

TRABAJO FIN DE GRADO

UNIVERSIDAD DE ALMERÍA
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

Caracterización fenotípica y molecular
de líneas CRISPR del gen *TOMATO
GASSHO (TGSO)*, implicado en el
desarrollo embrionario de tomate

Alumno: Juan Manuel Ocaña Gálvez

Curso Académico: 2020/2021

Director: Rafael Lozano Ruíz

Codirectora: Cristina Ramón Barros

Área de Genética

Departamento de Biología y Geología

Universidad de Almería



Contenido

| | |
|----------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Resumen | 3 |
| 1. Summary | 4 |
| 2. Introducción | 5 |
| 2.1 El tomate | 5 |
| 2.1.1 Domesticación y valor económico-social | 5 |
| 2.1.2 Descripción botánica | 6 |
| 2.2. El tomate como especie modelo en genómica de plantas cultivadas | 8 |
| 2.3 La metodología CRISPR/Cas9 | 9 |
| 2.4 Desarrollo embrionario en tomate | 11 |
| 2.5 Antecedentes | 14 |
| 2.5.1. Análisis genético y molecular del gen TGSO..... | 16 |
| 3. Objetivos..... | 19 |
| 4. Materiales y métodos..... | 20 |
| 4.1. Material vegetal | 20 |
| 4.1.1. Elaboración de las construcciones CRISPR | 20 |
| 4.1.2. Transformación mediante <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | 21 |
| 4.2. Caracterización molecular | 22 |
| 4.2.1. Extracción de DNA genómico y amplificación mediante PCR | 22 |
| 4.2.2. Ligación y transformación de <i>Escherichia coli</i> | 23 |
| 4.2.3. Purificación de DNA plasmídico | 24 |
| 4.2.4. Purificación del producto de PCR y secuenciación..... | 25 |
| 4.2.5. Análisis bioinformático de secuencias genómicas | 26 |
| 4.3. Caracterización fenotípica de líneas CRISPR | 26 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.3.1. Aislamiento y fenotipado de embriones | 26 |
| 4.3.2. Desarrollo embrionario en condiciones <i>in vitro</i> | 27 |
| 4.3.3. Fenotipado <i>in vivo</i> de plántulas CRISPR | 28 |
| 5. Resultados | 29 |
| 5.1. Caracterización genotípica de las líneas CRISPR de la progenie TG ₁ | 29 |
| 5.2. Caracterización fenotípica de embriones y plántulas TG ₁ procedentes de líneas CRISPR TG ₁ .. | 31 |
| 5.2.1. Caracterización fenotípica de embriones TG ₂ | 32 |
| 5.2.2. Caracterización fenotípica de plántulas TG ₂ | 34 |
| 5.2.2.1. Plántulas desarrolladas en condiciones de cultivo <i>in vitro</i> | 34 |
| 5.2.2.2. Plántulas crecidas <i>in vivo</i> | 35 |
| 5.3. Relación fenotipo embrionario-genotipo editado | 35 |
| 6. Discusión..... | 38 |
| 7. Conclusiones..... | 41 |
| 8. Bibliografía..... | 42 |

1. Resumen

La epidermis de los organismos vivos supone la barrera primaria frente al exterior, y, por tanto, desempeña una función esencial no solo en la protección frente a otros organismos y moléculas, sino también en la regulación de las interacciones fisicoquímicas del ser vivo con el mundo que lo rodea. En plantas, la epidermis se encuentra asociada a una barrera de tipo céreo llamada cutícula. El correcto desarrollo de la epidermis y de la cutícula constituye un proceso biológico complejo de especial relevancia pues de él depende el crecimiento de los distintos órganos vegetales, así como caracteres de interés agronómico como son la protección frente a factores externos y patógenos. Se desconocen en gran medida los genes que regulan el desarrollo de la epidermis, y más aún los mecanismos genéticos y moleculares implicados en dicho proceso. Recientemente, se ha descrito que los genes *GASSHO1* (*GSO1*) y *GSO-2* tienen una función clave en el desarrollo de la epidermis en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, si bien poco se ha estudiado el papel de este gen en otras especies de importancia agronómica como es tomate.

En este trabajo, se han caracterizado líneas de tomate en las que el gen *TOMATO GASSHO* (*TGSO*) ha sido silenciado totalmente mediante la metodología CRISPR/Cas9. A partir de estas líneas de silenciamiento se pretende analizar la función del gen *TGSO*, y si esta es homóloga a la que desempeña los genes *GSO* previamente descritos en *A. thaliana*. Para ello se llevó a cabo un estudio de los embriones generados por líneas *TG₂*, que presentaban en su mayoría deleciones de 4 o 7 nucleótidos en la secuencia de *TGSO*. Se encontró que el silenciamiento de este gen promueve letalidad en las últimas fases del desarrollo embrionario, lo que impedía el crecimiento de los embriones mutados en condiciones de cultivos *in vitro*. Además, se observaron fenotipos similares a los encontrados en los dobles mutantes *gso1-2* tales como la disposición del embrión en la semilla o la alteración del crecimiento. La caracterización de las líneas CRISPR indica que la función de *TGSO* es necesaria para el establecimiento de un correcto patrón de desarrollo embrionario en tomate, y así como para los posteriores procesos de diferenciación celular y crecimiento de los embriones de esta especie. En definitiva, el gen *TGSO*, aunque presente en una sola copia en el genoma de tomate, tendría una función homóloga a la que desempeñan, de forma redundante los genes *GSO1-2* de *A. thaliana*

1. Summary

The epidermis of living organisms is the primary barrier to the outside world, and therefore plays an essential role not only in protecting against other organisms and molecules, but also in regulating the physico-chemical interactions of the living organism with the surrounding world. In plants, the epidermis is associated with a waxy barrier called the cuticle. The correct development of the epidermis and cuticle is a complex biological process of special relevance, as the growth of the different plant organs depends on it, as well as characteristics of agronomic interest such as protection against external factors and pathogens. The genes that regulate the development of the epidermis, and even more so the genetic and molecular mechanisms involved in this process, are largely unknown. Recently, the *GASSHO1* (*GSO1*) and *GSO-2* genes have been described as having a key role in epidermal development in the model plant *Arabidopsis thaliana*, although the role of this gene in other agronomically important species such as tomato has been little studied.

In this work, we have characterised tomato lines in which the *TOMATO GASSHO* (*TGSO*) gene has been completely silenced using CRISPR/Cas9 methodology. From these silenced lines, the aim is to analyse the function of the *TGSO* gene, and whether it is homologous to that of the *GSO* genes previously described in *A. thaliana*. To this end, a study was carried out on embryos generated from *TG₂* lines, most of which had 4- or 7-nucleotide deletions in the *TGSO* sequence. Silencing of this gene was found to promote lethality in the late stages of embryonic development, which prevented the growth of the mutated embryos under in vitro culture conditions. In addition, phenotypes similar to those found in *gso1-2* double mutants such as embryo arrangement in the seed or growth impairment were observed. The characterisation of the CRISPR lines indicates that *TGSO* function is necessary for the establishment of a correct embryo development pattern in tomato, as well as for the subsequent processes of cell differentiation and embryo growth in this species. In short, the *TGSO* gene, although present in a single copy in the tomato genome, would have a function homologous to that performed redundantly by the *GSO1-2* genes of *A. thaliana*.

2. Introducción

2.1 El tomate

2.1.1 Domesticación y valor económico-social

El tomate cultivado (*Solanum lycopersicum* L.) es una planta eudicotiledónea que se ubica taxonómicamente en la familia de las Solanáceas, un grupo monofilético de gran importancia para la agricultura. También forman parte de esta familia otras especies cultivadas tan extendidas como la patata (*Solanum tuberosum* L.), el pimiento (*Capsicum annuum* L.) o la berenjena (*Solanum melongena* L.), entre otras 2.500 especies. Dentro de esta familia, el tomate pertenece a la subfamilia Solanoideae, que se caracteriza por sus frutos de tipo baya y sus semillas de tipo discoide plano, en cuyo interior se pueden encontrar embriones en disposición curva (Olmstead *et al.*, 2008).

La producción de tomates para consumo fresco supone un valor de 86.000 millones de dólares a nivel mundial, que se traduce en 181 millones de toneladas generadas al año. El principal exportador es China, que produce casi 60 millones de toneladas de forma anual, mientras que España queda como el octavo productor mundial con algo más de 5 millones de toneladas cada año (FAOSTAT, 2019). La producción está repartida en diferentes áreas de la Península, siendo Almería el segundo productor sólo por detrás de Badajoz. En concreto, Almería genera 888.000 toneladas de forma anual en unas 9.500 hectáreas frente a los casi 2 millones de toneladas que produce la provincia extremeña. Sin embargo, en esta última se produce mediante regadío al aire libre principalmente para consumo como tomate procesado (jugos, salsas...) frente al cultivo en invernadero que se utiliza en la provincia andaluza, centrado en la producción de tomate para su consumo fresco (MAPA, 2019).

Respecto a la domesticación de *Solanum lycopersicum* L., esta se produjo a partir de la especie *Solanum pimpinellifolium* L., cuyo origen se encuentra (al igual que en otras especies del género) en la región occidental del continente suramericano, concretamente en la región de los Andes que se ubica entre el sur de Colombia y el norte de Chile (Bergougnoux, 2014). Tras ello, se cree que el centro de domesticación fue México, en cuyos cultivares primitivos se han realizado estudios de semejanza mediante isoenzimas que reflejan una gran similitud con los cultivares europeos. A esto hay que sumar que el propio nombre “tomate” proviene de tomatl, que es como se le llamaba en “nahualt”, un lenguaje de los nativos centroamericanos, a este fruto (Blanca *et al.*, 2012). De esta región fue tomado por los colonos españoles en el siglo XV, que lo llevaron a la Península, que a su vez sirvió como punto de expansión para esta hortaliza por Europa a través de las diferentes rutas comerciales y colonias (Figura 1) (Esquinas-Alcázar & Nuez, 1995; Bai & Lindhout, 2007).

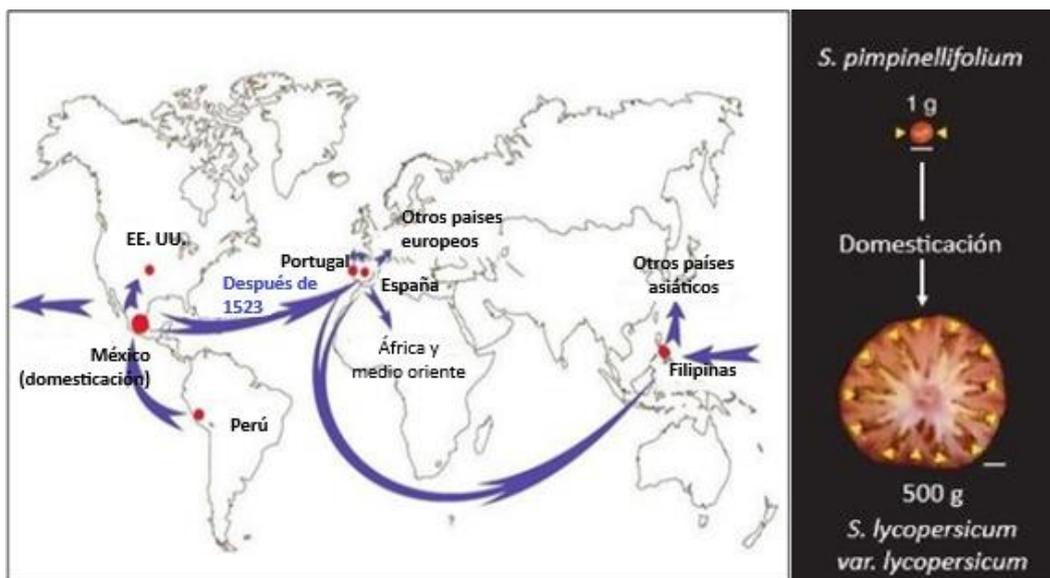


Figura 1. Origen geográfico y expansión del cultivo de tomate (izquierda) (Blancard, 2012). Comparación de los frutos de *S. pimpinellifolium* y *S. lycopersicum* var. *Lycopersicum* (derecha) (Rodríguez-Leal et al., 2017).

En concreto, el proceso de domesticación de tomate pasó por dos grandes etapas, una primera de pre-domesticación en la región andina, hasta llegar a lo que se conoce como *Solanum lycopersicum* variedad *cerasiforme*, con características y morfología intermedias entre la variedad cultivada y la de origen (Blanca et al., 2012), y una segunda que se puede definir más como un proceso de mejora en la que se alcanzó la especie actualmente cultivada *Solanum lycopersicum* variedad *lycopersicum* (Lin et al., 2014). Durante el proceso de domesticación de tomate se produjeron importantes cambios, los más importantes de los cuales promovieron una gran diversidad de formas de fruto, un aumento del número de lóculos y la dureza del pericarpo, o la reducción de la acidez (Razifard et al., 2020).

2.1.2 Descripción botánica

Taxonómicamente, el tomate se ubica en el Reino Plantae, división Magnoliophyta, clase Magnoliopsida, subclase Asteridae, Orden Solanales, suborden Solanineae, familia Solanaceae, género *Solanum* y especie *S. lycopersicum* (Foolad, 2007). Se trata de una planta autógama, de talla arbustivo y cultivo anual, pudiendo desarrollarse de forma rastrera, sermierecta o erecta. Respecto a su raíz, esta se caracteriza por presentar un eje principal corto, en contraposición con sus raíces secundarias, de mucho mayor número y potencia. En lo relativo a su parte aérea, presenta un tallo principal cuyo diámetro presenta valores entre los 2 y 4 cm, desarrollándose en él tanto ramificaciones secundarias de tipo simpodial como inflorescencias y hojas. Estas últimas serán de tipo compuesto e imparipinnado, de foliolos peciolados, lobulados y con borde dentado (Grandillo et al., 2011).

El tomate se caracteriza por patrón de crecimiento simpodial, lo que supone que tras la formación de las primeras 6-12 hojas durante la fase juvenil del desarrollo vegetativo, el meristemo apical del tallo (SAM) queda determinado, dando lugar a un meristemo de inflorescencia. Este paso activa al último meristemo axilar localizado en la axila de la última hoja, que pasa a denominarse meristemo simpodial, y que adquiere las funciones de meristemo apical primario. La actividad de este último permite proseguir el crecimiento vegetativo, ocupando una posición superior al meristemo de inflorescencia antes formado, hasta formar tres nuevas hojas; a continuación, este nuevo meristemo se determinará, formando un nuevo meristemo de inflorescencia. El conjunto formado por estas tres nuevas hojas y la nueva inflorescencia se denomina segmento simpodial. El proceso se repite de forma indeterminada a partir del meristemo situado en la axila de la última hoja del primer segmento simpodial (Thouet *et al.*, 2008; Lozano *et al.*, 2009).

En lo concerniente a la flor, estas se organizan formando inflorescencias de tipo cima racimosa, es decir, en forma de racimo. Habitualmente, estas se compondrán de hasta 12 flores hermafroditas que se abrirán de forma secuencial, pudiendo encontrar en una misma inflorescencia tanto flores como frutos en diferentes estadios del desarrollo (Welty *et al.*, 2007). Las flores de tomate son simétricas o actinomorfas, e hipóginas; se componen de cuatro verticilos, a saber, los formados por sépalos, pétalos, estambres y carpelos (desde el más externo al más interno). En el primer verticilo se desarrollan 5-6 sépalos verdes, que alternan con un número equivalente de pétalos de coloración amarilla en el segundo verticilo. Los estambres, en número de 5-6 se fusionan lateralmente para formar un cono estaminal que engloba al gineceo, asegurando la autofecundación del ovario, de tipo bilocular o plurilocular. Por su parte, el fruto de tomate es una baya, presentando tantos lóculos como carpelos se desarrollan en el ovario. Los principales tejidos a distinguir en el interior del fruto son el pericarpo, la placenta y el tejido locular, que alberga las semillas (Figura 2) (Castañeda, 2011 ; Martínez, 2015).

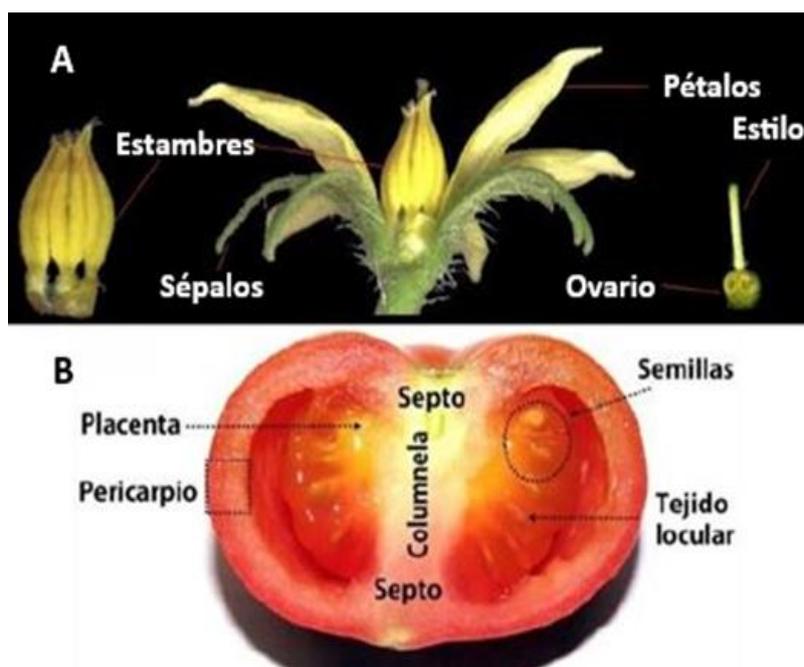


Figura 2. A) Disposición de los órganos en los distintos verticilos de la flor de tomate, B) Principales tejidos que se observan en un corte transversal del fruto de tomate (Martínez, 2015).

2.2. El tomate como especie modelo en genómica de plantas cultivadas

La importancia del tomate no se encuentra únicamente en su valor económico-social, sino que es utilizado como organismo modelo para la investigación de diversos caracteres, presentando varias características que hacen de él una especie idónea:

- Presenta 24 cromosomas ($2n=24$), siendo una especie diploide con un relativamente pequeño tamaño de genoma (900 Mb). Cuenta con 34.075 genes que se encuentran secuenciados completamente desde el año 2012 (Tomato Genome Consortium, 2012), de los cuales, 29.532 se encuentran anotados funcionalmente.
- Desde el primer protocolo de transformación genética (McCormick et al., 1986) se han desarrollado y optimizado diversos protocolos que permiten una alta eficacia de transformación mediante *Agrobacterium tumefaciens*, y regeneración de plántulas en esta especie, y entre los cuales destaca el de Ellul *et al.* (2003).
- Se trata una planta de reproducción autógama y con un corto periodo de generación. Además, es la única especie modelo con caracteres como hojas compuestas o frutos tipo baya de la que se dispone tanta información genética y número de mutantes (Kessler *et al.*, 2001; Kimura & Sinha, 2008).
- Exhibe una gran diversidad fenotípica para caracteres del fruto que afectan a caracteres de calidad externa (color, forma, tamaño, etc.) e interna (maduración, larga vida, contenido en compuestos de interés organoléptico y nutricional), tanto en variedades cultivadas como en variedades salvajes. Estas, además, pueden cruzarse entre sí, lo que hace al tomate una especie ideal para el análisis de QTLs y el estudio de genética cuantitativa (Gorguet *et al.*, 2008; Kimura & Sinha, 2008; Capel *et al.*, 2015).

La obtención de un genoma de tomate de referencia fue posible en el año 2012 como resultado de años de trabajo de un consorcio internacional público privado (The Tomato Genome Consortium, 2012). Este gran proyecto ha sido la base para posteriores proyectos de resecuenciación de buena parte de la diversidad genética presente en tomate y especies silvestres relacionadas, incluyendo genotipos con caracteres de interés agronómico; es el caso del proyecto “Tomato Inmune Response Resequencing” liderado por el Instituto de investigación Boyce Thompson (Roberts *et al.*, 2019) o el “100 Tomato Genomes Project” por la Universidad Johns Hopkins (Alonge *et al.*, 2020). Junto a la secuenciación de DNA cabe destacar los nuevos métodos de secuenciación masiva de RNA, que han permitido la construcción de varias bases de datos públicas sobre el nivel y el tejido de expresión de miles de genes de tomate como son *TomExpress* (<http://tomexpress.toulouse.inra.fr>) (Zouine *et al.*, 2017) o *Tomato Functional Genomics Database* (<http://ted.bti.cornell.edu>) (Fei *et al.*, 2010).

Actualmente, los avances en técnicas de secuenciación masiva han permitido disponer no solo del genoma secuenciado del tomate, sino también de otras especies emparentadas como son *S. pimpinellifolium* o *S. pennellii*, pudiendo acceder a todos ellos a través de la plataforma de *Sol Genomics Network* (solgenomics.net) (Fernandez-Pozo *et al.*, 2015). Precisamente estas especies silvestres han sido uno de los elementos más importantes en la investigación genética de esta

solanácea. Así, la presencia de estas y la capacidad de cruzar líneas mutantes con sus especies silvestres emparentadas han contribuido en gran medida para el estudio de sus caracteres y los genes que los controlan (Emmanuel & Levi, 2002). Para ello se han desarrollado un gran número de líneas mutantes, tanto naturales como inducidas, distinguiendo en este último caso la utilización de radiación (mutagénesis física) o mutágenos químicos como el etil-metanosulfonato (EMS). Estos se pueden encontrar en diferentes bancos de germoplasma, siendo uno de los más importantes es el Tomato Genetics Resource Center, adscrito a la Universidad California-Davis, donde se pueden encontrar más de 1.000 mutantes monogénicos de tomate (Rick, 1990).

Uno de los problemas que plantean los mutantes naturales e inducidos es encontrar la localización del gen mutante que causa el fenotipo observado. Por ello, una de las estrategias más utilizadas es la mutagénesis insercional. En esta, se realiza la que la transformación genética con un fragmento de secuencia conocida, este fragmento se insertará en un lugar aleatorio del genoma, interrumpiendo la secuencia de esa región. Así, si esta mutación genera un fenotipo de interés, la región mutada quedará marcada por una secuencia conocida (Perez-Martin *et al.*, 2017).

Sin embargo, recientemente se han puesto a punto metodologías de edición genética para regiones concretas del genoma con un alto grado de fiabilidad como es CRISPR-Cas9. Esta se ha desarrollado a partir de un mecanismo de defensa de origen bacteriano frente a virus para lograr ediciones precisas y estables con una eficiencia mayor al 80% (Ford *et al.*, 2019). Así, con este y otros avances en campos como en el de la bioinformática, se espera que se vean aceleradas tanto la investigación básica como la aplicación de esta al cultivo de especies de interés como es el tomate (Wada *et al.*, 2020).

2.3 La metodología CRISPR/Cas9

El término CRISPR/Cas9 tiene su origen en un sistema de defensa adaptativo frente a ácidos nucleicos exógenos encontrado en procariontes. Así, en un 45% de las bacterias y un 87% de las arqueas se han localizado elementos del genoma de secuencia corta repetida que se encuentran separados por secuencias específicas de DNA denominadas “espaciadores”. Esta disposición, descrita inicialmente en *Escherichia coli* K12 por Ishino *et al.* (1987), es la que da nombre al sistema, cuyas siglas significan “*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*” o “Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Espaciadas”. Estos espaciadores presentan secuencias propias de virus y plásmidos exógenos que son las que confieren resistencia adaptativa frente a los mismos mediante el reconocimiento por enzimas de restricción concretas, cuyos genes se encontrarán de forma adyacente a las regiones CRISPR (Li & Peng, 2019).

Así, el término Cas proviene de “*CRISPR associated*”. Las caspasas, que es como se conoce a estas endonucleasas, serán las que desarrollen dicho mecanismo defensivo mediante la realización de cortes de doble cadena. En concreto, llevan a cabo 3 funciones diferentes, a saber, adaptación, procesamiento e interferencia. La adaptación la llevarán a cabo al detectar DNA exógeno del que no

se presente ninguna secuencia en la región CRISPR. En este caso, las caspasas (en especial Cas1 y Cas2) son capaces de reconocer el DNA extraño y procesarlo, produciendo cortes en el mismo, con lo que se genera un fragmento de DNA que se introduce entre dos espaciadores de la región CRISPR (Thurtle-Schmidt & Lo, 2018).

La presencia de este elemento nuevo en la región CRISPR permite llevar a cabo la función de interferencia. Para ello, la entrada de una molécula de DNA que presente parte de su secuencia previamente en la región CRISPR será reconocida por proteínas de tipo caspasa, destacando la Cas9, procesando el DNA exógeno mediante cortes de doble cadena, lo que, por ejemplo, en el caso de virus, impediría que estos continuaran el ciclo infeccioso. Sin embargo, para el reconocimiento de regiones concretas en moléculas de DNA exógenas y el procesamiento de las mismas las caspasas deben asociarse a moléculas de RNA concretas denominadas crisprRNA o crRNA (Jinek *et al.*, 2014).

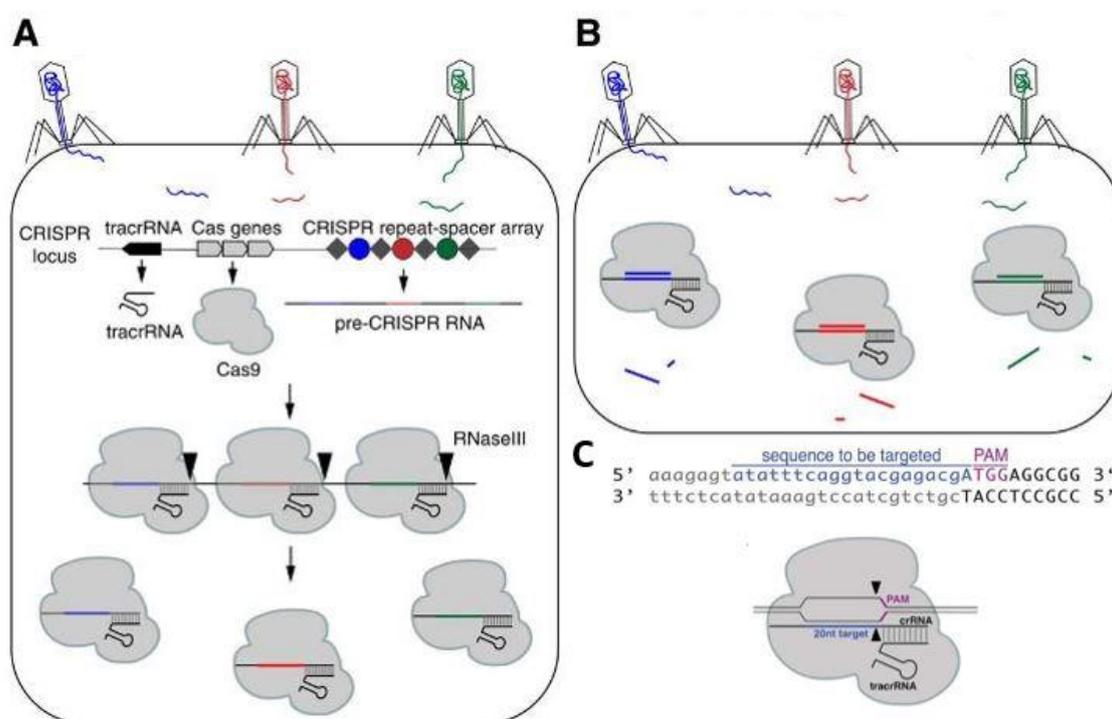


Figura 3. Mecanismo CRISPR/Cas en procariontes. A) Adquisición de la inmunidad. B y C) Procesamiento del DNA exógeno reconocido por el cr-RNA (Thurtle-Schmidt & Lo, 2018)

El crRNA se formará a partir de las secuencias espaciadoras, siendo moléculas de RNA complementarias a las mismas y, por tanto, a la secuencia del DNA a partir de donde se obtuvieron. De forma previa a la formación del crRNA maduro, se sintetizará una molécula de RNA inmadura llamada pre-crRNA. Junto a esta, se sintetizará también aguas arriba de la región CRISPR una molécula de RNA denominada “*trans activating crRNA*” o tracrRNA. Esta se caracterizará por presentar una región homóloga a la secuencia repetida de forma espaciada en la región CRISPR, lo que le permitirá asociarse al pre-crRNA, formando una molécula de RNA de doble cadena. Esta molécula será reconocida por la RNasa III, que la procesará, dando lugar al crRNA maduro, que conservará la región homóloga a la secuencia del espaciador. Esta se asociará a una caspasa, con lo que le permitirá a esta reconocer, mediante homología con la secuencia del crRNA, DNA exógeno que haya invadido

previamente la célula. Este reconocimiento provocará la activación de la caspasa, y, por tanto, el corte de doble cadena del DNA exógeno (Sampson *et al.*, 2013) (Figura 3).

Ante este mecanismo, se ha desarrollado un método de edición basado en los elementos del sistema CRISPR de procariontes. Así, mediante la transformación genética de un DNA concreto (de secuencia igual a la de una región del genoma a editar y que debe presentar junto a él una secuencia de 3 nucleótidos concreta denominada PAM, necesaria para la unión de la endonucleasa) junto al *single-guide* RNA o sgRNA (que contendrá la secuencia necesaria para la formación del crRNA maduro) y una construcción que permita la síntesis de la Cas9 por parte de la célula, es posible generar un corte de doble cadena en un punto concreto del DNA. No obstante, la finalidad de este corte no será la separación del DNA cromosómico, sino al activación de los mecanismos de reparación del DNA (Doudna & Charpentier, 2014).

Los mecanismos de reparación del DNA ante cortes de doble cadena se pueden clasificar en dos tipos, a saber, “*homology-directed repair*” o HDR y “*non-homologous end joining*” o NHEJ, diferenciándose estos en la presencia o no, respectivamente, de una secuencia de DNA homóloga a la región cortada que las enzimas de reparación puedan tomar como modelo para la reparación. Esta diferencia convierte al HDR en el método más efectivo para volver a la secuencia a su estado inicial, aunque es el menos realizado debido a la falta de un molde, siendo lo más común la realización del NHEJ, mucho más dado a generar errores (Bothmer *et al.*, 2017). En este mecanismo, las enzimas de reparación agregan o delecionan nucleótidos de los extremos de cada uno de los fragmentos generados hasta dar lugar a una secuencia que permita la unión de nuevo de ambos. Sin embargo, este proceso lleva a que, de forma habitual, no pueda recuperarse la secuencia original, dando lugar a la deleción o inserción de un pequeño número de nucleótidos. Esto, aplicado a la ingeniería genética permite que, al editar un gen, este quede silenciado por el cambio en el marco abierto de lectura (ORF) derivado de la pérdida o adición de nucleótidos, formando un codón de fin de transcripción (o codón stop) prematuro (Afzal *et al.*, 2020)

2.4 Desarrollo embrionario en tomate

La embriogénesis en dicotiledóneas se puede definir como el proceso de desarrollo ocurrido desde el proceso de la fecundación que da lugar al embrión hasta la maduración final de la semilla y sus componentes internos. Dentro de una semilla podemos distinguir su envoltura, que provendrá de los tegumentos que rodean al saco embrionario en el gineceo; el endospermo, que actuará como tejido con fines de reserva energética y con el que el embrión intercambiará señales que permitirán su correcta morfogénesis; y este último, el embrión, que será el producto de la fecundación de los gametos, dando lugar a una estructura a partir de cuyo crecimiento y diferenciación se formará la planta adulta (Nabors, 2004; Berger & Chaudhury, 2009).

En plantas, al igual que en el resto de eucariotas, la unión entre los gametos da lugar a una única célula huevo o cigoto de tipo diploide, sin embargo, en el caso concreto de las angiospermas,

este proceso se ve acompañado de un segundo proceso de fecundación en el que una célula espermática se une a dos núcleos polares, dando lugar al endospermo triploide ($3n$), en un fenómeno que se conoce como doble fecundación. Por tanto, durante la embriogénesis tendrá lugar, de forma simultánea y coordinada, el desarrollo del endospermo, el embrión, y el óvulo, lo que a su vez permitirá la correcta formación de la semilla (Taiz *et al.*, 2014).

Una característica que diferencia a plantas y animales es que el embrión de las plantas no contiene los tejidos maduros que posteriormente tendrá la planta adulta. En su lugar, presentará una estructura rudimentaria que mediante posteriores procesos de crecimiento y diferenciación generará los tejidos especializados. Sin embargo, el proceso de desarrollo del embrión presenta una gran importancia al ser el proceso en el que se definen por un lado los polos apical y basal del embrión, y por otro, el patrón de desarrollo radial, siendo ambos necesarios para el posterior proceso de especialización que permitirá la formación de las estructuras presentes en una planta adulta (Taiz *et al.*, 2014).

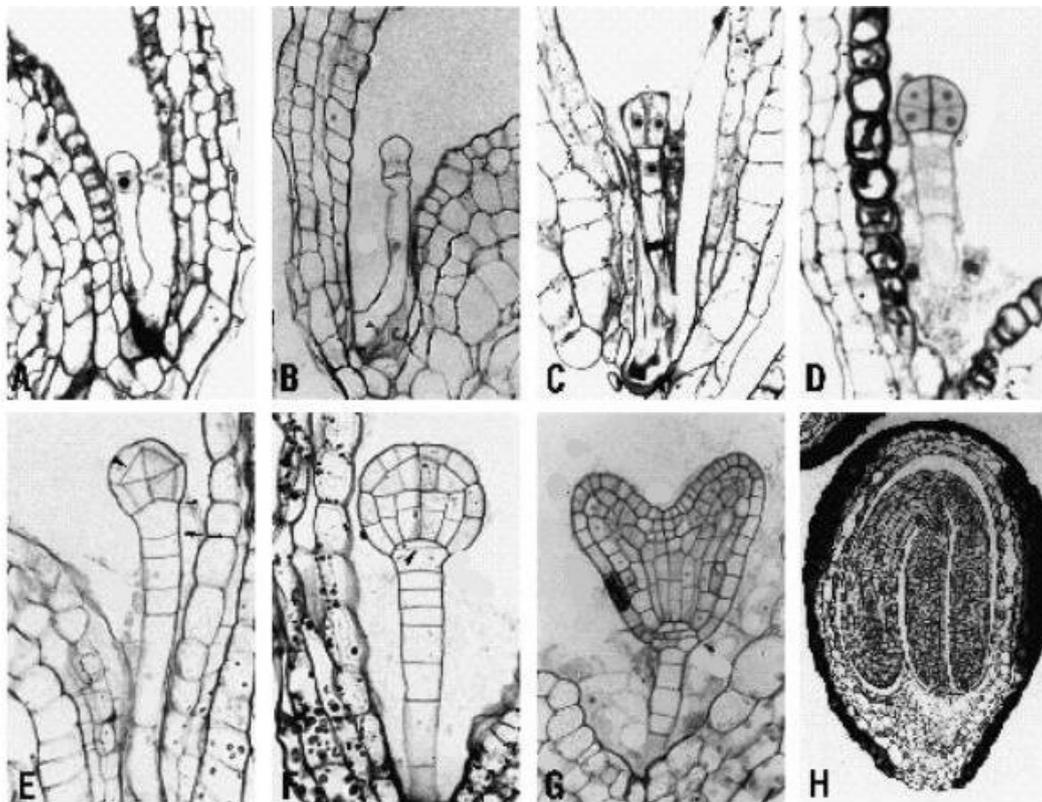


Figura 4. Fases del desarrollo embrionario en *Arabidopsis thaliana* (Mayer *et al.*, 1993)

El proceso de desarrollo del embrión puede dividirse en 3 etapas:

- 1) Fase cigótica: El núcleo del endospermo se divide repetidamente sin dar lugar a la formación de pared celular, lo que genera una fase endospérmica de cenocito. Por su parte, el embrión lleva a cabo una primera división celular de carácter asimétrico, generando una célula basal de mayor volumen (Mayer *et al.*, 1993). Esta se elongará y, tras una serie de divisiones celulares perpendiculares a su eje longitudinal, dará lugar a una estructura de entre 6 y 9 células denominada suspensor. Esta estructura desempeñará dos funciones básicas: El transporte de

nutrientes entre el endospermo y el embrión en desarrollo; y el traslado del embrión a la región central de la semilla (Yeung & Meinke, 1993). Una parte fundamental de esta estructura será la hipófisis (la célula del suspensor en contacto con el embrión), que en posteriores fases dará lugar a la columela. En esta región se encontrará el centro quiescente, que tendrá una importante función en el crecimiento radicular (Figura 4A y B) (Linkies *et al.*, 2010).

- 2) Fase globular: Tras la división del cigoto, la célula apical, de menor tamaño que la basal, llevará a cabo una serie de divisiones ordenadas. Estas se darán en los ejes longitudinal y transversal hasta generar una estructura de 8 células pasadas unas 30 horas de la fecundación (Figura 4C y D) (Taiz *et al.*, 2014). Tras ello, continuarán las sucesivas divisiones, sin embargo, ya habrá comenzado un proceso de especialización. Así, las células más externas formarán la protodermis, que en la fase corazón generará la epidermis, para lo que estas células deberán pasar a realizar divisiones de tipo anticlinal (Figura 4E) (De Smet *et al.*, 2010). El resto de células, a partir de ahora denominadas “inner cells” o células internas, llevarán a cabo una serie de divisiones sucesivas de tipo longitudinal.

Llegada la fase globular tardía, las células internas basales darán lugar a dos tipos de células: Precusores del meristemo fundamental, de mayor tamaño; y los precursores del procambium, de menor tamaño (Figura 5) (Colette *et al.*, 2015). Además, la hipófisis también sufrirá cambios, dándose una división asimétrica en la misma. Esta generará una célula basal de mayor tamaño, que dará lugar a la columela; y una superior más pequeña que recibirá el nombre de célula lenticular, siendo esta la que dará origen al centro quiescente (Figura 4F) (Mayer *et al.*, 1993).

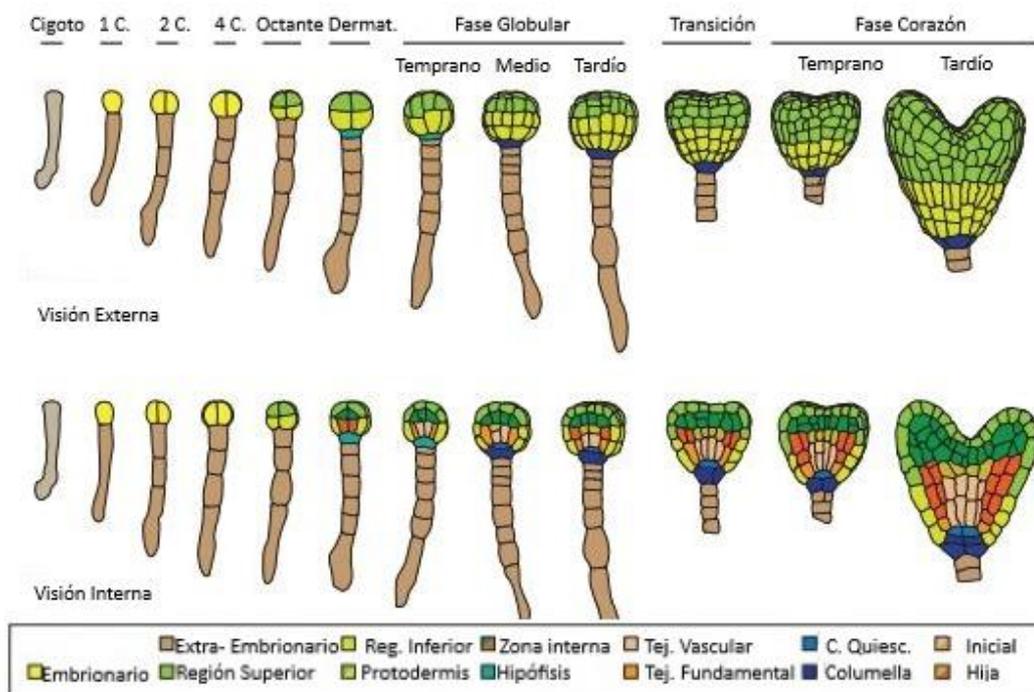


Figura 4. Diferenciación y determinación celular a lo largo del proceso de embriogénesis (adaptado de Colette *et al.*, 2015).

- 3) Fases de corazón y torpedo: Su nombre proviene de la morfología del embrión, que debido a rápidas divisiones a ambos lados del futuro meristemo apical, perderá la simetría radial tomando forma de corazón (Figura 4G). Estas dos regiones a ambos lados del eje longitudinal serán las que en el futuro darán lugar a los cotiledones, que actuarán como órganos de reserva de proteínas, almidón y lípidos que serán utilizados en el crecimiento inmediatamente posterior a la germinación (Taiz *et al.*, 2014). En esta fase, el suspensor alcanzará su tamaño máximo, de unos cientos de células, degenerándose en fases posteriores hasta no presentarse en la fase de maduración final de la semilla (Yeung & Meinke, 1993). Por su parte, en el endospermo comenzará un proceso de proliferación celular que no terminará hasta la fase torpedo (Olsen, 2001), en la que se produce la elongación de los cotiledones y de la región central del embrión, que posteriormente dará lugar al hipocótilo (Taiz *et al.*, 2014). Durante la fase corazón y esta última fase torpedo se producirá el establecimiento final del patrón de diferenciación radial y longitudinal que concluirán en la formación del embrión maduro (Van der Berg *et al.*, 1997). En este se distinguen, como estructuras principales, los cotiledones, el hipocótilo, culminado por el SAM y que dará lugar al tallo de la planta, y la radícula, en la que se encuentra el centro quiescente y la columela (Figura 4H) (Mayer *et al.*, 1993; Taiz *et al.*, 2014).

De forma paralela al desarrollo del embrión, el endospermo experimenta también una serie de eventos durante su desarrollo. Comienza con una fase de sincitio, producida por sucesivas mitosis sin telocinesis del núcleo triploide originado tras la doble fecundación. A esta le sigue una fase en la que se separan los núcleos hermanos mediante la formación de paredes celulares entre ellos; diferenciación, y, tras la germinación, la muerte celular (Yan *et al.*, 2014). La función principal del endospermo es actuar como tejido de reserva para el embrión; sin embargo, este tejido desempeña también funciones tanto de tipo físico como químico. Así, actúa como una estructura rígida que controla la expansión del embrión y produce enzimas hidrolíticos que debilitan la zona cercana a la radícula para permitir su emersión (Nonogaki *et al.*, 2000). También se ha visto que produce RNAs de interferencia pequeños (siRNA) que juegan papeles clave en rutas de silenciamiento epigenético que refuerza la estabilidad genética del embrión (Lafon-Placette & Köhler, 2014).

2.5 Antecedentes

El presente trabajo parte de los resultados previamente obtenidos en el marco de la Tesis Doctoral titulada “Caracterización genética y molecular de *TOMATO GASSHO (TGSO)*, un nuevo gen implicado en el desarrollo embrionario de tomate” que realizó y defendió el doctor Jorge Luís Quispe Velasquez en el laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Almería (Quispe, 2018). En dicha Tesis Doctoral se identificó el gen *TGSO* a partir del análisis genético realizado en el mutante *1310etmm*, alterado en el desarrollo embrionario y posterior desarrollo vegetativo. Así mismo, se llevó a cabo el estudio de los patrones de expresión de dicho gen, así como otros aspectos preliminares de su función. Sin embargo, en dicho trabajo no se pudo constatar la causalidad del gen *TGSO* mediante la caracterización de plantas de tomate en las que la

función de dicho gen estuviese completamente reprimido (líneas *knock-out*), como tampoco se pudo profundizar en el patrón del desarrollo que dicha pérdida de función ocasiona.

En este contexto, el Grupo de Genética y Fisiología del Desarrollo Vegetal de la Universidad de Almería junto al Grupo de Cultivos *in vitro* del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas de la Universidad Politécnica de Valencia (IBMCP-UPV, Valencia) han generado una colección de mutantes insercionales en el cultivar *MoneyMaker* (cv. *MoneyMaker*, abreviadamente MM), con el propósito de descubrir nuevos genes clave en la regulación del desarrollo vegetal. Así, se generaron un total de 7800 líneas transgénicas usando una construcción génica de tipo *enhancer trap* (*et*) con el vector pD911, que contenía el promotor débil CaMV y el gen *GUS* como delator (reporter), de forma que la inserción aguas abajo de una secuencia reguladora tipo enhancer haría detectable la expresión de *GUS*. Las líneas transformadas se pudieron seleccionar mediante la presencia en antisentido del gen *NPTII*, que aporta resistencia a kanamicina (Campisi *et al.*, 1999), que forma parte de la región T-DNA contenida en el vector antes citado. Uno de los mutantes seleccionados para su estudio se identificó en la progenie TG₂ de la línea 1310, razón por la que se denominó como mutante *1310etmm*.

El fenotipo del mutante *1310etmm* destacaba por el desarrollo anómalo del meristemo apical del tallo (SAM, del inglés *Shoot Apical Meristem*), observándose la aparición de una estructura de tipo calloso donde debería ubicarse el meristemo caulinar en plántulas de 12-14 días después de la germinación (DAG) de la semilla en condiciones "*in vitro*". En posteriores análisis de microscopía, este fenotipo pudo confirmarse mediante la observación de una estructura meristemática proliferativa y desordenada, que se sitúa desplazada lateralmente respecto a la posición habitual del SAM. Esta estructura anómala, en ocasiones denominada teratoma, parece deberse a la incapacidad del mutante para desarrollar un nuevo primordio foliar (Figura 6). Se pudo ver, además, que a partir de esta estructura anómala se podía originar una estructura adventicia capaz de desarrollarse como una planta normal si se cultiva en un medio de enraizamiento *in vitro*.

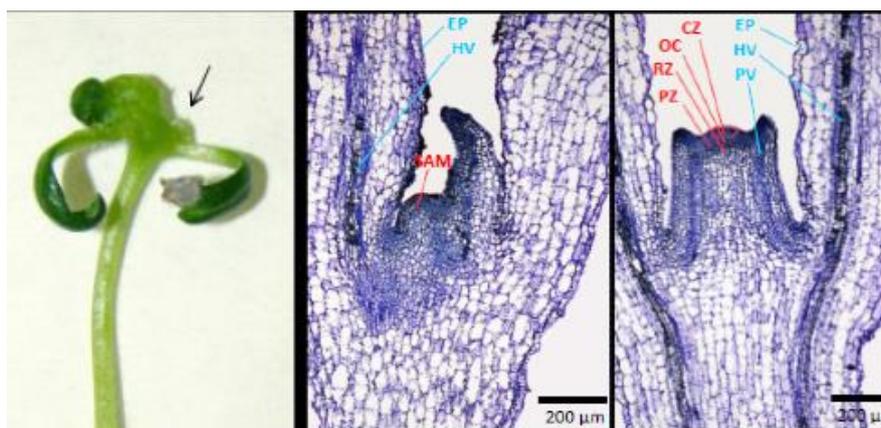


Figura 6. Formación de una estructura callosa en mutantes *1310etmm* en la región donde debería ir ubicado el SAM. Señalado con una flecha se observa el punto de origen del tallo adventicio. También podemos comparar los cortes histológicos de una planta mutante (izq.), donde no se pueden identificar las diferentes regiones del SAM respecto a una planta WT (der.).

En el desarrollo del mutante *1310etmm* cabe destacar también la fusión parcial de los cotiledones, característica que permanecía durante las primeras etapas del crecimiento vegetativo y que pudo confirmarse mediante microscopía electrónica de barrido. Así mismo, las células de la cara interna de los primordios foliares presentaban una morfología irregular, además de un menor tamaño, lo que podría estar relacionado con alguna de las anomalías antes descritas respecto al menor tamaño de las hojas de este mutante.

En resumen, la presencia de cotiledones parcialmente fusionados y anomalías en las primeras etapas del desarrollo vegetativo, unido a la enorme susceptibilidad a la desecación que mostraban las plantas mutantes *1310etmm* (que hacían necesario su cultivo “*in vitro*” en condiciones de elevada humedad relativa durante los primeros días de desarrollo) indicaron alteraciones a nivel epidérmico durante el desarrollo embrionario y etapas tempranas del desarrollo vegetativo

Para completar el análisis fenotípico, se caracterizaron embriones recuperados de semillas del mutante *1310etmm* previamente sumergidas en una solución de esterilización. En este análisis se observaron embriones con diferente grado de alteración, desde los que mostraban un fenotipo normal, similar al silvestre (Figura 7A y F), otros en los que los cotiledones se encontraban fusionados y cambiaban el sentido de giro de dextrógiro a levógiro (Figura 7D, E, I y J), y otros de fenotipo más extremo en los que se llegaba a detener la elongación del embrión, dando lugar a morfologías anómalas (Figura 7D, E, I y J).

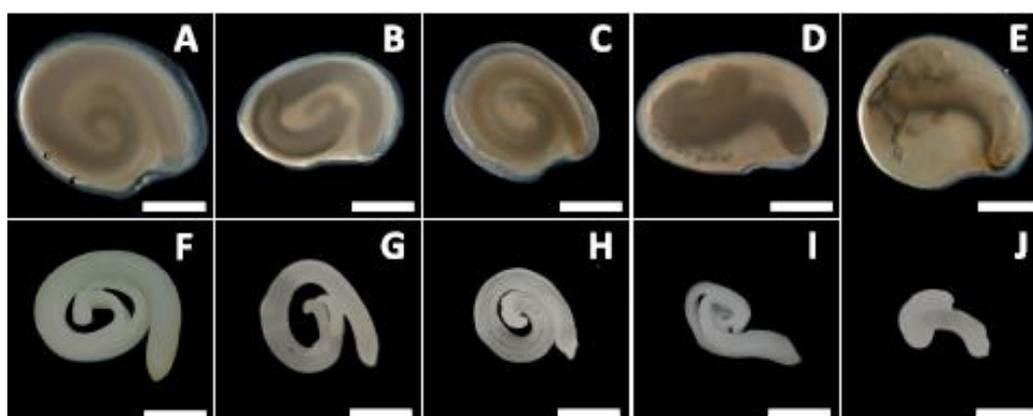


Figura 7. Disposición y morfología de embriones en el interior de la semilla de tomate (paneles superiores) y embriones aislados (paneles inferiores). Los paneles A y F muestran embriones de fenotipo silvestre o WT, siendo el resto embriones de fenotipo mutante. Cabe destacar el fenotipo severo de los embriones mostrados en los paneles D, E, I y J.

2.5.1. Análisis genético y molecular del gen *TGSO*

El análisis genético de la mutación *1310etmm* se realizó en una población segregante TG₂ compuesta por 53 plantas, entre las cuales se identificaron 10 de fenotipo alterado, lo que sugería que el alelo mutante se expresa únicamente en homocigosis. Mediante una prueba estadística chi-cuadrado (χ^2) se dedujo que la mutación seguía un patrón de herencia de tipo monogénico y recesivo.

Sabiendo que la mutación *1310etmm* se había detectado en una colección de mutantes insercionales generada por la inserción de un elemento T-DNA en diferentes posiciones del genoma de tomate, se realizó un análisis para comprobar la presencia del inserto de T-DNA en los individuos de la progenie TG_2 antes mencionada, eligiéndose para dicho análisis el gen *NPTII*, que confiere resistencia al antibiótico kanamicina (kan). El cultivo *in vitro* de plántulas TG_2 permitió observar que algunas de ellas, aun mostrando fenotipo mutante, eran sensibles a kanamicina, lo que implicaba que estos individuos carecían del gen *NPTII* funcional, y que por tanto, la causa del fenotipo mutante no era la presencia del T-DNA, sino una mutación somaclonal ocurrida durante el proceso de transformación genética y posterior cultivo *in vitro* de las plantas transformadas; ambos procesos, necesarios para la generación de la colección de mutantes insercionales, suponen factores de estrés que, en ocasiones, se traducen en cambios mutacionales aleatorios en el genoma de las plantas transformadas (Bairu *et al.*, 2011).

Teniendo en cuenta de la naturaleza somaclonal de la mutación *1310etmm*, se optó por realizar un mapeo genético para identificar la región genómica y, a ser posible, el gen afectado por dicha mutación, determinando así el origen de la misma. Para lograrlo, se cruzó una planta mutante de la progenie TG_2 que, además, carecía de T-DNA, con una planta de la especie silvestre *S. pimpinellifolium* (accesión LA1589). Del cruzamiento se obtuvo una descendencia F_1 , que se autofecundó, generando con ello una población segregante F_2 en la que se identificaron los individuos de fenotipo mutante. Estos se agruparon en un *pool* distinto al del resto de plantas de fenotipo normal. A continuación, se procedió a la secuenciación masiva del DNA procedente de ambos *pools* de plantas, y al análisis comparativo de ambas secuencias.

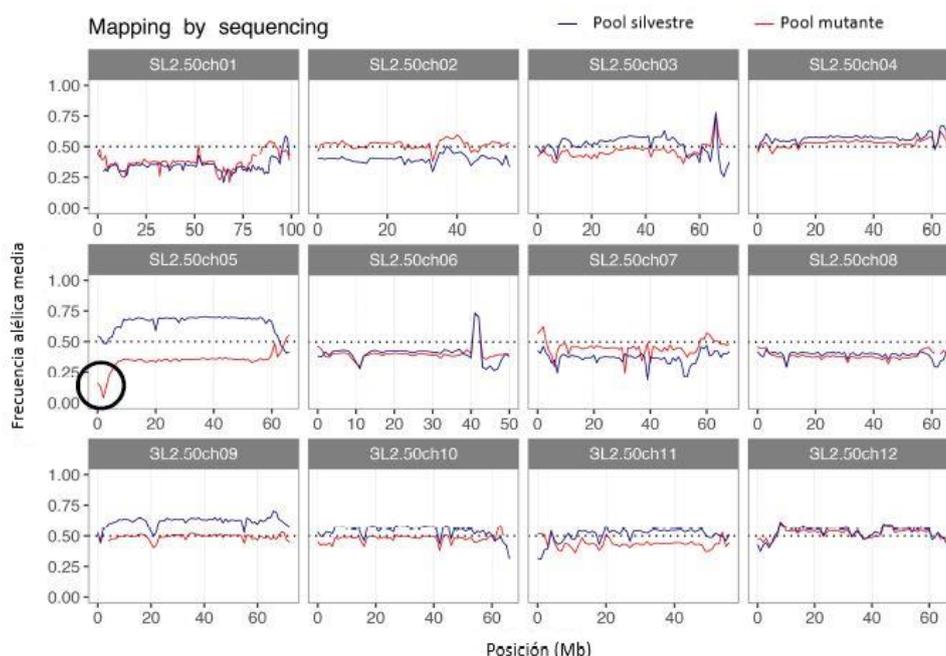


Figura 8. Mapeo por secuenciación de la mutación *1310etmm*. Cada gráfica representa la frecuencia alélica de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en cada uno de los 12 cromosomas de tomate detectados en los pools WT (azul) y mutante (rojo) para la progenie F_2 del cruce *1310etmm* x *S. pimpinellifolium*. Cabe destacar el descenso en la frecuencia de la región señalada en el cromosoma 5.

Mediante una metodología de mapeo por secuenciación masiva, se pudo determinar que la región genómica candidata a ser la causante de la mutación se ubicaba en el cromosoma 5 (Figura 8). El análisis detallado de los polimorfismos presentes en esta región permitió identificar una mutación puntual tipo transición C → T presente en el gen anotado como *Solyc05g007230*, la cual generaba el cambio de un aminoácido de tirosina por otro de cisteína. Este cambio alteraba la función de la proteína al provocar el cambio de un aminoácido hidrófobo por otro de tipo hidrófilo en el dominio quinasa del gen afectado. Este gen codifica una proteína de una familia de proteínas kinasas receptoras (RLK), portadoras de regiones ricas en leucina (LRR, del inglés *Leucine Rich Repeats*) que actúan como receptores de distintos tipos de señales celulares. Las RLK se caracterizan por presentar tres dominios funcionales, distinguiendo un dominio receptor que se sitúa de forma extracelular y detecta ligandos específicos, un dominio transmembrana que permite su presencia en la superficie celular y que conecta con un dominio quinasa intracelular, que es el que transduce la señal mediante la interacción con otras proteínas reguladoras intracelulares (Walker, 1994). Cabe señalar que los miembros de la familia RLK se clasifican en función del dominio extracelular. Así, los LRR-RLKs presentarán un dominio receptor rico en leucinas en el que los residuos de leucina se suelen repetir y agrupar en tándem formando dominios conservados en distintos genomas (Liu *et al.*, 2017).

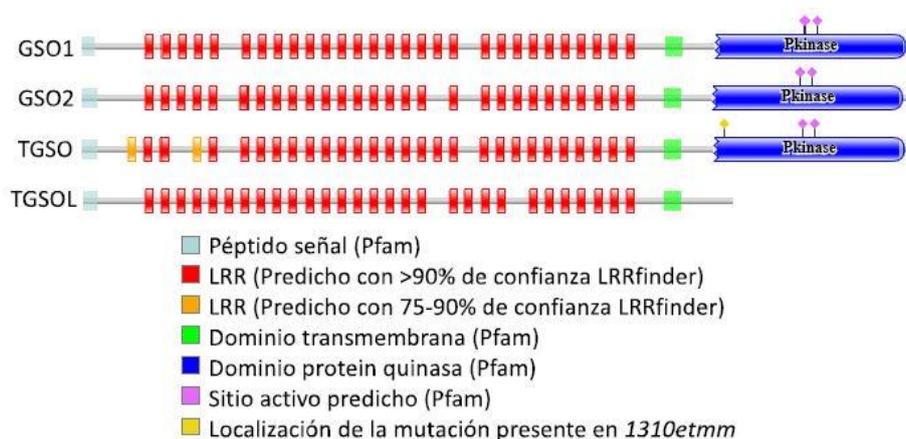


Figura 9. Comparación de los dominios propuestos para las proteínas GSO1-2 Y TGSO-TGSOL. Señalar la presencia de la mutación 1310etmm en un extremo del dominio quinasa y la ausencia de este mismo dominio en TGSOL.

Puesto que el gen *Solyc05g007230* no se había caracterizado previamente en tomate, se utilizaron herramientas bioinformáticas para encontrar proteínas de secuencia parecida en la especie modelo *A. thaliana*, lo que arrojó una alta homología con las proteínas GASSHO 1 y GASSHO 2 (GSO1 y GSO2) de esta especie. Ambas proteínas también actúan como LRR-RLK en *Arabidopsis*, y su falta de función en plantas de genotipo doble mutante *gso1-2* causan anomalías en el desarrollo embrionario y alteraciones en los cotiledones (Tsuwamoto *et al.*, 2008) similares a las observadas en el mutante *1310etmm*. Las semejanzas con las anomalías observadas en el mutante indicaban que el gen aislado en tomate es funcionalmente homólogo a los genes *GSO1* y *GSO2* de *A. thaliana*. Para comprobar los resultados, se realizó una búsqueda BLAST de proteínas homólogas a *GSO1* y *GSO2* en la base de datos del genoma del tomate (*Sol Genomics Network*) y se encontró que la proteína con mayor homología era la expresada por *Solyc05g007230*. Estos resultados del análisis filogenético, unidos a los obtenidos

de la caracterización fenotípica de los mutantes de *Arabidopsis* y de tomate, hizo que se renombrara al gen *Solyc05g007230* afectado en el mutante *1310etmm* como *TOMATO GASSHO (TGSO)*. Así mismo, el análisis BLAST también indicaba una alta homología de las proteínas *GSO* de *Arabidopsis* con otra proteína de tomate codificada por el gen *Solyc03g112680*, también perteneciente a la familia LRR-RLK, y a la que se denominó *TOMATO GASSHO LIKE (TGSOL)*, si bien esta última carece del dominio quinasa presente en la proteína *TGSO* (Figura 9).

3. Objetivos

La genómica funcional busca encontrar la correlación genotipo-fenotipo, descubrir la función de elementos del genoma y la interacción entre estos que permiten establecer mecanismos genéticos y moleculares implicados en caracteres esenciales para el desarrollo y supervivencia de los organismos. Para ello, se han utilizado diferentes técnicas basadas en el silenciamiento génico mediado por RNA de interferencia (RNAi) o métodos de corte específicos como las TALE o las “Zinc fingers” (Montoliu, 2019). Sin embargo, la aparición de nuevas herramientas de modificación genéticas de alta fiabilidad como es CRISPR-Cas9 y su utilidad en la genética funcional han supuesto una revolución en el campo, al aportar una mayor facilidad, rapidez y versatilidad que las técnicas anteriormente usadas, además de una mayor efectividad (Chen *et al.*, 2019; Ford *et al.*, 2019). Por tanto, el uso de esta herramienta podría servir para comprobar la función del gen *TGSO* y su papel en el desarrollo embrionario de tomate.

Es importante señalar que, en cualquier especie vegetal, el desarrollo embrionario es un proceso clave para la correcta formación y viabilidad de la semilla, de ahí su importancia en especies de interés agronómico. Es por ello por lo que, a tenor de los antecedentes mencionados, este trabajo se desarrollará a fin de abordar los siguientes objetivos concretos:

- 1) Caracterizar a nivel molecular diferentes líneas CRISPR de tomate en las que se ha editado el gen *TGSO*, y determinar la naturaleza molecular de los diferentes alelos generados en plantas afectadas en el desarrollo embrionario.
- 2) Estudiar el fenotipo de los embriones producidos por líneas CRISPR con falta de función del gen *TGSO*.
- 3) Rescatar los embriones editados procedentes de líneas CRISPR y promover su cultivo *in vitro* con el fin de comprobar la influencia que la falta de función de *TGSO* ocasiona en fases tempranas del desarrollo vegetativo.
- 4) Determinar el genotipo de plantas CRISPR carentes de la función *TGSO* para establecer una correlación genotipo-fenotipo y establecer la función del gen *TGSO* durante el desarrollo embrionario de tomate.

4. Materiales y métodos

4.1. Material vegetal

La especie elegida para realizar este trabajo de investigación ha sido *Solanum lycopersicum*, concretamente el cultivar *MoneyMaker* (accesión LA2706). Previo a este trabajo experimental, el grupo de Genética y Fisiología del Desarrollo Vegetal (AGR-176) de la Universidad de Almería, en colaboración con el laboratorio del Catedrático Vicente Moreno Ferrero de la Universidad Politécnica de Valencia, ha obtenido la primera generación de líneas transgénicas CRISPR/Cas del gen *TGSO*. A continuación, se describen los pasos principales para la obtención de estas líneas.

4.1.1. Elaboración de las construcciones CRISPR

Para la obtención de plantas editadas en el gen *TGSO* se utilizó la tecnología CRISPR/Cas9, una técnica basada en la acción específica de una nucleasa bacteriana, Cas9, que corta una región concreta del genoma reconocida por su homología con un *guide*-RNA diseñado por el investigador (Ford *et al.*, 2019). La construcción CRISPR/Cas9 se obtuvo mediante un protocolo basado en la utilización de 3 vectores distintos denominados $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\Omega 1$. Todos ellos contienen el promotor *lacZ* y un gen de resistencia a un antibiótico concreto, lo que permite seleccionar las colonias transformadas con plásmidos correctamente ligados en cada una de las clonaciones.

El diseño del RNA guía encargado de dirigir a la nucleasa al lugar del genoma específico donde deberá producir el corte es uno de los factores claves para tener éxito en la estrategia CRISPR/Cas9. Los programas informáticos utilizados para la búsqueda de la diana del RNA guía y el diseño de los oligonucleótidos para el ensamblaje de dicho RNA guía en el vector $\alpha 2$ fueron Breaking-Cas (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/breakingcas/>) y GoldenBraid (<https://gbcloning.upv.es/>), respectivamente. Los oligonucleótidos diseñados fueron los siguientes:

Forward primer: ATTGGCCAGCTGATGCATTACC

Reverse primer: AAACGGTGAATGCATCAGCTGGC

Estos oligonucleótidos, tras su hibridación al mezclarse 30 min. a temperatura ambiente, se ligaron al primer vector, $\alpha 2$, junto al promotor de la ubiquitina y el sgRNA (una secuencia necesaria para la actuación de la nucleasa) mediante la ligasa T4 y la enzima de restricción *Bsal*. Este se transformó siguiendo el protocolo del apartado 4.2.2. en células competentes de *Escherichia coli* *DH5 α* , que se sembraron en un medio con kanamicina (para que solo sobrevivan las bacterias con el gen de resistencia presente en el plásmido), IPTG y XGAL (observándose una coloración blanca en las colonias positivas). Por último, se realizó la purificación de los plásmidos obtenidos y la secuenciación del inserto introducido siguiendo los pasos expuestos en el apartado 4.2. usando cebadores específicos del vector para comprobar la no presencia de mutaciones inesperadas en el inserto.

Tras la primera clonación, el DNA plasmídico purificado se mezcló con los vectores $\alpha 1$ y $\Omega 1$ para su digestión y ligación simultánea. El vector $\alpha 1$ aporta el gen *hCAS9* y un gen de resistencia a

kanamicina (para plantas). Por su parte, el vector $\Omega 1$ incorpora un gen de resistencia a espectinomicina y otro a rifampicina. El plásmido resultante se transformó en *E. coli* siguiendo el mismo protocolo que en la anterior transformación, realizando los mismos pasos hasta su purificación con la única diferencia de que el cultivo bacteriano fue crecido en un medio con espectinomicina en lugar de kanamicina.

Una vez ensamblado el vector $\Omega 1$, se procedió a transformar dicho vector en la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens*. Para ello, en lugar del método del *shock* térmico se utilizó la técnica de electroporación, sometiendo a descargas eléctricas cortas a las bacterias en contacto con el material genético a transformar. La selección de las bacterias transformadas se realizó mediante un medio con rifampicina, puesto que el vector $\Omega 1$ incluye un gen de resistencia a este antibiótico.

4.1.2. Transformación mediante *Agrobacterium tumefaciens*

Los experimentos de transformación genética se han llevado a cabo mediante co-cultivo de explantes de hojas jóvenes del cultivar *MoneyMaker* (accesión LA2706A) con la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* que contenía el vector binario CRISPR/Cas9 del gen TGSO. Con el fin de aumentar el área de infección, los explantes fueron sometidos a cortes no muy extensos, de forma que, sin generar un excesivo estrés en las células, se abrieron nuevas vías para facilitar la infección de *A. tumefaciens*.

La inoculación de los explantes se realizó sumergiendo estos en un cultivo con la bacteria transformada (DO_{600} de 0,2-0,4) durante unos min. A continuación, los explantes se dispusieron sobre un medio de cultivo similar al “medio de inducción” (Sales MS 100%, Sacarosa 30 g/l, Inositol 100 mg/l, Vitaminas RT 100%, IAA 1 mg/l, Kinetina 1 mg/l, Agar 0,8%) pero con presencia de acetosiringona (200 μ M). Este compuesto es un inductor de virulencia para *A. tumefaciens* que actúa favoreciendo el ataque del mismo a los explantes.

Pasados uno o dos días a 28 °C, los explantes fueron transferidos a un “medio de lavado” (MB: Sales MS 100%, Sacarosa 20 g/l, Inositol 100 mg/l, Tiamina 1 mg/l) al que se añadieron 0,5 g/L de cefotaxima, un bacteriostático, para bloquear el crecimiento bacteriano. Tras 10 min en este medio, los explantes se traspasaron al “medio de regeneración”, de igual composición al “medio de inducción” pero suplementado con dos compuestos: kanamicina 100 mg/l, que permite crecer a las células portadoras del inserto T-DNA, y cefotaxima 300 mg/l para limitar el desarrollo bacteriano. Los explantes se mantuvieron en una cámara de crecimiento a 25 °C hasta que se generaron brotes a partir de los callos.

Con cuidado de no dañar los callos, se cortaron los brotes, pasándolos a un medio de enraizamiento con kanamicina para seleccionar las células transformadas y favorecer el desarrollo de la radícula. Una vez que los brotes se encontraban lo suficientemente desarrollados, fueron cultivados *in vitro* y crecidos hasta un estadio que permitiese su aclimatación a campo. Para este paso, la planta crecida en agar se recuperó del recipiente que la contenía y se eliminó el medio de cultivo, pasándola a una maceta con tierra.

Se realizó primero el paso a un fitotrón con condiciones de temperatura y humedad óptimas para el crecimiento del tomate. El primer día, la plántula estuvo tapada con un vaso de plástico transparente que le permitía reducir de manera más gradual la pérdida de humedad respecto al cultivo en laboratorio. En los días sucesivos se fueron haciendo agujeros al vaso, con lo que, al cuarto día, este fue retirado. Las plantas se pasaron a campo entre 1-2 semanas después. Una vez las plantas florecieron, se realizó la autofecundación de las mismas, obteniendo la población segregante TG_2 , cuyas semillas fueron recuperadas para su posterior caracterización (Figura 10).



Figura 10. Esquema de las etapas de un experimento de transformación genética de explantes de tomate mediado por *Agrobacterium tumefaciens* (elaborado a partir del presente en Gutierrez-Aguilar, 2014)

4.2. Caracterización molecular

4.2.1. Extracción de DNA genómico y amplificación mediante PCR

Para llevar a cabo la extracción de DNA de las plantas TG_1 , así como de los embriones o las plántulas TG_2 , se empleó el kit "Plant DNAzol[®] Reagent" (Invitrogen). Para ello se maceró la muestra vegetal previamente congelada con nitrógeno líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, haciendo uso de bolas de tungsteno y un TissueLyser (Retsch), añadiendo luego el reactivo DNAzol. Pasado el tiempo de incubación, se adicionó cloroformo, que precipita otros componentes tales como proteínas y restos celulares, quedando el DNA genómico en el sobrenadante. El siguiente paso fue la precipitación del DNA con Etanol (100%), este se resuspendió usando la solución de lavado, volviendo a precipitar por centrifugación. Tras un nuevo lavado con etanol al 75%, se retiró este mediante pipeteo y se dejó secar *overnight* para evitar la presencia de etanol en el pellet, resuspendiendo con agua estéril pasado el tiempo necesario.

Tras la extracción de DNA genómico, se utilizó la herramienta bioinformática *Primer3* (<https://primer3.ut.ee/>) para diseñar cebadores para la región diana del RNA guía. Con ello se obtuvieron los siguientes oligonucleótidos:

Forward primer: AAGTGCGCTTGGAGAACTCA

Reverse primer: AAGAGTGCAGCTCCAAGCAA

Estos se caracterizan por generar un amplicón de 410 pb que contiene la región genómica a estudiar.

4.2.2. Ligación y transformación de *Escherichia coli*

En el caso concreto de la caracterización molecular de las plantas TG₁, los productos de PCR amplificados fueron clonados en el plásmido linealizado pGEM-T® (Promega Corporation) (Figura 11). Este tiene como principales características la presencia del gen de resistencia a Ampicilina, el origen de replicación del fago f1 (que permite la replicación del fago en el interior de *E. coli*) y el gen *lacZ* (junto a su promotor inducible), entre cuya secuencia se liga el fragmento de PCR en estudio. Esto permite identificar las bacterias transformadas con plásmidos sin inserto de PCR haciendo uso del inductor de expresión IPTG y XGAL (un compuesto que se tornará azul al ser catalizado por la enzima que aporta el operón *lacZ*, que se sintetiza al no estar presente dicho inserto). Para llevar a cabo la ligación se utilizaron la enzima T4 ligasa y un buffer de ligación específicos, que junto al fragmento de PCR se dejaron a 4 °C toda la noche hasta el día siguiente.

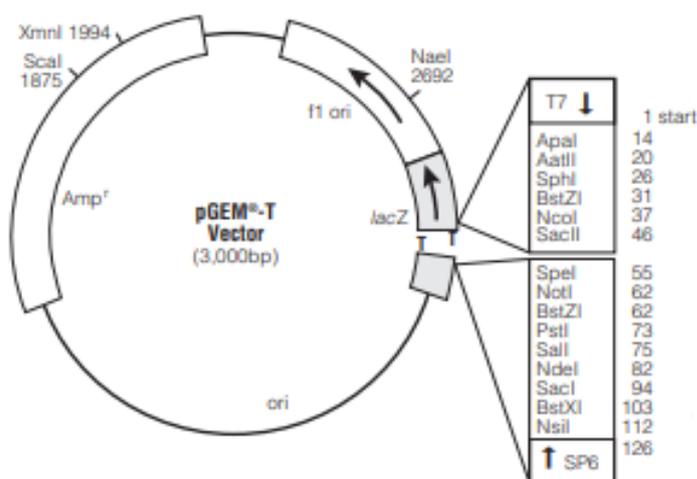


Figura 11. Esquema de los componentes del vector de clonación pGEM-T (Promega Corporation).

Una vez se realizó la ligación, se transformaron cepas de *E. coli* competentes DH5α (Invitrogen) mediante *shock* térmico, poniendo en una misma solución los plásmidos ligados junto a las bacterias competentes durante 30 min en hielo, 40 s a 42 °C y 5 min en hielo nuevamente. A continuación, se procedió al pre-cultivo durante 1h en el medio LB en un agitador orbital a 37°C, seguido de la siembra en placas con medio LB sólido con ampicilina, IPTG y XGAL, que permiten discernir aquellas bacterias en las que el plásmido presenta el inserto de PCR y las que no (de coloración azulada). Pasadas 24 horas, las colonias de interés se cultivaron en tubos Falcon de 15 mL con 3 mL de una mezcla de LB líquido con ampicilina, llevando estos a un agitador orbital, donde permanecieron 24 h a 220 rpm. y 37 °C para permitir el crecimiento y multiplicación de las bacterias con el plásmido que contenía el inserto de PCR en estudio.

4.2.3. Purificación de DNA plasmídico

Para llevar a cabo la extracción plasmídica se utilizó el kit de extracción de DNA plasmídico “GenJet Plasmid Miniprep Kit” (Thermo FischerScientific). Para el uso de este, es necesario llevar a cabo dos pasos fundamentales con diferentes fines:

- Primero se debe producir la lisis celular. Para ello el cultivo bacteriano se centrifugó en un tubo eppendorf de 1,5 mL durante 1 min a máxima velocidad. Al partir de 3 mL de cultivo bacteriano, este proceso se realizó 2 veces. El sobrenadante se decantó hasta dejar únicamente el pellet con la menor cantidad posible de medio líquido.
Para romper las células lo primero fue resuspender estas en el buffer “Resuspension Solution”, que se conserva a 4 °C para evitar la desnaturalización de la RNAsa A. Tras mezclarlo en el vórtex, se añadió el buffer “Lysis solution” que destruye las envolturas celulares, dejando libre el DNA plasmídico. Por último, se usó el buffer “Neutralization solution”, que cesa el proceso de lisis de la solución anterior.
- El segundo paso consiste en la recuperación de los plásmidos de la solución lisada. Tras liberar el contenido genético en el citoplasma y centrifugar para eliminar los restos celulares, el sobrenadante se transfirió a unas columnas de centrifugación, quedando así los plásmidos asociados a una base sólida de sílice. Tras añadir el buffer “Wash solution”, se centrifugó la columna hasta en dos ocasiones, eliminando el volumen que ha pasado por la columna al terminar cada una de ellas. Finalmente, se utilizó el buffer “Elution solution”, en el cual se resuspende el material genético plasmídico y donde permaneció para su posterior utilización.

Usando la solución de elución como blanco, se midió la concentración de DNA plasmídico extraído en el espectrofotómetro NanoDrop 2000® (Thermo Fisher). El DNA plasmídico absorberá la radiación con una longitud de onda de 260 nm siendo los resultados esperados para la concentración de DNA plasmídico entre 250 y 350 ng/ μ L.

Antes de llevar a cabo la secuenciación del fragmento, se comprobó la presencia del inserto de PCR en la solución de DNA plasmídico. Para ello se llevó a cabo una PCR usando los cebadores específicos que utilizados en el apartado de “Extracción de DNA genómico”. Para cada reacción se utilizó 1 μ L (10 ng/ μ L) de DNA plasmídico, 3 μ L de buffer NH₄ 10x; 2,4 μ L de dNTPs (2,5 mM); 1,8 μ L de MgCl₂ (50 mM), 1 μ L de cada uno de los primers (0,33 μ M) y 0,2 mL de la enzima BioTaq Polimerase (Bioline), completando con agua estéril hasta los 30 μ L de disolución. Una vez preparadas las diferentes mezclas en tubos de PCR, estos se introdujeron en un termociclador Eppendorf Mastercycler® Pro S, donde se llevó a cabo un programa basado en una primera desnaturalización a 94 °C durante 5 min, seguida de 25 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 60 °C y 1 min a 72 °C. Una vez transcurrido este tiempo, tuvo lugar un último ciclo de 5 min a 72 °C.

Los resultados de la PCR fueron evaluados mediante electroforesis a 200 V, durante 30-45 min, en un gel de Agarosa (1%), usando el tampón SB 1x y el marcador de tamaño 1kb DNA Ladder

(Invitrogen). Los fragmentos amplificados fueron posteriormente teñidos con GelRed (Biotum Inc.) y visualizados mediante un transiluminador de luz ultravioleta (FireReader XS, UVItec Cambridge).

4.2.4. Purificación del producto de PCR y secuenciación

Una vez realizada la PCR, se purificó el producto de reacción eliminando los restos de polimerasa, cebadores o dNTPs, entre otros. Para ello se utilizó el kit de purificación “GeneJET PCR Purification Kit” (ThermoFischer Scientific). Dicho kit funciona mediante columnas de purificación específicas con una membrana de sílice que retiene el amplicón generado, filtrando este del resto de componentes. Para su utilización, las columnas se prepararon previamente mediante centrifugado a 14000 rpm durante 1 min con 500 μ L del buffer “Preparation solution”. Tras ello, se adicionaron 20 μ L de producto de PCR junto a 100 μ L del buffer “Binding solution”. Las columnas se centrifugaron 1 min a 14000 rpm, con lo que el amplicón de PCR quedó unido a la membrana.

El siguiente paso fue el lavado del resto de componentes no deseados que pudieran haber quedado adheridos a la misma. Para ello se añadieron 500 μ L del buffer “Wash solution” y se centrifugó 1 min a 14000 rpm. Por último, se colocaron las columnas en eppendorfs autoclavados y se eluyó el DNA amplificado centrifugando 1 min con agua estéril a 14000 rpm. A continuación, los productos de PCR purificados fueron empleados para llevar a cabo una PCR de secuenciación utilizando los reactivos del BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), que consta de un buffer en el que ya se incluye el $MgCl_2$ y los dNTPs marcados con fluoróforos (5X *Sequencing Buffer*); y la enzima de secuenciación BigDye® (BigDye™ Terminator v3.1 Ready Reaction Mix). En concreto, por cada muestra se utilizó 1 mL con el que se realizó un mix con 1,5 μ L del buffer de secuenciación, 1 μ L de uno de los cebadores (en este caso el Forward) y 1 μ L de la enzima de secuenciación, completando con agua estéril hasta llegar a los 10 μ L de disolución. Se utilizó para la PCR un termociclador Eppendorf Mastercycler® Pro S, usando un programa específico que comienza con un periodo de 1 min a 96 °C seguido de 25 ciclos de 96 °C durante 10 s, 50 °C durante 5 s y 60 °C durante 4 min. Una vez terminados los 25 ciclos, el termociclador se mantiene a 4 °C hasta la recogida de las muestras (Figura 12).

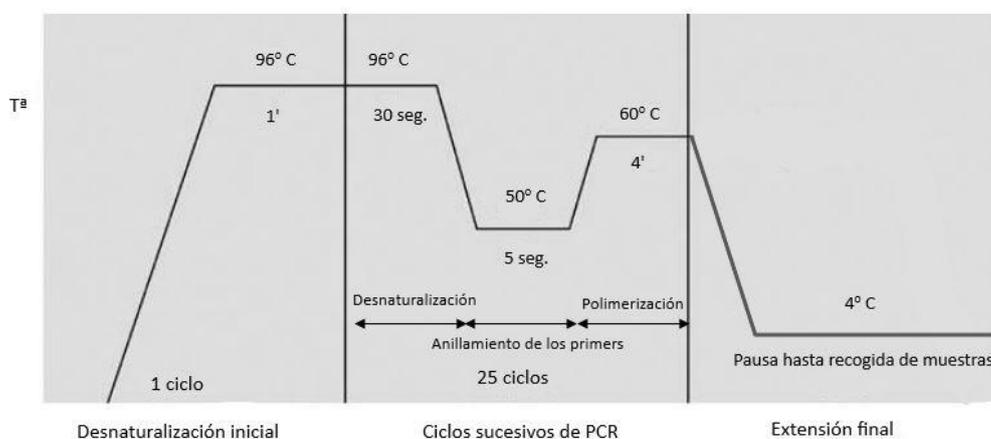


Figura 12. Etapas de un experimento de PCR dirigido a la secuenciación de un fragmento genómico.

El producto de PCR se precipitó mediante la adición de Acetato de Sodio 3 M pH 5,2; EDTA 125 mM y Etanol al 100%. Tras una mezcla en vórtex, un periodo de oscuridad y 15 min de centrifugado a máxima velocidad; se eliminó el sobrenadante, resuspendiendo con 35 μ L de Etanol al 70%. Por último, se realizó un centrifugado de 10 min a máxima velocidad, eliminando la totalidad del sobrenadante. Las muestras se mantuvieron secando en oscuridad toda la noche para, al día siguiente, resuspender con 10 μ L de formamida. Las muestras resuspendidas fueron entregadas a los servicios de secuenciación de la Universidad de Almería. Allí fueron secuenciadas mediante un secuenciador automático haciendo uso de electroforesis capilar asociada a un espectrofotómetro, obteniendo como resultado un cromatograma de cada muestra que fue analizado mediante herramientas bioinformáticas.

4.2.5. Análisis bioinformático de secuencias genómicas

A partir de la secuencia nucleotídica del gen *TGSO*, depositada en la base de datos *Sol Genomics Network* (<https://solgenomics.net/>), se predijo *in silico* la secuencia nucleotídica del ORF más probable y su secuencia de aminoácidos mediante el software “ORF Finder” del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>). Además, se predijo de igual forma los efectos que tendrían los nuevos alelos generados mediante tecnología CRISPR/Cas en la proteína TGSO. Una vez obtenidas estas, se procedió al análisis de los dominios funcionales presentes en las mismas. Para ello se utilizó la base de datos de PFAM (<http://pfam.xfam.org/>) del EBI (Europeans Bioinformatics institute) que dedujo el dominio Kinasa. Por su parte, los dominios LRR y la región transmembrana se predijeron mediante el programa LRRfinder (www.lrrfinder.com). Para la elaboración del gráfico de dominios se utilizó la herramienta “Generate domain images” de PFAM-EBI.

4.3. Caracterización fenotípica de líneas CRISPR

4.3.1. Aislamiento y fenotipado de embriones

Para la caracterización embrionaria se siguió el protocolo descrito por Ortiz-Atienza *et al.* (2020). Se realizó un proceso de humectación y esterilización mediante una “serie de aguas”. Primero se introdujeron las semillas en una disolución de 50 mL formada por una mezcla de agua autoclavada e hipoclorito de sodio al 10% (lejía comercial) en una relación 50:50 junto a 1-2 gotas de Tritón X-100. Estas se mantuvieron en la mezcla durante 30 min. Pasado este tiempo, se limpiaron las semillas de la solución de esterilización mediante 3 cambios sucesivos del medio líquido con agua autoclavada a 5 y 10 min, terminando con una etapa en agua estéril de 2,5 horas.

Una vez terminado, el primer paso consistió en eliminar la capa de mucílago que recubre la semilla. Para poder eliminar esta capa adherida a la testa se realizaron movimientos de arrastre en su superficie con un bisturí del número 11. Cuando esta se había eliminado por completo, se realizó un corte en el extremo de la testa más cercano a los cotiledones procurando no dañar los mismos. Al generar el orificio, emergen parte de estos cotiledones y con ayuda de unas pinzas se extrajo el embrión por el orificio creado mediante el empuje de la radícula (Figura 13). Todo el proceso fue realizado con una lupa binocular Nikon SMZ1500 y un iluminador Volpi Intralux 4000-1. Por último, la visualización de las formas embrionarias se llevó a cabo haciendo uso de un macroscopio digital Leica DMS1000.

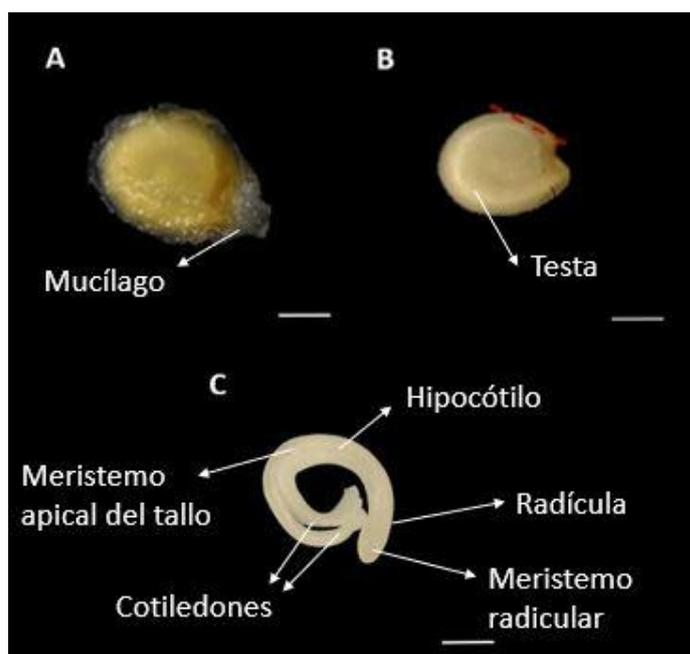


Figura 13. Diferentes fases del proceso de extracción de embriones. A) Semilla esterilizada. B) Semilla en la que se ha eliminado la capa mucilaginosa que recubre la testa. C) Embrión rescatado, separado del interior de la semilla. La línea roja discontinua indica la posición del corte a realizar en la semilla para la separación de la testa y el rescate del embrión. Escala: 1 mm

4.3.2. Desarrollo embrionario en condiciones *in vitro*

Siguiendo el protocolo mostrado en el apartado anterior, se realizó la extracción de embriones en campana estéril. Los embriones recuperados se dispusieron sobre placas de Petri con medio de Germinación (MG). Este contendrá las soluciones minerales MS (Murashige & Skoog, 1962) con sacarosa al 1% y Agar al 0,8% (Ortiz-Atienza *et al.*, 2020). Se colocaron unos 10 embriones por placa y estas se introdujeron en una cámara en condiciones controladas de fotoperiodo de día largo a 24 °C. Durante los primeros dos días, las placas permanecieron tapadas con papel de aluminio para favorecer el crecimiento, destapándolas pasado este tiempo. Cumplida una semana en placa, los embriones fueron transferidos a tubos de ensayo de forma individual, manteniéndose las condiciones de crecimiento establecidas (Figura 14).

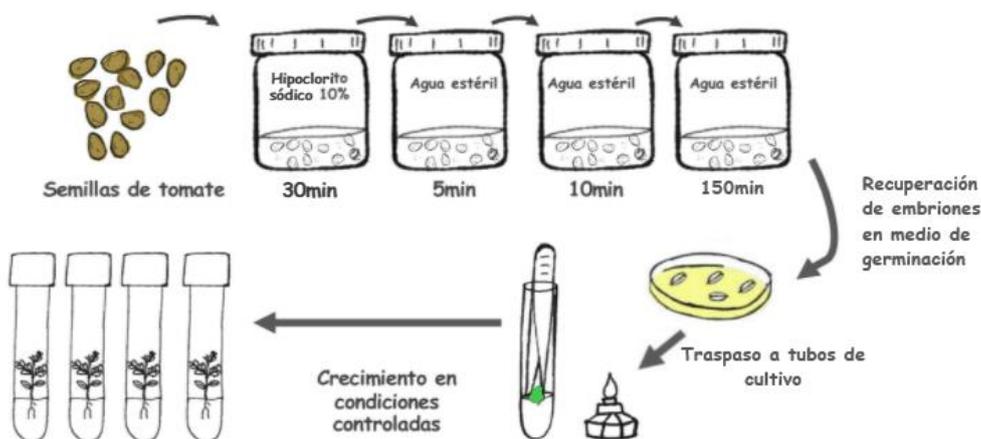


Figura 14. Esquema del protocolo seguido para el rescate de embriones de tomate (elaborado a partir del que se encuentra en Ortiz-Atienza et al., 2020)

4.3.3. Fenotipado *in vivo* de plántulas CRISPR

Para evaluar el crecimiento de las plántulas sin realizar la extracción de embriones, se pregerminaron las semillas tras su esterilización mediante una serie de aguas. En este caso, la serie de aguas fue análoga a la usada en apartados anteriores pero dejando las semillas sólo 15 min en el último lavado. Cuando pasaron los diferentes tiempos, estas se dispusieron en placas de petri (unas 15-20 por placa) con 2 papeles de filtro humedecidos con 5 mL de agua estéril. Se llevaron a una cámara de cultivo de condiciones controladas a 24 °C y un 60% de humedad relativa. Transcurridos 5 días, las semillas pregerminadas se colocaron en macetas con tierra previamente autoclavada divididas por líneas en grupos de 10 y fueron llevadas a otra cámara para su crecimiento en condiciones idóneas.

5. Resultados

5.1. Caracterización genotípica de las líneas CRISPR de la progenie TG₁

Las líneas TG₁ de tomate generadas mediante una construcción CRISPR/Cas9 fueron autofecundadas para obtener las correspondientes progenies TG₂. Tanto plantas de las líneas TG₁ como de sus progenies TG₂ constituyeron el material vegetal de estudio para este trabajo fin de grado. La caracterización genotípica tuvo como primer objetivo identificar los diferentes alelos editados presentes en las plantas progenitoras TG₁ para, de esta forma, predecir los fenotipos y genotipos de los embriones TG₂ a analizar posteriormente. Del proceso inicial de transformación con la construcción CRISPR/Cas9 se obtuvieron 17 plantas TG₁, generándose dos clones de cada una de ellas, denominados clones a y b, si bien en este trabajo se han caracterizado 10 de estas líneas, tal y como se muestra en la Tabla 1. Tras la purificación del DNA genómico de cada una de ellas, el análisis mediante PCR de la secuencia nucleotídica del gen *TGSO* permitió identificar diferentes variantes alélicas, correspondiendo todas ellas a deleciones en la secuencia del gen objeto de estudio. Los resultados del análisis y el número de semillas obtenidas de cada línea TG₁ se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Cambios en la secuencia nucleotídica del gen *TGSO* detectados en las líneas TG₁ obtenidas mediante CRISPR/Cas9, y número de semillas TG₂ obtenidas mediante autofecundación en cada una de ellas.

| Línea TG1 | Edición genómica (#) | Genotipo | Número de semillas |
|-----------|------------------------------------------|----------------------|--------------------|
| 1a | A1 (-6), A2 (-1) | Mutante bialélico | 90 |
| 4b | A3 (-4) | Homocigótico mutante | 120 |
| 6a | Múltiples alelos, incluyendo el alelo WT | Quimera | 500 |
| 6b | Múltiples alelos, incluyendo el alelo WT | Quimera | 300 |
| 7a | A3 (-4), A4 (-7), WT | Quimera | 1.000 |
| 9a | A3 (-4), A4 (-7), WT | Quimera | 470 |
| 9b | A3 (-4), A4 (-7), WT | Quimera | 460 |
| 11a | A3 (-4), A4 (-7) | Mutante bialélico | 57 |
| 13a | A3 (-4), A4 (-7), WT | Quimera | 230 |
| 13b | A3 (-4), A4 (-7), WT | Quimera | 150 |
| 14a | A3 (-4), A4 (-7), WT | Quimera | 180 |
| 14b | A3 (-4), A4 (-7), WT | Quimera | 220 |
| 15b | A3 (-4), A4 (-7), WT | Quimera | 50 |
| 16a | A3 (-4), A4 (-7), WT | Quimera | 300 |
| 16b | A3 (-4), A4 (-7), WT | Quimera | 1.500 |

(#) Con la letra A se indican los nuevos alelos editados; los valores negativos entre paréntesis indican el número de nucleótidos delecionados en cada variante alélica. WT indica el alelo silvestre.

Cabe señalar que, la mayoría de las plantas TG₁ presentaron mutaciones bialélicas (dos alelos mutantes en un mismo locus) en el gen *TGSO*, excepto la línea 4b que resultó ser homocigótica mutante para el alelo A3 generado por una deleción de 4 nucleótidos en la secuencia del gen *TGSO*. En concreto, la línea 1a es portadora de dos alelos mutantes, el alelo editado 1 (A1) y el alelo editado 2

(A2) caracterizados por presentar una delección de 6 y 2 nucleótidos, respectivamente. De forma similar, el genotipo de la línea 11 incluye dos alelos mutantes, el alelo A3 y el alelo editado 4 (A4), que se caracterizan por la presencia de una delección de 4 y 7 nucleótidos, respectivamente. El resto de las líneas TG_1 resultaron ser más heterogéneas, con más de dos alelos del mismo locus, por lo que fueron consideradas como quimeras. La mayoría de estas líneas quiméricas presentaron los alelos editados, A3 y A4 (Tabla 1), aunque también portan el alelo silvestre de *TGSO* (WT), por lo que cabe esperar que en su descendencia TG_2 estos tres alelos estén segregando. De este modo, sería esperable encontrar entre sus descendientes individuos tanto de fenotipo WT como mutante.

La descripción de los nuevos alelos editados se va a centrar en aquellos presentes con una frecuencia significativa en las líneas CRISPR analizadas, a saber, los alelos A1, A2, A3 y A4, si bien fueron estos dos últimos los que se detectaron mayoritariamente en todas las líneas, con excepción de la línea 1ª, en la que únicamente estaban presentes los alelos A1 y A2. Así, la delección del alelo A3 promueve la aparición de un codón de terminación prematura de la transcripción (codón stop) 1149 pb antes del presente en el alelo silvestre (WT). Y esto es lo que también sucede en el alelo A4, si bien en este caso, el codón stop se localiza 1152 pb antes de la posición normal en el alelo WT. En consecuencia, la longitud de los marcos abiertos de lectura (ORF) se reduce a 2604 y 2601 pb para los alelos A3 y A4, respectivamente, tamaño que difiere significativamente de las 3753 pb que muestra el alelo silvestre. Por su parte, el alelo A1 es portador de una delección de un nucleótido de citosina en la posición 2529 pb que, al igual que en los casos anteriormente descritos, dará lugar a la formación de un codón stop prematuro. Este se encontrará 1146 pb aguas arriba del presente en el alelo silvestre, lo que cambiará el ORF predicho a 2607 pb frente a las 3753 pb del ORF del alelo WT. Finalmente, el alelo A2 se caracterizó por la delección de seis nucleótidos, que no altera el marco abierto de lectura respecto al alelo silvestre, siendo igualmente la longitud prevista de 3747 pb, 6 pb menos que las presentes en el ORF no editado (Figura 15).

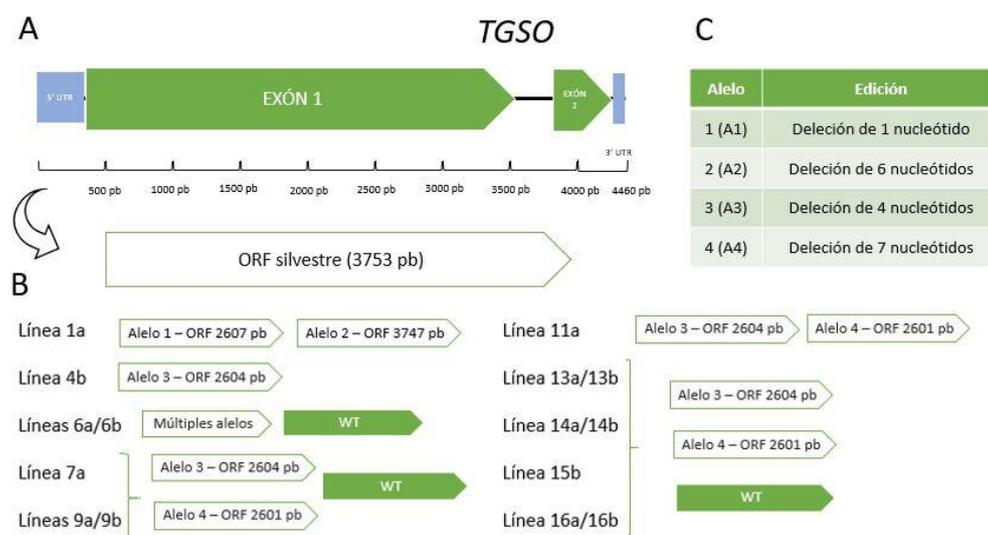


Figura 15. Caracterización molecular de las plantas CRISPR *TGSO* TG_1 . A) Estructura silvestre del gen *TGSO*, de 4460 pb, y longitud del ORF predicho para el mismo, de 3753 pb. B) Longitud de los ORF predichos para los alelos observados en las plantas de cada línea analizada. C) Edición asociada a cada alelo analizado.

En lo referente a la secuencia aminoacídica, la proteína silvestre predicha a partir del alelo silvestre del gen *TGSO* consta de 1250 aminoácidos, mientras que, en caso de llegar a ser transcritos y traducidos, los alelos A1, A3 y A4 codificarían proteínas truncadas de 868, 867 y 866 aminoácidos, respectivamente. Este cambio supondría la pérdida de casi un tercio del tamaño de la proteína WT en las plantas editadas (Figura 16). A nivel de dominios funcionales, el programa “LRRfinder” y la base de datos “PFAM” predicen para la proteína el WT la presencia de 24 secuencias LRR, un dominio transmembrana y un dominio kinasa. Sin embargo, para la secuencia de las nuevas variantes alélicas A1, A3 y A4, las ediciones generadas por CRISPR/Cas9 causarían la pérdida tanto de los dominios kinasa, como del dominio transmembrana, no viéndose afectados las secuencias LRR (Figura 16). Por su parte, la variante alélica A2 carecerá únicamente de dos aminoácidos, de fenilalanina y treonina, que corresponden a los presentes en las posiciones 843 y 844 de la proteína silvestre, no afectando a la secuencia ni de los motivos ni de los dominios funcionales predichos (Figura 16).

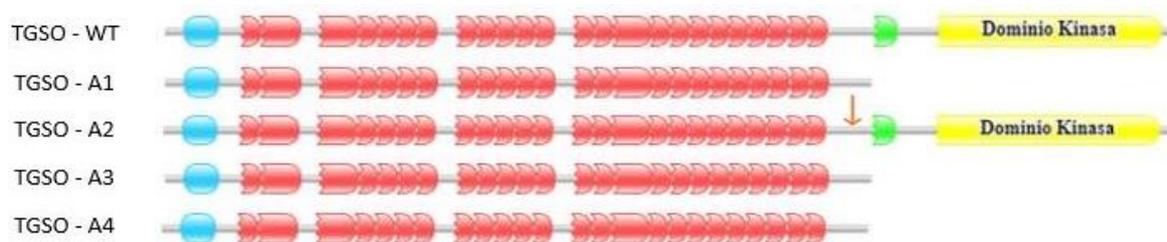


Figura 16. Representación gráfica del alineamiento de los motivos y dominios funcionales de la proteína *TGSO* y los péptidos traducidos a partir de los alelos CRISPR editados. En azul se representa el péptido señal, en rojo las repeticiones ricas en leucina (LRR), en verde el dominio transmembrana, y en amarillo se representa el dominio kinasa. Cabe destacar la ausencia de estos dos últimos dominios en las proteínas codificadas por los dos alelos editados A3 y A4. Mediante una flecha naranja se señala la posición de los dos aminoácidos perdidos en el A2 respecto al alelo silvestre

Habida cuenta que tanto el dominio transmembrana como el dominio kinasa son absolutamente esenciales para la función de la proteína *TGSO*, no cabe duda de que las variantes alélicas A1, A3 y A4 significan la falta total de función de la proteína codificada, y por tanto se trata de alelos nulos o alelos *knock-out* del gen *TGSO*.

5.2. Caracterización fenotípica de embriones y plántulas TG₁ procedentes de líneas CRISPR TG₁

Mediante autofecundación de las líneas CRISPR TG₁ descritas en el apartado anterior se obtuvieron las correspondientes progenies TG₂ en un número variable de semillas (Tabla 1). Para el estudio del desarrollo embrionario, se eligieron las líneas CRISPR 6a, 7a, 9a, 11a y 16b a fin de caracterizar el fenotipo de los embriones, así como el de las plántulas a las que estos daban lugar como resultado de la diferenciación celular y crecimiento de los mismos. En estadio de plántula, se evaluaron dos tipos de ellas, a saber, las desarrolladas a partir de embriones aislados a partir de semillas y cultivados en condiciones *in vitro*, así como las crecidas a partir de semillas pregerminadas en condiciones semi-estériles en placas de Petri.

5.2.1. Caracterización fenotípica de embriones TG_2

Tras la desinfección de las semillas TG_2 tal y como se muestra en el protocolo de la Figura 14, se aislaron embriones procedentes de las líneas CRISPR 6a, 7a, 9a, 11a y 16b y se comparó su fenotipo con el de embriones aislados de semillas procedentes de plantas WT. A excepción de la línea 11a, en la cual no se detectaron embriones de fenotipo normal, la mayoría de los embriones extraídos de las otras cuatro líneas mostraban un desarrollo normal, probablemente por ser portadoras del alelo WT del gen *TGSO*. No obstante, en estas últimas se identificaron varios embriones que exhibían morfologías alteradas, esencialmente a nivel de los cotiledones. Estos carecían de la disposición curvada característica de los embriones WT. En su lugar, los cotiledones de embriones CRISPR mostraban escasa curvatura, manteniéndose uno de ellos, adherido a la base por su cara adaxial (Figura 17 B). Además, ambos cotiledones se mantenían fusionados total o parcialmente a lo largo del eje longitudinal (Figura 17 C, D).

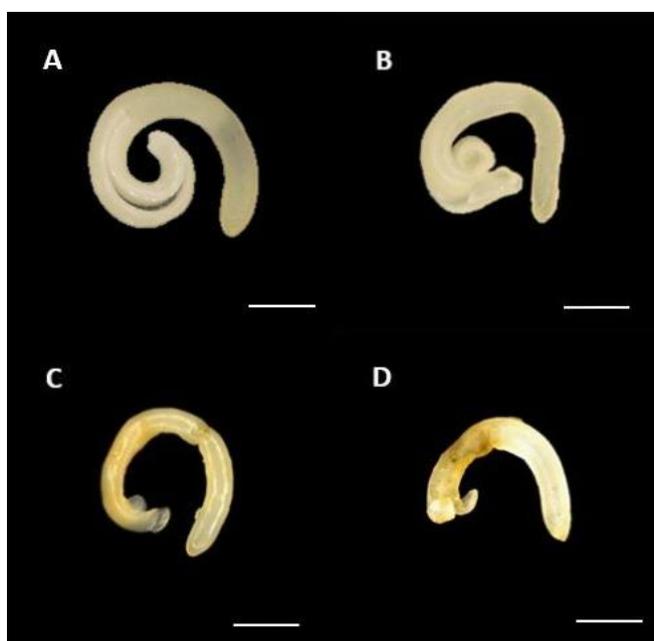


Figura 17. Disposición y morfología de los embriones de líneas CRISPR. A) Embrión de fenotipo silvestre (WT). B) Embrión CR-6a de fenotipo anómalo en el que se aprecia el giro defectuoso de los cotiledones, la adhesión del cotiledón adaxial a la base del mismo, así como la fusión parcial de ambos cotiledones. C y D) Embriónes CR-9a de fenotipo anormal, en los que se observa un escaso desarrollo, la fusión longitudinal de los cotiledones, y la coloración más oscura de estos. Escala: 1 mm

Otro rasgo a destacar de los embriones CRISPR es su coloración, que se torna más oscura o parduzca especialmente en la región basal de los cotiledones (Figura 17, D), o incluso en la superficie de la semilla. No obstante, el carácter que probablemente mejor define a una parte significativa de los embriones de líneas CRISPR es su escaso desarrollo. En las líneas CRISPR editadas, y de modo muy particular, en las semillas de la línea 11, se encontraron embriones de tamaño muy reducido, fenotipo causado principalmente por una reducción en la longitud de los cotiledones y una menor elongación del hipocótilo (Figura 18B-D). En ellos, además se pudieron observar también los caracteres ya descritos como la presencia de cotiledones fusiones y de color pardo, así como la morfología y curvatura alteradas de los propios embriones (Figuras 17 y 18).



Figura 18. Alteraciones en el desarrollo embrionario de líneas CRISPR. A) Embrión de fenotipo silvestre (WT). B, C y D) Embriones rescatados de semillas CR-11a, que muestran un tamaño reducido, alteración en la morfología y la fusión parcial de los cotiledones. Escala: 1 mm

Después del análisis fenotípico de los embriones, se procedió a caracterizar el fenotipo de las semillas procedentes de líneas CRISPR. Dentro de estas hay que señalar caracteres asociados al tamaño y la coloración de la testa, además de su dureza. En lo referente al tamaño, una proporción significativa de semillas mostraron esterilidad, es decir, carecían de embrión, y presentaban un mucho más reducido, hasta la mitad del tamaño normal. La coloración fue así mismo una característica común en muchas semillas de las líneas CRISPR estudiadas, y concretamente la tonalidad parda y ocres de la testa (Figura 19C), que además se corresponde con la coloración observada en los cotiledones de los embriones aislados de tales semillas. En casos extremos se detectaron semillas carentes de embrión, de tamaño muy reducido y coloración intensa. En lugar del embrión, todo el interior se encontraba ocupado por el endospermo formando una masa uniforme y homogénea (Figura 18C, F).



Figura 19. Morfología de semillas y embriones CRISPR. A y D) Semilla y embrión producidas por plantas WT. B y E) Semilla y embrión de la línea CRISPR CR-9a. Se puede observar el tamaño reducido del embrión y la disposición anómala de sus cotiledones. C y F) Semillas estériles, carentes de embrión, producidas por la línea CR-11a. Escala: 1 mm.

5.2.2. Caracterización fenotípica de plántulas TG₂

5.2.2.1. Plántulas desarrolladas en condiciones de cultivo *in vitro*

Una vez caracterizado el desarrollo de los embriones rescatados a partir de semillas TG₂ producidas por líneas CRISPR del gen *TGSO*, quisimos analizar la consecuencias que las anomalías observadas en dichos embriones pudieran tener sobre el desarrollo post-embrionario, es decir, de las plántulas surgidas tras la diferenciación y crecimiento de los tejidos embrionarios. Con esta finalidad se utilizó tanto el rescate de los embriones en medio de germinación para su crecimiento *in vitro* como la siembra de semillas pregerminadas en placas de Petri.

En el primer caso, las plántulas cultivadas *in vitro* se analizaron cuando estas exhibían las primeras hojas verdaderas posteriores a los cotiledones, 14 días tras el rescate del embrión y 7 días después de que este fuese transferido a un tubo de ensayo para su adecuado crecimiento. En estas condiciones solo algunos embriones de fenotipo normal fueron capaces de alcanzar el estado de plántula, lo que sugiere la presencia en tales embriones de alteraciones significativas que impiden su correcto desarrollo.

Por su parte, los embriones alterados de fenotipo suave, especialmente de la línea 7a, se desarrollaron hasta alcanzar el estado de plántula, sin embargo, se observó que estas mostraban una curvatura inusualmente anómala y menor longitud. Aun así, las plántulas se dejaron crecer durante 3-4 semanas más al objeto de analizar posibles alteraciones en fases posteriores del crecimiento. Gracias a ello, se identificaron plántulas con escaso desarrollo vegetativo y disposición anómala de los tejidos foliares, en las cuales fue significativo encontrar la formación de una estructura de tipo calloso similar al teratoma observado en las plantas del mutante *1310etmm* (Figura 20B). En esta etapa se tomaron muestras para la caracterización genotípica. Finalmente, aquellos embriones con un fenotipo más extremo se mantuvieron totalmente arrestados en su desarrollo, y por tanto incapaces de proseguir su crecimiento.

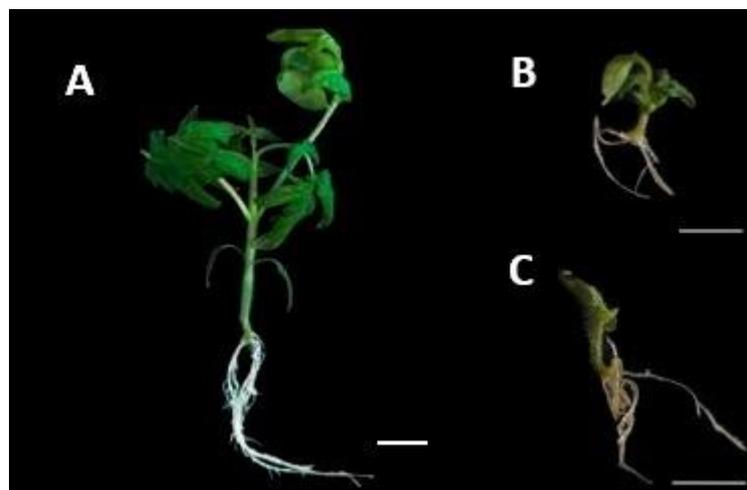


Figura 20. Plántulas crecidas en condiciones “*in vitro*” a partir de embriones rescatados de semillas CRISPR. A) Plántula recuperada a partir de una semilla WT. B) Plántula desarrollada a partir de un embrión CR-7a en la que destaca su pequeño tamaño y la formación de una estructura callosa al inicio del crecimiento vegetativo. C) Plántula de fenotipo alterado, de pequeño tamaño y morfología anómala de los cotiledones procedente de semilla CR-7a. Escala de los paneles: 1 cm

5.2.2.2. Plántulas crecidas *in vivo*

Por otra parte, se realizó el análisis fenotípico a plántulas crecidas a partir de semillas esterilizadas y pre-germinadas, sin que mediara el rescate de embriones. Para facilitar el crecimiento de las mismas se mantuvieron 5 días en placas de Petri con papel de filtro humedecido con agua estéril hasta su germinación en condiciones controladas, momento en que se transfirieron a macetas con tierra. Transcurridos 10 días, las plántulas presentaban un crecimiento similar a las desarrolladas en condiciones de cultivo *in vitro*, es decir, habían formado las dos primeras hojas verdaderas (posteriores a los cotiledones). En este estadio no se observó en las plántulas procedentes de semillas CRISPR un fenotipo reconocible distinto al de las plantas silvestres. No obstante, cabe destacar la falta de germinación de las semillas en las líneas 6b y 11a, en la que ya durante la caracterización fenotípica embrionaria se observó la ausencia de embriones maduros en muchas de las semillas producidas.

5.3. Relación fenotipo embrionario-genotipo editado

Una vez extraído el DNA de las muestras de hojas de plántulas y embriones de fenotipo anómalo, se procedió a la secuenciación de los alelos *TGSO* presentes en dichas muestras, al objeto de corroborar la correlación entre la edición presente en los diferentes alelos CRISPR y el fenotipo observado en las líneas evaluadas. Como resultado, se encontró que la mayoría de las plántulas crecidas *in vitro* que mostraban alteraciones en su desarrollo (Figuras 20 y 21) presentaban una elevada proporción de alelos WT, y, por tanto, se podría calificar como plántulas de genotipo silvestre (Figura 21).

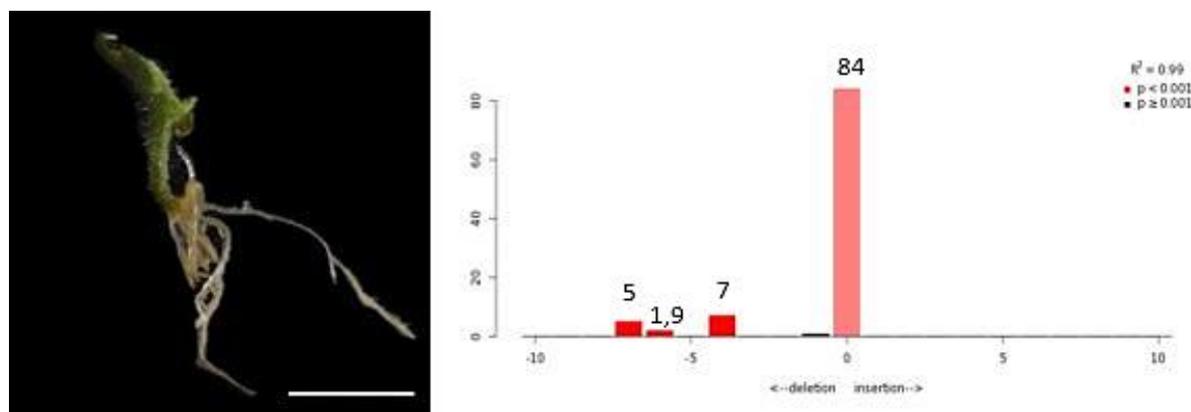


Figura 21. Correlación genotipo-fenotipo en plántulas crecidas a partir de semillas CRISPR. A tenor de la elevada frecuencia de alelos WT (gráfica derecha), la mayoría de estas plántulas eran genotípicamente silvestres, aun cuando mostraban alteraciones en su desarrollo (izquierda). En rosa se muestra la frecuencia del alelo WT y en rojo la de los alelos editados. En el eje de abscisas se presentan los número de nucleótidos delecionados en cada alelo. (Datos obtenidos en <http://shinyapps.datacurators.nl/tide/>). Escala del panel izquierdo: 1 cm.

En lo referente a los embriones, se observó que aquellos que mostraban alteraciones significativas en su desarrollo, eran portadores de alelos editados distintos al alelo WT, y en una frecuencia significativamente alta (Figura 22). Este fue el caso de los alelos encontrados en los

embriones de las líneas 6b, 9a, 11a y 16b que mostraban un desarrollo arrestado en fases tempranas, y, por consiguiente, eran totalmente incapaces de continuar su crecimiento.

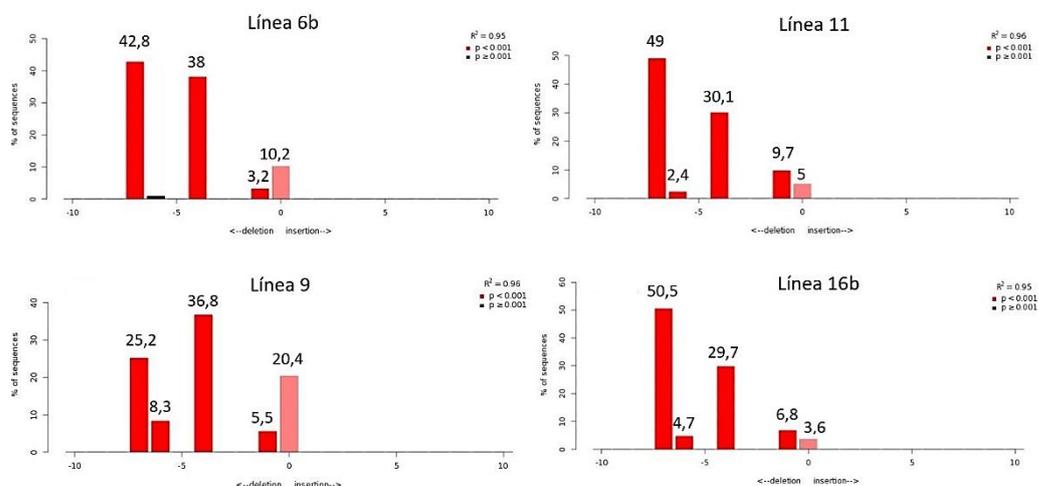


Figura 22. Correlación entre DNA editado y fenotipo en embriones carentes de crecimiento. Se puede observar una mayor proporción de DNA editado en la región indicada por el gRNA. Cabe destacar la predominancia de alelos -4 y -7, aunque aparecen también en menor medida alelos con otro número de deleciones, sobre todo -6 y -1 (Gráfico obtenido mediante <http://shinyapps.datacurators.nl/tide/>).

De forma generalizada, en los embriones editados que fueron caracterizados en este apartado predominaban los alelos A3 (-4) y A4 (-7). Sin embargo, se encontró que en todos los embriones analizados aparecían también, aunque con menos frecuencia, los alelos A1 (-1) y A2 (-6). Un análisis más detallado de los alelos encontrados permitió determinar que no todos los alelos con igual número de nucleótidos delecionados tenían la misma secuencia nucleotídica, y, por tanto, eran portadores de la misma edición CRISPR. Así, se encontraron dos alelos nuevos con una delección de 7 nucleótidos en diferentes posiciones distintas a la del alelo A4. A estos se les denominó alelo 5 (A5) y alelo 6 (A6). La caracterización molecular de dichos alelos mostró que la longitud de la secuencia aminoacídica no cambiaba respecto a la traducida a partir del alelo A4 y no se predecía ninguna alteración distinta en los dominios funcionales que caracterizan a la proteína *TGSO*. Por tanto, solo cambiaba la secuencia de bases nucleotídicas en la región diana del RNA guía, lo que suponía, como en el caso del alelo A4, la aparición de un codón stop prematuro, y por tanto de una proteína truncada.

Finalmente, el análisis molecular de los embriones de fenotipo anormal nos llevó a otras consideraciones adicionales acerca de los alelos editados de los que estos eran portadores. Así, los embriones de las progenies de las líneas 6b, 9a, 11a y 16b presentaban, todos ellos una proporción significativamente alta de los alelos A3 y A4. Adicionalmente, se encontró el alelo A5 en los embriones de la línea 11a, el alelo A6 en los procedentes de la línea 16b, y el alelo WT en los embriones de la línea 6b. La presencia de más de 2 alelos en cada línea indica que en todos los embriones analizados se observa un “mosaico genético”. Este hecho implica que no todas las células de los mismos presentan igual secuencia genotípica (Figura 23).

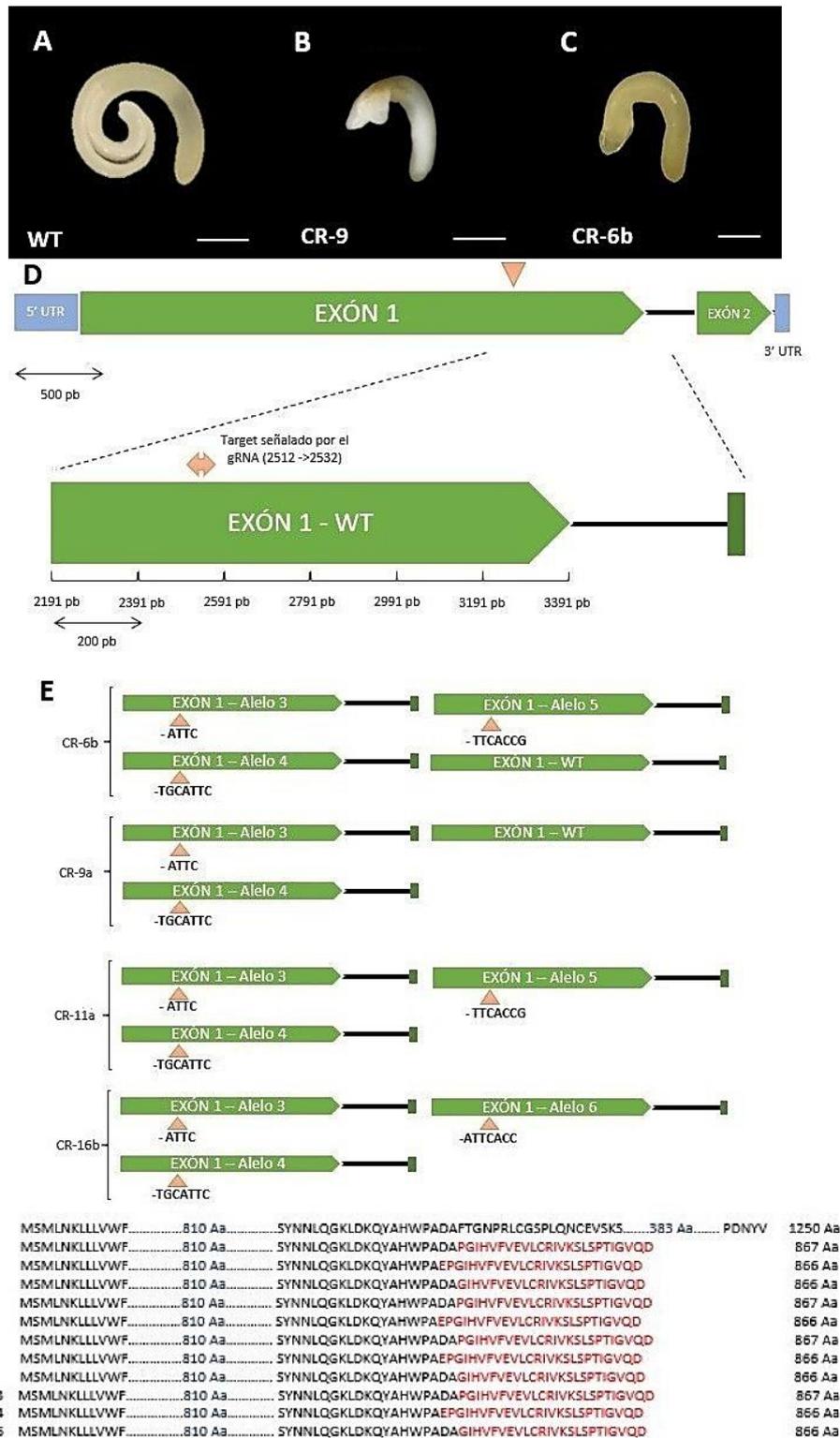


Figura 23. Correlación entre fenotipo y genotipo de embriones procedentes de las líneas CRISPR CR-6a y CR-9a. A-C) En comparación con el embrión rescatado de una semilla WT (A), los embriones rescatados de las líneas CR-9a (B) y CR-6b (C) muestran alteraciones notables en su desarrollo, quedándose arrestados en su crecimiento. D) Organización genómica del gen TGSO, con indicación de la región elegida para la edición mediante CRISPR/Cas9 (línea punteada) y la secuencia diana del RNA guía (flecha doble naranja). E) Esquema de la organización genómica de los nuevos alelos editados que fueron identificados en embriones procedentes de cuatro líneas CRISPR (6b, 9a, 11a, 16b). F) Secuencias aminoacídicas esperadas para las proteínas codificadas por cada uno de los alelos editados en las líneas CRISPR del panel E. Escala en el panel A: 1 mm. Se puede constatar que las anomalías en el desarrollo embrionario de las líneas CR-9a y CR-6b se corresponden con la presencia de dos alelos editados de TGSO en el genotipo de estas líneas, y que promueven la pérdida de la función de este gen.

6. Discusión

El trabajo expuesto analiza la alteración fenotípica causada por mutaciones del gen *TGSO* (*Solyc05g007230*) en diferentes líneas de tomate editadas mediante la tecnología CRISPR/Cas9. Trabajos previos demostraron que los genes de *A. thaliana* homólogos a *TGSO*, denominados *GASSHO1* (*GSO1*) y *GSO2* se encuentran implicados en la formación y desarrollo de la epidermis y la cutícula del embrión (Moussu *et al.*, 2013). Estos codifican dos receptores tipo quinasa con repeticiones ricas en leucina que se sitúan en la membrana plasmática de las células de la protodermis (Tsuwamoto *et al.*, 2008). Los genes *GSO1-2* interaccionan con *ZHOUP1* (*ZOU*) y *ABNORMAL LEAF SHAPE1* (*ALE1*), siendo el primero un factor de transcripción que se expresa en las células del endospermo, donde activa a *ALE1*, una serin-proteasa también específica de este tejido embrionario (Yang *et al.*, 2008; Xing *et al.*, 2013).

El mecanismo molecular en el que participan las proteínas GSO de *Arabidopsis* comienza con la expresión de *ZOU* en el endospermo y la consiguiente formación de *ALE1*. Este, usando como sustrato la proteína producto del gen *TWISTED SEED1* (*TWS1*), previamente modificada por TIROSIL-PROTEIN SULFOTRANSFERASE (TPST) (Fiume *et al.*, 2016); generaría un ligando reconocible por los receptores *GSO1* y *GSO2* (Doll *et al.*, 2020). Al detectarlo, estos iniciarían una cascada de transducción que activaría la expresión de los genes encargados de la biosíntesis de la cutícula en las células de la protodermis (Javelle *et al.*, 2011) (Figura 24).

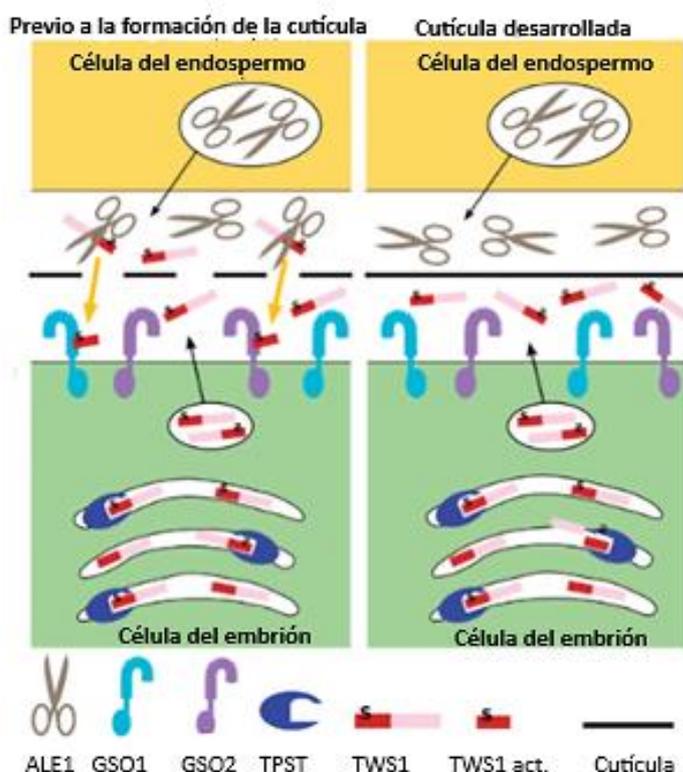


Figura 24. Modelo de desarrollo de la cutícula mediante la modificación postranscripcional del gen *TWS1* (adaptado de Doll *et al.*, 2020).

A su vez, la cutícula actuaría como una barrera de difusión que impedirá el paso de TWS1, lo que frenaría la activación de este proceso (Moussu *et al.*, 2013). Además, la formación de esta barrera de difusión tendría una doble función al aumentar la concentración del ligando reconocido por ACR4 para la diferenciación de la epidermis durante la embriogénesis, siendo este, por tanto, un proceso de regulación vital en las primeras etapas del desarrollo embrionario (San-Bento *et al.*, 2014; Doll *et al.*, 2020). La importancia de este mecanismo del desarrollo implica que la ausencia de expresión de algunos de sus componentes llevaría a un desarrollo anómalo no sólo de la cutícula de la planta, sino también de su epidermis. Al describir el doble mutante *gso1-2* se observan alteraciones tales como el cambio en el eje de giro del embrión o la dificultad en el crecimiento de la planta en condiciones normales de cultivo (Tsuwamoto *et al.*, 2008). En tomate, el mutante *1310etmm* previamente descrito por Quispe (2018) muestra alteraciones similares en el desarrollo embrionario, además de otras anomalías como la fusión de los cotiledones o la formación de estructuras callosas indiferenciadas, de tipo teratoma, en etapas post-embrionarias.

La caracterización de los embriones procedentes de líneas CRISPR mostraron un fenotipo más severo que el del mutante *1310etmm/gso*, esencialmente el arresto en el desarrollo embrionario de los primeros. Esta diferencia podría deberse a la naturaleza molecular de cada una de las mutaciones estudiadas. Así, mientras el mutante *1310etmm/tgso* es portador de una sustitución C->T en el dominio quinasa de la proteína *TGSO*, y que altera la funcionalidad de esta, las deleciones de 4 y 7 nucleótidos que caracterizan a los alelos CRISPR A3 y A4 suponen la aparición de un codón stop prematuro y con ello la pérdida del dominio transmembrana y quinasa, y por tanto serían incapaces de captar y transducir la señal, lo que sin duda supondría la pérdida total de la función de la proteína *TGSO*. Estos resultados permiten concluir que la proteína *TGSO* desempeña un papel clave en la regulación del desarrollo embrionario de tomate.

La proteína *TGSO* no solo participa en una compleja ruta del desarrollo embrionario; sino que modula la diferenciación de la epidermis. Tiene por tanto sentido que la falta total de función tenga consecuencias severas en el desarrollo embrionario. Esta teoría se confirma con la correlación positiva entre embriones incapaces de crecer y el genotipo editado que estos poseen, caracterizado por la presencia de mutaciones CRISPR. Por tanto, los resultados indican que la falta de función del gen *TGSO* es causante de cierta letalidad embrionaria que impide el crecimiento y provoca la muerte del embrión llegadas las últimas fases de su desarrollo. La causalidad de la mutación en la letalidad de los embriones se puede corroborar no solo por las correlaciones genotipo editado-fenotipo, sino por el hecho de que el desarrollo embrionario se vea interrumpido en la etapa de corazón-torpedo (Figura 25), durante la cual tiene lugar la formación de la cutícula y el desarrollo de la epidermis (Lin & Schiefelbein, 2001; Xing *et al.*, 2013).

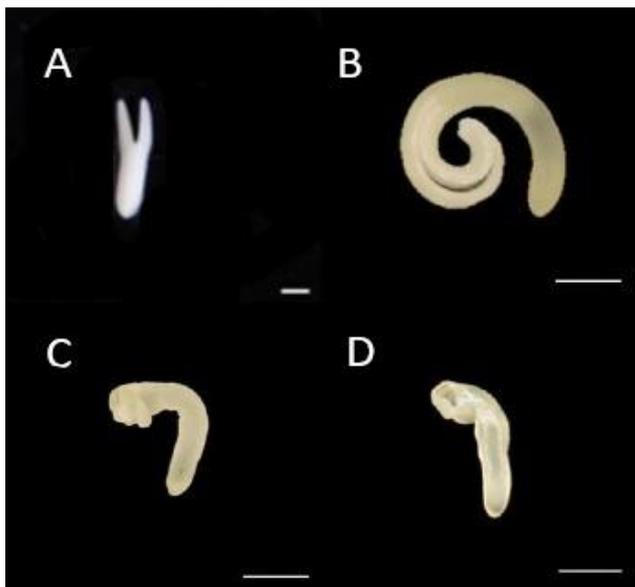


Figura 25. Desarrollo de la fase corazón-torpedo en embriones rescatados de semillas CRISPR *TG₂* (Goetz *et al.*, 2012). A) Embrión en etapa de torpedo inicial; B) Embrión maduro. Los paneles C y D muestran dos embriones rescatados de semillas CRISPR *TG₂* de las líneas 11a y 9a; ambas muestran anomalías significativas en el desarrollo de tales embriones. Las barras de escala representan 250 μm para el panel A y 1 mm para el resto de paneles.

Por otro lado, en los embriones analizados aparecen también fenotipos no descritos con anterioridad como son la falta de resistencia mecánica de embrión y semilla o la aparición de coloraciones oscuras en sendas estructuras. El primer carácter podría relacionarse con la ausencia de cutícula. Esta presenta entre sus funciones la de actuar como una barrera al paso de agua (Fernandez *et al.*, 2017), por lo que su déficit conllevaría una mayor entrada de agua en el proceso de imbibición al que se someten las semillas en su esterilización, lo que aumentaría su fragilidad.

En lo referente a la pigmentación, el fenotipo observado en los embriones CRISPR concuerda con los resultados de Meinke (1985), Castle *et al.* (1993) y Fan *et al.* (2005), quienes describen la aparición de pigmentaciones amarillo-verdosas y amarronadas en embriones y semillas de diferentes líneas mutantes de *Arabidopsis* que suponen la muerte del embrión. Tales alteraciones se muestran únicamente en los embriones cuya letalidad aparece en las últimas fases de la embriogénesis, tal y como pudimos observar en los embriones CRISPR de tomate.

Por otro lado, en este trabajo pudimos determinar que algunas plántulas con alteraciones significativas en su desarrollo no eran portadoras de alelos CRISPR, siendo de genotipo WT. Esta aparente incongruencia puede encontrar su explicación en las alteraciones que el rescate de embriones y su posterior cultivo *in vitro* promueve en el desarrollo de estos.

En cualquier caso, en la elaboración de este Trabajo Fin de Grado han confluído varias circunstancias que han contribuido favorablemente a la consecución de resultados de relevancia científica, entre ellas la identificación de plantas editadas mediante el sistema CRISPR/Cas9, el análisis molecular de las misma, el rescate de embriones a partir de semillas y la puesta a punto de las condiciones adecuadas para su desarrollo *in vitro*. Ello ha permitido analizar adecuadamente los caracteres propios de la embriogénesis y de las primeras etapas del desarrollo vegetativo que, en su conjunto, confirman la función esencial que desempeña el gen *TGSO* como parte del mecanismo molecular que regula dichos procesos.

7. Conclusiones

La caracterización fenotípica, genética y molecular de embriones obtenidos de líneas CRISPR de tomate, en las que se ha editado la secuencia genómica del gen *TGSO* ha permitido profundizar acerca de la función clave que la proteína codificada por este gen, una kinasa de la familia LRR-RLK, desempeña durante la embriogénesis de tomate. Las conclusiones extraídas de los resultados obtenidos han sido las siguientes:

PRIMERA.- Se han podido identificar rescatar e identificar embriones TG_2 portadores de deleciones de diferente naturaleza en el gen *TGSO*, producto de la edición mediante CRISPR de líneas de tomate. Dentro de las diferentes ediciones, fueron mayoritarios los alelos A3 y A4 con deleciones de 4 y 7 nucleótidos, respectivamente.

SEGUNDA.- Los embriones portadores de mutaciones bialélicas y los homocigóticos para alguno de los nuevos alelos editados muestran un fenotipo anómalo, en el que destacan la fusión de los cotiledones y, sobre todo, la incapacidad para proseguir su normal desarrollo. Ello prueba que se trata de alelos de falta de función del gen *TGSO*.

TERCERA.- La correlación entre las mutaciones CRISPR y las alteraciones observadas en el fenotipo embrionario constituyen una evidencia científica acerca de la función que el gen *TGSO*, absolutamente indispensable durante el proceso de desarrollo del embrión.

CUARTA.- En etapas post-embrionarias, el fenotipo de las plántulas portadoras de alelos CRISPR muestra alteraciones en su desarrollo, y en particular la aparición de estructuras celulares indiferenciadas, tipo teratoma, que denotan anomalías en la actividad del meristemo apical del tallo. Cabe pensar que el gen *TGSO* no sólo se requiere durante la embriogénesis, sino en las primeras etapas del desarrollo vegetativo de tomate.

QUINTA.- Este trabajo supone una aportación al análisis funcional del gen *TGSO* y al conocimiento del proceso de embriogénesis en tomate, aunque para ello serán necesarios futuros estudios de mayor duración y profundidad.

8. Bibliografía

- Afzal, S., Sirohi, P., & Singh, N. K. (2020). A review of CRISPR associated genome engineering: application, advances and future prospects of genome targeting tool for crop improvement. *Biotechnology letters*, 1-22.
- Alonge, M., Wang, X., Benoit, M., Soyk, S., Pereira, L., Zhang, L., ... & Lippman, Z. B. (2020). Major impacts of widespread structural variation on gene expression and crop improvement in tomato. *Cell*, 182(1), 145-161.
- Bai, Y., & Lindhout, P. (2007). Domestication and breeding of tomatoes: what have we gained and what can we gain in the future?. *Annals of botany*, 100(5), 1085-1094.
- Bairu, M. W., Aremu, A. O., & Van Staden, J. (2011). Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regulation*, 63(2), 147-173.
- Berger, F., & Chaudhury, A. (2009). Parental memories shape seeds. *Trends in plant science*, 14(10), 550-556.
- Bergougnoux, V. (2014). The history of tomato: from domestication to biopharming. *Biotechnology advances*, 32(1), 170-189.
- Blanca, J., Cañizares, J., Cordero, L., Pascual, L., Diez, M. J., & Nuez, F. (2012). Variation revealed by SNP genotyping and morphology provides insight into the origin of the tomato. *PLoS one*, 7(10).
- Blancard, D. (2012). *Tomato diseases: identification, biology and control: a colour handbook*. CRC Press.
- Bothmer, A., Phadke, T., Barrera, L. A., Margulies, C. M., Lee, C. S., Buquicchio, F., ... & Cotta-Ramusino, C. (2017). Characterization of the interplay between DNA repair and CRISPR/Cas9-induced DNA lesions at an endogenous locus. *Nature communications*, 8(1), 1-12
- Campisi, L., Yang, Y., Yi, Y., Heilig, E., Herman, B., Cassista, A. J., ... & Jack, T. (1999). Generation of enhancer trap lines in Arabidopsis and characterization of expression patterns in the inflorescence. *The Plant Journal*, 17(6), 699-707.
- Capel, C., Del Carmen, A. F., Alba, J. M., Lima-Silva, V., Hernández-Gras, F., Salinas, M., ... & Granell, A. (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*, 128(10), 2019-2035.
- Castañeda Cruz, L. (2011). *Caracterización fenotípica y molecular de un mutante insercional de tomate* (Doctoral dissertation, Universidad de Almería).
- Castle, L. A., Errampalli, D., Atherton, T. L., Franzmann, L. H., Yoon, E. S., & Meinke, D. W. (1993). Genetic and molecular characterization of embryonic mutants identified following seed transformation in Arabidopsis. *Molecular and General Genetics MGG*, 241(5), 504-514.
- Chen, K., Wang, Y., Zhang, R., Zhang, H., & Gao, C. (2019). CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture. *Annual review of plant biology*, 70, 667-697.
- Colette, A., Lu, K. J., & Weijers, D. (2015). Building a plant: cell fate specification in the early Arabidopsis embryo. *Development*, 142(3), 420-430.
- De Smet, I., Lau, S., Mayer, U., & Jürgens, G. (2010). Embryogenesis—the humble beginnings of plant life. *The Plant Journal*, 61(6), 959-970.

- Doll, N. M., Royek, S., Fujita, S., Okuda, S., Chamot, S., Stintzi, A., ... & Ingram, G. (2020). A two-way molecular dialogue between embryo and endosperm is required for seed development. *Science*, 367(6476), 431-435.
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213).
- Emmanuel, E., & Levy, A. A. (2002). Tomato mutants as tools for functional genomics. *Current opinion in plant biology*, 5(2), 112-117.
- Esquinas-Alcázar, J. y Nuez, F. (1995). Situación taxonómica, domesticación y difusión del tomate. El cultivo del tomate (ed). Madrid, Mundi-Prensa: 13–42.
- Fan, J., Quan, S., Orth, T., Awai, C., Chory, J., & Hu, J. (2005). The Arabidopsis PEX12 gene is required for peroxisome biogenesis and is essential for development. *Plant Physiology*, 139(1), 231-239.
- FAOSTAT. (2019). < <http://faostat.fao.org/> >.
- Fei, Z., Joung, J. G., Tang, X., Zheng, Y., Huang, M., Lee, J. M., ... & Giovannoni, J. J. (2010). Tomato Functional Genomics Database: a comprehensive resource and analysis package for tomato functional genomics. *Nucleic acids research*, 39(suppl_1), D1156-D1163.
- Fernandez, V., Bahamonde, H. A., Javier Peguero-Pina, J., Gil-Pelegrín, E., Sancho-Knapik, D., Gil, L., ... & Eichert, T. (2017). Physico-chemical properties of plant cuticles and their functional and ecological significance. *Journal of Experimental Botany*, 68(19), 5293-5306.
- Fernandez-Pozo, N., Menda, N., Edwards, J. D., Saha, S., Tecle, I. Y., Strickler, S. R., ... & Mueller, L. A. (2015). The Sol Genomics Network (SGN)—from genotype to phenotype to breeding. *Nucleic acids research*, 43(D1), D1036-D1041.
- Fiume, E., Guyon, V., Remoué, C., Magnani, E., Miquel, M., Grain, D., & Lepiniec, L. (2016). TWS1, a novel small protein, regulates various aspects of seed and plant development. *Plant physiology*, 172(3), 1732-1745.
- Foolad, M. R. (2007). Genome mapping and molecular breeding of tomato. *International journal of plant genomics*, 2007.
- Ford, K., McDonald, D., & Mali, P. (2019). Functional genomics via CRISPR–Cas. *Journal of molecular biology*, 431(1), 48-65.
- Goetz, S., Hellwege, A., Stenzel, I., Kutter, C., Hauptmann, V., Forner, S., ... & Hause, B. (2012). Role of cis-12-oxo-phytodienoic acid in tomato embryo development. *Plant Physiology*, 158(4), 1715-1727.
- Gorguet, B., Eggink, P. M., Ocana, J., Tiwari, A., Schipper, D., Finkers, R., ... & van Heusden, A. W. (2008). Mapping and characterization of novel parthenocarpy QTLs in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 116(6), 755-767.
- Grandillo, S., Chetelat, R., Knapp, S., Spooner, D., Peralta, I., Cammareri, M., ... & Pignone, D. (2011). Solanum sect. Lycopersicon. *Wild crop relatives: Genomic and breeding resources*, 129-215.
- Gutierrez-Aguilar, P.R., Gil-Vega, K.C. and Simpson, J. 2014. Development of an Agrobacterium tumefaciens mediated transformation protocol for two Agave species by organogenesis. Sustainable and Integral Exploitation of Agave. Retrieved from: <http://www.ciatej.net.mx/agave/1.7agave.pdf>

- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., & Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of bacteriology*, *169*(12), 5429.
- Javelle, M., Vernoud, V., Rogowsky, P. M., & Ingram, G. C. (2011). Epidermis: the formation and functions of a fundamental plant tissue. *New Phytologist*, *189*(1), 17-39.
- Jinek, M., Jiang, F., Taylor, D. W., Sternberg, S. H., Kaya, E., Ma, E., ... & Doudna, J. A. (2014). Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science*, *343*(6176).
- Kessler, S., Kim, M., Pham, T., Weber, N., & Sinha, N. (2001). Mutations altering leaf morphology in tomato. *International Journal of Plant Sciences*, *162*(3), 475-492.
- Kimura, S., & Sinha, N. (2008). Tomato (*Solanum lycopersicum*): a model fruit-bearing crop. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2008*(11).
- Kimura, S., & Sinha, N. (2008). Tomato transformation. *CSH protocols*, *2008*.
- Lafon-Placette, C., & Köhler, C. (2014). Embryo and endosperm, partners in seed development. *Current Opinion in Plant Biology*, *17*, 64-69.
- Li, Y., & Peng, N. (2019). Endogenous CRISPR-Cas system-based genome editing and antimicrobials: review and prospects. *Frontiers in microbiology*, *10*, 2471.
- Lifschitz, E., & Eshed, Y. (2006). Universal florigenic signals triggered by FT homologues regulate growth and flowering cycles in perennial day-neutral tomato. *Journal of experimental botany*, *57*(13), 3405-3414.
- Lin, T., Zhu, G., Zhang, J., Xu, X., Yu, Q., Zheng, Z., ... Huang, S. (2014). Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding. *Nature Genetics*, *46*(11), 1220-1226.
- Lin, Y., & Schiefelbein, J. (2001). Embryonic control of epidermal cell patterning in the root and hypocotyl of *Arabidopsis*. *Development*, *128*(19), 3697-3705.
- Linkies, A., Graeber, K., Knight, C., & Leubner-Metzger, G. (2010). The evolution of seeds. *New Phytologist*, *186*(4), 817-831.
- Liu, P. L., Du, L., Huang, Y., Gao, S. M., & Yu, M. (2017). Origin and diversification of leucine-rich repeat receptor-like protein kinase (LRR-RLK) genes in plants. *BMC evolutionary biology*, *17*(1), 1-16.
- Lozano, R., Gimenez, E., Cara, B., Capel, J., & Angosto, T. (2009). Genetic analysis of reproductive development in tomato. *International Journal of Developmental Biology*, *53*(8-9-10), 1635-1648.
- MAPA. (2019). Análisis provincial de superficie, rendimiento y producción de Tomate. *Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación*, Madrid, España.
- Martinez Rivas, F. J. (2015). Caracterización fenotípica del desarrollo reproductivo del mutante excessive number of floral organs (eno) de tomate, *Solanum lycopersicum* L.
- Mayer, U., Buttner, G., & Jurgens, G. (1993). Apical-basal pattern formation in the *Arabidopsis* embryo: studies on the role of the *gnom* gene. *Development*, *117*(1), 149-162.
- McCormick, S., Niedermeyer, J., Fry, J., Barnason, A., Horsch, R., & Fraley, R. (1986). Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant cell reports*, *5*(2), 81-84.

- Meinke, D. W. (1985). Embryo-lethal mutants of *Arabidopsis thaliana*: analysis of mutants with a wide range of lethal phases. *Theoretical and Applied Genetics*, 69(5), 543-552.
- Montoliu, L. (2019). *Editando genes: recorta, pega y colorea: las maravillosas herramientas CRISPR*. Next Door Publishers SL.
- Moussu, S., San-Bento, R., Galletti, R., Creff, A., Farcot, E., & Ingram, G. (2013). Embryonic cuticle establishment: the great (apoplastic) divide. *Plant signaling & behavior*, 8(12).
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. plant*, 15(3), 473-497.
- Nabors, M. W. (2004). *Introduction to botany* (No. 580 N117i). Pearson.
- Nonogaki, H., Gee, O. H., & Bradford, K. J. (2000). A germination-specific endo- β -mannanase gene is expressed in the micropylar endosperm cap of tomato seeds. *Plant Physiology*, 123(4), 1235-1246.
- Olmstead, R. G., Bohs, L., Migid, H. A., Santiago-Valentin, E., Garcia, V. F., & Collier, S. M. (2008). A molecular phylogeny of the Solanaceae. *TAXON*, 57(4), 1159-1181.
- Olsen, O. A. (2001). Endosperm development: cellularization and cell fate specification. *Annual review of plant biology*, 52(1), 233-267.
- Ortiz-Atienza, A. B., Salinas, C. C., Lisbona, F. J. Y., & Trillo, M. T. A. (2020). *Guía de procedimientos prácticos en Biotecnología Vegetal* (Vol. 48). Universidad Almería.
- Perez-Martín, F., Yuste-Lisbona, F. J., Pineda, B., Angarita-Díaz, M. P., García-Sogo, B., Antón, T., ... & Lozano, R. (2017). A collection of enhancer trap insertional mutants for functional genomics in tomato. *Plant biotechnology journal*, 15(11), 1439-1452.
- Quispe Velasquez, J. (2018). *Caracterización genética y molecular de TOMATO GASSHO (TGSO), un nuevo gen implicado en el desarrollo embrionario de tomate* (Doctoral dissertation, Universidad de Almería).
- Razifard, H., Ramos, A., Della Valle, A. L., Bodary, C., Goetz, E., Manser, E. J., ... & Caicedo, A. L. (2020). Genomic evidence for complex domestication history of the cultivated tomato in Latin America. *Molecular biology and evolution*, 37(4), 1118-1132.
- Rick, C. M. (1990). Perspectives from plant genetics: the Tomato Genetics Stock Center. In *Genetic resources at risk: scientific issues, technologies, and funding policies. Proceedings of a symposium, American Association for the Advancement of Science annual meeting, San Francisco, California, USA, 16 January 1989*. (pp. 11-19). Genetic Resources Conservation Program, University of California.
- Roberts, R., Mainiero, S., Powell, A. F., Liu, A. E., Shi, K., Hind, S. R., ... & Martin, G. B. (2019). Natural variation for unusual host responses and flagellin-mediated immunity against *Pseudomonas syringae* in genetically diverse tomato accessions. *New Phytologist*, 223(1), 447-461.
- Rodriguez-Leal, D., Lemmon, Z. H., Man, J., Bartlett, M. E., & Lippman, Z. B. (2017). Engineering quantitative trait variation for crop improvement by genome editing. *Cell*, 171(2), 470-480.
- Sampson, T. R., Saroj, S. D., Llewellyn, A. C., Tzeng, Y. L., & Weiss, D. S. (2013). A CRISPR/Cas system mediates bacterial innate immune evasion and virulence. *Nature*, 497(7448), 254-257

- San-Bento, R., Farcot, E., Galletti, R., Creff, A., & Ingram, G. (2014). Epidermal identity is maintained by cell–cell communication via a universally active feedback loop in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 77(1), 46-58.
- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., & Murphy, A. (2015). *Plant physiology and development* (Ed. 6). Sinauer Associates Incorporated
- Thouet, J., Quinet, M., Ormenese, S., Kinet, J. M., & Périlleux, C. (2008). Revisiting the involvement of SELF-PRUNING in the sympodial growth of tomato. *Plant Physiology*, 148(1), 61-64.
- Thurtle-Schmidt, D. M., & Lo, T. W. (2018). Molecular biology at the cutting edge: a review on CRISPR/CAS9 gene editing for undergraduates. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 46(2), 195-205.
- Tomato Genome Consortium. (2012). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, 485(7400), 635.
- Tsuwamoto, R., Fukuoka, H., & Takahata, Y. (2008). *GASSHO1* and *GASSHO2* encoding a putative leucine-rich repeat transmembrane-type receptor kinase are essential for the normal development of the epidermal surface in *Arabidopsis* embryos. *The Plant Journal*, 54(1), 30-42.
- Walker, J. C. (1994). Structure and function of the receptor-like protein kinases of higher plants. *Plant molecular biology*, 26(5), 1599-1609.
- Welty, N., Radovich, C., Meulia, T., & Van Der Knaap, E. (2007). Inflorescence development in two tomato species. *Botany*, 85(1), 111-118.
- Xing, Q., Creff, A., Waters, A., Tanaka, H., Goodrich, J., & Ingram, G. C. (2013). ZHOUP1 controls embryonic cuticle formation via a signalling pathway involving the subtilisin protease ABNORMAL LEAF-SHAPE1 and the receptor kinases GASSHO1 and GASSHO2. *Development*, 140(4), 770-779.
- Yan, D., Duermeyer, L., Leoveanu, C., & Nambara, E. (2014). The functions of the endosperm during seed germination. *Plant and Cell Physiology*, 55(9), 1521-1533.
- Yang, S., Johnston, N., Talideh, E., Mitchell, S., Jeffree, C., Goodrich, J., & Ingram, G. (2008). The endosperm-specific ZHOUP1 gene of *Arabidopsis thaliana* regulates endosperm breakdown and embryonic epidermal development. *Development*, 135(21), 3501-3509.
- Yeung, E. C., & Meinke, D. W. (1993). Embryogenesis in angiosperms: development of the suspensor. *The Plant Cell*, 5(10), 1371.
- Zouine, M., Maza, E., Djari, A., Lauvernier, M., Frasse, P., Smouni, A., ... & Bouzayen, M. (2017). TomExpress, a unified tomato RNA-Seq platform for visualization of expression data, clustering and correlation networks. *The Plant Journal*, 92(4), 727-735.