

UNIVERSIDAD DE ALMERIA

MASTER EN BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL Y AGROALIMENTARIA

Caracterización fenotípica y genética
de mutantes EMS de tomate
(*Lycopersicon esculentum* L.)

Andrés Cáceres Burbano

14/09/2011

Tutor: Pr. Dr. Rafael Lozano Ruiz

CONTENIDO	PAG
1.- INTRODUCCIÓN	3
2.- MATERIALES Y MÉTODOS	6
2.1.- <i>Caracterización fenotípica de mutantes EMS</i>	6
2.1.1.- Material Vegetal	6
2.1.2.- Siembra	6
2.1.3.- Plantación y cultivo	7
2.1.4.- Variables analizadas	7
2.1.5.- Gestión de plantas seleccionadas	8
2.1.6.- Tratamiento estadístico de los datos	8
2.2.- <i>Caracterización fenotípica y genotípica de mutantes falsiflora3 (fa3) y uniflora (uf) en tomate</i>	8
2.2.1.- Caracterización fenotípica en campo	8
2.2.2.- Caracterización molecular	9
3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	9
3.1.- <i>Caracterización fenotípica de mutantes EMS</i>	10
3.1.1.- Descripción de mutantes alterados en el desarrollo vegetativo	10
3.1.2.- Descripción de mutantes alterados en el desarrollo de los órganos reproductivos	12
3.1.3.- Evaluación del contenido en sólidos solubles del fruto	14
3.1.4.- Evaluación de la acidez del fruto	18
3.1.5.- Evaluación de la partenocarpia del fruto	22
3.1.6.- Otros caracteres de importancia en la calidad del tomate: color y forma	24
3.1.7.- Análisis genético de los fenotipos seleccionados	28
3.2.- <i>Caracterización fenotípica y genotípica de mutantes falsiflora3 (fa3) y uniflora (uf) en tomate</i>	30
3.2.1.- Análisis fenotípico	30
3.2.2.- Análisis molecular	31
4.- BIBLIOGRAFÍA	32

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

1.- INTRODUCCIÓN

El tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) es una planta dicotiledónea perteneciente a la familia de las solanáceas (1). Los orígenes del tomate cultivado se remontan a la región andina de Suramérica desde Ecuador a Chile, pero sus especies nativas eran de menor atractivo respecto a su tamaño, forma o color que los cultivares domesticados que fueron llevados a Europa a mediados del siglo XVI. Mucha información apunta a México como la probable región de domesticación y la palabra “tomatl” en la lengua Nahuatl de México es sin dudarle el origen del nombre moderno (2).

El tomate es uno de los cultivos más importantes en el mundo. Sus frutos son el producto final tanto para el consumo en fresco como para la industria de procesamiento (3).

Es una de las hortalizas de mayor consumo a nivel mundial, y es esta la razón para buscar mediante mejora genética vegetal, nuevas variedades que se adapten a las necesidades del consumidor.

En la Tabla 1 se registra la producción mundial de tomate según datos de la FAO en los últimos 5 años.

Tabla 1. Producción, rendimiento y área cosechada de tomate a nivel mundial Fuente: FAOSTAT 2009

	2009	2008	2007	2006	2005
Producción mundial(tm)	152956115	142153859	137291870	130226252	127929037
Rendimiento (Hg/ha)	348177	335384	327776	280671	279864
Área cosechada (ha)	4393045	4238536	4188583	4639810	4571111

*tm:tonelada
métrica; Hg:
Hectogramos
; ha:hectárea*

Los programas de mejora genética toman como punto de partida todo el material genético que esté disponible ya sea en bancos de germoplasma o colecciones privadas y del cual se tiene información. La mejora vegetal implica, la disponibilidad de un adecuado “pool” de genes y la selección de genotipos o genes deseables. Segundo, la manipulación de genes o grupos de genes seleccionados para generar combinaciones favorables. Tercero

pruebas comparativas para demostrar la superioridad de los genotipos seleccionados, finalizando con la liberación de las variedades mejoradas (4).

En años recientes el programa de secuenciación del genoma de muchas plantas, incluyendo el tomate, ha permitido tener la disponibilidad de un gran número genes secuenciados en bases de datos públicas. (3).

Los mejoradores están siempre preocupados de la necesidad de tener amplias y diversas fuentes de germoplasma para hacer frente a las demandas de los programas de mejora, de ahí la importancia de los programas de mutagénesis y la caracterización de mutantes de interés.

El tomate es una planta con gran potencial debido a su implicación en la alimentación mundial así como en el impacto económico que de su producción se deriva, al mismo tiempo diversas industrias como la de la pasta de tomate, salsas, bebidas, dependen de la producción de este cultivo.

El tomate es fácil de cultivar, posee un ciclo de vida corto, varios tipos de explantes pueden ser cultivados “in vitro” y la regeneración de plantas es factible, favoreciendo cualquier procedimiento de transformación. Sus características son diferentes a otras plantas modelos como arabidopsis, maíz, arroz, lo que ha permitido a la investigación genética progresar mucho más que en otras especies, siendo en la actualidad la especie modelo más avanzada de las frutas tipo baya carnosas. (2).

El tomate presenta relativamente un pequeño genoma, en relación a otras Solanaceas de importancia comercial, por lo que fue seleccionada como una especie de referencia para la secuenciación del genoma de las Solanaceas (3). La disponibilidad de un amplio grupo de mutantes y el desarrollo de mapas físicos y genéticos, ESTs y microarrays, también favorecieron al proyecto de secuenciación internacional y están contribuyendo al progreso actual en la comprensión de las bases biológicas del desarrollo de la planta (7).

Las mutaciones son alteraciones estables y heredables del material genético material genético que pueden ser reconocidas entre otras, por cambios en el fenotipo.

Una mutación puede ser una alteración de la secuencia de bases nucleotídicas. El cambio en una base puede o no resultar en un cambio reconocible en el fenotipo del

organismo completo pero si puede ser reconocido como un cambio en el DNA, constituye por definición una mutación (4).

Las mutaciones espontáneas son promovidas por la recombinación y selección natural. A su vez es posible inducir mutaciones similares a las que ocurren en la naturaleza y muchas otras que posiblemente no ocurran espontáneamente o que se han perdido en las poblaciones. Por medio de técnicas apropiadas se puede retener a los mutantes adecuados para los sistemas de agricultura moderna y no esperar ni depender de aquellos que han sobrevivido a la selección natural(3).

Las mutaciones inducidas son consideradas como alternativa a la variación que ocurre naturalmente como un recurso o fuente de germoplasma para los programas de mejoramiento vegetal (3). Es importante mencionar que los mutantes de tomate constituyen no solamente una fuente esencial de recursos de material vegetal, sino también una herramienta valiosa para el aislamiento de genes importantes, como aquellos que regulan los patrones de desarrollo de esta planta y cuyas funciones están siendo aún dilucidadas (2). Muchos de los mutantes espontáneos se conservan y son caracterizados por el Centro de Recursos Genéticos del Tomate (TGRC) (5). Todo este germoplasma ha sido colectado alrededor del mundo, por lo que se cuenta con una fuente de variabilidad importante. Sin embargo los mutantes inducidos químicamente, principalmente por Etil metil sulfonato (EMS) o por irradiación, tienen en la actualidad un papel trascendental pues nos permiten tener a disposición poblaciones seleccionadas y la posibilidad de identificar nuevos genes (2).

Se ha trabajado en la generación de mutantes EMS en diferentes cultivares como M82, con 13000 familias M2 y alrededor de 3000 mutantes catalogados (6); también se ha creado una librería de mutantes EMS en cultivares de porte enano como cv.Micro-Tom o el Red Setter, constituyéndose como recursos para nuevos estudios genéticos del tomate(7).

La generación de mutantes EMS también ha sido empleada con éxito en otras especies como soja (*Glicine max*) (8) o el alholva o fenogreco (*Trigonella foenum-graecum L.*) (9).

El objetivo de este trabajo es evaluar y seleccionar fenotípicamente una población M2 de mutantes que tengan características importantes relacionadas a la calidad de fruto.

2.- MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.- Caracterización fenotípica de mutantes EMS

2.1.1.- Material vegetal

Para llevar a cabo este proyecto se analizó una población compuesta por familias segregantes M2-EMS. Estas familias se obtuvieron por medio de la autofecundación de una primera generación de plantas mutagenizadas M1.

Para este ensayo se utilizó semillas provenientes del cultivar Moneymaker, la cual presenta un crecimiento indeterminado y frutos de calibre mediano.

El programa de mutagénesis consistió en introducir 3 lotes de semillas codificadas como H, L y M en una solución de un mutágeno químico EMS (Etil metil sulfonato), a tres distintas concentraciones, 0.5, 0.7 y 1%, respectivamente durante 16 horas. Pasado este tiempo el agente químico se destruyó mediante tratamiento con NaOH 4 M y se lavó posteriormente las semillas con H₂O destilada por 3 veces.

Se colectó tres frutos de cada planta M2 en estado de madurez comercial sobre los que se realizaron las mediciones para la caracterización agronómica y los parámetros de calidad. Todos los frutos analizados se colectaron del 2^{do} o 3^{er} racimo. El ensayo se llevó a cabo durante la campaña de Primavera – Verano 2011.

2.1.2.- Siembra

Se llevó a cabo en un semillero situado en San Isidro, Término Municipal de Níjar, Almería. La germinación y el desarrollo de las plántulas transcurrieron bajo condiciones controladas en los invernaderos tipo multi – túnel del semillero. Se emplearon bandejas de polipropileno de 150 alveólos (10 x 15) con una mezcla de sustrato de turba rubia:fibra de coco en una proporción de 3:1. Las plantas se transplantaron en el invernadero cuando desarrollaron entre 4 o 5 hojas verdaderas.

Se sembró un total de 20 familias MM (300 plantas), 70 familias ML (1050 plantas), 130 familias MH (1950 plantas) y 90 familias A para injertar (1350 plantas).

2.1.3.- Plantación y cultivo

El establecimiento del cultivo se hizo en un invernadero perteneciente a la Finca Experimental de la Fundación UAL – ANECOOP, ubicado en los parajes “Los Goterones” de la localidad de Retamar (Término Municipal de Almería). La extensión total de la finca es de 14 ha. El invernadero usado para la evaluación de la población M2 fue el módulo 2, con una superficie de 1800 m².

La técnica de cultivo fue de cultivo sin suelo utilizando cordones o salchichas de perlita, con un volumen de 20 litros y una longitud de 1 m.

Se transplantó 6 plantas por cordón en condiciones de hidroponía colocando un gotero autocompensante por cada 2 plantas.

Se tutoró las plantas con rafia para mantener la verticalidad de las plantas y se eliminó tallos secundarios. Además se cortó el primer racimo para facilitar el análisis y favorecer el desarrollo de los siguientes racimos.

Al finalizar el ciclo de cultivo se cosechó 3 frutos de cada planta, y de todas las familias para realizar el análisis de los parámetros de calidad de fruto en el laboratorio. Se plantó 20 plantas control del cultivar MoneyMaker, sin mutagenizar.

2.1.4.- Variables analizadas

Precocidad a la floración: Se evaluaron 310 familias y se cuantificaron el número de hojas (nudos) hasta la aparición de la primera inflorescencia.

° **Brix:** Se tomó datos de 3 frutos por planta con un refractómetro digital ATAGO Pallette PR - 101 α (Brix 0 ~ 45%) colocando 2 a 3 gotas del zumo del fruto sobre el lector óptico, previamente calibrado.

pH: Se tomó datos de 3 frutos por planta con un pHmetro digital CRISON PH25, previamente calibrado, introduciendo el electrodo en la placenta de cada fruto.

Diámetro: Se tomó datos de los frutos que presentaran aparentemente un tamaño muy superior o inferior al control. Esta variable se midió con un pie de rey digital.

Peso: Se tomó datos de los frutos que presentaran un tamaño visiblemente superior o inferior al control. Esta variable se midió con una balanza electrónica KERN 440 – 49A.

Color: Se tomó datos de los frutos que presentaran una coloración muy llamativa, diferente del control. Esta variable se midió con un colorímetro CHROMA METER CR-400.

2.1.5.- Gestión de plantas seleccionadas

Dado que uno de los objetivos finales de cualquier proyecto de mutagénesis es identificar nuevas variantes alélicas, en este caso responsables de caracteres de calidad de fruto, de las plantas M2, seleccionadas por presentar los caracteres de interés se obtuvieron familias M3 por autofecundación. Las semillas se separaron mediante adición de HCl diluido en H₂O al 1% por 24 horas. Luego se lavó con agua corriente y se procedió a secar a temperatura ambiente.

2.1.6.- Tratamiento estadístico de los datos

Para el análisis se utilizó el programa Microsoft EXCELL 2007, INFOSTAT 2000, STATGRAPHICS 5.0.

2.2.- Caracterización fenotípica y genotípica de mutantes falsiflora3 (fa3) y uniflora (uf) de tomate

2.2.1.- Caracterización fenotípica en campo

La caracterización fenotípica en campo se realizó de tres grupos de plantas provenientes de la autofecundación de una planta F1 procedente del cruzamiento entre una planta de fenotipo mutante *uniflora (uf)* y otra heterocigótica para la

mutación *falsiflora* (*fa*) . Se identificó los diferentes fenotipos y se calculó la segregación observada en el campo.

2.2.2.- Caracterización molecular

Muestras de tejido vegetal de los individuos que en campo presentaron un fenotipo anómalo, se seleccionaron como posibles dobles mutantes (*fa3uf*), para su posterior análisis molecular mediante el uso de marcadores específicos. Con tal fin se realizó la extracción de DNA mediante el protocolo de DNAzol. Una vez obtenido el DNA, se cuantificó en un gel de agarosa al 2%, mediante electroforesis. Para la amplificación por PCR se utilizó dos parejas de cebadores Fa3F_(CACCACAACCTCCTCCATCT), Fa3Pvu_R_(AAATATCTGCGAGAGGCTATCGATC) y Fa3Nde_F_(GACATGAAAGATGAAGAAGCTGATCATA), Fa3R_(AGAGCGTCAAGGACATTTCGT). Una vez obtenido el producto de PCR se purificó con *GenElute™ PCR Clean Up Kit* (Sigma-aldrich) y finalmente se realizó una digestión de 12 horas, con las enzimas PvuI y NdeI (TAKARA Bio Inc). Los productos se observaron mediante electroforesis en gel de acrilamida al 10%.

3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la actualidad, el término calidad, aún teniendo diversas connotaciones subjetivas, suele englobar rasgos apreciados por el consumidor, así como otros vinculados a una alimentación saludable y segura. Por ello existe un sinnúmero de esfuerzos por parte de los productores en conseguir productos de mayor valor añadido mediante la incorporación de caracteres de calidad organoléptica y nutricional, que además fomenten consumos saludables en la alimentación. En definitiva, la calidad de un producto ha pasado a ser un argumento determinante para el éxito de la comercialización de los productos hortícolas (10), y este es el caso del tomate.

Hasta ahora la mejora genética ha buscado el aumento de la productividad, la resistencia a plagas y enfermedades y la mejora de características agronómicas. El éxito en el mercado de una nueva variedad, sobretodo en el campo de las frutas y hortalizas, está cada vez más ligada a la calidad sensorial y nutricional (10).

3.1.- Caracterización fenotípica de mutantes EMS

Con el objetivo de generar nueva variabilidad genética para diferentes caracteres del desarrollo reproductivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.), se llevó a cabo un programa de mutagénesis con EMS utilizando como germoplasma original (fondo genético), el cultivar Moneymaker. Con tal fin, se evaluaron 310 familias M2 de tomate en función de parámetros de calidad interna del fruto, en concreto contenidos en sólidos solubles (°Brix), acidez (pH), y desarrollo partenocárpico del fruto, todo ello en el ciclo de cultivo correspondiente a la campaña primavera – verano 2011.

La identificación de una familia M2 como portadora de una posible mutación en alguno de los genes responsables de los caracteres en estudio, se llevó a cabo tras la comparación del valor fenotípico medio de individuos concretos (x_i) de dicha familia candidatos a segregar para una mutación dada, con el valor fenotípico medio de las plantas control no mutagenizadas (x_C), con el valor fenotípico medio del conjunto de la población M2 (x_P) y con el del conjunto de plantas hermanas de la familia, tanto con el total de plantas hermanas (x_F) como con el conjunto de plantas hermanas de fenotipo normal (x_f). Así pues fueron 5 los valores fenotípicos medios calculados para cada carácter.

3.1.1.- Descripción de mutantes alterados en el desarrollo vegetativo

Para la mayoría de cultivares la fase vegetativa es corta, típicamente 6 a 10 hojas son producidas bajo la primera inflorescencia y la transición floral usualmente comienza cuando la tercera hoja se está expandiendo. Contrario a *Arabidopsis thaliana* y *Antirrhinum majus*, que tienen un patrón de crecimiento monopodial, el tomate presenta un hábito de crecimiento simpodial. Mientras en especies monopodiales el meristemo del brote apical es indeterminado y los órganos reproductivos y vegetativos se desarrollan lateralmente, el meristemo del brote apical del tomate es determinado y el brote primario es completado por la primera inflorescencia. Este brote apical forma tres nudos vegetativos (hojas) y termina en una nueva inflorescencia. Este patrón de crecimiento se repite por la formación de unidades determinadas sucesivas o segmentos simpodiales (2).

En la campaña primavera – verano se caracterizó una población M2, semanalmente realizando observaciones en campo para describir los aspectos más importantes del desarrollo de las posibles plantas mutantes, morfología, tamaño, color o cualquier otra característica de interés.

En una base de datos se detalló la descripción de las principales características de las plantas que presentaban fenotipos diferentes al control.

Un primer grupo se lo clasificó como mutantes alterados en su desarrollo vegetativo y los más relevantes se detallan en la Tabla 2 y el fenotipo de algunos de ellos se muestra en la Figura 1.

Tabla 2. Descripción del fenotipo de plantas mutantes, alteradas en su desarrollo vegetativo.

Familia	Planta	Descripción Fenotipo
A910	7	Poca densidad foliar, hojas grandes sin foliolos completos y retorcidos
A929	12	Planta pequeña y poca densidad foliar. Retraso en el crecimiento
A943	5	Planta pequeña, hojas superiores cloróticas, clorosis en los bordes de la hoja.
A967	1	Planta compacta con desarrollo determinado
MH19	15	Despigmentación en tallo, hojas y sépalos por toda la planta.
MH31	1	Planta de tamaño normal, tallo delgado, menor densidad foliar, mayor distancia entre nudos.
MH5	2	Morfología alterada en hojas y foliolos.
ML36	1	Planta pequeña con desarrollo determinado, hojas cortas, foliolos arrugados.
MH21	7	Desarrollo vegetativo mal diferenciado. Planta con poco vigor. Las ramas laterales no tienen firmeza.
MM4	6	Foliolos enrollados, aspecto senescente. Tejido ciego.

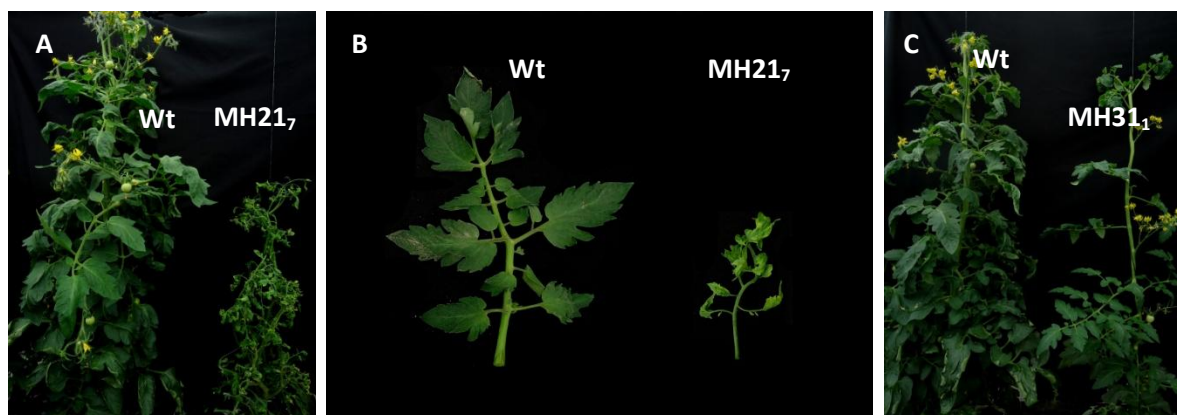


Figura 1. A.- Respecto a una planta control del cultivar Moneymaker (marcada como Wt del inglés wild type, izquierda), el mutante MH21₇ (derecha) muestra un escaso desarrollo vegetativo. B.- Morfología de una hoja mutante MH21₇ y una hoja normal (Wt). C.- Mutante MH31₁ con poca densidad foliar y entrenudos largos en relación a la planta control (Wt).

De todo este tipo de mutaciones registradas en campo, cabe mencionar que no son de mayor interés para el programa, pues el objetivo de la caracterización de la población M2-EMS son aquellas mutaciones que alteren la calidad del fruto, sin embargo los genes que puedan estar relacionados con el control de otros caracteres pueden ser indispensables en otros programas.

3.1.2.-Descripción de mutantes alterados en el desarrollo de los órganos reproductivos

En una población natural se encuentran mutaciones al azar que afectan a diferentes órganos o actividades de la planta. Actualmente se conoce varios genes que intervienen en procesos como la transición floral y el desarrollo de los órganos reproductivos de la planta.

En el tomate, la transición floral significa que el meristemo apical es completamente consumado en el desarrollo de la primera inflorescencia. De hecho muchos genes han sido identificados y caracterizados como miembros de una ruta autónoma que controla la transición floral y entre ellos podemos mencionar a *FALSIFLORA (FA)*, *SINGLE FLOWER TRUSS (SFT)* y *SELF – PRUNING (SP)*. (2)

Cualquier mutación en estos genes resulta en un fenotipo de floración tardía y anomalías que afectan el desarrollo de la inflorescencia. *FA* es ortólogo a *LEAFY* y *FLORICAULA*, aunque *LEAFY* regula la transición floral como lo hace *FA* (11).

En la maduración, la flor hermafrodita del tomate es simétrica y consiste en 4 verticilios cada uno formado desde la pared exterior por 4 a 6 sépalos verdes, los cuales se alternan a un número similar de pétalos amarillos en el segundo verticilo, alrededor de 6 estambres muestran las anteras forman un cono alrededor del estilo, y un número variable de carpelos fusionados en el verticilo más interior.

En la Tabla 3 se detallan los mutantes más destacados que presentaron alteraciones en la morfología y desarrollo de sus órganos reproductivos y el fenotipo de algunos de ellos se observa en la Figura 2 y 3.

Tabla 3. Descripción del fenotipo de plantas mutantes, alteradas en el desarrollo de sus órganos reproductivos.

Familia	Planta	Descripción Fenotipo
A963	12	Inflorescencias muy pequeñas, flores no abiertas, tallo delgado. Similar a mutante UFD, pero son plantas con poco vigor. No desarrolla inflorescencias.
A975	2	Planta pequeña con folíolos retorcidos, el estilo sobresale del cono estaminal.
A984	6	Tamaño normal, primeras hojas normales, inflorescencias grandes ramificadas, flores con el estilo sobresaliendo el cono estaminal, muy poco frutos.
MH11	8	Flores con sépalos grandes, pétalos semiconvertidos en sépalos, sin estambres o retorcidos. Se cuajaron frutos pero no maduraron a tiempo.
MH22	3	Hojas retorcidas, folíolos enrollados. Flores grandes que no se abren. Pétalos, estambres, óvulo y estilo forman un bloque fusionado. Órganos no diferenciados. Se cuajó un fruto pequeño.
MH29	8	Compacta, pequeña, sépalos semiconvertidos en hojas, cono estaminal mal fusionado. No cuajaron frutos
MH33	3	Flores con sépalos semiconvertidos en hojas y pétalos en sépalos.
MH44	1	Sépalos largos, pétalos semiconvertidos en sépalos de color verdes
MH55	2	Hojas con pocos folíolos, pequeñas y arrugadas, aspecto senescente, flores de la 1, 2 y 3 era inflorescencia normales, el resto tienen flores con morfología alterada. Alteración en el balance hormonal.
MH79	3	Ápice con folíolos cloróticos, finos y pequeños. Flores con pétalos con bandas blanquecinas. Alteración en la lámina de la hoja.

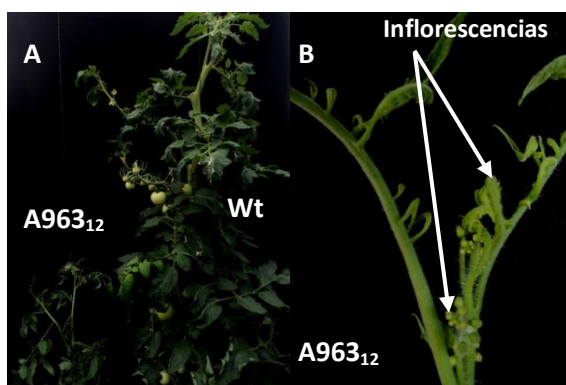


Figura 2. A.- Respecto a una planta control del cultivar Moneymaker (marcada como Wt, derecha), el mutante A963₁₂ (izquierda) muestra un escaso desarrollo y crecimiento. **B.-** Inflorescencias poco desarrolladas del mutante A963₁₂.

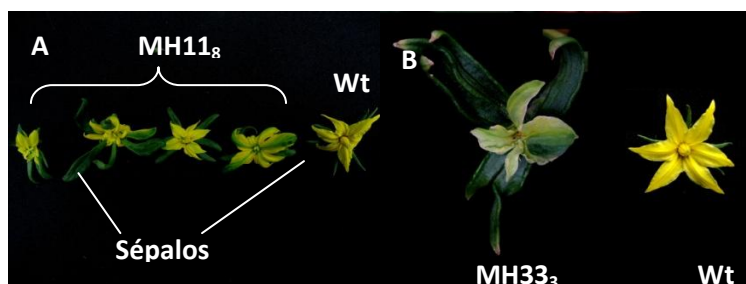


Figura 3. A.- Respecto a una flor control del cultivar Moneymaker (marcada como Wt, derecha), las flores del mutante MH11₈ (izquierda) presenta una morfología alterada en sépalos, pétalos y cono estaminal. **B.-** Respecto a una flor de una planta control (Wt) (derecha), las flores del mutante MH33₃ (izquierda) presentan pérdida de identidad en sépalos y pétalos.

3.1.3.- Evaluación del contenido de sólidos solubles (°Brix)

El sabor del tomate involucra la percepción del consumidor influenciado por los aromas de muchos constituyentes químicos. Azúcares, ácidos y sus interacciones son importantes para la dulzura, acidez y sobretodo en la intensidad del sabor en los tomates (12).

El tomate está compuesto principalmente por azúcares y ácidos orgánicos, los cuales representan alrededor del 60% del peso en materia seca. En el tomate maduro, la glucosa y la fructosa constituyen la mayoría de azúcares, y el ácido cítrico y málico la mayoría de ácidos orgánicos. El tamaño y la composición del fruto exhiben una variación cuantitativa, controlada por varios genes más o menos influenciados por las condiciones ambientales (13).

En la campaña de primavera – verano 2011, se analizó una población total de 310 familias M2. EMS, para los diferentes parámetros de calidad de fruto.

La evaluación del contenido de sólidos solubles (SSC - °Brix) se la hizo en 282 familias, debido a que de las restantes familias no se recolectó frutos para el análisis, ya sea por retraso en la maduración como por ausencia total de frutos o flores.

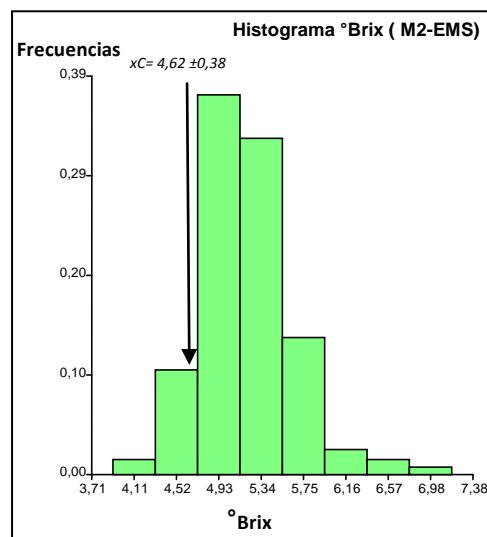
En la población M2, se determinó un rango entre 3,91 a 7,18 °Brix para el carácter de contenido de sólidos solubles (SSC) entre todas las familias.

Al realizar un cuadro de frecuencias, se clasificó a la población M2 en 8 clases o categorías (Tabla 4) y en la Figura 4 se observa la distribución de las familias en función de la variable, encontrándose el 93% de las familias dentro de un rango normal, mientras que el restante 7% presentan valores extremos, lo que aparentemente se podría ajustar a una distribución normal, sin embargo por algunos valores atípicos dentro de la población esto no es posible. Se realizó una prueba de Shapiro – Wilks para determinar si la variable se ajustaba a una distribución normal.

Tabla 4. Distribución de frecuencias en la población M2-EMS para la variable °Brix

Variable	Clase	LI	LS	MC	FA	FR
°brix	1	3,91	4,32	4,11	4	0,01
°brix	2	4,32	4,73	4,52	29	0,10
°brix	3	4,73	5,14	4,93	105	0,37
°brix	4	5,14	5,55	5,34	93	0,33
°brix	5	5,55	5,95	5,75	38	0,13
°brix	6	5,95	6,36	6,16	7	0,02
°brix	7	6,36	6,77	6,57	4	0,01
°brix	8	6,77	7,18	6,98	2	0,01

LI: Límite inferior; LS: Límite superior; MC: media de una clase; FA: Frecuencia absoluta; FR: Frecuencia relativa



x_C: Valor fenotípico medio del control Moneymaker

Figura 4.- Frecuencias en la población M2-EMS por °Brix (Sólidos solubles).

Para seleccionar las plantas como posibles portadoras de una mutación se siguió el criterio de elegir a los individuos que presentaran un valor fenotípico medio (x_i) mayor al de las plantas control (x_C) más 4 veces su desviación estándar (sd) para altos °Brix o bien un valor fenotípico medio (x_i) menor al de las plantas control (x_C) menos 3 veces su desviación estándar (sd) para bajos °Brix (Tabla 5).

De esta forma se identificaron 95 familias M2 – EMS, como posibles portadoras de al menos un individuo mutante para el carácter en estudio (°Brix). De estas 95 familias se seleccionaron un total de 153 plantas con altos ° Brix, y 2 plantas con bajos °Brix. En la Tabla 6 se observan algunos de los individuos seleccionados.

Tabla 5. Promedio control de plantas Moneymaker sin mutagenizar para °Brix.

CONTROL	x_C	4,62
	sd	0,38
	$x_C + 4sd$	6,15
	$x_C - 3sd$	3,46

x_C: Valor fenotípico medio del control Moneymaker; sd: desviación estándar

Tabla 6. Familias M2 y plantas seleccionadas de toda la población para el contenido en sólidos solubles (°Brix).

FAMILIA	PLANTA	\bar{x}_i	sd	\bar{x}_F	sd	\bar{x}_f	sd	\bar{x}_C	sd
MH76	7	15,30	2,26	6,02	3,12	4,96	0,60	4,62	0,38
MH81	11	13,70	0,00	5,83	2,02	5,37	0,49	4,62	0,38
MH91	7	9,93	0,64	7,18	2,34	7,01	2,57	4,62	0,38
MH104	5	9,55	0,30	6,92	1,78	5,62	0,58	4,62	0,38
MH104	3	9,40	0,49	6,92	1,78	5,62	0,58	4,62	0,38
A922	1	9,15	0,35	5,74	0,90	5,55	0,37	4,62	0,38
MH66	5	8,80	1,84	5,80	1,16	5,48	0,43	4,62	0,38
MH104	6	8,77	0,84	6,92	1,78	5,62	0,58	4,62	0,38
ML21	2	8,60	0,57	5,12	1,72	4,49	0,82	4,62	0,38
A929	14	8,45	1,06	5,62	0,78	5,46	0,37	4,62	0,38
A933	11	8,43	1,50	5,25	1,18	4,91	0,37	4,62	0,38
MH91	4	8,40	0,00	7,18	2,34	7,01	2,57	4,62	0,38
A967	8	8,35	0,35	5,52	1,21	5,11	0,53	4,62	0,38
ML62	4	8,13	0,99	5,00	1,24	4,67	0,69	4,62	0,38
MH78	5	8,10	3,82	6,36	1,61	5,68	0,83	4,62	0,38
MH103	3	7,93	0,67	5,80	0,89	5,51	0,53	4,62	0,38
A977	10	7,90	0,26	5,98	0,91	5,61	0,52	4,62	0,38
MH15	3	7,73	0,06	5,52	1,08	5,16	0,60	4,62	0,38
A946	12	7,70	0,00	5,10	0,85	4,84	0,38	4,62	0,38
MH78	13	7,67	2,73	6,36	1,61	5,68	0,83	4,62	0,38
ML35	3	7,60	0,36	6,42	0,76	5,68	0,40	4,62	0,38
A907	1	7,55	1,63	5,40	0,88	5,14	0,50	4,62	0,38
MH80	1	7,55	2,05	5,36	1,19	5,13	0,87	4,62	0,38
MM20	1	7,47	0,21	6,51	0,73	5,90	0,35	4,62	0,38
A968	8	7,40	0,60	5,75	0,78	5,58	0,56	4,62	0,38
ML38	1	7,40	1,27	5,53	1,20	4,91	0,80	4,62	0,38
ML52	3	7,30	1,56	5,04	0,86	4,85	0,45	4,62	0,38
MH91	8	7,25	2,62	7,18	2,34	7,01	2,57	4,62	0,38
ML35	5	7,23	0,67	6,42	0,76	5,68	0,40	4,62	0,38
MH78	6	7,17	2,63	6,36	1,61	5,68	0,83	4,62	0,38
ML35	7	7,10	0,20	6,42	0,76	5,68	0,40	4,62	0,38
ML35	4	7,03	0,64	6,42	0,76	5,68	0,40	4,62	0,38
ML50	1	7,00	0,50	6,11	0,82	5,67	0,51	4,62	0,38
ML20	6	3,27	0,32	4,68	0,66	4,83	0,49	4,62	0,38
MH29	7	3,03	0,40	3,91	0,68	4,15	0,51	4,62	0,38

xi: valor fenotípico medio de un individuo; *sd*: desviación estándar; *x_F*: valor fenotípico medio de una familia; *x_f*: valor fenotípico medio de una familia sin los mutantes; *x_C*: valor fenotípico medio del control Moneymaker.

De las plantas que presentaron altos valores de °Brix, la mayoría de individuos tenían un tamaño similar al control (diámetro polar $45,23 \pm 5,40$; diámetro transversal $50,89 \pm 6,45$ mm), a excepción de los individuos MH48₅ (Figura 5), MH76₄ (Figura 6), MH49₃, ML20₆, con tamaños muy inferiores al control (diámetro polar $27,795 \pm 1,591$; $24,33 \pm 0,919$; $34,650 \pm 2,277$; $16,82 \pm 1,0505$ y diámetro transversal $33,26 \pm 1,690$; $28,93 \pm 0,431$; $40,865 \pm 4,250$; $22,607 \pm 1,308$) respectivamente.

En el caso de los individuos ML50₁ (Figura 7) y MH129₁ además de presentar valores de °Brix altos (7,00 y 6,16), presentaron un diámetro polar similar al control ($44,65 \pm 3,408$; $38,912 \pm 3,841$) aunque su diámetro transversal ($36,893 \pm 4,030$; $43,388 \pm 7,297$) no se comportó igual, ya que los frutos procedentes de estas plantas son cordiformes, característica que puede ser atractiva en un fruto más aun si también presenta atributos organolépticos importantes.

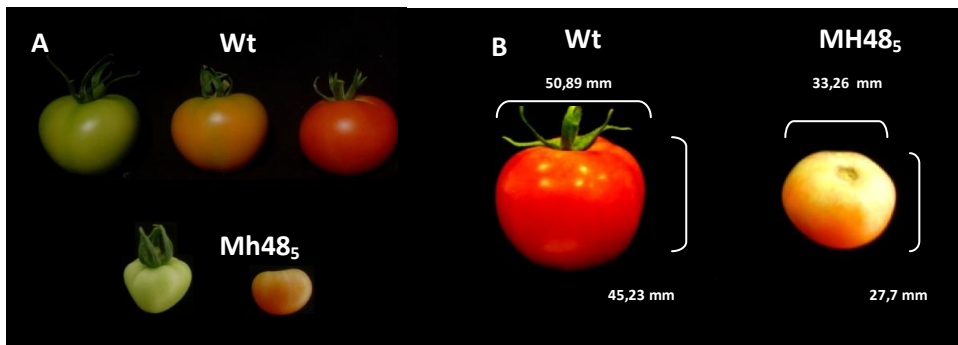


Figura 5. A.- Frutos en diferentes estados de maduración de la planta control del cultivar Moneymaker (marcada como Wt, arriba) y frutos del mutante MH48₅ (abajo). B.- Respecto al fruto de una planta control Wt (izquierda), el mutante MH48₅ (derecha) muestra un diámetro polar y transversal menor.

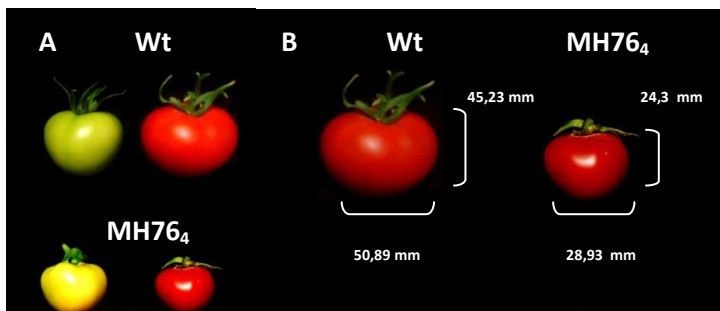


Figura 6. A.- Frutos en diferentes estados de maduración de la planta control del cultivar Moneymaker (marcada como Wt, arriba) y frutos del mutante MH76₄ (abajo). B.- Respecto al fruto de una planta control Wt (izquierda), el mutante MH76₄ (derecha) muestra un diámetro polar y transversal menor.



Figura 7. A.- Frutos en diferentes estados de maduración de la planta control del cultivar MoneyMaker (marcada como Wt, arriba) y frutos del mutante ML50₁ (abajo). B.- Respecto al fruto de una planta control Wt (izquierda), el mutante ML50₁ (derecha) muestra un diámetro polar similar y un diámetro transversal menor, es decir una forma ovoide.

3.1.4.- Evaluación de la acidez de frutos (pH)

La calidad del tomate se la ha evaluado por el contenido de sus compuestos químicos tales como la materia seca, °brix, acidez, azúcares simples, ácido cítrico y otros ácidos orgánicos y compuestos volátiles (14).

La característica del gusto ácido – dulce del tomate y sobretodo la intensidad del sabor se deben a componentes como azúcares reductores (fructosa y glucosa), ácidos libres (principalmente cítrico) así como sustancias volátiles que derivan de los ácidos grasos y amino ácidos (15). Aproximadamente 400 compuestos volátiles han sido encontrados en la maduración del fruto, sin embargo las rutas biosintéticas por las cuales muchos son producidos nos son completamente comprendidas aún (16). De todos estos compuestos volátiles hasta ahora identificados, se ha encontrado que varios que tienen un roll de mayor importancia en el sabor del tomate fresco como son el cis-3-hexenal, trans-2-hexenal, 2-isobutylthiazole (15). La maduración del tomate se caracteriza por el reblandecimiento del fruto, la degradación de la clorofila, y un incremento en la tasa respiratoria, producción de etileno, así como síntesis de ácidos, azúcares y licopeno (14).

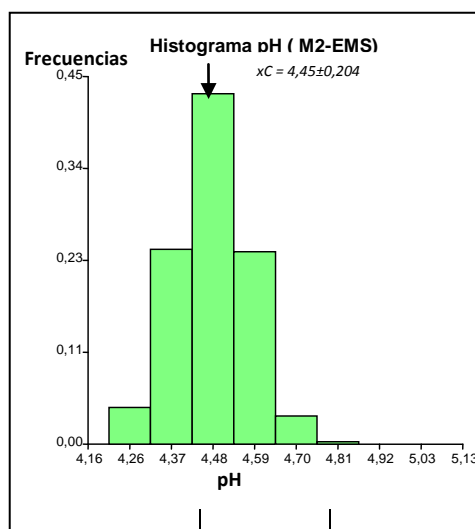
La evaluación del pH se la hizo en 282 familias de la población M2, debido a que de las restantes familias no se recolectó frutos para el análisis, ya sea por retraso en la maduración como por ausencia total de frutos o flores.

En la población M2, se determinó un rango entre 4,21 y 5,08 para el carácter de pH entre todas las familias. Al realizar un cuadro de frecuencias, se clasificó a la población M2 en 8 clases (Tabla 7) y en la Figura 8 se observa la distribución de las familias en función de la variable, encontrándose el 91% de las familias dentro de un rango normal, mientras que el restante 9% presentan valores extremos, lo que aparentemente se podría ajustar a una distribución normal, sin embargo por algunos valores atípicos dentro de la población esto no es posible. Se realizó una prueba de Shapiro – Wilks para determinar si la variable se ajustaba a una distribución normal.

Tabla 7. Distribución de frecuencias en la población M2-EMS para la variable pH.

Variable	Clase	LI	LS	MC	FA	FR
pH	1	4,21	4,32	4,26	13	0,05
pH	2	4,32	4,43	4,37	68	0,24
pH	3	4,43	4,54	4,48	122	0,43
pH	4	4,54	4,65	4,59	67	0,24
pH	5	4,65	4,75	4,70	10	0,04
pH	6	4,75	4,86	4,81	1	0,00
pH	7	4,86	4,97	4,92	0	0,00
pH	8	4,97	5,08	5,03	1	0,00

LI: Límite inferior; LS: Límite superior; x de clases; FA: frecuencia absoluta; FR: frecuencia relativa



x_C: Valor fenotípico medio del control Moneymaker

Figura 8.- Frecuencias en la población M2-EMS por pH.

Para seleccionar las plantas como posibles portadoras de una mutación se siguió el criterio de elegir a los individuos que presentaran un valor fenotípico medio (x_i) mayor al de las plantas control (x_C) más 3 veces su desviación estándar (sd) para un pH alto o bien un valor fenotípico medio (x_i) menor al de las plantas control (x_C) menos 2 veces su desviación estándar (sd) para un pH bajo (Tabla 8).

De esta forma se identificaron 14 familias M2 – EMS, como posibles portadoras de al menos un individuo mutante para el carácter en estudio de pH. De estas 14

familias se seleccionaron un total de 11 plantas con un pH alto, y 6 plantas con un pH bajo (Tabla 9).

Tabla 8. Promedio control de plantas Moneymaker sin mutagenizar para pH.

CONTROL	x_C	4,454
MM	sd	0,204
	$x_C + 3sd$	5,065
	$x_C - 2sd$	4,047

x_C : Valor fenotípico medio del control Moneymaker; sd : desviación estándar

Tabla 9. Familias M2 y plantas EMS seleccionadas para la acidez del fruto (pH).

FAMILIA	PLANTA	$\underline{x_i}$	\underline{sd}	$\underline{x_F}$	\underline{sd}	$\underline{x_f}$	\underline{sd}	$\underline{x_C}$	\underline{sd}
A942	1	6,45	0,00	4,51	0,30	4,48	0,18	4,45	0,204
ML17	10	6,03	0,19	5,08	0,59	4,68	0,23	4,45	0,204
ML17	4	6,01	0,27	5,08	0,59	4,68	0,23	4,45	0,204
ML17	12	5,76	0,07	5,08	0,59	4,68	0,23	4,45	0,204
ML17	3	5,32	0,16	5,08	0,59	4,68	0,23	4,45	0,204
MH36	6	5,32	0,00	4,62	0,24	4,57	0,13	4,45	0,204
ML44	14	5,27	0,47	4,63	0,33	4,58	0,27	4,45	0,204
ML21	5	5,25	0,21	4,71	0,34	4,61	0,25	4,45	0,204
MH60	3	5,21	0,00	4,44	0,22	4,40	0,13	4,45	0,204
A963	5	5,08	0,00	4,45	0,20	4,43	0,16	4,45	0,204
MH97	10	5,07	0,08	4,60	0,28	4,55	0,25	4,45	0,204
ML30	12	4,04	0,19	4,41	0,27	4,44	0,25	4,45	0,204
MH85	9	4,03	0,08	4,35	0,18	4,38	0,15	4,45	0,204
MH73	4	4,02	0,06	4,34	0,23	4,42	0,18	4,45	0,204
A968	1	4,01	0,08	4,31	0,17	4,34	0,14	4,45	0,204
MH31	6	4,00	0,00	4,50	0,23	4,54	0,19	4,45	0,204
MH116	3	3,94	0,92	4,54	0,37	4,61	0,17	4,45	0,204

x_i : valor fenotípico medio de un individuo; sd : desviación estándar; x_F : valor fenotípico medio de una familia; x_f : valor fenotípico medio de una familia sin los mutantes; x_C : valor fenotípico medio del control Moneymaker.

En la Figura 9 se observan algunos de los fenotipos seleccionados por presentar un pH superior al control Moneymaker.

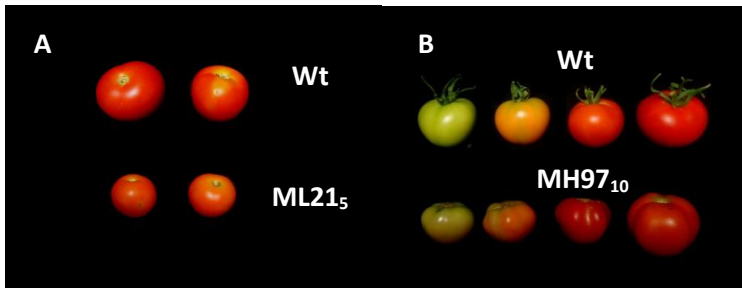


Figura 9. A.- Frutos de una planta control del cultivar MoneyMaker (Wt) (arriba) y frutos del mutante ML21₅ (abajo). B.- Frutos en diferentes estados de maduración de la planta control Wt (arriba) y frutos del mutante MH97₁₀ (abajo).

De todos los individuos seleccionados, la planta MH116₃ presentó el pH más bajo con un valor de 3,95 lo que puede ser una característica positiva muy apreciada por el consumidor al momento de desarrollar una nueva variedad. Sin embargo como varios autores mencionan el buen sabor y aroma de un tomate fresco no viene determinado solo por la alta o baja concentración de un compuesto, sino por la interacción de los mismos. Es necesario que un potencial individuo mutante cuente con todas las cualidades y características necesarias, para que el trabajo del mejorador pueda ser enfocado al carácter de interés.

Mientras muchos investigadores han reportado que la tasa de sólidos solubles/acidez titulable (TA) es importante en la definición de las diferencias de sabores entre los cultivares, otros sugieren que el sabor del tomate puede ser potenciado por el incremento del azúcar total y contenido de ácido de la fruta.

Los niveles de azúcar tienen una correlación positiva con el sabor dulce mientras que la concentración de ácido con la acidez (17).

La identificación de mutantes con un alto contenido de ácidos orgánicos y azúcares, son un objetivo de suma importancia para los programas de mejora genética ya que en la actualidad los seres humanos están en busca de mejorar su alimentación y día a día exigen mejores propiedades y características organolépticas y nutritivas en una fruta o verdura.

Por este motivo la identificación de posibles genes que regulen el complejo mecanismo por el cual un fruto acumula mayoritariamente determinadas sustancias y reduce otras, pueden darnos la clave para acelerar el desarrollo de variedades que permitan satisfacer estas demandas.

El análisis de una población M2-EMS, nos abre un abanico de posibilidades, mostrándonos una variabilidad poco usual en la naturaleza, por el tiempo y por el espacio que requerimos para generarla, y al mismo tiempo incrementa la probabilidad de que en estas poblaciones de individuos mutantes, existan genes modificados o silenciados, convirtiéndose en una herramienta valiosa para el mejora genética de plantas, tanto para caracteres cualitativos como cuantitativos como son el pH y °Brix.

3.1.5.- Evaluación de la partenocarpia del fruto

El término partenocarpia fue por primera vez introducido por Nolly (1902) para denotar a la condición de ausencia de semillas en los frutos. La partenocarpia es un fenómeno natural o que puede darse bajo condiciones inducidas o artificiales como lo menciona Gustafson (1942) (18). Este fenómeno es ventajoso para las plantas de cultivos hortícolas por el valor de sus frutos. El tomate es una planta muy versátil, desde el punto de vista que es un producto que puede ser consumido en fresco o procesado, y por este hecho, los mejoradores van seleccionando líneas o cultivares que se adapten a las necesidades de una u otra marca.

La principal ventaja para la productividad de la fruta es que el cuajado del fruto y su desarrollo no son inhibidos por condiciones ambientales adversas para la polinización o fertilización, así la partenocarpia asegura la estabilidad del rendimiento. En tomate la polinización no ocurre cuando la temperatura nocturna está por debajo de los 13°C o la temperatura en la mañana es superior a los 38 °C por 5 horas (19). La partenocarpia es una valiosa característica para la industria del tomate porque este tipo de frutos pueden tener un elevado porcentaje de sólidos solubles. Además puede permitir un mayor rendimiento, sabor de la pasta y

reducción de costos de producción. Por otra parte los frutos partenocárpico al no tener semillas mejora la calidad del fruto de muchas especies, porque las semillas son usualmente duras para comer y digerir, y frecuentemente su presencia es asociada con sustancias amargas, como la berenjena (19).

Hay varias opciones para obtener genéticamente frutos de tomate partenocárpico, una fuente muy potencial es la hibridación interespecífica. (18). Las técnicas moleculares y de ingeniería genética también han probado ser útiles sin ninguna duda. En tomate, la supresión del gen *CHS* por interferencia de RNA, ha resultado en la producción de frutos con niveles reducidos de flavonoides, color alterado y ausencia de semillas (19). La partenocarpia genética también ha sido inducida por tratamientos mutagénicos. Soressi (1970) obtuvo un mutante partenocárpico con anteras cortas (stock 2524), mediante un tratamiento con EMS (etil metano sulfonato).

En la población M2-EMS evaluada en la campaña primavera – verano 2011, se evaluó la presencia de partenocarpia como una característica relacionada a la calidad de fruto, identificándose 15 familias con un total de 17 plantas como posibles portadores de una mutación (Tabla 10). De toda la población analizada 3 individuos MH48₅, MH49₃ y MH76₄, presentaron altos valores de °Brix en frutos partenocárpico como mencionan autores como Ingrosso (2011). En la Figura 10 se observa uno de los mutantes seleccionados por presentar partenocarpia del fruto.

En la población M2-EMS, las plantas que se seleccionaron por partenocarpia presentaron un tamaño de fruto menor al del control. Para el diámetro polar se registraron valores entre 20 – 34 mm, y para el diámetro ecuatorial entre 24 - 40 mm.

La evaluación de una familia M2-EMS es importante como un escaneo inicial de todos los fenotipos que puedan presentar potencial y a los cuales será necesario hacer un seguimiento a lo largo de campañas posteriores para así descartar o seleccionar un gen o grupos de genes.

Tabla10.- Familias M2 y plantas mutantes de la población M2-EMS seleccionadas por presencia de frutos partenocárpicos.

FAMILIA	PLANTA	MUTACIÓN
A923	1	PARTENOCARPIA
MH110	2	PARTENOCARPIA
MH111	3	PARTENOCARPIA
MH23	7	PARTENOCARPIA
MH23	9	PARTENOCARPIA
MH24	3	PARTENOCARPIA
MH37	10	PARTENOCARPIA
MH44	4	PARTENOCARPIA
MH48	1	PARTENOCARPIA
MH48	5	PARTENOCARPIA
MH49	3	PARTENOCARPIA
MH63	8	PARTENOCARPIA
MH76	4	PARTENOCARPIA
ML12	6	PARTENOCARPIA
ML22	6	PARTENOCARPIA
ML28	9	PARTENOCARPIA
ML46	9	PARTENOCARPIA

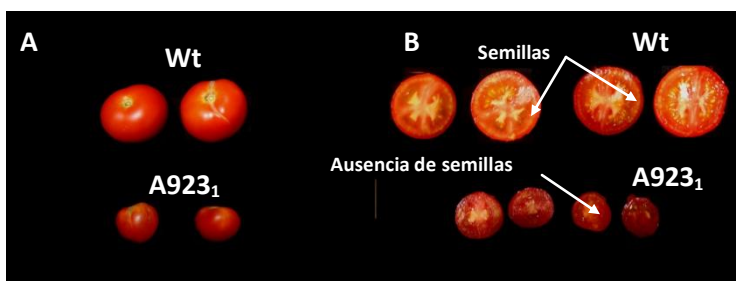


Figura 10. A.- Frutos de una planta control Wt (arriba) y frutos del mutante A923₁ (abajo). B.- Respecto a una planta control del cultivar Moneymaker (Wt) (arriba), el mutante A923₁ (abajo) muestra ausencia total de semillas.

3.1.6.- Otros caracteres de importancia en la calidad del tomate: color y forma

En el presente trabajo se ha evaluado una población M2- EMS con la finalidad de encontrar plantas que presenten características importantes en relación a la calidad del fruto y para esto se ha estudiado el contenido de sólidos solubles, pH, presencia de partenocarpia, sin embargo existen también otras características interesantes.

Los factores que afectan la apariencia son el color, tamaño, forma, defectos o pudriciones. El color externo de los tomates es el resultado de la pigmentación

tanto de la pulpa como de la corteza. Hay genotipos de tomates de color púrpura – rosado, naranja, amarillo oscuro, amarillo claro, amarillo y rosado y otros colores. Sin embargo la mayoría de consumidores prefieren un tomate rojo de coloración profunda y uniforme.

Los cultivares de tomate difieren mucho en la forma del fruto, pudiendo ser esféricos, ovalados, elongados o en forma de pera. Además de estos términos para definir la forma de los frutos, la proporción entre el diámetro polar y ecuatorial puede ser usada como indicador de la forma (12).

El color de un fruto es una característica estrechamente relacionada con el grado de madurez. La conversión de un tomate desde su estado verde maduro al estado pleno de madurez abarca cambios dramáticos de color, composición, aroma, sabor y textura. Se pensaba en la maduración como un simple resultado de una serie de procesos degradativos, probablemente porque la mayoría de cambios requieren de la acción de enzimas hidrolíticas: Sin embargo ahora está claro que este fenómeno depende de un amplio rango de reacciones separadas de síntesis como de degradación (12).

Muchas de las mutaciones que afectan varios aspectos de la maduración han sido estudiadas por los mejoradores de plantas. Mutaciones, como *gf* y *r*, parecen afectar aspectos únicos de la maduración, mientras otros como *rin*, *nor*, *Nr* parecen regular varios procesos simultáneamente. La mutación de *rin* y *nor* son particularmente interesantes: plantas homocigóticas para cualquiera de estos alelos mutantes da lugar a un fruto amarillo o anaranjado pálido respectivamente los cuales producen muy poco licopeno.

En la población M2-EMS se seleccionó los frutos que visualmente presentaron una coloración de interés, diferente del control y se registraron los datos con un colorímetro tomando los índices a y b que se basa en la teoría opuesta del color a la percepción humana del color, desarrollada por Hering en 1872, la percepción del rojo versus verde (valor Hunter a), y el azul versus el amarillo (valor Hunter b).

El valor fenotípico medio control (\bar{x}_C) de plantas no mutagenizadas tuvieron un valor de $a = 25,72 \pm 4,89$ y $b = 24,92 \pm 6,65$.

En la campaña primavera-verano se identificaron varias plantas mutantes con características alteradas respecto a la coloración de sus frutos como se puede observar en las Figuras 11 y 12. La planta ML30₈ presentó frutos de color amarillo con un índice $a = 9,69$ y $b = 41,13$ y la A957₁₅ valores de $a = 7,85$ y $b = 38,8$.

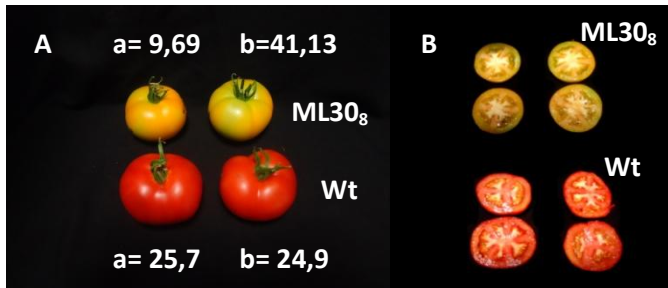


Figura 11. A.- Respecto a una planta control (Wt) (abajo), el mutante ML30₈ (arriba) muestra una maduración alterada, al presentar una coloración amarilla intensa tanto en el epicarpio como en la placenta.

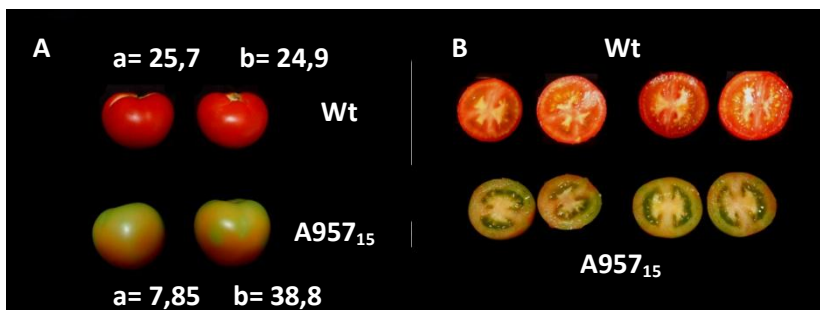


Figura 12. A.- Respecto a una planta control (Wt) (abajo), el mutante A957₁₅ (arriba) muestra una maduración heterogénea, al presentar una pigmentación variada en el epicarpio y en la placenta

Se han identificado un pequeño número de genes cuantitativos como responsables para la gran variación que afecta al tamaño del tomate pero solamente *fw2.2* ha sido aislado. Dos mutaciones independientes *locule-number* y *fasciated (fas)* han sido identificados como responsables en la definición del número de lóculos finales formados en un fruto maduro. Otros genes como *OVATE* alteran y tienen efectos en la forma y tamaño de los frutos, promoviendo la elongación y la forma de pera de los frutos como resultado de codón de parada prematuro en el segundo exón que genera una proteína truncada (2).

En la población M2-EMS se pudo diferenciar y seleccionar varios fenotipos mutantes de interés por la forma del fruto, encontrándose individuos esféricos, elongados, achatados en los polos, cordiformes. Se destaca de estas plantas los frutos de las plantas MH1₁, ML23₃, ML52₈, cuyas dimensiones (diámetro polar 36,82; 48,8; 54,5 mm y diámetro ecuatorial 51,90; 43,4; 39,5 mm respectivamente) resultaron en un fruto de apariencia atractiva (Figura 13 y 14).



Figura 13. A. Frutos en diferentes estados de maduración de la planta control Wt (arriba) y frutos del mutante MH1₁ (abajo). B.- Respecto al fruto de una planta control Wt (izquierda), el mutante MH1₁ (derecha) muestra un diámetro transversal similar y un diámetro polar menor.

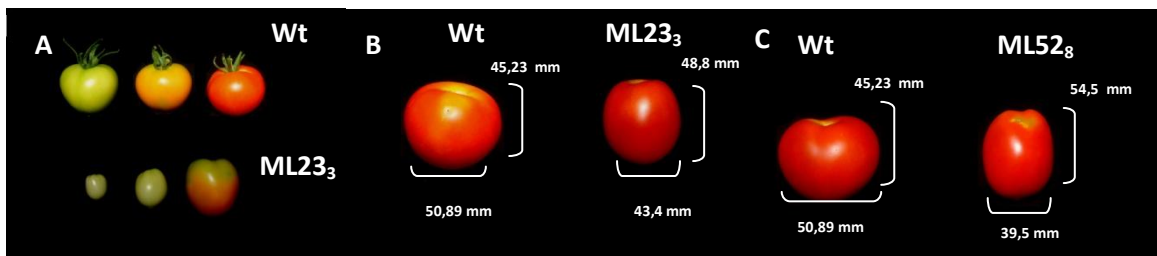


Figura 14. A.- Frutos en diferentes estados de maduración de la planta control Wt (arriba) y frutos del mutante ML23₃ (abajo). B.- Respecto al fruto de una planta control Wt (izquierda), el mutante ML23₃ (derecha) muestra un diámetro transversal menor y un diámetro polar superior. C.- Respecto al fruto de una planta control Wt (izquierda), el mutante ML52₈ (derecha) muestra un diámetro transversal menor y un diámetro polar superior.

En la Figura 14 se observa otro fenotipo como la planta MH99₇, que presentó una pigmentación heterogénea sobre la corteza y en el mesocarpo del fruto, además de formas poco usuales. Como este, muchos otros mutantes a pesar de no presentar un fenotipo deseado, su posterior estudio y seguimiento pueden ser de gran relevancia, al poder ser una parte clave en la comprensión del funcionamiento de otros genes.

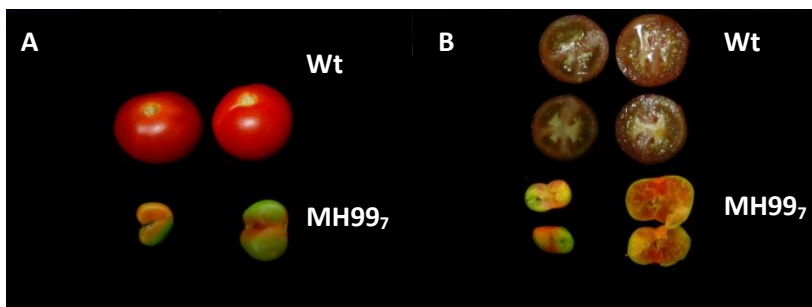


Figura 15. A y B.- Respecto al fruto de una planta control Wt (arriba), el mutante MH99₇ (abajo) muestra un tamaño y color muy diferenciado . B.- Mesocarpio de frutos control del cultivar Moneymaker (Wt) (arriba) y del mutante MH99₇ (abajo).

3.1.7.- Análisis genético de los genotipos seleccionados

Para realizar el análisis genético de los genotipos seleccionados se parte de la hipótesis, que la mutación observada es de naturaleza monogénica. Bajo este concepto la segregación esperada en las familias M2 sería $\frac{3}{4}$ fenotipo normal (*wt*): $\frac{1}{4}$ fenotipo mutante o bien $\frac{3}{4}$ fenotipo mutante: $\frac{1}{4}$ fenotipo normal (*wt*). Esto dependerá si la herencia del carácter analizado es dominante o recesiva. Se llevó a cabo un test chi-cuadrado para comparar las proporciones observadas de las segregaciones en el campo, con las proporciones teóricas esperadas según la hipótesis de herencia que se maneje. El nivel de significación del test chi-cuadrado se estableció en el 5% (0,05).

En las Tablas 11, 12 y 13 se recogen algunas de las segregaciones de las familias M2 de la campaña primavera – verano 2011, junto a los resultados del test chi-cuadrado, cuyo valor experimental se ha calculado bajo la hipótesis de segregación para un solo gen recesivo (3:1), para pH, °Brix y partenocarpia.

Tabla 11. Segregación de una mutación recesiva en la población M2-EMS para pH.

FAMILIA	Plantas totales	Segregación Observada		Segregación teórica		$\chi^2 - exp$
		normal	mutante	normal	mutante	
A942	14	13	1	10,5	3,5	1,7857
ML17	12	8	4	9	3	0,3333
MH36	7	6	1	5,25	1,75	0,3214
ML44	14	13	1	10,5	3,5	1,7857
ML21	6	5	1	4,5	1,5	0,1667

MH60	10	9	1	7,5	2,5	0,9000
A963	14	13	1	10,5	3,5	1,7857
MH97	11	10	1	8,25	2,75	1,1136
ML30	10	9	1	7,5	2,5	0,9000
MH85	8	7	1	6	2	0,5000

χ^2 : estadístico chi cuadrado

Tabla 12. Segregación de una mutación recesiva en la población M2-EMS para °Brix.

FAMILIA	Plantas totales	Segregación Observada		Segregación esperada		$\chi^2 - exp$
		normal	mutante	normal	mutante	
MH76	9	7	2	6,75	2,25	0,0278
MH81	9	7	1	6,75	2,25	0,6944
MH91	5	2	3	3,75	1,25	2,4500
MH104	11	5	6	8,25	2,75	3,8409
A922	13	12	1	9,75	3,25	1,5577
MH66	8	7	1	6	2	0,5000
ML21	5	4	1	3,75	1,25	0,0500
A929	14	13	1	10,5	3,5	1,7857
A933	12	11	1	9	3	1,3333
A967	6	5	1	4,5	1,5	0,1667
MH78	11	10	6	8,25	2,75	3,8409
A946	9	7	2	6,75	2,25	0,0278
ML35	12	4	8	9	3	8,3333
A907	10	8	2	7,5	2,5	0,1000
MM20	4	1	3	3	1	4,0000
A968	12	11	1	9	3	1,3333
ML38	6	4	2	4,5	1,5	0,1667
ML52	11	10	1	8,25	2,75	1,1136
MH88	8	6	2	6	2	0,0000

χ^2 : estadístico chi cuadrado

Cabe mencionar que las familias MM20 y ML35 que presentaron un valor de chi cuadrado (χ^2) 4 y 8,33 respectivamente, no se adaptan a la hipótesis de que el carácter en estudio está regulado por un solo gen recesivo, por lo que la hipótesis correcta sería el planteamiento que el carácter está regulado por un solo gen dominante.

Tabla 13. Segregación de una mutación recesiva en la población M2-EMS para partenocarpia.

FAMILIA	Plantas totales	Segregación Observada		Segregación esperada		$\chi^2 - exp$
		normal	mutante	normal	mutante	
A923	15	14	1	11,25	3,75	2,0167
MH110	4	33	1	3	1	0,0000
MH111	6	5	1	4,5	1,5	0,1667
MH23	11	9	2	8,25	2,75	0,2045
MH37	8	7	1	6	2	0,5000
MH44	9	8	1	6,75	2,25	0,6944
MH48	12	10	2	9	3	0,3333
MH49	6	5	1	4,5	1,5	0,1667
MH63	9	8	1	6,75	2,25	0,6944
ML12	7	6	1	5,25	1,75	0,3214
ML22	5	4	1	3,75	1,25	0,0500
ML28	10	9	1	7,5	2,5	0,9000

χ^2 : estadístico chi cuadrado

3.2.- Caracterización fenotípica y genotípica de mutantes *falsiflora3* (*fa3*) y *uniflora* (*uf*) en tomate.

3.2.1.- Análisis fenotípico

Todas las plantas fueron caracterizadas fenotípicamente, identificando 6 fenotipos diferentes: Wild type (Wt), *falsiflora 3* (*fa3*), *uniflora* (*uf*), y tres fenotipos anómalos catalogados como *f1*, *f2* y *f3* como se observa en la Figura 16. En campo se tomó muestras de tejido vegetal para su posterior análisis.



Figura 16. A.- Planta Wild type (Wt). B.- Planta *uniflora*(*uf*). C.- Planta *falsiflora 3*(*fa3*). D.- Fenotipo 1 (*f1*). E.- Fenotipo 2 (*f2*). F.- Fenotipo 3 (*f3*).

3.2.2.- Análisis molecular

Se realizó la extracción del DNA de aquellos individuos con un fenotipo extraño y se genotipó para el gen *fa3*, pudiendo confirmar si este alelo se presentaba en homocigosis o heterocigosis. Se amplificó una región de 191 pb con los cebadores correspondientes Fa3Nde_F, Fa3R. El producto de PCR se purificó y se realizó una digestión con la enzima NdeI, capaz de digerir el alelo Wild type.

El resultado de la digestión se observó mediante una electroforesis en gel de acrilamida (Figura 17), encontrándose un patrón de bandas característico para las plantas que tenían el alelo *wild type* y el alelo mutante *fa3*.

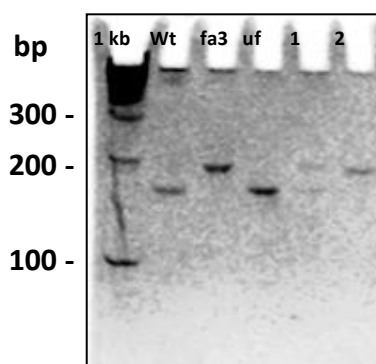


Figura 17. Patrón de bandas en un gel de acrilamida (10%), para la digestión con NdeI. Wt: *wild type*, *fa3*: mutante de falsiflora, *uf*: mutante uniflora, 1: planta heterocigota, 2: doble mutante(homocigoto para *fa3*)

Se realizó un procedimiento similar pero complementario con otra pareja de cebadores Fa3F, Fa3Pvu_R. Para la digestión del producto de PCR purificado se utilizó la enzima PvuI, capaz de digerir el alelo mutante. Con esto se confirmó la presencia del polimorfismo y de las plantas heterocigotas, pues los patrones de bandas observados eran complementarios en los dos experimentos.

Una vez realizada la caracterización genotípica de los individuos que presentaron un fenotipo extraño, se procedió a ajustar la segregación observada en el campo y se realizó una prueba estadística de chi – cuadrado, para poder aceptar o rechazar la hipótesis de la segregación e interacción entre los genes *falsiflora 3 (fa3)* y *uniflora (uf)* (Tabla 14).

Tabla 14. Segregación teórica y segregación observada en campo para dos genes *fa3* y *uf*.

Planta	Total plantas	Segregación esperada				Segregación observada				$\chi^2 - exp$
		wt	fa3	uf	fa3uf	wt	fa3	uf	fa3uf	
1.3	8	4,5	1,5	1,5	0,5	3	2	2	1	1,32
2.4	66	37,12	12,35	12,35	4,125	36	14	14	2	1,56
2.1	39	21,93	7,3	7,3	2,4	26	5	6	2	1,76

El valor de χ^2 debe encontrarse en un rango entre 0 – 3,8

Se puede concluir que los genes *falsiflora 3 (fa3)* y *uniflora (uf)* segregan independientemente, y al expresarse conjuntamente se origina un fenotipo anómalo, que no desarrolla inflorescencias aunque la estructura de la planta es similar a una planta control (Wt).

4.- BIBLIOGRAFIA:

- 1.- Nuez, F. 1995. El cultivo del tomate. Editorial Aedos. 1era ed. *Disponible en:* http://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=EMXnooyk-TQC&oi=fnd&pg=PA13&dq=historia+de+la+domesticaci%C3%B3n+del+tomate&ots=O-lBpZpHs2&sig=r-zD1V4oONS0Td_vVREfeeqPAC8#v=onepage&q&f=false
- 2.- Lozano, R. Gimenez, E. Cara, B. Capel, J. and Angosto, T. 2009. Genetic analysis of reproductive development in tomato. THE INTERNATIONAL JOURNAL OF DEVELOPMENTAL BIOLOGY. 53; 1635-1648
- 3.- Silvia Minoia, S. Petrozza, A. D'Onofrio, O. Piron, F. Mosca, G. Sozio, G. Cellini, F. Bendahmane, A. Carriero, F. 2010. A new mutant genetic resource for tomato crop improvement by TILLING technology. *BMC Research Notes* 3:69.
- 4.- Brock, R.D. (1971). The role of induced mutations in plant improvement. *Radiation Botany*, Vol. 11, pp. 181 to 196.
- 5.- Chatelat, 2005 (TGRC)
- 6.- Menda, N. Semel, Y. Peled, D. Eshed, Y. and Zamir, D. (2004). *In silico* screening of a saturated mutation library of tomato. *The Plant Journal* 38; 861– 872.
- 7.- Emmanuel, E. and Levy, A. (2002). Tomato mutants as tools for functional genomics. *Plant Biology*, 5:112–117
- 8.- Baoge, Z. Aiqiu, G. Xiangdong, Yuxuan, G. Zixian, L. 1995. Effects of caffeine or EDTA post-treatment on EMS mutagenesis in soybean. *Mutation Research* 334 157-159.

- 9.- Saikat, K. Surya, N. James, E. 2008. Genetic improvement of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) through EMS induced mutation breeding for higher seed yield under western Canada prairie conditions. *Euphytica*. 160:249–258.
- 10.- Fernandez, A. (2009). Evaluación agronómica de la variabilidad genética inducida mediante mutagénesis química en tomate. Manuscrito. Proyecto de Carrera.
- 11.- Molinero – Rosales, N. Jamilena, M. Zurita, S. Gómez, P. Capel, J. Lozano, R. (1999). FALSIFLORA, the tomato orthologue of FLORICAULA and LEAFY, controls flowering time and floral meristem identity. *The Plant Journal*. 6; 685-693.
- 12.- Grieson, D. and Kader, A. (1986). Fruit Ripening and quality. *The Tomato Crop. A Scientific Basis for Improvement*. pp 241-280.
- 13.- Causse, A. Duffe, P. Gomez, M.C. Buret, M. Damidaux, R. Zamir, D. Gur, A. Chevalier, C. Lemaire-Chamley, M. and Rothan, C. 2004. **A genetic map of candidate genes and QTLs involved in tomato fruit size and composition**. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 55, No. 403, pp. 1671–1685.
- 14.- Suárez, M. Rodríguez, E.M. Romero, C.2008. Chemical composition of tomato (*Lycopersicon esculentum*) from Tenerife, the Canary Islands. *Food Chemistry* 106; 1046–1056.
- 15.- Petro-Turza, M. (1986). Flavor of tomato and products.. *Food Reviews International*. Volume 2, Issue 3.
- 16.- Kovács, K. Fray, R. Tikunov, Y. Graham, N. Bradley, G. Seymour, G. Bovy, A. Grierson, D. (2009). Effect of tomato pleiotropic ripening mutations on flavour volatile biosynthesis. *Phytochemistry* 70; 1003–1008.
- 17.- Malundo, T.M.M. Shewfelt, R.L. and Scott, J.W.(1995). Flavor quality of fresh tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) as affected by sugar and acid levels. *Postharvest Biology and Technology* 6; 103-110
- 18.- Ho, LC. and Hewitt, JD.(1986). Fruit development. *The Tomato Crop. A Scientific Basis for Improvement*.pp 201-239
- 19.- Ingrosso, I. Bonsegna, S. Dedomenico, S. Laddomada, B. Blando F. Santino, A. Giovanazzo, G. (2011). Over-expression of a grape stilbene synthase gene in tomato induces parthenocarpy and causes abnormal pollen development. *Plant Physiology and Biochemistry* 1 – 8.
- 20.- Lanahan, M. Yen, H. Giovannoni, J and Klee, H. 1994. The *Never Ripe* Mutation Blocks Ethylene Perception in Tomato. *The Plant Cell*, vol6; 521-530.

