese gen, hay que indicar que se realizó con 3 parejas de cebadores obteniendo en todos los casos resultados muy similares. En la Figura 6 se muestran los resultados obtenidos al utilizar la pareja de cebadores ExostF3R3z. Cabe destacar que todas las líneas TG₁ RNAi muestran niveles de expresión relativa del gen muy inferiores a los observados en las plantas control no transformadas. Este resultado demuestra que el silenciamiento se habría producido de forma efectiva en todas estas líneas transgénicas. Cabe la posibilidad de que al ser *SIExost* un gen de expresión relativa más elevada que los genes *SIGlabra* o *SIMixta*, el silenciamiento que se observa en esta línea sea más efectivo que el observado en las otras líneas antes descritas (Figuras 4 y 5). Sin embargo, el gen *SIExost* debería estar implicado en la síntesis de compuestos como los acilazúcares que se secretan por los tricomas glandulares. Hasta el momento no disponemos de un sistema de cuantificación efectiva de estos compuestos, motivo por el cual, las plantas TG₂ de este gen no fueron sembradas y posteriormente caracterizadas.

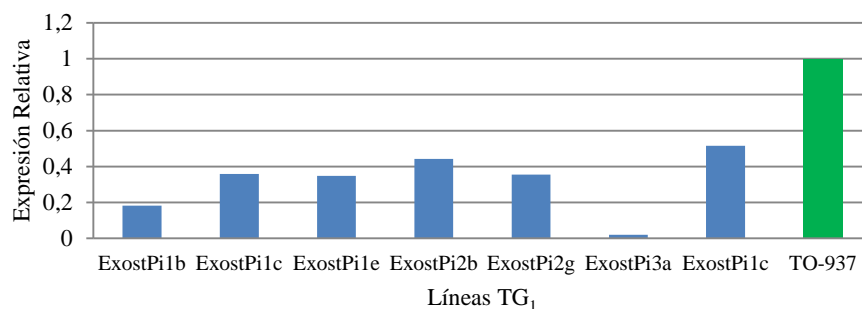


Figura 6: Expresión relativa del gen *SLEXOST* en las 7 plantas TG₁ portadoras de construcciones de silenciamiento génico para ese gen analizadas en este proyecto. Se muestran los resultados obtenidos al utilizar la pareja de cebadores ExostF3R3z.

3.3 Caracterización molecular de familias TG₂ seleccionadas

Tal y como se ha comentado, los transgenes están presentes en una única copia en las plantas TG₁ por lo que segregan en la siguiente generación (TG₂) como si se tratase de genes dominantes. En el caso de las líneas de silenciamiento por RNAi, se espera que las plantas acigotas (no transgénicas) muestren un nivel de expresión del gen de interés muy superior al de las plantas hemicigotas (con una copia del transgen) u homocigotas (con dos copias del transgen en su genoma), donde cabría esperar un silenciamiento postranscripcional del gen específico de cada línea. Por ello, es necesario conocer el genotipo de cada planta TG₂ que se analice.

Previo al genotipado de estas TG₂ se ajustaron las condiciones de detección de las construcciones mediante PCR, modificando parámetros como la temperatura de anillamiento y la concentración de cebadores. Como punto de partida se utilizó una concentración stock de cebadores de 50 μ M y una temperatura de anillamiento de 60°C, condiciones relativamente similares a las utilizadas en la literatura para este tipo de construcciones génicas (Gimenez y col., 2010). En ninguna de esas reacciones se observó un producto de amplificación único y nítido, sino que, por el contrario, se observó que muchos cebadores quedaron sin utilizar, motivo por el cual hubo de acometerse la puesta a punto de las condiciones de PCR. En primer lugar se procedió a modificar la Temperatura de anillamiento de la reacción de PCR manteniendo la concentración inicial de cebadores. Este ensayo se realizó con todos los cebadores y consistió en una PCR en gradiente de tres temperaturas: 56°C, 60°C y 62°C para determinar cuál era la Temperatura de anillamiento óptima de los cebadores de este estudio. Se utilizaron dos muestras de ADN, *S. lycopersicum* cultivar Moneymaker (MM) como control negativo de

las reacciones y la planta TG₁ GIPI2e, planta madre de una de las familias TG₂ analizadas como control positivo. Los resultados obtenidos, tal y como se aprecia en la Figura 7, tampoco fueron concluyentes, puesto que no se observa la presencia de productos de amplificación en forma de bandas nítidas, con la excepción de los cebadores del gen control *Poligalacturonasa* (*PG*) y la temperatura de anillamiento de 62°C.

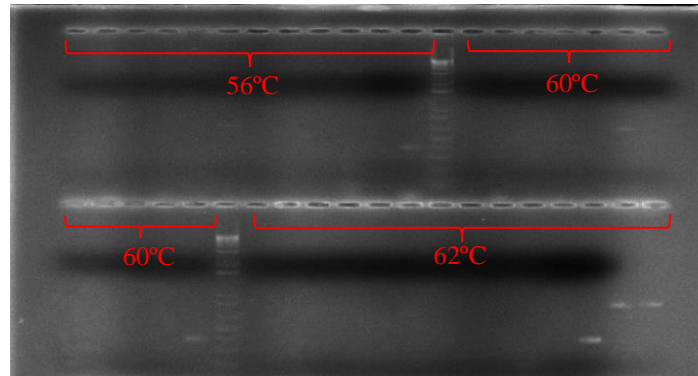


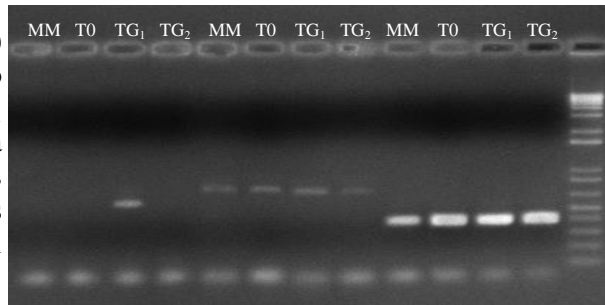
Figura 7: Resultado de la amplificación en gradiente de temperaturas. Se muestran los resultados obtenidos con tres de las temperaturas utilizadas (56°C, 60°C y 62°C) separados por el marcador 1 kb Ladder. El orden de carga de cada una de las parejas de cebadores fue 35Spro; 35S-500; 35S 800; nos; npt II y PG.

Continuando con la puesta a punto de las condiciones de PCR para la detección de los transgenes, se realizaron nuevas reacciones en las que el parámetro que se modificó fue la concentración de cebadores. Se utilizaron las tres parejas de cebadores que habían mostrado mejores resultados en los anteriores experimentos, esto es, dos parejas específicas de la secuencia del promotor 35S (35S-500 y 35S-800) y la pareja de cebadores específica del gen endógeno *PG*.

En la Figura 8 se muestra el resultado de las amplificaciones observadas utilizando una concentración stock de cebadores de 10 µM. Como ADN molde de las reacciones se utilizaron dos controles negativos, *S. lycopersicum* cultivar MM, y *S. pimpinellifolium* genotipo TO-937, un control positivo (GIPI2e TG₁) y una muestra TG₂ elegida al azar. Los resultados demostraron que los cebadores 35S-500 funcionan en la detección de dicho elemento transgénico, ya que aparece una banda correspondiente a la planta TG₁ utilizada como control positivo y por el contrario, no aparece amplificación en las plantas controles negativos. Por el contrario, los cebadores 35S-800 producen bandas en todas las muestras, incluidas las no transgénicas, lo que ha de ser considerado un artefacto y por lo tanto se descartó su uso. En cuanto a la detección del gen endógeno de la *PG* como cabía

esperar aparecen bandas en cada una de las muestras. De esta forma quedaron establecidas las condiciones de la PCR para proceder al genotipado de las familias TG₂.

Figura 8: Ajuste en las condiciones de PCR. Se utilizaron ADN de *S. lycopersicum* (MM) y *S. pimpinellifolium* TO-937 (T0) como controles negativos; la planta GIPi2eTG₁ como control positivo (TG₁) y una muestra TG₂ elegida al azar. Se muestran los resultados obtenidos con los amplicones 35S-500, 35S-800 y PG respectivamente y el marcador de tamaño “1kb Ladder”.



Utilizando las condiciones optimizadas descritas en el párrafo anterior, se procedió al genotipado de 16 plantas pertenecientes a la familia MixtaPi3d TG₂ utilizando los cebadores específicos del promotor 35S 35S-500 y los cebadores específicos del gen *PG* como control positivo de las reacciones. Los resultados obtenidos pueden verse en la Figura 9.

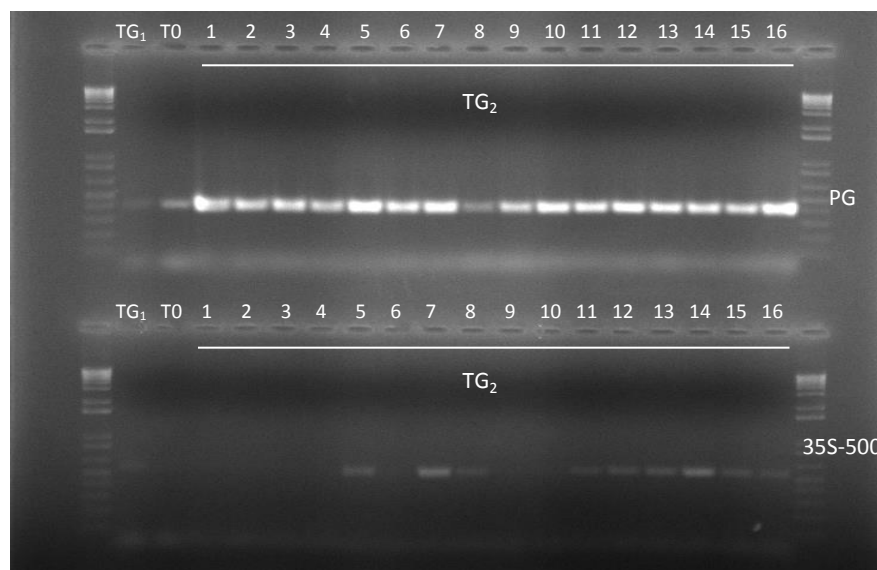


Figura 9: Genotipado mediante PCR de 16 plantas pertenecientes a la familia TG₂ MixtaPi3d utilizando los cebadores específicos *PG* y 35S-500. Se utilizó como control positivo la línea TG₁ MixtaPi3d y como control negativo ADN de TO-937.

Las amplificaciones observadas usando los cebadores 35S-500 muestran que entre las 16 plantas TG₂ analizadas se encontraron 9 plantas en las que esos cebadores amplificaban un fragmento de promotor 35S y que por tanto podemos deducir que son transgénicas y 7 plantas en las que no se detecta producto de amplificación y deducimos que son acigotas (Figura 9). Con el amplicón del gen *PG* se observa banda en las 16

muestras de ADN de las plantas, de lo que se deduce que las condiciones utilizadas son óptimas para la PCR. A la segregación obtenida se le realizó entonces un test de Bondad de Ajuste de Chi Cuadrado con 1 grado de libertad, donde $\chi^2=3,8415$ y $p=0,05$, lo que indica que la proporción encontrada se ajusta a la esperada para la segregación de un gen (transgen) de herencia dominante.

El análisis de la expresión del gen *SIMixta* mediante PCR cuantitativa a Tiempo Real en las mismas 16 plantas permitió observar que las plantas acigotas para la construcción de silenciamiento específica de ese gen mostraban niveles de expresión del mismo más elevadas que las plantas sin transformar TO-937 (Figura 10). Por el contrario, las plantas en las que está presente la construcción de silenciamiento por RNAi muestran niveles de expresión del gen *SIMixta* muy inferiores a las plantas acigotas. Esta evidencia, unida a los resultados obtenidos sobre la expresión de la línea TG₁ MixtaPi3d (Figura 5), demuestra que en la misma se ha conseguido de forma efectiva el silenciamiento de este gen y que este se trasmite a su descendencia, con una segregación similar a la esperada

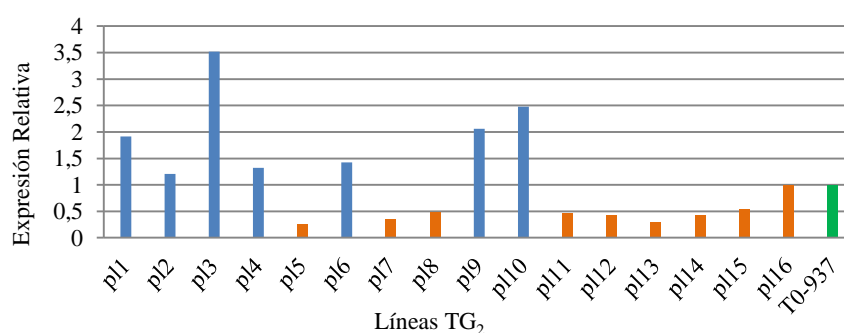


Figura 10: Expresión relativa del gen *SIMixta* en la familia TG₂ MixtaPi3d. Los niveles de expresión en las plantas no transformadas TO-937 se muestran con una barra verde, la expresión en las plantas acigotas se representan con barras azules, mientras que en el caso de las plantas transgénicas se representan por las barras de color naranja.

Por otra parte, el genotipado de 16 plantas de la familia TG₂ GIPi2e donde se encontraba silenciado el gen *SlGlabra*, mostró una segregación de 14 plantas acigotas y 2 transgénicas (Figura 11), que no se ajusta a una distribución de Chi cuadrado, lo que indica que el transgen no segrega en la forma esperada de un gen dominante. Esto podría deberse a que al silenciar este gen aparezca algún efecto letal en los cigotos y/o embriones de estas plantas y como consecuencia no se observe el número de descendientes transgénicos esperado. Habría que incrementar el número de plantas transgénicas de esta familia a genotipar y fenotipar mediante análisis de la expresión del gen endógeno para corroborar esta hipótesis. Adicionalmente habría que analizar otras familias portadoras de

la misma construcción génica para demostrar que es el silenciamiento del gen *SlGlabra* el causante del fenotipo observado y que este no se debe a los denominados efectos de posición, o lo que es lo mismo, la inserción del transgen en un gen cuya interrupción causa letalidad embrionaria.

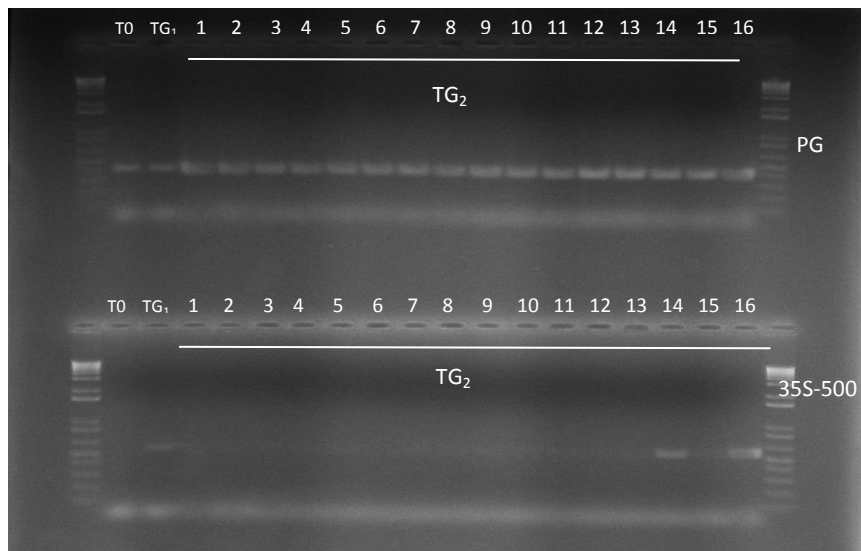


Figura11: Genotipado mediante PCR de 16 plantas pertenecientes a la familia TG₂ GIPi2e utilizando los cebadores específicos PG y 35S-500. Se utilizó como control negativo TO-937 y como control positivo la línea TG₁ GIPi2e.

Las 16 plantas TG₂ de la familia GIPi2e fueron utilizadas para analizar la expresión del gen endógeno *SlGlabra*. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 12 en la que se puede observar que la expresión relativa del gen *SlGlabra* en esas plantas TG₂ es mucho más elevada que la que muestran las plantas no transformadas de TO-937 y que el silenciamiento del gen *SlGlabra* no es evidente en esa familia de plantas TG₂.

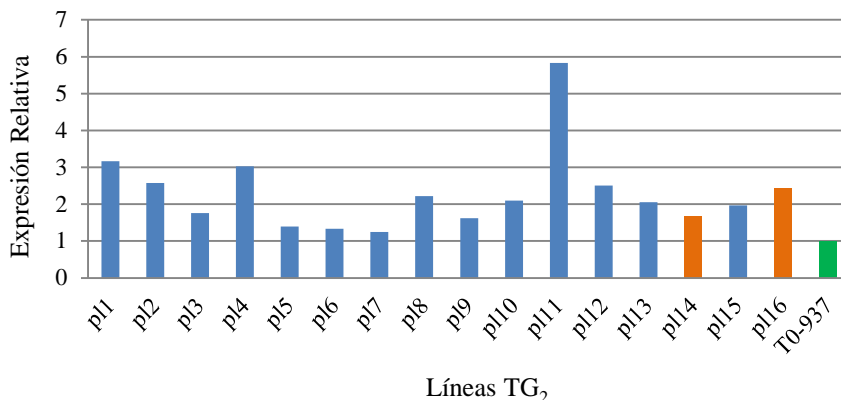


Figura 12: Expresión relativa del gen *SlGlabra* en las plantas TG₂ GIPi2e. La expresión en las plantas transgénicas se representa con barras de color naranja, en las plantas acigotas con barras azules y en las plantas no transformadas TO-937 se representa con una barra verde.

3.4 Caracterización fenotípica de familias TG2 seleccionadas

Los tricomas constituyen un mecanismo de defensa idóneo que frena el avance de las plagas, ya sea mediante la secreción de sustancias tóxicas para las mismas (Ferré, 2004) o actuando como barreras físicas que impiden su diseminación y acceso a los tejidos de los que se nutren (Simmons y Gurr, 2004). Con el fin de esclarecer la implicación de esos genes en la resistencia a araña roja y para determinar si el silenciamiento de los genes *SIMixta* y *SlGlabra* tiene algún efecto sobre la densidad de tricomas de tipo IV responsables de la resistencia a la plaga, se realizó un recuento del tipo y número de tricomas en plantas de dos familias TG₂ portadoras de construcciones de silenciamiento generadas en TO-937 para esos genes.

Con tal fin, se sembraron semillas de plantas de *S. pimpinellifolium* TO-937 y de 4 líneas TG₂, dos líneas de silenciamiento del gen *SlGlabra* (GIPi2a y GIPi2b) y dos líneas de silenciamiento del gen *SIMixta* (MixtaPi1c y MixtaPi6a). El recuento de los distintos tipos de tricomas se realizó obteniendo de cada tejido analizado secciones de 1,0 cm de largo por 0,2 cm de ancho y contando en toda la sección el número y tipo de tricomas con la ayuda de una lupa estereoscópica Nikon SMZ-2T. El recuento se realizó en plantas de desde 1 a 30 días de desarrollo y en tres tejidos diferentes: cotiledones, primera hoja y segunda hoja.

Los tricomas que se pueden observar en las plantas de *S. pimpinellifolium* TO-937 en este estudio son glandulares de los tipos I, IV y VI y su morfología se muestra en la Figura 13. Los de tipo I son los de mayor longitud, si bien su cabeza glandular es muy pequeña, los de tipo IV son de longitud intermedia mientras que los de tipo VI son los de menor longitud aunque su cabeza glandular es más grande.



Figura 13: Tricomas presentes en *S. pimpinellifolium*. En A la flecha señala un tricoma de tipo I, en B señala un tricoma de tipo IV y en C un tricoma de tipo VI.

El recuento de los tricomas observados en las plantas de TO-937 se muestra en la Figura 14. En los cotiledones se observaron tricomas a los 5 días de desarrollo. Estos tricomas son en su mayoría de tipo I aunque también aparecen tricomas de tipo IV, que son mayoritarios en el haz de los cotiledones el día 14 del desarrollo, cuando se contaron 15 tricomas/sección, y no se observaron tricomas tipo VI. En el caso de la primera hoja se encontraron tricomas de los tres tipos, si bien los más abundantes son los de tipo I seguidos por los de tipo IV, cuyo máximo en este tejido se corresponde con el día 30, cuando se contaron 19 tricomas/sección en el envés de la hoja.

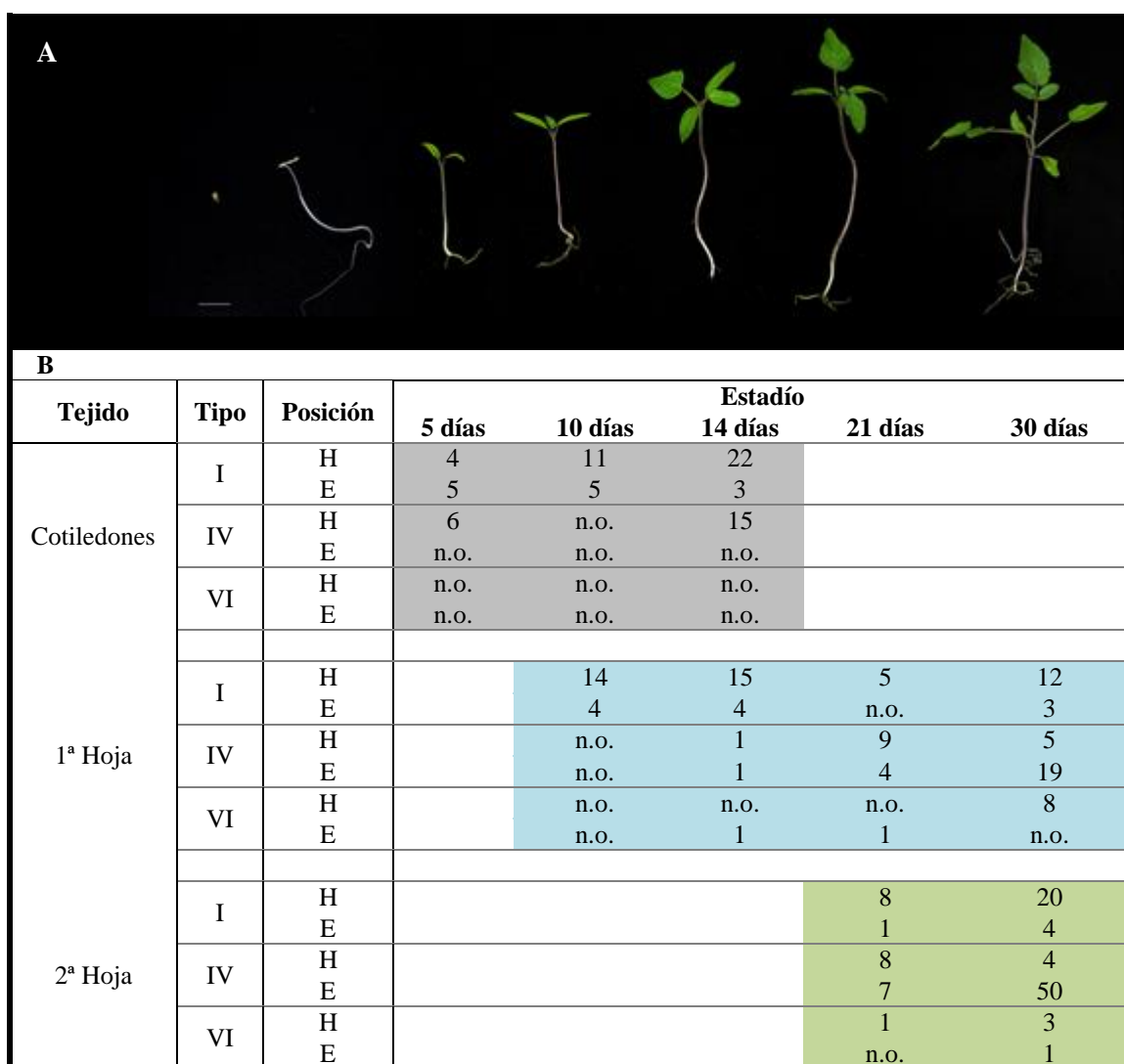


Figura 14: Estudio de los tricomas en *S. pimpinellifolium* TO-937. En A se muestran de izquierda a derecha los estadios analizados, que fueron 1, 3, 5, 10, 14, 21 y 30 días de desarrollo. En B se muestra el número y tipo observado en secciones de distintos tejidos, así como su posición en la hoja, donde H hace referencia al Haz y E al envés. Los tricomas fueron visibles a partir del día 5 de desarrollo. Cuando no se observó un tipo de tricoma se denota como n.o.= no observado.

Por lo que respecta a la segunda hoja, se observaron todos los tipos de tricomas glandulares, si bien los más abundantes fueron los de tipo IV, que predominan en el envés de la hoja con un máximo de 50 tricomas/sección en las plantas de 30 días. De este modo podemos afirmar que los tricomas glandulares de tipo IV aparecen desde los primeros estadios de desarrollo en TO-937 y conforme este avanza van haciéndose mayoritarios. El predominio de tricomas glandulares de tipo IV es precisamente la causa de la resistencia de este genotipo a araña roja y lo que le convierte en la fuente de resistencia idónea para introgresar estos rasgos en especies cercanas como el tomate cultivado *S. lycopersicum* (Fernández-Muñoz y col., 2000). También cabe destacar la presencia de otro tipo de tricomas, los de tipo VI, que se observaron en la primera y segunda hoja, si bien su recuento máximo se produjo en las plantas del día 30 y en el haz de la primera hoja, detectándose 8 tricomas de tipo VI/sección.

El resultado del recuento de tricomas en los cotiledones de las familias TG₂ y su comparación con los observados en las plantas de TO-937 sin transformar se muestra en la Tabla 3. En ninguna de las plantas analizadas se observaron tricomas de tipo VI en los cotiledones. Los tricomas más abundantes en los cotiledones son los de tipo I y se detectan en mayor número en el haz de los cotiledones de la línea MixtaPi1c en el día 5, con 47 tricomas de tipo I/sección en el haz y 40 tricomas de tipo I/sección en el envés. Le sigue la línea GIPi2a, cuyo recuento de tricomas de tipo I asciende a 35 tricomas/sección en el haz. Cabe destacar que la fluctuación que se observa en algunos datos entre diferentes días y en una misma línea podría deberse al método empleado, ya que el recuento de tricomas es un método destructivo en el que hay que arrancar el órgano a analizar, por lo que era imposible repetir el recuento en la misma planta entre diferentes días, aunque tampoco podemos descartar efectos debidos al desarrollo y expansión de los tejidos.

Tabla 3. Número de tricomas en secciones de cotiledones de TO-937 y de las plantas TG₂.

Tipo	Loc	5 d					10 d					14 d				
I	H	4	47	30	35	24	11	n.o.	12	21	7	22	24	14	29	5
	E	5	40	12	8	7	5	n.o.	2	5	n.o.	3	16	12	21	4
IV	H	6	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	4	n.o.	n.o.	15	n.o.	12	n.o.	1
	E	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	1	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	1	n.o.	n.o.

Loc= Localización del tricoma, donde H se refiere al Haz y E al envés.

La columna en blanco son los datos de TO-937, las columnas en verde son los de las familias TG₂ MixtaPi1c y MixtaPi6a y las columnas en azul los de las familias GIPi2a y GIPi2b.

En cuanto a los recuentos realizados en la primera hoja, estos se muestran en la Tabla 4 y se realizó en plantas de 14, 21 y 30 días de edad. En el día 14 predominan los

tricomas de tipo I con un máximo de 17 tricomas/sección en el haz de la hoja de las líneas MixtaPi1c y GIPi2b, si bien en el envés de esta última el recuento de este tipo de tricomas es también elevado. No obstante los recuentos más elevados aparecen en el día 30 en las líneas MixtaPi1c y GIPi2a, con 27 y 25 tricomas/sección en el haz de la hoja respectivamente. Les sigue la línea MixtaPi6a, con 23 tricomas/sección en el haz de la hoja. De aquí podemos concluir que los tricomas de tipo I son más abundantes en el haz de la hoja y que el silenciamiento de los genes *SIMixta* y *SIGlabra* incrementa su número en las líneas TG₂. En cuanto a los tricomas de tipo IV, en las líneas TG₂ también se incrementa su número respecto de las plantas no transformadas, siendo este incremento muy evidente en las líneas MixtaPi1c y 6a, donde el día 30 asciende a 28 y 71 tricomas/sección respectivamente en el envés de la hoja. Teniendo en cuenta que el gen *Mixta* está implicado en la densidad de tricomas (Serna y Martin, 2006), el fenotipo observado en las líneas de silenciamiento del gen *SIMixta* en el cromosoma 2 es el esperado. Cabe destacar también que el número de tricomas de tipo IV es más elevado en el envés que en el haz de las hojas de estas líneas TG₂. Por último se han detectado tricomas de tipo VI en mayor número en las TG₂, concretamente en GIPi2a, con un recuento de 12 tricomas/sección en el día 30. Habida cuenta de la función de los genes *Glabra* (Serna y Martin, 2006) este fenotipo también concuerda con lo esperado del silenciamiento del gen homólogo *SIGlabra* del cromosoma 2, que se incrementa el número de otros tipos de tricomas en estas líneas respecto de las plantas no transformadas.

Tabla 4. Tricomas presentes en secciones de la primera hoja de TO-937 y de las plantas TG₂

Tipo	Loc	14 d					21 d					30 d				
I	H	15	17	13	5	17	5	15	10	16	14	12	27	23	25	7
	E	4	4	3	5	9	n.o.	8	2	n.o.	n.o.	3	13	7	8	3
IV	H	1	11	1	n.o.	n.o.	9	n.o.	n.o.	5	n.o.	5	6	22	9	3
	E	1	2	9	n.o.	n.o.	4	n.o.	7	6	5	19	28	71	14	2
VI	H	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	8	n.o.	n.o.	4	1	2	8	2	n.o.	12	2
	E	1	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	1	n.o.	2	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	2	n.o.

Los recuentos realizados en la segunda hoja de plantas de 21 y 30 días de desarrollo se muestran en la Tabla 5. El máximo de tricomas de tipo I aparece en las líneas MixtaPi1c y 6a, con valores de 22 tricomas/sección en el haz de la hoja y en el día 30. Por otra parte el mayor recuento de tricomas de tipo IV se corresponde con el envés de la hoja de la línea MixtaPi6a en el día 30, con un recuento de 82 tricomas/sección, le sigue el WT con 50 tricomas/sección en el envés de la hoja y luego la línea MixtaPi1c,

con 37 tricomas/sección también en el envés de la hoja, lo que implicaría que el silenciamiento del gen *SLMixta* altera la densidad de tricomas de tipo IV. En cuanto a los tricomas de tipo VI sus recuentos más elevados también aparecen en la línea GIPi2b, indicando que el silenciamiento del gen *SIGlabra* parece alterar la identidad de los tricomas en la superficie de la hoja.

Tabla 5. Tricomas observados en secciones de la segunda hoja de TO-937 y de las plantas TG₂

Tipo	Loc	21d					30 d				
		I	H	8	16	21	8	8	20	22	22
	E	1	7	2	3	4	4	6	3	5	5
IV	H	8	6	3	3	5	4	7	29	5	2
	E	7	13	9	10	7	50	37	82	8	4
VI	H	1	1	2	2	2	3	2	n.o.	4	10
	E	n.o.	n.o.	2	n.o.	n.o.	1	n.o.	n.o.	1	3

Si bien los resultados obtenidos indican que los genes *SLMixta* y *SIGlabra* participan en la formación y densidad de tricomas de tomate, habría que corroborar estos resultados con nuevos experimentos a realizar con líneas TG₃ acigotas y homocigotas para la presencia del transgen, de forma que el recuento de tricomas se pueda realizar en un número elevado de plantas en las que todas sean de idéntico genotipo para presencia del transgen. Asimismo habrá que comprobar los resultado observados en las plantas transgénicas con los observados en plantas de la misma línea pero acigotas para presencia del transgen.

4. Bibliografía

- Alba, J.M, Montserrat, M. y Fernandez-Muñoz, R. (2009). Resistance to the two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae*) by acylsucroses of wild tomato (*Solanum pimpinellifolium*) trichomes studied in a recombinant inbred line population. *Exp Appl Acarol* 47, 35–47.
- Baulcombe, D. (2004). RNA silencing in plants. *Nature* 431, 356-363.
- Berlinger, M.J. (1986). The tomato crop. A Scientific Basis for Improvement. En: Atherton, J.G. Atherton y Rudich (Eds) *Pests*: 391-441. Chapman & Hall, New York.
- Brody, J.R. y Kern, S.E. (2004). Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. *Biotechniques* Feb 36(2), 214-6.
- Carter, C.D. y Snyder, J.C. (1985). Mite responses in relation to trichomes of *L. esculentum* x *L. hirsutum* F₂ hybrids. *Euphytica* 34, 177-185.
- Chamarro, J. (1995). Anatomía y fisiología de la planta. En: Nuez, F. ed. *El cultivo del tomate*. Madrid, Mundi-Prensa. pp: 44-91.
- Diez, M.J y Nuez, F. (2008). Tomato. En: *Vegetables II: Handbook of plant breeding*. Springer. pp: 249-327.
- Fernandez-Muñoz, R., Dominguez, E. y Cuartero, J. (2000). A novel source of resistance to the two-spotted spider mite in *Lycopersicon pimpinellifolium* (Jusl.) Mill.: its genetics as affected by interplot interference. *Euphytica* 111, 169–173.
- Fernandez-Muñoz, R., Salinas, M., Alvarez, M. y Cuartero, J. (2003). Inheritance of resistance to two-spotted spider mite and glandular leaf trichomes in wild tomato *Lycopersicon pimpinellifolium* (Jusl.) Mill. *J Am Soc Hortic Sci* 128, 188–195.
- Ferré, J. (2004). Resistencia a artrópodos. F. Nuez, Perez de la Vega, M. y Carrillo, M. (Eds). Valencia, Editorial de la UPV: 243-270.
- Giménez, E., Pineda, B., Capel, J., Antón, M.T., Atarés, A., y col. (2010). Functional Analysis of the Arlequin Mutant Corroborates the Essential Role of the ARLEQUIN/TAGL1 Gene during Reproductive Development of Tomato. *PLoS ONE* 5(12): e14427.

- Goffreda, J.C., Mutschler, M.A. y Steffens, J.C. (1990). Association of epicuticular sugars with aphid resistance in hybrids with wild tomatoes. *J Am Soc Hortic Sci* 117, 210-216.
- Grime, J.P. (1979). *Plant Strategies and Vegetation Processes*. Chinchester.
- Jones, D.A., Thomas, C.M., Hammond-Kosack, K.E., Balint-Kurti, P.J. y Jones, J.D. (1994). Isolation of the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science* 266, 789-793.
- Jonhson, 1992, R. (1992). Past, present and future opportunities in breeding for disease resistance, with examples from wheat. *Euphytica* 63, 3-22.
- Livak, K.J. y Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *Methods* 25, 402-408.
- López-Gómez, M. (2011). Análisis genómico funcional de la resistencia a araña roja en tomate. Director Dr. Juan Capel Salinas. Trabajo de Fin de Máster, Máster en Biotecnología Industrial y Agroalimentaria, Universidad de Almería.
- Luckwill, L.C. (1943). *The genus Lycopersicon: an historical, biological and taxonomic survey of the wild and cultivated tomatoes*. Aberdeen University Press, Aberdeen, UK.
- Martin, G.B, Brommonschenkel, S.H, Chunwongse, J., Frary, A., Ganai, M.W., Spivey, R., Wu, T., Earle, E.D. y Tanksley, S.D. (1993). Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science* 262, 1432-1436.
- Nihoul, P. y Van Impe, G. (1992). Contrôle de *Tetranychus urticae* au moyen de *Phytoseiulus persimilis* en culture de tomate sous serre. *Mededelingen van de Faculteit Landbouwwerenschappen Rijksuniversiteit Gent* 56, 319-324.
- Nuez, F. (1995). *El cultivo del tomate*. Editorial Mundiprensa. Madrid.
- Pfaffl, M.W. (2004). Quantification strategies in real-time PCR. En: Bustin, S.A. (Ed) *A-Z of quantitative PCR: 87-112*. International University Line (IUL), La Jolla, (CA) USA.
- Salinas, M., Capel, C., Alba, J.M., Mora, B., Cuartero, J., Fernández-Muñoz, R., Lozano, R., y Capel, J. (2013). Genetic mapping of two QTL from the wild tomato

- Solanum pimpinellifolium* L. controlling resistance against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). *Theor Appl Genet* 126, 83–92.
- Simmons, A.T. y Gurr, G.M. (2004). Trichome-based host plant resistance of *Lycopersicon* species and the biocontrol agent *Mallada signata*: are they compatible? *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 113, 95-101.
- Serna, L. y Martin, C. (2006). Trichomes: different regulatory networks lead to convergent structures. *Trends in Plant Science* 11 (6), 274-280.
- Stevens, M.R., Lamb, E.M. y Rhoads, D.D. (1995). Mapping the Sw-5 locus for tomato spotted wilt virus-resistance in tomatoes using rapd and RFLP analyses. *Theoretical and Applied Genetics* 90, 451-456.
- Tomczyk, A. y Kropczynska, D. (1985). Effects on the host plant. Spider Mites. Their Biology, Natural Enemies and Control. En: *World Crop Pests*. Elsevier 1A, 317-329.
- Young, N.D. y Tanksley, S.D. (1989). RFLP analysis of the size of chromosomal segments retained around the *Tm-2* locus of tomato during backcross breeding. *Theoretical and Applied Genetics* 77, 353-359.
- Van Leeuwen T., Van Pottelberge S., Tirry L. (2005). Comparative acaricide susceptibility and detoxifying enzyme activities in field-collected resistant and susceptible strains of *Tetranychus urticae*. *Pest Manage Sci* 61, 499–507.
- Verlan, M., Ibrahim, R.M., Kormelink, R., Scott, J.W., Edwards, J.D. y Ba, Y. (2013). The Tomato Yellow Leaf Curl Virus Resistance Genes Ty-1 and Ty-3 Are Allelic and Code for DFDGD-Class RNA-Dependent RNA Polymerases. *PLOS Genetics* (9) 3, e1003399.