

UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

MÁSTER “BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL Y AGROALIMENTARIA”

TRABAJO FIN DE MÁSTER

**ANÁLISIS GENÉTICO DE MUTANTES
ALTERADOS EN EL DESARROLLO DEL
FRUTO DE TOMATE**



JONATHAN ROMERO MASEGOSA

DIRIGIDO POR:

Dr. D. Rafael Lozano Ruiz

Dr. D. Fernando J. Yuste Lisbona

Almería, Julio de 2015

ÍNDICE

RESUMEN.....	5
1. INTRODUCCIÓN.....	6
1.1 El tomate	6
1.2 Descripción botánica	7
1.3 Variabilidad natural e inducida mediante Etilmetilsulfonato (EMS)	8
1.4 Calidad del fruto del tomate.....	9
1.4.1 Calidad externa del fruto del tomate. Control genético.....	9
1.4.1.1 <i>Tamaño</i>	9
1.4.1.2 <i>Firmeza</i>	10
1.4.2 Calidad interna del fruto del tomate. Control genético	11
1.4.2.1 <i>Sabor</i>	11
1.4.3 Partenocarpia. Control genético	12
1.5 El etileno como iniciador de la maduración y desarrollo del fruto.....	12
2. OBJETIVOS.....	16
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
3.1 Material vegetal.....	17
3.2 Caracterización fenotípica de familias segregantes M2.....	17
3.2.1 Calidad externa del fruto de tomate	18
3.2.1.1. <i>Tamaño</i>	18
3.2.1.2 <i>Firmeza</i>	18
3.2.2 Calidad interna del fruto de tomate	18
3.2.2.1 <i>Acidez (pH)</i>	18
3.2.2.2 <i>Contenido en sólidos solubles (° Brix)</i>	18
3.2.2.3 <i>Partenocarpia</i>	19
3.3 Análisis estadísticos	19
3.4 Análisis de complementación alélica del mutante <i>eu1.8</i>	19
3.4.1 Extracción de ADN	19
3.4.2 Genotipado mediante PCR	20
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
4.1 Análisis de la calidad del fruto en una población de familias segregantes M2	23

4.1.1 Calibre	23
4.1.3 Acidez	24
4.1.4 Sólidos solubles (° Brix).....	26
4.1.5 Partenocarpia.....	26
4.2 Análisis de complementación alélica del mutante <i>eu1.8</i>	27
4.2.1 Secuenciación del gen <i>NR</i>	29
4.2.2 Evaluación de la población F2 (<i>eu1.8</i> x <i>Nr</i>).....	31
5. CONCLUSIONES.....	33
6. BIBLIOGRAFÍA.....	34

RESUMEN

Actualmente, el tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una de las especies hortícolas más importantes a nivel mundial. Uno de los requisitos fundamentales para su comercialización, es la calidad del producto. En dicha calidad se incluyen tanto aspectos externos como internos. Aquí, los programas de mejora genética prestan especial atención a la mejora del sabor y del aroma procurando mantener de igual modo los excelentes atributos sobre los caracteres externos.

En el presente trabajo se ha realizado la caracterización de una población compuesta por familias segregantes M2 de tomate obtenidas mediante autopolinización de la primera generación mutagenizada M1 procedente de un programa de mutagénesis química llevado a cabo por el grupo de Genética y Fisiología del Desarrollo Vegetal (AGR-176) de la Universidad de Almería.

Como resultado, se han seleccionado diferentes familias M2 en relación a los diferentes caracteres, externos e internos, del fruto (calibre, firmeza, acidez, contenido en sólidos solubles y partenocarpia) prestando especial interés a la familia 7-365, por poseer niveles de acidez y cantidad de sólidos solubles significativamente superiores al control *Moneymaker*.

Bajo el mismo programa de mutagénesis química llevado a cabo por el grupo AGR-176, mencionado anteriormente, se obtuvo el mutante EMS (Etilmetilsulfonato) de maduración de fruto denominado *eul.8*. Este mutante ha seleccionado por presentar frutos incapaces de completar la maduración, manteniendo un color naranja en lugar el rojo característico de los frutos normales. Como parte de este trabajo de investigación, se ha llevado a cabo un análisis de complementación, con el objetivo de determinar si la mutación mencionada corresponde a un nuevo alelo de alguno de los genes de maduración ya descritos en tomate o por el contrario se trata de un nuevo gen implicado en este proceso. Los resultados muestran claramente que la mutación *eul.8* afecta a un nuevo gen de tomate implicado en el proceso de maduración.

Por todo ello, tanto las familias seleccionadas como el mutante *eul.8*, constituyen un material vegetal de interés para futuros programas de mejora hortícola destinados a obtener variedades de tomate con mejor calidad de fruto y variedades larga vida, respectivamente.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El tomate

El tomate cultivado, *Solanum lycopersicum* L. pertenece a la familia de las Solanáceas. Dicha familia comprende alrededor de 3.000 especies muchas de ellas de gran importancia económica y social, puesto que incluye especies como patata, pimiento, berenjena, petunia o tabaco. Dentro de esta familia se puede destacar a tomate, pues su cultivo constituye el de la hortaliza de mayor relevancia de la familia.

El origen del género *Solanum* se ubica en la región andina que hoy comparte Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y Chile. En dichas zona geográfica crecen de forma espontánea las diversas especies silvestres del género. Por su parte, el origen del tomate cultivado se encuentra en la región andina que comprende desde el sur de Colombia hasta el norte de Chile (Nuez, 1995).

La domesticación del tomate probablemente finalizó 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 nutraceuticos de interés. La superficie cultivada con tomate a nivel mundial en 2012 fue de 4.803.680 hectáreas, con una producción de 161.793.834 toneladas (FAOSTAT 2012). España generó el 2,5% del total, con 48.800 hectáreas y 4.007.000 toneladas, ocupando el octavo lugar mundial en producción.

El incremento anual de la producción de tomate que se ha producido en los últimos años se debe principalmente al aumento en el rendimiento y en menor proporción al aumento de la superficie cultivada. A dicho incremento ha contribuido la gran adaptabilidad de esta especie a distintos entornos y a que 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).

En la actualidad tomate representa un excelente modelo para estudio genéticos y fisiológicos debido a que se trata de una especie autógama, de un ciclo de vida corto y un elevado potencial reproductivo, que es diploide ($2n=24$) y que posee un genoma relativamente pequeño (950 Mb) ya secuenciado en el que se han descrito aproximadamente 35.000 genes (Barone et al., 2008).

1.2 Descripción botánica

La clasificación taxonómica de tomate es la siguiente: Reino *Plantae*, división *Magnoliophyta*, clase *Magnoliopsida*, subclase *Asteridae*, Orden *Solanales*, suborden *Solanineae*, familia *Solanaceae*, género *Solanum* y especie *S. lycopersicum* (Fooland, 2007). Su forma de crecimiento es perenne y de porte arbustivo, aunque se cultiva como anual. Puede desarrollarse de forma rastrera, semierecta o erecta, y el crecimiento es limitado en las variedades determinadas e ilimitado en las variedades indeterminadas que pueden llegar a crecer más de 10 m en un año (Rick, 1978).

El fruto de la especie también recibe el nombre de tomate y es una baya bi- o pluri-locular, se desarrolla a partir de un ovario de unos 5-10 mg que alcanza un peso final en la madurez que oscila entre los 5 y los 500 g, en función de la variedad y de las condiciones de desarrollo. El fruto adulto del tomate está mayoritariamente constituido por el pericarpio, el tejido placentario y las semillas (Figura 1).

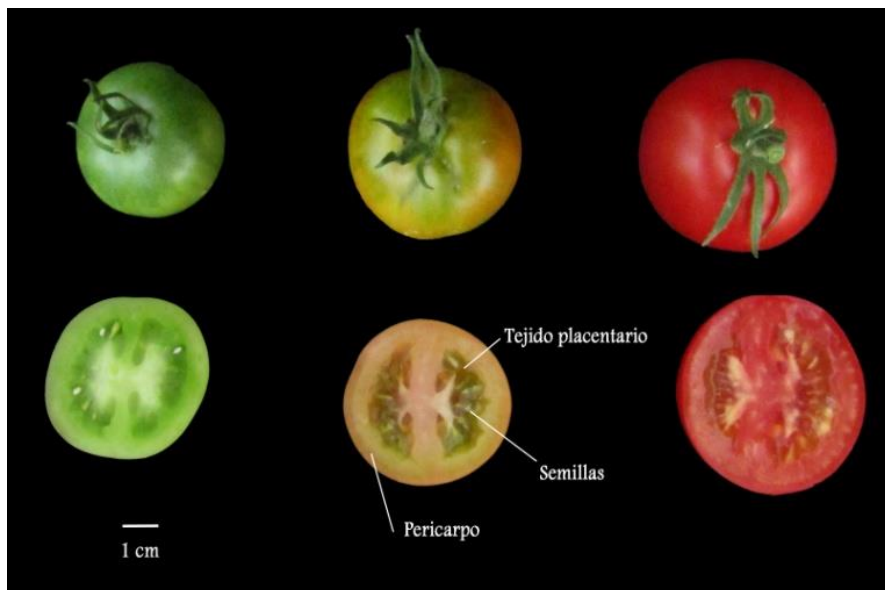


Figura 1. Diferentes estadios de maduración y sus respectivas secciones transversales en un fruto adulto del cultivar *Moneymaker* detallando sus diferentes partes.

1.3 Variabilidad natural e inducida mediante Etilmetilsulfonato (EMS)

Las mutaciones son alteraciones estables y heredables del material genético que, en ocasiones, producen cambios en el fenotipo. El cambio en la mayoría de las bases nucleotídicas no ocasiona cambios en el fenotipo del organismo, bien porque ocurren en regiones no codificantes para proteínas o por la degeneración del código genético (Brock, 1971). La mayoría de las mutaciones ocurren de forma espontánea por muy diversos motivos. Estas mutaciones generan la variabilidad natural de la especie y, por tanto, son la base de la evolución, supervivencia y éxito evolutivo de una determinada especie.

Por otro lado, 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. Así, se pueden dar lugar mutantes adecuados para los sistemas de agricultura moderna y no esperar ni depender de aquellos que han sobrevivido a la selección natural (Minoia et al., 2010).

Las mutaciones inducidas son consideradas como alternativa a la variación que ocurre naturalmente como un recurso o fuente de germoplasma para los programas de mejora genética vegetal (Cubero, 2003). 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 (Lozano et al., 2009).

Los mutantes inducidos mediante productos químicos, 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 (Lozano et al., 2009). El etil sulfonato de etilo (EMS) es un agente alquilante, capaz de ceder grupos alquilo a grupos ceto de las posiciones 6 de la guanina y 4 de la timina. Esta modificación produce una alteración en las afinidades de emparejamiento de las bases nitrogenadas, causando mutaciones de transición de GC a AT. Su eficacia radica en que induce una alta frecuencia de puntos de mutación en un amplio rango de organismos en ausencia de anomalías cromosómicas (Waugh y col., 2006). La generación de mutantes EMS también ha sido empleada con éxito en otras especies cultivadas a nivel mundial como soja (*Glicine max*) (Baoge et al., 1995) y arroz

(*Oriza sativa*) (Micke et al., 1987), y con en especies menos conocidas como puede ser el alholva o fenogreco (*Trigonella foenum-graecum L.*) (Saikat et al., 2008). En el presente trabajo, se ha utilizado una población M2 proveniente de una población M1 que a su vez han sido generadas por semillas tratadas con EMS.

1.4 Calidad del fruto del tomate

Uno de los requisitos fundamentales para la comercialización es la calidad del producto. En la calidad del fruto del tomate se incluyen tanto aspectos externos del fruto (color, tamaño, forma, firmeza, ausencia de manchas y defectos), como aspectos internos relacionados con el sabor, el aroma y el contenido en vitaminas y minerales (Nuez, 1995).

En un primer momento, los atributos de calidad externa, percibidos por la vista y el tacto determinan la elección inicial por parte del consumidor, quedando en un segundo plano aspectos como el aroma, el sabor y el valor nutritivo. El aspecto externo, sin embargo, no asegura una elevada calidad interna, condicionada por el sabor y el aroma. Por ello, es el conjunto de características las que van a influir de manera determinante en la decisión de volver a consumir un determinado tipo de tomate.

En la actualidad, los programas de mejora genética prestan especial atención a la mejora del sabor y del aroma procurando mantener de igual modo los excelentes atributos sobre los caracteres externos. Sin embargo no pueden dejar de ser considerados en estos programas de mejora genética caracteres como las resistencias a plagas y patógenos, causantes por diversos motivos de la falta de sabor de muchos cultivares actuales.

1.4.1 Calidad externa del fruto del tomate. Control genético

1.4.1.1 Tamaño

El tamaño del fruto del tomate cultivado presenta una gran diversidad. La predilección de un tamaño de fruto por parte del consumidor dependerá del uso para el cual esté destinado el fruto, es decir, no es un factor que defina el grado de calidad, pero puede influir de manera importante en las expectativas de su calidad comercial. El tamaño del fruto se ve afectado durante su desarrollo principalmente por factores ambientales como la temperatura, observándose que las temperaturas bajas aumentan el tiempo requerido para la maduración del fruto, incrementando por tanto su tamaño (Van der Ploeg y Heuvelink, 2005).

La variabilidad de tamaño y forma del fruto de tomate puede asociarse a unos pocas regiones genómicas que contiene los denominados QTL (*Quantitative Trait Loci* o Loci que Controlan caracteres cuantitativos). Algunos de estos QTL responsables de la variación del tamaño del fruto han sido identificados y entre ellos destaca el gen *fw2.2*, el cual explica el 30% de la variación de tamaño del fruto en poblaciones segregantes (Fray et al., 2000). Además de este gen se ha descrito la localización de otros QTL intervienen en la herencia de este carácter de la mayor importancia agronómica (Capel et al., 2015)

El tamaño de fruto también está asociado al número de carpelos, ya que estos condicionarán el número de lóculos que componen el fruto maduro. Este carácter está controlado por los genes *Locule-number (lc)*, *fasciated (fas)* (Tanksley, 2004, Lozano et al., 2009) y el más recientemente descrito *EXCESSIVE NUMBER OF FLORAL ORGANS (ENO)* (Fernández-Lozano et al., 2015). La mayoría de las variedades comerciales actuales portan la mutación *fasciated*, mientras que las variedades de tamaño grande parecen requerir la presencia de *fas* y *ln* simultáneamente (Tanksley, 2004).

1.4.1.2 Firmeza

La firmeza es, junto al color y el tamaño, uno de los atributos que el consumidor considera como más importante para la calidad de los frutos. La retención de firmeza durante el periodo post-cosecha es de gran importancia también para los productores y, sobre todo, para los comercializadores. La reducción de firmeza que ocurre durante la maduración es debida a la actividad de enzimas pectinolíticas que actúan sobre las pectinas de las paredes celulares, provocando el debilitamiento de las uniones entre células y el posterior ablandamiento del fruto (Angosto y Borja, 2000). Estas enzimas se sintetizan y acumulan a lo largo de la maduración del fruto.

El control de la firmeza en tomate es un rasgo poligénico complejo. La disminución en la firmeza que ocurre durante la maduración está relacionada con la expresión de genes que codifican para diferentes enzimas pectinolíticas, como las pectinesterasas (PE), las poligalacturonasas (PG) o la expansina (EXP) (Brummel y Harpster, 2001, Seymour et al., 2014). Usando la tecnología de ARN antisentido, se han obtenido plantas transgénicas en las que se produce un descenso en las diferentes actividades enzimáticas mencionadas y que ha ayudado a entender el papel que cada una juega en el metabolismo de las pectinas durante la maduración.

Por el contrario, una sobreexpresión de una proteína PG en el mutante *rin*, el cual no acumula cantidades apreciables de PG, produjo una solubilización y despolimerización de las pectinas similar a la observada en la maduración de los frutos de las plantas no mutadas (Giovannoni y col., 1989; DellaPenna y col., 1990). Además, se ha comprobado que la expresión del gen PG se estimula por etileno (Grierson y col., 1986; Maunders y col., 1987). En tomate, la expresión del gen *PG* comienza en el estadio de inicio de viraje cuando se incrementa la producción de etileno (DellaPenna y col., 1987). Todos estos datos implican que el *PG* es uno de los principales determinantes de la firmeza de los frutos de tomate durante la maduración.

1.4.2 Calidad interna del fruto del tomate. Control genético

1.4.2.1 Sabor

El sabor del tomate está determinado principalmente por los niveles de azúcares y ácidos. Los azúcares, glucosa y fructosa, constituyen el 65% de los sólidos solubles, mientras que el resto está constituido principalmente por los ácidos cítrico y málico, minerales, lípidos y un conjunto de otros compuestos a bajas concentraciones. En consecuencia, un aumento en el contenido de sólidos solubles produce también un aumento en el sabor (Jones y Scott, 1983).

El contenido en azúcares del fruto se encuentra estrechamente relacionado con la radiación solar, aumentando su concentración con irradiancias elevadas (Winsor y Adams, 1976); el mismo efecto que se produce ante el aumento del estrés salino (Grierson y Kader, 1986, Beckles, 2012).

Mediante cruzamientos interespecíficos entre poblaciones de *S. lycopersicum* y especies silvestres como *S. pimpinellifolium*, *S. parviflorum*, *S. peruvianum* o *S. chmielewskii* se han podido describir un gran número de QTLs con efecto positivo en el contenido de sólidos solubles (Causse et al., 2004, Stommel et al., 2005, Klee y Tieman, 2012). Recientemente el grupo de investigación en el que se ha realizado este TFM ha generado un nuevo mapa genético de tomate en el que ha identificado QTL para 15 caracteres implicados con la calidad de la producción de tomate entre los que se encuentran nuevos QTL para el contenido en sólidos solubles (Capel et al., 2015). Otras alteraciones, como la mutación *hp-1* en homocigosis, incrementa la acumulación de

sacarosa y, simultáneamente la de flavonoides, lo que implica que este gen podría ser utilizado para la mejora del sabor del fruto (Yen et al., 1997).

1.4.3 Partenocarpia. Control genético

La fecundación del óvulo marca el inicio del crecimiento del fruto. Una posible opción de cuajado y crecimiento de fruto sin que se desarrolle el embrión es la llamada partenocarpia. La partenocarpia en el tomate puede producirse naturalmente o ser inducida artificialmente (Bangerth y Sjut, 1978). La partenocarpia natural se produce por causas genéticas y puede ser obligatoria o facultativa, es decir, dependiente de las condiciones ambientales (Ho y Hewitt, 1986) (Strassburger, 1994).

Se han estudiado varios mutantes partenocárpicos, en particular, el mutante *pat* de tomate, en el cual el desarrollo del ovario comienza antes de que se produzca la antesis y ocurren algunas alteraciones en el desarrollo floral. Es posible que la partenocarpia sea un efecto secundario de la actividad de los genes que controlan la identidad de los órganos en las primeras etapas del desarrollo floral. Sin embargo, la falta de elongación celular en diferentes órganos sugiere que los productos del gen *PAT* interactúan con el metabolismo de las giberelinas (Varoquaux y col., 2000).

1.5 El etileno como iniciador de la maduración y desarrollo del fruto

Al iniciarse la maduración, la respiración aumenta hasta alcanzar un máximo llamado, pico climatérico, en el que la producción de CO₂ aumenta. Parece ser que el aumento climatérico de la respiración es una respuesta más al etileno. El etileno desempeña un papel importante en la iniciación y continuación de la maduración en frutos climatéricos como el tomate. Esta hormona vegetal, sintetizada a partir del aminoácido metionina (figura 2), es considerada la hormona de la maduración y de la senescencia de los vegetales (Bapat *et al.*, 2010).

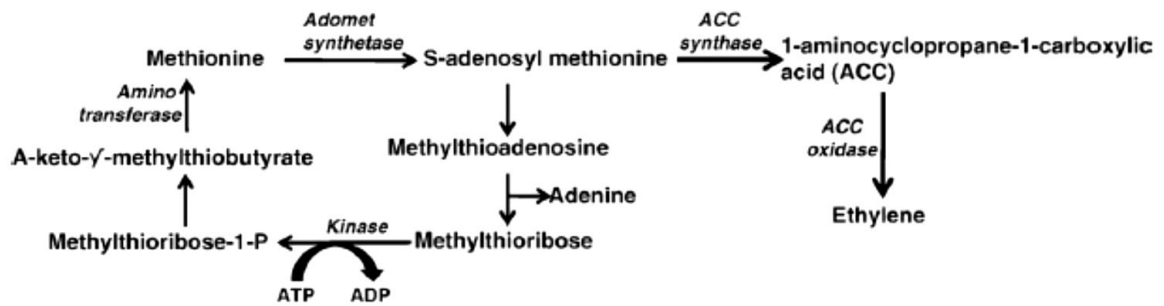


Figura 2. Síntesis del etileno. Fuente: V.A. Bapat *et al.*, 2010.

El etileno, C_2H_4 , coordina la expresión de genes que controlan diversos procesos asociados a la maduración (figura 3), tales como degradación de clorofila, síntesis de pigmentos, ablandamiento del fruto y producción de sustancias responsables del aroma y sabor (Bapat *et al.*, 2010).

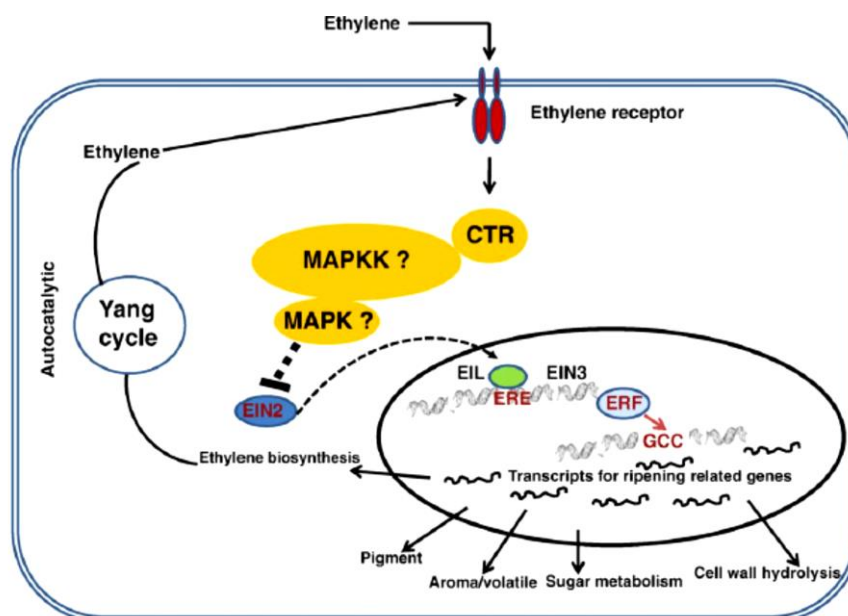


Figura 3. Ciclo del etileno. Fuente: V.A. Bapat *et al.*, 2010.

Al alcanzarse la madurez (estado verde maduro) el enzima ACC oxidasa del fruto, empieza a sintetizar etileno, el cual retroalimenta la actividad de la ACC sintetasa,

produciéndose un fuerte incremento de la síntesis de C_2H_4 . El papel del etileno durante la maduración no se restringe a la capacidad de biosíntesis de esta hormona de forma regulada en el tiempo y en los distintos tejidos. Si no que, también, la posesión de un determinado genotipo que provea de sensibilidad al etileno es otro factor clave. De hecho, se han descrito mutantes de tomate, tales como *ripening inhibitor (rin)*, *non-ripening (nor)*, *alcobaca (alc)* y *Never ripe (Nr)*, que muestran insensibilidad al etileno y cuyos frutos no maduran, sin que este aspecto afecte a otros procesos del desarrollo (Lozano et al., 2009).

Los frutos de *rin* y *nor* en homocigosis no maduran en absoluto. En heterocigosis, sólo *rin* y *alc* presentan frutos con una coloración roja similar a la normal (Nguyen *et al.*, 1991; Mutschler *et al.*, 1992). Por otro lado, la mutación *Nr* de tomate, es dominante y, por tanto, los frutos de las plantas mutantes *Nr/Nr* y *Nr/nr* son insensibles al etileno y no maduran ni aún en presencia de etileno exógeno. Los efectos del gen *Nr* dependen del cultivar del que se ha obtenido la mutación, y por ello en la variedad Pearson son totales, mientras que en Ailsa Craig, que retiene una respuesta residual al etileno, los efectos son parciales (Lanahan y col., 1994).

La expresión de una versión mutada del gen del receptor de etileno *ETR1* en tomate, inhibe la percepción al etileno y consecuentemente se produce un evidente retraso en la senescencia, abscisión de las flores y en la maduración de los frutos, similar al observado en el mutante *Nr*. Los frutos de las líneas transgénicas insensibles a etileno permanecen en un color amarillo-dorado después de tres meses de almacenamiento (Wilkinson y col., 1997).

En nuestro caso, este trabajo se ha centrado en el mutante *Never ripe* (Figura 4). Este gen se encuentra en el cromosoma 9 del genoma del tomate (Rick, 1980) y su función es independiente de la síntesis del etileno, por lo que esta mutación produce un fruto insensible a esta fitohormona (Hobson, 1967).



Figura 4. En la parte superior de la imagen se puede observar el cultivar *MoneyMaker* (MM), variedad control. En la parte inferior de la imagen, el mutante de maduración *Never ripe*. De izquierda a derecha se muestra la maduración del fruto en 3 estados (verde, “*breaker*” y *maduro*). Fuente: elaboración propia.

2. OBJETIVOS

Con los antecedentes descritos en el apartado anterior, los objetivos concretos de este Proyecto Fin de Máster fueron los siguientes:

1. Caracterizar una población compuesta por familias segregantes M2 de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) procedente de un programa de mutagénesis química llevado a cabo por el grupo de Genética y Fisiología del Desarrollo Vegetal de la Universidad de Almería.
2. Realizar una selección de familias M2 que posean nuevas características de calidad externa e interna del fruto que puedan ser utilizadas en futuros programas de mejora genética en tomate.
3. Realizar una selección de familias mutantes que posean la característica de producir frutos partenocárpicos con niveles de calidad externa e interna similares a las variedades comerciales.
4. Llevar a cabo la caracterización de los cruzamientos del mutante *eu1.8*, previamente seleccionado por el grupo AGR-176 por presentar frutos incapaces de completar la maduración, con plantas homocigóticas para las mutaciones *rin*, *nor*, *Nr* y *alc*, lo que permitiría dilucidar si la mutación *eu1.8* corresponde a un nuevo alelo de alguno de los genes de maduración ya descritos en tomate o por el contrario se trata de un nuevo gen implicado en este proceso.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material vegetal

En el presente trabajo se ha llevado a cabo la caracterización de una población compuesta por familias segregantes M2 de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Estas se obtuvieron mediante autopolinización de la primera generación mutagenizada M1 procedente de un programa de mutagénesis química llevado a cabo por el grupo de Genética y Fisiología del Desarrollo Vegetal (AGR-176) de la Universidad de Almería. Para el programa de mutagénesis química se utilizaron semillas del cultivar *Moneymaker* (MM) a las que se les aplicó un tratamiento mutagénico con etilmetanosulfonato (EMS). La población evaluada estaba formada por 200 familias M2, cada una de ellas constituida por 12 individuos, sumando un total de 2.400 plantas.

El mutante EMS de maduración de fruto denominado *eul.8*, ha sido previamente seleccionado por el grupo AGR-176 por presentar frutos incapaces de completar la maduración, manteniendo un color naranja en lugar del rojo característico de los frutos normales. Como parte de este trabajo de investigación, asimismo, se llevó a cabo un análisis de complementación, con el objeto de determinar si la mutación *eul.8* corresponde a un nuevo alelo de alguno de los genes de maduración ya descritos en tomate o por el contrario se trata de un nuevo gen implicado en este proceso. En concreto, se caracterizaron los cruzamientos del mutante *eul.8* con plantas homocigóticas para las mutaciones *ripening-inhibitor (rin)*, *non-ripening (nor)*, *Never-ripe (Nr)* y *alcobaca (alc)*. Como control de maduración se utilizaron los cultivares MM y *Ailsa Craig (AC)*.

Los ensayos fueron llevados a cabo durante la campaña de Primavera–Verano 2014 en las instalaciones de la Fundación UAL-ANECOOP, ubicada en los parajes “Los Goterones” de la localidad de Retamar (Término Municipal de Almería).

3.2 Caracterización fenotípica de familias segregantes M2

Para el estudio fenotípico de las familias M2 se definieron una serie de caracteres dentro de las categorías calidad interna y externa del fruto de tomate. Para llevar a cabo la evaluación de estos caracteres se recolectaron tres frutos de cada planta M2. Todos los frutos analizados se recolectaron del 2^{do} o 3^{er} ramo, descartando aquellos frutos situados en los extremos del ramo. Los caracteres evaluados se describen a continuación.

3.2.1 Calidad externa del fruto de tomate

3.2.1.1. Tamaño

El diámetro mayor de cada fruto recolectado fue medido con un calibre pie de rey digital. Estas medidas fueron realizadas en estado de madurez comercial.

3.2.1.2 Firmeza

La firmeza del fruto fue evaluada mediante el uso del penetrómetro digital DUROFEL de Agro Technologie. Dicho instrumento realiza medidas de compresión aplicando una fuerza para deformar el fruto. La fuerza aplicada es un indicador de la firmeza del fruto y es expresada como un porcentaje de fuerza máxima. Las estimas de firmeza se realizaron en el ecuador del fruto, efectuando compresiones en su diámetro mayor. Para analizar la evolución de este parámetro durante el periodo post-cosecha, se han obtenido valores de firmeza en tres momentos diferentes: el día de la cosecha de los frutos (día 0), posterior a una semana de haberse realizado la recolección de los frutos (día 7) y dos semanas después (día 14).

3.2.2 Calidad interna del fruto de tomate

3.2.2.1 Acidez (pH)

El pH del fruto se midió directamente con un pH-metro digital Crison PH25. Con el instrumento previamente calibrado, el electrodo de penetración se insertó a una profundidad de 5 mm en la placenta de cada uno de los frutos analizados en estado de madurez comercial. Los datos dados como unidades de pH son el resultado de tres medidas independientes en los tres frutos analizados por planta.

3.2.2.2 Contenido en sólidos solubles (° Brix)

Para determinar el contenido en sólidos solubles del jugo de tomate se utilizó el refractómetro digital de la marca ATAGO palette PR-101 α . Para ello se obtuvo una muestra del jugo de la pulpa de cada fruto en estado de madurez comercial y se echaron varias gotas en la superficie del prisma (con el instrumento previamente calibrado) hasta cubrirlo totalmente. Los resultados expresados en ° Brix son la media de tres medidas independientes de los tres frutos de cada planta.

3.2.2.3 Partenocarpia

Para comprobar si la población en estudio produce frutos partenocárpicos se realizaron emasculaciones en el 2° y 3° ramo de cada inflorescencia (aprox. 5 emasculaciones por ramo) de cada planta. Posteriormente, se evaluó la producción de frutos sin semilla con características similares a las del control.

3.3 Análisis estadísticos

El test estadístico Chi-cuadrado (χ^2) fue utilizado para analizar si la segregación observada en una familia M2 se ajusta a la segregación esperada para un carácter monogénico y recesivo (i.e. 3 silvestres: 1 mutante) con una probabilidad $P > 0,05$. Posteriormente, se realizó el análisis estadístico LSD (Least Significant Difference) para comprobar si existen diferencias significativas entre el valor medio del control y la media de los individuos mutantes identificados en cada familia M2 ($P < 0,05$).

3.4 Análisis de complementación alélica del mutante *eu1.8*

Conjuntamente a la evaluación fenotípica de los cruzamientos del mutante *eu1.8* con plantas homocigóticas para las mutaciones *rin*, *nor*, *Nr* y *alc*, se llevó a cabo la secuenciación del gen *Nr*. A continuación se muestran los pasos realizados para obtener las secuencias en los diferentes genotipos evaluados.

3.4.1 Extracción de ADN

Las muestras consistieron en folíolos de las plantas MM, AC, *Nr* y F1 (*eu1.8* x *Nr*). Las muestras se colocaron dentro de tubos Eppendorf que contenían bolas de tungsteno 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. Consistió en la adición de 300 μ l de DNAzol hasta descongelar la muestra vegetal, seguido de 300 μ l 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 μ l de etanol al 100%, se centrifugó a 7.500g durante 4 minutos y se eliminó esta vez el sobrenadante. Luego se lavó el pellet utilizando 300 μ l de solución de lavado compuesta de DNAzol y etanol en proporción 4:3 vol., respectivamente. Se centrifugó (7.500g, 4 minutos) y el pellet se lavó con 300 μ l de etanol al 70%, seguido de otra centrifugación (7.500g, 4 minutos).

Posteriormente se eliminó todo el etanol utilizando una pipeta y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente dentro de una campana extractora de gases durante aproximadamente 30 minutos. Una vez seco, el pellet se disolvió en 50 μ l 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 molecular λ /HindIII. Una vez cuantificado se prepararon alícuotas de 10 ng/ μ l de ADN para proceder al genotipado mediante PCR.

3.4.2 Genotipado mediante PCR

El ADN genómico fue utilizado como molde para la amplificación. Para cada reacción de PCR se usó 1 μ l de ADN (10 ng/ μ l); 20 μ l de agua destilada estéril; 3 μ l de Buffer NH₄ 10X; 2,4 μ l de dNTP 2,5 mM; 1,5 μ l de MgCl₂ 50 mM; 0,10 μ l de BIOtaq Pol (Bioline); 1 μ l (0,33 μ M) de cada uno de los miembros de la pareja de cebadores utilizados en cada caso, para un volumen final de 30 μ l. Las reacciones de PCR se realizaron en el termociclador Eppendorf Mastercycler® Pro S. El programa utilizado comenzó con un primer paso de desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 30 seg a 94 °C, 30 seg a 60 °C y 2 min 30 seg a 72 °C y por último, una extensión final de 5 min a 72 °C.

A partir de la secuencia del gen *NR*, obtenida de la base de datos SGN (Solanacea Genomics Networks - <http://www.sgn.cornell.edu>), se diseñaron 11 parejas de cebadores en regiones solapantes de dicho gen. Los cebadores empleados se diseñaron utilizando el programa Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) y se muestran en la Tabla 1.

La PCR se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa preparado al 1% en tapón SB 1X, utilizando 1kb DNA Ladder (Invitrogen) como marcador de tamaño. El gel fue teñido con bromuro de etidio al 1% y visualizado en el transiluminador de luz ultravioleta Alliance 4.7 (Uvitec), para ser posteriormente fotografiado.

Tabla 1. Cebadores utilizados para el genotipado mediante PCR.

Forward	Secuencia 5'-3'	Reverse	Secuencia 5'-3'
NR-F1	TGGGCTTGGAATGAGAAAATGA	NR-R1	TACTCACCGGAATCACGCTG
NR-F2	GTCGCAGCAGGAAATAGCAT	NR-R2	CTACCACGCCGAAAAGAAAA
NR-F3	TTGGTAAGTTCAGGAGATAAAAAGG	NR-R3	TTGTACAATTGGAGCCAAACA
NR-F4	TGTTGAAGACTCTGTTGATGCTG	NR-R4	TCGTTTCGTCCCAAAGAATC
NR-F5	TTGGTTGCAATGATCAGGAA	NR-R5	GGGAAAGTTGCAAAGTCAGG
NR-F6	CTGCATGCTTCCCATACAGA	NR-R6	TTCATCGGGAGAACCAGAAC
NR-F7	AGACCTGGCAGAATGTGCTT	NR-R7	ACCGACACCAGAGTCTGAGC
NR-F8	CAATCTTTGCCCTTGCTTTC	NR-R8	AATTAACGGCCTGCAAATCA
NR-F9	TTGAAGAGCAGCAATCTTCTTG	NR-R9	CGGACAATCTGAAGGGAAGA
NR-F10	AAGCCAGCAAAGAATCAGGA	NR-R10	GACATCCCACCATCATCTCC
NR-F11	CTCCCAGAGGCAGATTGAAC	NR-R11	GATTGAAGGTTGAGGCTTGG

3.4.3 Secuenciación y análisis bioinformático

Una vez verificado, el producto de las reacciones de PCR fue purificado mediante la técnica de cromatografía de afinidad siguiendo las indicaciones del protocolo del kit GenElute™ PCR (Sigma-Aldrich). Los productos de PCR purificados fueron utilizados como DNA molde en las reacciones de secuenciación, empleando cada uno de los cebadores específicos de cada fragmento amplificado anteriormente.

Las reacciones de secuenciación se realizaron utilizando los reactivos BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Cada reacción estaba compuesta por 5 µl de DNA molde, 1 µl de cebador, 1,5 µl de 5X Sequencing Buffer, 1 µl de Ready Reaction Mix y 1,5 µl de agua destilada estéril, para un volumen final de 10 µl. Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador Eppendorf Mastercycler® Pro S, utilizando el programa compuesto por un primer paso de desnaturalización a 96°C durante 1 min, seguido por 25 ciclos de 10 seg a 96 °C, 5 seg a 50 °C y 4 min 60 °C, y por último, dejar enfriar hasta 4 °C.

El producto de la reacción de PCR de secuenciación (10 µl) fue precipitado mediante adición de 1 µl de EDTA 125mM, 1 µl de Acetato de Sodio 3M y pH 5,2 y 25 µl de Etanol 100%. Esta reacción fue mezclada en un agitador vórtex y se dejó incubar en oscuridad y a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después de la incubación, se centrifugó a 12.000g durante 15 minutos, se retiró el sobrenadante y se añadió 35 µl de etanol 70%. Después de mezclar bien, se centrifugó 10 minutos a 12.000g. Una vez finalizada la centrifugación, se eliminó el sobrenadante, y se dejó secar el pellet. Posteriormente, las muestras se resuspendieron en 10 µl de formamida desionizada y fueron secuenciadas mediante la técnica de electroforesis capilar en un secuenciador automático ABIPRISM 3130XL (Applied Biosystems), obteniendo los cromatogramas correspondientes a cada uno de los fragmentos analizados.

Las secuencias obtenidas fueron alineadas mediante el programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), para determinar la existencia de polimorfismos a nivel de nucleótidos en la región codificante del gen *NR*.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis de la calidad del fruto en una población de familias segregantes M2

Se ha realizado la caracterización fenotípica de una población M2 de mutantes de tomate con la finalidad de seleccionar aquellas familias que muestren una mayor aptitud en lo que a calidad de fruto se refiere. Para lograr tal objetivo, se han estudiado una serie de parámetros que afectan de forma directa a la calidad del fruto (tamaño, firmeza, acidez y contenido en sólidos solubles), del mismo modo también se ha evaluado la producción de frutos partenocárpicos en cada uno de los individuos muestreados.

El análisis fenotípico de cada uno de los caracteres evaluados se ha llevado a cabo teniendo como referencia la variedad de tomate *Moneymaker* (MM). Esta variedad ha destacado por poseer frutos de tamaño medio de $56,58 \pm 2,71$ mm, una firmeza media de 86,50% en el día 0 y 62,50% en el día 14, un pH de $3,94 \pm 0,10$, así como una cantidad de sólidos solubles de $5,81 \pm 0,09$ ° Brix. Cualquier variación significativa respecto a los parámetros de calidad de MM se ha considerado como posible alteración causada por una mutación originada durante el tratamiento con EMS.

4.1.1 Calibre

La evaluación de la población M2 ha permitido seleccionar 8 familias por presentar individuos cuyos frutos presentaron un tamaño que difería significativamente del control MM. Así, los valores medios relativos al tamaño del fruto de los individuos mutantes en las familias M2 seleccionadas variaron desde los $27,97 \pm 1,61$ mm hasta los $44,01 \pm 1,55$ mm (Tabla 2). Los individuos mutantes de todas las familias M2 seleccionadas presentaron un tamaño inferior al control ($56,58 \pm 2,71$ mm). La segregación observada en las 8 familias M2 seleccionadas se ajustó a una segregación de 3 plantas silvestres por 1 planta mutante, que se corresponde con la segregación esperada para un carácter de naturaleza recesiva.

4.1.2 Firmeza

La firmeza es una de las principales características en la cual se basa el consumidor a la hora de adquirir un determinado tipo de tomate. En este trabajo ha sido evaluada mediante compresión, siendo el valor de todos los individuos mutantes identificados inferior al control MM, tanto en el día 0 como en el día 14. Para futuros ensayos se debería dirigir la atención a las condiciones de temperatura del invernadero donde se ha realizado el ensayo, ya que una elevada temperatura puede afectar gravemente a la firmeza del fruto y a su estado de maduración.

4.1.3 Acidez

Se han encontrado un total de 3 familias M2 que presentaron individuos cuyos frutos presentaron un valor de pH que difería significativamente del control MM. Los valores medios relativos al pH de los individuos mutantes en estas familias oscilaron entre $4,44 \pm 0,04$ y $4,58 \pm 0,05$ (Tabla 3). Todos ellos presentaron niveles de pH superiores al control MM ($3,94 \pm 0,10$). La segregación observada en las 3 familias M2 seleccionadas se ajustó a la segregación esperada para un carácter de naturaleza recesiva.

Tabla 2. Familias M2 seleccionadas para el carácter tamaño de fruto (mm).

Familias	\bar{X} mut	Segregación observada	χ^2 (P)
7-369	$30,07 \pm 1,49^*$	9 wt : 3 mut	0,00 (1,00)
7-371	$31,73 \pm 0,78^*$	9 wt : 3 mut	0,00 (1,00)
7-409	$29,43 \pm 3,12^*$	10 wt : 2 mut	0,44 (0,50)
7-403	$44,01 \pm 1,55^*$	8 wt : 3 mut	0,03 (0,86)
7-353	$41,39 \pm 2,34^*$	9 wt : 3 mut	0,00 (1,00)
7-316	$27,97 \pm 1,61^*$	6 wt : 5 mut	2,45 (0,16)
7-319	$30,57 \pm 2,13^*$	9 wt : 3 mut	0,00 (1,00)
7-351	$35,84 \pm 0,94^*$	9 wt : 3 mut	0,00 (1,00)

Valor medio MM (control): $56,58 \pm 2,71$ mm.

*Diferencias significativas respecto al control MM ($P < 0,05$).

Tabla 3. Familias M2 seleccionadas para el carácter acidez (pH).

Familias	\bar{X} mut	Segregación observada	χ^2 (P)
7-397	4,58±0,05*	8 wt : 2 mut	0,13 (0,72)
7-365	4,49±0,10*	9 wt : 2 mut	0,27 (0,60)
7-334	4,44±0,04*	7 wt : 3 mut	0,13 (0,72)

Valor medio MM (control): pH 3,94±0,10.

*Diferencias significativas respecto al control MM (P < 0,05).

Tabla 4. Familias M2 seleccionadas para el carácter sólidos solubles (° Brix).

Familias	\bar{X} mut	Segregación observada	χ^2 (P)
7-313	9,31±0,26*	9 wt : 3 mut	0,00 (1,00)
7-316	8,72±0,23*	9 wt : 3 mut	0,00 (1,00)
7-319	9,33±0,37*	11 wt : 1 mut	1,78 (0,18)
7-320	9,57±0,98*	10 wt : 1 mut	1,48 (0,22)
7-327	8,73±0,26*	9 wt : 3 mut	0,00 (1,00)
7-339	9,03±0,17*	10 wt : 2 mut	0,44 (0,50)
7-341	9,19±0,50*	8 wt : 4 mut	0,44 (0,50)
7-343	9,00±0,62*	9 wt : 1 mut	1,20 (0,27)
7-344	8,87±0,29*	11 wt : 1 mut	1,78 (0,18)
7-345	9,40±0,32*	11 wt : 1 mut	1,78 (0,18)
7-347	8,79±0,13*	9 wt : 3 mut	0,00 (1,00)
7-350	8,87±0,29*	11 wt : 1 mut	1,78 (0,18)
7-351	8,97±0,03*	11 wt : 1 mut	1,78 (0,18)
7-352	8,87±0,19*	10 wt : 1 mut	1,48 (0,22)
7-356	8,97±0,22*	11 wt : 1 mut	1,78 (0,18)
7-357	8,27±0,13*	11 wt : 1 mut	1,78 (0,18)
7-360	8,40±0,11*	9 wt : 1 mut	0,27 (0,60)
7-361	8,03±0,23*	11 wt : 1 mut	1,78 (0,18)
7-365	8,53±0,24*	9 wt : 1 mut	1,20 (0,27)
7-367	9,00±0,44*	8 wt : 3 mut	0,03 (0,86)
7-368	9,51±0,15*	7 wt : 3 mut	0,13 (0,72)
7-369	8,23±0,08*	10 wt : 2 mut	0,44 (0,50)
3-373	8,87±0,58*	11 wt : 1 mut	1,78 (0,18)
3-375	8,40±0,23*	11 wt : 1 mut	1,78 (0,18)
3-376	8,80±0,23*	10 wt : 1 mut	1,48 (0,22)
7-377	8,67±0,12*	11 wt : 1 mut	1,78 (0,18)
7-380	9,05±0,35*	10 wt : 2 mut	0,44 (0,50)
7-384	8,48±0,15*	10 wt : 2 mut	0,44 (0,50)
7-385	8,67±0,16*	10 wt : 2 mut	0,44 (0,50)

7-387	8,65±0,14*	10 wt : 2 mut	0,44 (0,50)
7-388	8,63±0,19*	10 wt : 1 mut	1,48 (0,22)
7-389	9,08±0,34*	10 wt : 2 mut	0,44 (0,50)
7-392	8,40±0,06*	10 wt : 1 mut	1,48 (0,22)
7-394	8,67±0,27*	11 wt : 1 mut	1,78 (0,18)
7-397	8,63±0,07*	9 wt : 3 mut	0,00 (1,00)
7-407	9,50±0,70*	10 wt : 1 mut	1,48 (0,22)
7-409	8,37±0,12*	10 wt : 1 mut	1,48 (0,22)

Valor medio MM (control): 5,81±0,09 ° Brix

*Diferencias significativas respecto al control MM (P < 0,05).

4.1.4 Sólidos solubles (° Brix)

Se han seleccionado un total de 37 familias M2 para el carácter sólidos solubles (° Brix). Los valores medios relativos a la cantidad de sólidos solubles en los individuos mutantes de estas familias fluctuaron entre 8,03±0,23 y 9,57±0,98 ° Brix (Tabla 4). Todos los individuos mutantes identificados presentaron niveles de ° Brix superiores al control MM, el cual posee 5,81±0,09 ° Brix. En las 37 familias M2 seleccionadas, la segregación observada se ajustó a la segregación esperada para un carácter de naturaleza recesiva.

4.1.5 Partenocarpia

Entre las 200 familias M2 evaluadas, se han encontrado dos plantas (7-373-7 y 7-284-4) que presentaron frutos partenocárpicos (Figura 5A). Además, se evaluó el calibre, la acidez y la cantidad de sólidos solubles en los frutos de estas dos plantas (Figura 5B). En tomate, la partenocarpia con frecuencia produce frutos sin semillas más pequeños que los frutos con semillas (Scott y Geroge, 1983; Pholouze, 1987). En este trabajo, las dos plantas mutantes identificadas presentaron frutos de inferior tamaño al control MM (56,58±4,43 mm), siendo 41,19±3,04 mm el tamaño de la planta 7-373-7 y 43,35±1,83 mm el de la planta 7-284-4. Sin embargo, los valores de acidez y de sólidos solubles han superado al control, el cual posee 3,94±0,10 y 5,81±0,09 ° Brix respectivamente. Se han registrado valores de acidez de 4,45±0,11 para 7-373-7 y 4,35±0,18 para 7-284-4 y 6,50±0,30 ° Brix en la planta 7-373-7 y 6,18±0,28 ° Brix en 7-284-4, en cuanto a sólidos solubles.

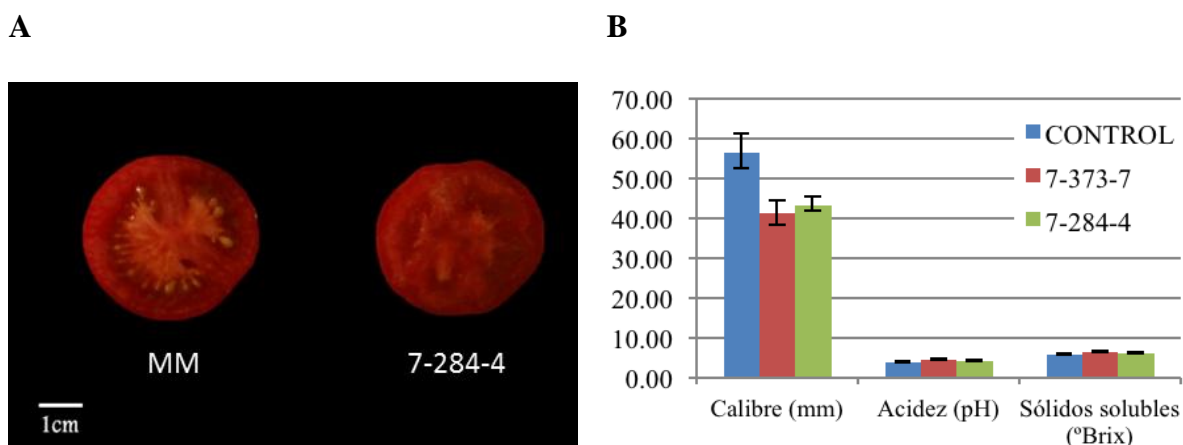


Figura 5. A. Sección transversal de un fruto control MM y de un fruto partenocárpico del mutante 7-284-4. **B.** Calibre, acidez y sólidos solubles de los frutos partenocárpicos y el control MM.

Entre las familias M2 seleccionadas, destaca la familia 7-365, cuyos individuos mutantes mostraron valores significativamente superiores a el control MM para los caracteres acidez y cantidad de sólidos solubles. Este conjunto de familias seleccionadas y, especialmente la familia 7-365, constituye un material vegetal de interés para futuros programas de mejora genética dirigidos a obtener variedades con una mayor aptitud en lo que a calidad de fruto se refiere.

4.2 Análisis de complementación alélica del mutante *eu1.8*

Se ha llevado a cabo la caracterización de los cruzamientos del mutante *eu1.8* con plantas homocigóticas para las mutaciones *rin*, *nor*, *Nr* y *alc*, con el objeto de determinar si la mutación *eu1.8* corresponde a un nuevo alelo de alguno de los genes de maduración ya descritos en tomate o por el contrario se trata de un nuevo gen implicado en este proceso.

Tras el cuajado, desarrollo y maduración de los frutos de las diferentes poblaciones F1, se observó que todas las plantas procedentes de los cruzamientos entre el mutante *eu1.8* con los mutantes *alc* (Figura 7), *nor* (Figura 8) y *rin* (Figura 9) dieron lugar a frutos que maduraron como los frutos de las plantas control (i.e. cultivares MM y AC). Las mutaciones *eu1.8*, *alc*, *nor* y *rin* son de naturaleza recesiva; por tanto, los resultados indicaron que la mutación *eu1.8* no es un nuevo alelo de los genes *ALC*, *NOR* y *RIN*,

puesto que de haberlo sido todas las plantas F1 deberían presentar frutos de color anaranjado.

Por otro lado, las plantas F1 del cruzamiento de *eul.8* con *Nr* presentaron frutos anaranjados que no son capaces de madurar a rojo (Figura 10). Este resultado podría indicar que ambas mutaciones son alelos de un mismo locus; sin embargo, *Nr* es una mutación de naturaleza dominante, por lo que no es posible determinar si ambas mutaciones complementan en plantas de la generación F1. Por ello, se procedió a secuenciar el gen *NR*, con el objeto de analizar si existen diferencias nucleotídicas en la región codificante de dicho gen.



Figura 7. Estados de maduración.
Arriba: Control AC.
Abajo: *eul.8* x *alc*



Figura 8. Estados de maduración.
Arriba: Control AC.
Abajo: *eul.8* x *nor*



Figura 9. Estados de maduración.
Arriba: Control AC.
Abajo: *eul.8* x *rin*



Figura 10. Estados de maduración.
Arriba: Control AC.
Abajo: *eul.8* x *Nr*

4.2.1 Secuenciación del gen *NR*

A partir de la secuencia del gen *NR*, obtenida de la base de datos SGN (Solanacea Genomics Networks - <http://www.sgn.cornell.edu/>), se diseñaron 11 parejas de cebadores para amplificar la región codificante de dicho gen. Estas once parejas de cebadores fueron evaluadas en los genotipos *Nr*, *eul.8* y F1 (*eul.8* x *Nr*), así como en los genotipos control MM y AC. Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa. Posteriormente, el gel fue teñido con bromuro de etidio y visualizado en el transiluminador de luz ultravioleta. No se encontraron diferencias en el tamaño de los amplicones obtenidos en los diferentes genotipos analizados. Por ello, para analizar si existen o no diferencias nucleotídicas entre las secuencias amplificadas, se procedió a secuenciar dichos amplicones.

Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante el programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Así, se realizó un alineamiento múltiple con las secuencias nucleotídicas de cada uno de los genotipos evaluados. Los resultados mostraron que las secuencias del mutante *eul.8* no presentan diferencias nucleotídicas con las secuencias obtenidas en los genotipos control (i.e. MM y AC).

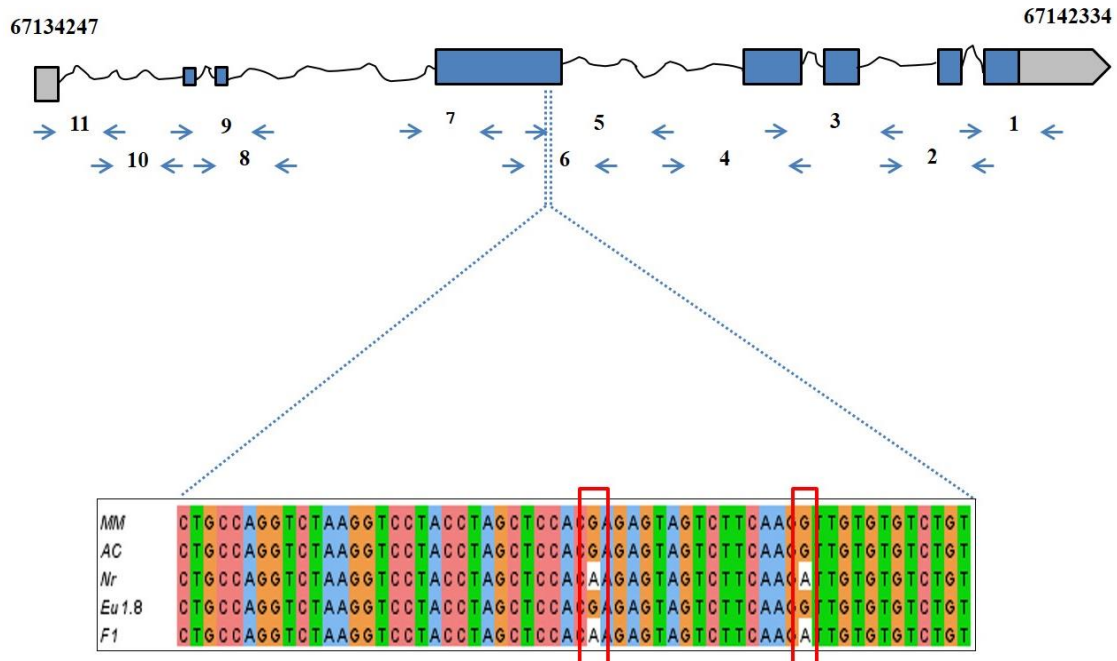


Figura 11. Arriba: Estructura génica del gen *NR* y disposición de los cebadores utilizados para secuenciar la región codificante de dicho gen. Abajo: Alineamiento de las secuencias amplificadas en los diferentes genotipos evaluados: MM (*Moneymaker*), AC (*Ailsa craig*), *Nr* (*Never ripe*), *eu1.8* y F1 (*eu1.8* x *Nr*). Se descacan en rojo las zonas con mutaciones puntuales.

La mutación *Nr*, descrita por Jack *et al.* (1995), se debe al intercambio de dos guaninas (G) por dos adeninas (A) en el cuarto exón de dicho gen (Figura 11). Estas dos mutaciones puntuales alteran la secuencia de aminoácidos del dominio de unión a etileno de la proteína NR. De este modo, el mutante *Nr* es insensible al proceso de maduración por etileno, permaneciendo sus frutos de un color anaranjado e incapaces de madurar a rojo. Los resultados mostraron que las secuencias del mutante *Nr* y la F1 (*eu1.8* x *Nr*) presentan ambos polimorfismos; sin embargo, estas mutaciones no se observaron en el mutante *eu1.8*, ni en las plantas control MM y AC.

Por tanto, los resultados indican que la región codificante del gen *NR* en el mutante *eu1.8* no presenta alteraciones a nivel nucleotídico. No obstante, no puede descartarse la existencia de polimorfismos en las regiones no codificantes de dicho gen. Por este motivo, se decidió evaluar una población F2 del cruzamiento *eu1.8* x *Nr* con el objeto de observar la segregación del fenotipo de maduración en dicha población. En el caso de que ambas mutaciones fueran alelos de un mismo locus, todas las plantas producirían frutos anaranjados. Si por el contrario, ambas mutaciones se encuentran en distintos loci, la

segregación esperada sería de 13 plantas con frutos anaranjados frente a 3 planta con frutos rojos.

4.2.2 Evaluación de la población F2 (*eu1.8* x *Nr*)

Se han analizado los frutos de 21 plantas F2 del cruzamiento *eu1.8* x *Nr* para determinar si la mutación *eu1.8* corresponde a un nuevo alelo del gen *NR* o por el contrario esta mutación afecta a un nuevo gen implicado en el proceso de maduración de tomate. La segregación observada fue la siguiente: 15 plantas con frutos anaranjados frente a 6 plantas con frutos rojos (similar a los obtenidos en las plantas control: MM y AC). De este modo, los resultados indicaron que las mutaciones *eu1.8* y *Nr* no son alelos de un mismo locus.



Figura 12. Frutos maduros del cultivar control *MoneyMaker* (MM, a la izquierda) y del mutante *eu1.8* (3 frutos, a la derecha).

Si denominamos al gen *NR* como A y al gen *EU1.8* como B, la segregación esperada para dos genes independientes sería 9 (A-B-) : 3 (A-bb) : 3 (aaB-) : 1 (aabb). Dado que las mutaciones *eu1.8* y *Nr* son de naturaleza recesiva y dominante, respectivamente, las plantas de fenotipos silvestre (frutos rojos) presentarían el genotipo aaB-, mientras que las plantas con frutos anaranjados podrían ser A-B-, A-bb o aabb. Entre las plantas con frutos anaranjados, 12 individuos F2 mostraron frutos de forma redondeada, similar a los frutos *Nr*, por lo que su genotipo sería del tipo A-B-. Además de estas 12 plantas, se encontraron 3 individuos F2 que presentaron frutos de color naranja pero en este caso de forma cuadra (Figura 12). Estos frutos son similares a los frutos producidos por el mutante *eu1.8*; sin embargo, es imposible diferenciar si estos frutos son del doble mutante *eu1.8:Nr* (A-bb) o del mutante simple *eu1.8* (aabb). Por este motivo, ambos genotipos (A-bb y aabb) fueron considerados como una única clase. El test

estadístico Chi-cuadrado (χ^2) mostró que la segregación observada (12:3:6; $\chi^2 = 0,89$, $P = 0,36$) se ajusta a la segregación esperada con una probabilidad $P > 0,05$.

Por tanto, aunque serán necesarios más experimentos para evaluar los mecanismos fisiológicos que afectan al proceso de maduración de los frutos del mutante *eul.8*, los resultados claramente muestran que la mutación *eul.8* afecta a un nuevo gen de tomate implicado en dicho proceso de maduración. Este nuevo mutante de maduración, *eul.8*, constituye un material vegetal de interés para futuros programas de mejora hortícola destinados a obtener variedades comerciales de tomate larga vida.

5. CONCLUSIONES

Las conclusiones que pueden extraerse del presente Trabajo Fin de Máster se exponen a continuación:

1. El conjunto de familias M2 seleccionadas en relación a los caracteres de calidad de fruto (calibre, firmeza, acidez, contenido en sólidos solubles y partenocarpia) constituye un material vegetal de interés para futuros programas de mejora genética dirigidos a obtener variedades con una mayor aptitud en lo que a calidad de fruto se refiere.
2. Entre las familias M2 seleccionadas, destaca la familia 7-365, cuyos individuos mutantes mostraron valores significativamente superiores a el control MM para los caracteres acidez y cantidad de sólidos solubles.
3. La mutación *eul.8* no es un nuevo alelo de los genes de maduración previamente descritos en tomate *ALC*, *NOR*, *RIN* y *NR*.
4. Los análisis de complementación alélica del mutante *eul.8*, así como la evaluación molecular, muestran que la mutación *eul.8* afecta a un nuevo gen implicado en el proceso de maduración de tomate.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Angosto, T., Borja, A. 2000. Mejora biotecnológica de la calidad de fruto, pp 125-148. En: R. Lozano e I. Cuadrado (eds), Biotecnología de cultivos hortícolas. FIAPA. Almería.
- Baoge, Z., G. Aigi, D. Xiangdoug, G. Yuxuan and L. Zixian, 1995. Effect of caffeine or EDTA post-treatment on EMS mutagenesis in soybean. *Mutat. Res.*, 334: 157-159.
- Bapat VA, Trivedi PK, Ghosh A, Sane VA, Ganapathi TR, Nath P. 2010. Ripening of fleshy fruit: molecular insight and the role of ethylene. *Biotechnol Adv* 28:94–107
- Barone, A., Chiusano, M.L., Ercolano, M.R., Giuliano, G., Grandillo, S., Frusciante, L. 2008. Structural and functional genomics of tomato. *Int J Plant Genomics*
- Basu SK, Acharya SN, Thomas JE. 2008b. Genetic improvement of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) through EMS induced mutation breeding for higher seed yield under western Canada prairie conditions. *Euphytica* 160(2):249–258
- Beckles, D.M. 2012. Factors affecting the postharvest sugar content of tomato *Solanum lycopersicum* L. fruit. *Postharvest Biol Technol* 63 (1): 129-140.
- Brock, R.D. 1971. The role of induced mutation in plant improvement. *Radiation Botany*, 11, 181-96
- Brummell, D.A, Harpster, M.H. 2001. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Mol Biol* 47: 3
- Capel, C., Fernández del Carmen, A., Alba, J.M., Lima-Silva, V., Hernández-Gras, F., a Salinas, M., Boronat, A., Angosto, T., Botella, M.A., Fernández-Muñoz, R., Granell, A., Capel, J., Lozano, R. 2015. Wide-genome QTL mapping of fruit quality traits in a tomato RIL population derived from the wild-relative species *Solanum pimpinellifolium* L. *Theoretical and Applied Genetics* (en prensa), DOI:10.1007/s00122-015-2563-4.
- Casas Diaz, A.V., Hewitt, J.D., Lapushner, D. 1987. Effects of parthenocarpy on fruit-quality in tomato. *J Amer Soc Hortic Sci* 112, 4, 634-637

- Causse, M., Duffe, P., Gomez, M.C., Buret, M., Damidaux, R., Zamir, D., Gur, A., Chevalier, C., Lemaire-Chamley, M., Rothan, C. 2004. A genetic map of candidate genes and QTLs involved in tomato fruit size and composition. *J. Exp. Bot.* 55, 1671–1685.
- Cubero, J.I. 2003. Introducción a la mejora genética vegetal. Ed. Mundiprensa.
- Dellapenna D., Alexander D.C., Bennett A.B. 1986. Molecular cloning of tomato fruit polygalacturonase: Analysis of polygalacturonase mRNA levels during ripening. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83(17): 6420–6424
- DellaPenna., D, Lashbrook C.C, Toenjes, K, Giovannoni, J.J, Fischer R.L, Bennett A.B. 1999. Polygalacturonase Isozymes and Pectin Depolymerization in Transgenic rin Tomato Fruit. *Plant Physiol*, 94(4), 1882-6.
- Esquinas-Alcázar, J., Nuez, F. 1995. Situación taxonómica, domesticación y difusión del tomate, pp 13-42. En: F. Nuez (ed.) *El cultivo del tomate*. Mundi-Prensa, Madrid.
- FAOSTAT. 2012. < <http://faostat.fao.org/> >.
- Fernández-Lozano, A., Yuste-Lisbona, F.J., Pérez-Martín, F., Pineda, B. Moreno, V., Lozano, R., Angosto T. 2015. Mutation at the tomato *EXCESSIVE NUMBER OF FLORAL ORGANS (ENO)* locus impairs floral meristem development, thus promoting an increased number of floral organs and fruit size. *Plant Science* 232: 41-48.
- Frary A, Nesbitt TC, Grandillo S, Knaap E, Cong B, Liu J, Meller J, Elber R, Alpert KB, Tanksley SD. 2000. fw2.2: a quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science* 289: 85–88
- Giovannoni, J. J., DellaPenna, D., Bennett, A. B., & Fischer, R. L. 1989. Expression of a chimeric polygalacturonase gene in transgenic rin (ripening inhibitor) tomato fruit results in polyuronide degradation but not fruit softening. *The Plant Cell*, 1(1), 53–63.
- Grierson, D., Kader A.A. 1986. Fruit ripening and quality, pp 241-280. En: JG Atherton, J Rudich (eds.), *The Tomato Crop: A Scientific Basis for Improvement*. Chapman and Hall, NY.
- Grime JP. 1979. *Plant strategies and vegetation process*. Chichester, New York: John Wiley

- Hobson, G.E. 1967. Phenolase activity in tomato fruit in relation to growth and to various ripening disorders. *J. Sci. Food Agric.* 18, 523–526
- Jones, R.A., Scott, S.J. 1983. Improvement of tomato flavor by genetically increasing sugar and acid contents. *Euphytica* 32: 845-855.
- Klee H.J. & Tieman D.M. 2013. Genetic challenges of flavor improvement in tomato. *Trends in Genetics* 29, 257–262.
- Lanahan MB, Yen HC, Giovannoni JJ, Klee HJ. 1994. The never ripe mutation blocks ethylene perception in tomato. *The Plant Cell* 6:521–530.
- Lozano, R., Giménez-Caminero, E., Cara, B., Capel, J., Angosto, T. 2009. Genetic analysis of reproductive development in tomato. *Int. J Dev Biol* 53: 1635-1648.
- Maunder, M., Holdsworth, M., Slater, A., Knapp, J., Bird, C., Schuch, W. et al. 1987. Ethylene stimulates the accumulation of ripening-related mRNAs in tomatoes. *Plant Cell Environ.* 10: 177–184
- Micke, A., Donini, B., Maluszynski, M. 1987. Induced mutations for crop improvement. A. Review. *Agric.*, 64: 259-278.
- Minoia, S., Petrozza, A., D’Onofrio, O., Piron, F., Mosca, G., Sozio, G., Cellini, F., Bendahmane, A., and Carriero, F. 2010. A new mutant genetic resource for tomato crop improvement by TILLING technology. *BMC Research Notes* 3, 69–69.
- Mutschler MA, Wolfe DW, Cobb ED, Yourstone KS. 1992. Tomato fruit quality and shelf life in hybrids heterozygous for the alc ripening mutant. *HortScience* 27: 352–355
- Nguyen V.Q., Ashcroft W.J., Jones K.J., McGlasson W.B. .1991. Evaluation of F1 hybrids incorporating the rin (ripening inhibitor) gene to improve the storage life and fruit quality of fresh market tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill) *Aust. J. Exp. Agric.*, 31 pp. 407-413
- Rick, C.M. 1978. The tomato. *Science*, 239: 66-76.
- Seymour, G.B, Chapman, N.H, Chew, B.L, Rose, J.K.C. 2013. Regulation of ripening and opportunities for control in tomato and other fruits. *Plant Biotech J* 11 (3): 269-278.

- Sjut V, Bangerth F. 1982. Induced parthenocarpy—a way of changing the levels of endogenous hormones in tomato fruits (*Lycopersicon esculentum* Mill.) 1. Extractable hormones. *Plant Growth Regulation* 1: 243-251.
- Sjut V, Bangerth F. 1984. Induced parthenocarpy—a way of manipulating levels of endogenous hormones in tomato fruits (*Lycopersicon esculentum* Mill.) 2. Diffusible hormones. *Plant Growth Regulation* 2: 49-56.
- Stommel, J.R., Abbott, J., Saftner, R.A., Camp, M. 2005. Sensory and objective quality attributes of beta-carotene and lycopene-rich tomato fruit. *J Amer Soc Hortic Sci* 130: 244-251.
- Strasburger, Eduard et al. 2004. *Tratado de botánica*. 35^a ed. Barcelona. Omega
- Tanksley SD. 2004. The genetic, developmental, and molecular bases of fruit size and shape variation in tomato. *Plant Cell* 16:S181–S189
- Van Der Ploeg A, Heuvelink E. 2005. Influence of sub-optimal temperature on tomato growth and yield: a review. *J Hortic Sci Biotechnol* 80: 652–659
- Varoquaux F, Blanvillain R, Delseny M, Gallois P. 2000. Less is better: new approaches for seedless fruit production. *Trends Biotechnol* 18: 233–242
- Waugh, R., Leader, D.J., McCallum, N., Caldwell, D. 2006. Harvesting the potential of induced biological diversity. *Trends in Plant Science* 11:71-79.
- Wilkinson, J.Q., Lanahan, M.B., Yen, H.C., Giovannoni, J.J. and Klee, H.J. 1995. An ethylene-inducible component of signal transduction encoded by *Never-ripe*. *Science* 270: 1807–1809.
- Winsor, G.W., Adams, P. 1976. Changes in the composition and quality of tomato fruit throughout the season. *Ann Rep Glasshouse Crops Res Inst.* 1975: 134.
- Yen, H.C., Shelton, B.A., Howard, L.R., Lee, S., Vrebalov, J., Giovannoni, J.J. 1997. The tomato high-pigment locus maps to chromosome 2 and influences plastome copy number and fruit quality. *Theor Appl Genet* 95 (7): 1069-1079.