

Trabajo de investigación
Ingeniero Agrónomo

UNIVERSIDAD DE ALMERÍA



**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN
GENÉTICA DE NUEVOS MUTANTES
ALTERADOS EN EL DESARROLLO
VEGETATIVO Y REPRODUCTIVO DE TOMATE.**

Alumna

Isabel M^a Santorromán Mendizábal

Director:

Dr. D. Rafael Lozano Ruíz

Almería, Marzo – 2012

INDICE

A. INTERÉS Y OBJETIVOS	2
B. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
1. EL TOMATE	7
1.1 Origen y domesticación	7
1.2 Taxonomía y morfología	8
1.3 Importancia económica y distribución geográfica	9
1.4 Mejora genética del tomate	11
1.5 Importancia del tomate en la investigación científica	12
2. MEJORA GENÉTICA Y DESARROLLO DEL TOMATE	13
2.2 Desarrollo vegetativo	13
2.3 Transición floral	14
2.4 Desarrollo reproductivo	15
3. LA MUTACIÓN ARTIFICIAL O INDUCIDA	31
3.1 Los agentes mutagénicos	31
4. LA MUTAGÉNESIS INSERCIONAL	37
4.1 Mutagénesis con transposones	37
4.2 Mutagénesis con T-DNA	40
4.3 Mutagénesis insercional con vectores modificados con T-DNA	42
C. MATERIAL Y MÉTODOS	49
1. MATERIAL VEGETAL	50
2. DISEÑO EXPERIMENTAL	51
2.1 Diseño del cultivo	52
2.2 Fenotipado de la plantas	54
2.3 Tratamiento de las familias seleccionadas	56
3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	57
D. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	58
1. DESCRIPCIÓN DE LOS FONDOS GENÉTICOS: CULTIVARES P73 Y MONEYMAKER.....	59
2. DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE POSIBLES MUTANTES A PARTIR DEL ANÁLISIS DE FAMILIAS TG2	60
2.1 Caracteres fenotípicos analizados	60
2.2 Identificación de familias TG2 candidatas	62
2.3 Identificación de mutantes alterados en el desarrollo vegetativo	63
2.4 Identificación de mutantes alterados en el desarrollo reproductivo	70
2.5 Identificación de mutantes alterados en el desarrollo vegetativo y reproductivo	83
3. ANÁLISIS GENÉTICO DE LOS CARACTERES FENOTÍPICOS OBSERVADOS EN LA FAMILIAS TG2	99
4. ANÁLISIS DE PROGENIES TG3 EN LOS MUTANTES SELECCIONADOS	105
E. CONCLUSIONES	125
BIBLIOGRAFÍA	130

A. INTERÉS Y OBJETIVOS

A. INTERÉS Y OBJETIVOS

El tomate (*Solanum lycopersicum L.*) representa uno de los cultivos hortícolas de mayor repercusión socio-económica a nivel mundial. Su demanda aumenta continuamente y con ella su cultivo, producción y comercio. Según fuentes de la FAO, la superficie mundial de tomate (fresco y de transformación) en 2008 fue de 5.227.883 hectáreas, con una producción de 129,65 millones de toneladas y un rendimiento medio de 24.800 kg x ha⁻¹ (FAOSTAT, 2010). Junto a ello, el tomate se ha convertido en un excelente modelo para la investigación en mejora genética y genómica como consecuencia de una combinación de razones científicas y agronómicas.

Caracteres como la arquitectura de la planta, precocidad tanto en el desarrollo vegetativo como reproductivo, androesterilidad, partenocarpia, maduración y conservación post-cosecha del fruto, tienen una gran importancia agronómica y dependen del establecimiento de patrones de desarrollo adecuados que están regulados por distintos genes capaces de responder a señales endógenas y otras de naturaleza ambiental. Por ello, la identificación y caracterización funcional de nuevos genes implicados en los procesos del desarrollo suscita un enorme interés ya que se podrían establecer las bases para la mejora específica de caracteres de relevancia comercial en esta especie (Lozano y *col.*, 2009).

Los actuales progresos en la caracterización del genoma de tomate se han visto favorecidos por el hecho de ser una especie autógama y diploide ($2n=24$), con un ciclo de vida corto, elevado potencial reproductivo, de fácil polinización y propagación vegetativa. Junto a ello, el genoma de tomate es relativamente pequeño (950 Mpb) y existen numerosas herramientas genéticas y genómicas disponibles, entre las que se incluyen: la disponibilidad de poblaciones segregantes adecuadas para la construcción de mapas genéticos, la existencia de colecciones de mutantes idóneos para la identificación de genes clave en el desarrollo, y la posibilidad de transformación genética que ofrece esta especie, lo que sin duda permite realizar un análisis detallado de los genes identificados. Debido a que el genoma de las Solanáceas está altamente conservado, resulta posible asimismo comparar la información obtenida de estudios genómicos en tomate con otras especies de la misma familia (SOL, 2004; Mueller y *col.*, 2005). El Proyecto SOL (Solanaceae Genome Project) considera al tomate, la especie modelo de estudio entre las solanáceas; la información genética y genómica que

actualmente se está generando resulta clave para descifrar los genes cuyas rutas reguladoras permiten que se puedan llevar a cabo aquellos procesos fisiológicos cruciales para el desarrollo vegetal, desde la germinación hasta la maduración y senescencia del fruto (<http://solgenomics.net>). El estudio de estos procesos se puede abordar por diferentes vías. Por una parte, el análisis genético y molecular de mutantes del desarrollo es una de las aproximaciones más exitosas a la hora de identificar la función de los genes alterados. Por ejemplo, en el caso del tomate, la colección del “Tomato Genetic Resource Center” (TGRC, Univ. California, Davis: <http://tgrc.ucdavis.edu>) incluye 1023 mutantes espontáneos y variantes naturales correspondientes a 625 *loci*. El empleo de estos mutantes ha posibilitado el aislamiento de genes como *LS* y *FA* entre otros. Actualmente, hay una gama de herramientas genómicas que permiten la identificación y etiquetado de genes que actúan sobre determinados procesos. De hecho, la mutagénesis insercional se ha convertido en los últimos años en una herramienta básica en programas de genómica funcional dirigidos a la identificación y etiquetado de genes implicados en caracteres relevantes del desarrollo vegetal (Emmanuel and Levy, 2002; Krysan y col., 1999). El etiquetado con T-DNA ha sido empleado con éxito en *Arabidopsis* (Krysan y col., 1999; Sessions y col., 2002), *Oryza sativa* (arroz) (Sallaud y col., 2004; Zhang y col., 2007) y *Medicago truncatula* (Tadege y col., 2008). En tomate, han sido descritas algunas colecciones de mutantes insercionales, si bien el acceso a las mismas es bastante restringido. Además, si en lugar de T-DNAs convencionales se emplean trampas génicas (Springer, 2000) se pueden generar mutaciones de inserción de T-DNA y, al mismo tiempo, estudiar el patrón de expresión del gen etiquetado. De esta manera, no sólo se pueden hacer inferencias en torno a la función del gen etiquetado en un determinado mutante de inserción a través del fenotipado en TG1 o TG2, sino que también se puede obtener un panorama bastante preciso en torno al patrón de expresión espacio-temporal de dicho gen, ya que la expresión del gen delator de estas trampas mimetiza la expresión del gen endógeno etiquetado.

Con el fin de identificar genes relevantes en el proceso del desarrollo del tomate, en el presente estudio se plantean los siguientes objetivos:

Detectar e identificar nuevos mutantes T-DNA que afectan al desarrollo vegetativo y/o reproductivo a partir de una colección de familias mutagenizadas en cultivares de tomate “p73” y “Moneymaker”.

Análisis genético y estudio de la herencia de mutaciones de interés.

B. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

B. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. EL TOMATE

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.), universalmente considerado como hortícola y generalmente cultivado como anual aún tratándose de un planta perenne (Rick, 1978), es objeto de una amplia industria agrícola.

Constituye uno de los principales cultivos hortícolas en España, tanto en superficie como en producción, a la vez que representa la materia prima para una amplia variedad de industrias derivadas.

1.1 Origen y domesticación

Los orígenes y primeros pasos de la domesticación del tomate son dudosos. Sin embargo, puede tenerse una cierta seguridad en tres aspectos. Primero, el centro de origen del género *Solanum* es la región andina, que se extiende desde el Sur de Colombia al Norte de Chile, pero parece que podría ser en México donde se domesticó, quizá porque allí crecería y crece como mala hierba entre los huertos y milpas. Segundo, el tomate alcanzó un avanzado estado de domesticación antes de ser conocido en Europa. Grabados pertenecientes a los herbarios más antiguos revelan que los primeros tipos cultivados en Europa tenían frutos grandes. A mediados del siglo XVI se consumían en México tomates de distintas formas y tamaños, e incluso rojos y amarillos, pero por entonces ya habían sido traídos a Europa y servían como alimento en España e Italia. Tercero, el antecesor más directo, el tomate-cereza silvestre (*S. lycopersicum* variedad *cerasiforme*), crece de manera espontánea en toda América tropical y subtropical y se ha extendido a lo largo de los trópicos del Viejo Mundo.

La primera mención del tomate en el Viejo Mundo se debe a las descripciones publicadas en 1554 por el herborista Pier Andrea Mattioli. Esta fecha apoyaría la teoría de un origen mexicano, habida cuenta de que en la ciudad de México se tomó en 1519, que la conquista completa de Perú se fecha en 1531 y que se precisaría un cierto tiempo para la introducción, cultivo y valoración de la cosecha en Europa.

1.2 Taxonomía y morfología

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una planta dicotiledónea que se encuadra en la familia de las solanáceas, a la cual también pertenecen la patata, el tabaco y la petunia. La taxonomía aceptada para esta especie es la siguiente (Fooland, 2007):

REINO:	<i>Plantae</i>
Subreino:	<i>Traqueobinta</i>
Superdivisión:	<i>Spermatophyta</i>
Clase:	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase:	<i>Asteridae</i>
Orden:	<i>Solanales</i>
Suborden:	<i>Solanineae</i>
Familia:	<i>Solanaceae</i>
Género:	<i>Solanum</i>
Especie:	<i>Lycopersicum</i>

En la primera clasificación taxonómica, al tomate cultivado se le denominó *Solanum lycopersicum* (Linnaeus, 1753). En 1754, Miller hace una distinción asignando al tomate cultivado el género *Lycopersicon* y la especie *esculentum* (Miller, 1754). Recientemente y basándose en datos morfológicos y moleculares, se ha readoptado el nombre científico de *Solanum lycopersicum* para el tomate cultivado mientras que las otras especies de *Lycopersicon* han sido incorporadas al género *Solanum* (Foolad, 2007).

El tomate es una planta que puede desarrollarse de forma rastrera, semierecta o erecta. Su sistema radicular está compuesto por una raíz principal (corta y débil), raíces secundarias (numerosas y potentes) y raíces adventicias. En el tallo principal, de un grosor de 2 a 4 cm, se desarrollan hojas, tallos secundarios (cuya ramificación es simpodial) e inflorescencias. La hoja es compuesta e imparipinada, con foliolos peciolados, lobulados y con borde dentado. La flor es regular e hipógina, y consta de 5 o más sépalos verdes, suele tener el mismo número de sépalos que de pétalos, estos últimos de color amarillo. Los estambres se desarrollan fusionados formando un cono estaminal que envuelve al gineceo (con un ovario bi o plurilocular). Las flores se agrupan en inflorescencias de tipo racimoso y se unen al eje de la inflorescencia por

medio de un pedicelo articulado que contiene la zona de abscisión. El fruto es una baya carnosa bi o plurilocular constituida por el pericarpio, el tejido placentario y las semillas.

1.3 Importancia económica y distribución geográfica

A nivel mundial, el tomate representa la hortaliza de mayor difusión y valor económico. Su demanda aumenta continuamente y con ella su cultivo, producción y comercio. Según fuentes de la FAO, la superficie mundial de tomate (fresco y de transformación) en 2008 fue 5.227.883 hectáreas, con una producción de 129,65 millones de toneladas y un rendimiento medio de 24.800 kg/ha (Tabla 1). España ocupa el séptimo lugar del mundo en producción, muy por debajo de China, EEUU, Turquía, India, Egipto e Italia. En la Unión Europea (UE), la producción de tomate se reparte entre Italia, primer país en cuanto a producción, seguido de España, Grecia y Portugal (Tabla 2).

Tabla 1. Producción, superficie y rendimiento de los principales países productores del mundo en 2008 (FAOSTAT, 2010)

Países	Producción (tn)	Superficie (ha)	Rendimiento (kg/ha)
Asia	71.498.620	2.954.418	24.200
- China	33.811.702	1.454.533	23.246
- Turquía	10.985.400	300.000	36.618
- India	10.260.600	571.700	17.947
Europa	20.403.445	574.512	35.514
- UE	16.187.454	293.300	55.191
América N. y Central	16.909.292	289.740	108.148
- EEUU	12.575.900	162.580	77.352
- Méjico	2.936.773	101.784	28.853
América Sur	7.067.358	147.062	48.057
- Brasil	3.934.275	62.118	63.335
- Chile	1.270.000	19.500	65.128
África	12.482.054	1.180.943	10.569
- Egipto	4.204.039	571.844	7.352
- Túnez	1.170.000	26.000	45.000
- Marruecos	1.312.310	18.600	70.554
Total	129.649.883	5.227.883	24.800

Tabla 2. Producción, superficie y rendimiento de los principales países productores de la Unión Europea en 2008 (FAOSTAT, 2010)

Países	Producción (tn)	Superficie (ha)	Rto. (kg/ha)
España	3.847.800	55.300	69.580
Francia	714.635	4.122	173.371
Grecia	1.338.600	25.000	53.544
Italia	5.976.912	115.477	51.758
Portugal	1.100.000	13.000	84.615
Total UE	16.187.454	293.300	55.191

Los datos de producción en España indican que, en los quince últimos años, esta ha experimentado un incremento muy favorable: de una producción de 2,4 millones de toneladas en una superficie de 60.600 hectáreas en 1985, se ha pasado a una producción de 3,85 millones de toneladas en 55.300 hectáreas en 2008 (FAOSTAT, 2010). El sector productor de tomate se concentra principalmente en las comunidades autónomas de Andalucía, Murcia, Canarias y Valencia.

En España, el tomate fresco para consumo directo es la hortaliza en relación con la exportación, siendo el país que más exporta entre los principales productores mundiales de tomate (Tabla 3).

Tabla 3. Balance comercial de tomate fresco de los principales países productores del mundo en 2005 (Anuario FAO, 2008)

Países	Exportaciones		Importaciones		Saldo (E-I)
	Cantidad (t)	Valor (1000\$)	Cantidad (t)	Valor (1000\$)	Valor (1000\$)
España	923.405	1.040.955	72.354	36.518	1.004.437
China	85.931	17.987	42	67	17.920
EEUU	188.173	226.405	951.787	1.075.119	-848.714
Turquía	250.182	145.773	56	31	145.742
India	11.743	2.464	51	25	2.439
Egipto	18.470	3.753	71	10	3.743
Italia	91.875	168.924	99.325	128.380	40.544

En Europa, nuestro país lidera el comercio de exportación de tomate fresco, que en su mayor parte va dirigida al mercado de la Unión Europea, siendo Alemania, Países Bajos, Reino Unido y Francia los principales mercados comunitarios (Tabla 4).

Tabla 4. Exportaciones españolas de tomate para consumo fresco (Anuario FAO, 2008)

Países	2003	2004	2005
	Cantidad (tn)	Cantidad (tn)	Cantidad (tn)
Alemania	238.698	243.791	198.893
Francia	147.611	160.251	147.733
Países Bajos	165.370	181.902	170.609
Reino Unido	190.018	207.075	183.845
Italia	22.426	31.023	38.998
Resto UE	149.393	165.525	161.723
No comunitarios	32.544	28.864	21.604

1.4 Mejora genética del tomate

La mejora genética de nuevos cultivares de tomate empezó hace más de 200 años en Europa. En los últimos 40 años, el principal objetivo para mejora de tomate tanto para consumo en fresco como procesado ha sido el incremento de la producción de fruto por unidad de área. También se han contemplado como objetivos importantes la resistencia a fisiopatías y patógenos, la calidad externa o comercial (presencia, aspecto, firmeza, conservación, etc.), la extensión y adaptación de los ciclos a las necesidades y oportunidades de los mercados, la precocidad en la maduración, la tolerancia a estreses abióticos (salinidad, etc.), temperaturas adversas, resistencia al rajado. En buena medida estos objetivos se han alcanzado, aunque descuidando un aspecto que ahora se empieza a considerarse como prioritario, a saber, la calidad organoléptica y nutricional del fruto. Últimamente se observa una preferencia por estos valores gustativos conservados en las variedades tradicionales y que se han perdido, en mayor o menos medida, en muchas de las variedades actuales. Esto está llevando a plantear el sabor y la calidad nutricional como objetivos esenciales en la mejora genética del tomate.

Por otro lado, los objetivos de mejora han dependido de los métodos de cultivo (en campo o invernadero) o de si el producto se destina a consumo en fresco o a procesado industrial. Los caracteres específicos de interés para los cultivares de

mercado en fresco incluyen morfología redondeada, firmeza, uniformidad de tamaño, forma y color, así como aspectos relacionados con la apariencia externa (p.e: ausencia de marcas o anormalidades) y la calidad (p.e: textura, sabor y aroma) (Foolad, 2007; Paran y Knaap, 2007). El material vegetal utilizado en el cultivo de tomate para industria difiere del que utiliza para tomate fresco habida cuenta de los diferentes requerimientos de calidad de acuerdo al uso destinado. En este caso, se utilizan cultivares que ofrezcan facilidad para la separación del fruto, de crecimiento determinado, vigor medio, maduración agrupada y buena adaptación a la cosecha mecanizada. La forma de los frutos suele ser globosa o prismática para la elaboración de concentrados y triturados, y aperada para la elaboración de tomates pelados enteros. Aunque no de una manera tan clara como el caso del cultivo para fresco, hay un predominio cada vez mayor de los cultivares híbridos frente a las variedades o cultivos abiertos.

1.5 Importancia del tomate en la investigación científica

El tomate se ha convertido en un excelente modelo tanto para la investigación básica como para la investigación aplicada de plantas como consecuencia de una combinación de razones científicas y agronómicas. La interacción entre los programas de mejora genética y las técnicas de manejo del cultivo del tomate ha proporcionado un beneficio mutuo enriqueciendo a estas dos áreas. Muchos de los materiales útiles obtenidos en el estudio de la genética del tomate han contribuido a mejorar los métodos de cultivo del tomate y a la inversa (Allen y Rick, 1986). A parte de esto, la experimentación científica en el tomate se ve favorecida porque se trata de una especie autógama, diploide ($2n=24$), con un ciclo de vida corto, un elevado potencial reproductivo y de fácil polinización y propagación vegetativa (Rick, 1971). Además su genoma es relativamente pequeño (950 Mpb) y existen numerosas herramientas genéticas y genómicas disponibles: poblaciones de mapeo, marcadores de ADN (Tanksley y *col.*, 1992), colecciones de ESTs (van der Hoeven y *col.*, 2002), *microarrays* y bases de datos públicos (revisado por Yano y *col.*, 2007) así como librerías de BACs, cDNA y tipo YAC (Bonnema y *col.*, 1996; Hamilton y *col.*, 1999; Budiman y *col.*, 2000). Asimismo, en 2004 se inició el programa de secuenciación del genoma de tomate a través del consorcio internacional Solanaceae Genome Project (SOL) (Mueller y *col.*, 2005) y ya ha sido publicado un avance de estos resultados

(<http://solgenomics.net/>). Todos estos aspectos hacen del tomate uno de los modelos genéticos y genómicos de mayor consideración científica, sobre todo para el estudio de procesos singulares que afectan al desarrollo de esta planta (maduración del fruto y resistencia a patógenos) entre las especies cultivadas.

2. MEJORA GENÉTICA Y DESARROLLO DE TOMATE.

Los programas de mejora genética de tomate han incidido en caracteres relacionados con el crecimiento vegetativo de la planta más que otros.

2.1 Desarrollo vegetativo

La fase vegetativa del desarrollo es corta en la mayor parte de los cultivares de tomate. La primera inflorescencia comienza su desarrollo después de que aparezcan las primeras 6-12 hojas empezando la transición floral cuando la tercera hoja está expandida completamente. El tomate exhibe un hábito de crecimiento simpodial, donde el meristemo apical del tallo es determinado y el desarrollo del primer brote culmina con la formación de la primera inflorescencia. A este primer brote se le denomina “segmento inicial”. A continuación, un nuevo brote vegetativo se desarrolla a partir del meristemo axilar, localizado en la axila de la hoja más joven, justo por debajo de la inflorescencia. Este meristemo, ahora denominado meristemo simpodial, permite a la planta continuar su crecimiento, desarrollando tres nudos vegetativos (hojas) antes de terminar en una nueva inflorescencia. Este patrón de crecimiento se repite dando lugar a nuevos segmentos determinados o “segmentos simpodiales”. Por tanto, la arquitectura del tomate implica una alternancia regular de fases vegetativas y reproductivas entre el brote primario y los brotes axilares (Atherton y Harris, 1986).

En tomate, el gen *SELF-PRUNING* (*SP*) controla la transición del desarrollo vegetativo al reproductivo en los meristemas de la inflorescencia (Pnueli y col., 1998). La anulación del gen *SP* no tiene efectos en la arquitectura del segmento inicial, pero promueve una reducción gradual del número de nudos vegetativos que se generan en los sucesivos segmentos simpodiales, llegando un momento en el que no se produce la fase vegetativa sino el desarrollo de dos inflorescencias consecutivas (Yeager, 1927).

Por su parte, el desarrollo normal del meristemo simpodial requiere también de la actuación del gen *SINGLE FLOWER TRUSS* (*SFT*), cuya mutación detiene el

crecimiento de la yema simpodial y permite que la planta continúe su crecimiento sobre la base de meristemos vegetativos ectópicos que surgen de la inflorescencia (Kerr, 1982). La reducción del nivel de expresión de *SP* en el mutante *single flower truss* (*sft*) sugiere que *SFT* controla el desarrollo simpodial a través de su interacción con *SP*, actuando probablemente corriente arriba como regulador de *SP* en el meristemo simpodial (Molinero-Rosales y col., 2004).

La formación de ramas laterales está regulada por los genes *LATERAL SUPPRESSOR* (*LS*) y *BLIND* (*BL*). Mientras *BL* regula la formación de los meristemos simpodiales y axilares (Rick y Butler, 1956; Schmitz y col., 2002) *LS* solo está implicado en el desarrollo de los meristemos axilares (Malayer y Guard, 1964; Schumacher y col., 1999). El fenotipo del doble mutante *ls bl* sugiere que *BL* y *LS* participan en diferentes rutas que promueven el desarrollo de meristemos laterales (Schmitz y col., 2002).

2.2 Transición floral

La transición floral en tomate implica el cambio en la identidad del meristemo apical, que pasa de ser un meristemo vegetativo a tener identidad de meristemo de inflorescencia (reproductivo). Este proceso está controlado por factores ambientales y endógenos, siendo estos últimos de naturaleza genética y hormonal. El tomate, tal y como lo conocemos hoy, es considerado como una planta de día neutro debido a que el tiempo de floración (medido como el número de hojas desarrolladas hasta la primera inflorescencia) no se ve afectado por el fotoperiodo (Kinet y Peet, 1997; Molinero-Rosales y col. 1999). No obstante, algunos mutantes de tomate muestran fenotipos de floración tardía, lo que unido al hecho de poder adelantar el tiempo de floración en genotipos de tomate modificando la expresión de genes concretos, sugiere que la independencia fotoperiódica para florecer ha sido adquirida con el proceso de domesticación (Molinero-Rosales y col. 1999). Recientemente se han identificado algunos genes forman parte de una ruta autónoma que controla la transición floral en tomate. En el segmento inicial, *FALSIFLORA* (*FA*) y *SINGLE FLOWER TRUSS* (*SFT*) promueven la transición floral (Molinero-Rosales y col., 1999; Molinero-Rosales y col., 2004; Lifschitz y col., 2006), mientras que *SP* regula este proceso en los segmentos simpodiales (Pnueli y col., 1998).

Por su parte, los genes *JOINTLESS* (*J*) y *BLIND* (*BL*) promueven floración autónoma en tomate (Mao *y col.*, 2000; Schmitz *y col.*, 2002; Szymkowiak y Irish, 2006), si bien los mutantes de floración tardía *uniflora* (*uf*) y *compound inflorescence* (*s*) exhiben mayor retraso de floración en condiciones medioambientales de invierno (baja irradiación y escasa disponibilidad de asimilados en el meristemo apical) lo cual implica que la transición a la floración está también estaría regulada en parte por una ruta dependiente de condiciones medioambientales (Dielen *y col.*, 1998; Quinet *y col.*, 2006b). De hecho, se sabe que para que se produzca el proceso de transición floral en el segmento inicial y en los segmentos simpodiales tiene que existir un equilibrio entre las actividades de *SFT* y *SP* (Lifschitz y Eshed, 2006).

Ciertas señales medioambientales pueden modificar el tiempo de floración en tomate. Así, bajas temperaturas (10-15°C) reducen el número de nudos hasta la primera inflorescencia. Igualmente, en condiciones de día corto se produce una reducción en el tiempo de floración (Samach y Lotan, 2007), y lo contrario sucede en condiciones de elevada irradiación, un efecto que se ha relacionado con una mayor capacidad para el desarrollo foliar y un incremento de la disponibilidad de asimilados en el meristemo (Kinet y Peet, 1997; Dielen *y col.*, 2004).

La floración autónoma en tomate parece estar modulada por giberelinas. Las giberelinas (GAs) promueven floración en tomate ya que los mutantes deficientes en esta hormona requieren giberelinas exógenas para florecer (Koornneef *y col.*, 1990). Probablemente, las hormonas vegetales modulan la floración en tomate a través de interacciones génicas que se producen en diferentes rutas reguladoras, si bien se conoce poco sobre la naturaleza de tales interacciones.

2.3 Desarrollo reproductivo

La inflorescencia de tomate ha sido descrita como una cima, aunque las evidencias disponibles permiten que puedan considerarse como racimos (Quinet y Kinet, 2007). La iniciación al desarrollo reproductivo supone la conversión del meristemo apical en meristemo de inflorescencia, a partir del cual se desarrolla lateralmente el meristemo floral dando lugar a la primera flor. Los sucesivos meristemos florales se desarrollan por debajo del primero, alrededor de un eje principal.

El proceso culmina con la producción de una flor terminal. Generalmente, la inflorescencia determinada está compuesta por 5-10 flores (Allen y Sussex, 1996).

Los genes *BL* y *UF* controlan la actividad del meristemo de inflorescencia como lo fomenta el hecho de que el desarrollo de la inflorescencia concluya con el desarrollo de un número reducido de flores en el mutante *bl* o con una simple flor en el mutante *uf* (Rick y Butler, 1956; Fehleisen, 1967; Dielen y col., 1998; Schmitz y col., 2002). Además, los mutantes dobles *uf sft*, *uf bl* y *uf j* desarrollan una flor simple normal (Quinet y col., 2006a; Quinet y Kinet, 2007) lo que demuestra una interacción epistática de *UF* con *SFT*, *BL* y *J*.

Por su parte, los fenotipos de los mutantes *jointless (j)* y *macrocalyx (mc)* exhiben una reversión del meristemo de inflorescencia a meristemo vegetativo, lo que indica que para el mantenimiento de la identidad del meristemo de inflorescencia se requieren los genes *J* y *MC* (Rick y Sawant, 1955; Rick y Butler, 1956; Vrebalov y col., 2002; Szymkowiak y Irish, 2006). *SFT* previene el cambio de identidad del meristemo de inflorescencia una vez que la floración se ha iniciado (Molinero-Rosales y col., 2004).

Los genes *BL*, *J*, *SFT*, *MC* y *UF* (Tabla 5) desempeñan papeles importantes en el mantenimiento de la identidad del meristemo de inflorescencia y se requieren para otros procesos relacionados con la floración a saber, *BL*, *SFT* y *UF* para la transición floral; *J* y *SFT* para el crecimiento simpodial y *MC* para el desarrollo de los órganos florales.

Después del desarrollo floral, la identidad floral del meristemo de inflorescencia viene determinada por el gen *FALSIFLORA*. El alelo *fa* promueve la sustitución de flores por brotes vegetativos secundarios siendo los meristemos que derivan del meristemo de inflorescencia incapaces de adquirir identidad de meristemo floral (Allen y Sussex, 1996; Molinero-Rosales y col., 1999)

Mutaciones en los genes *ANANTHA (AN)* y *COMPOUND INFLORESCENCE (S)* modifican la identidad de los meristemos florales dando lugar a inflorescencias compuestas muy ramificadas (Rick y Butler, 1956; Allen y Sussex, 1996), indicando alteraciones en el desarrollo de los meristemos que emergen del meristemo de inflorescencia que impiden que estos adquieran identidad floral.

Del estudio de distintas interacciones, se ha sugerido que *FA* podría regular la identidad del meristemo floral activando *AN* y reduciendo la actividad de *SP* en los meristemas reproductivos (Lozano y *col.*, 2009).

Tabla 5. Mutaciones de tomate que afectan a genes de identidad de meristemo

Mutante	Fenotipo	Gen aislado	Referencia	Ortólogo de <i>Arabidopsis</i>
<i>self-pruning (sp)</i>	Alteración en el desarrollo del meristemo simpodial.	<i>SP</i>	Yeager, 1927 Nueli y col., 1998	<i>TERMINAL FLOWER1</i>
<i>single flower truss (sft)</i>	Floración tardía, desarrollo simpodial alterado.	<i>SFT (SPD3)</i>	Kerr, 1982 Lifschitz y col., 2006	<i>FLOWERING LOCUS T</i>
<i>lateral supresor (ls)</i>	Ausencia de meristemos axilares.	<i>LS</i>	Rick y Butler, 1956 Schumacher y col., 1999	Familia génica <i>VHIIID</i>
<i>blind (bl) = torosa (to)</i>	Ausencia de meristemos simpodiales.	<i>BL</i>	Malayer y Guard, 1964 Schmitz y col., 2002	<i>RAX R2R3 Myb</i>
<i>falsiflora (fa)</i>	Floración tardía, pérdida de la identidad del meristemo floral.	<i>FA</i>	Stubbe, 1963 Moliner-Rosales y col., 1999	<i>LEAFY</i>
<i>uniflora (uf)</i>	Floración tardía, inflorescencia compuesta por una sola flor.		Dielen y col., 1998	
<i>compound inflorescence (s)</i>	Floración tardía, alteración en el desarrollo del meristemo de inflorescencias muy ramificadas, identidad del meristemo floral		Quinet y col., 1998 Allen y Sussex, 1996	
<i>anantha (an)</i>	Identidad del meristemo floral			
<i>jointless (j)</i>	Identidad del meristemo de inflorescencia alterada.	<i>J</i>	Rick y Butler, 1956 Mao y col., 2000	<i>AGL24</i>

Desarrollo de los órganos florales

En el estado maduro, la flor simétrica y hermafrodita de tomate se compone de cuatro verticilos. El primer verticilo, y el más externo, está compuesto por 5-6 sépalos; que alternan con un número similar de pétalos dispuestos en el segundo verticilo; en el tercer verticilo se desarrollan 6 estambres fusionados lateralmente para formar un cono alrededor del estilo, y el cuarto verticilo lo integran un número variable de carpelos fusionados.

Análisis genéticos y moleculares realizados en *Arabidopsis* y *Antirrhinum* han permitido proponer un modelo con tres funciones génicas (A, B, C), cada una de las cuales está codificada por un número reducido de genes que actúa en solitario o a través de interacciones génicas que determinan la identidad de los órganos florales en los cuatro verticilos. El modelo ABC (Coen y Meyerowitz, 1991; Meyerowitz y col., 1991) asume que mutaciones que afecten a genes de la clase A, B o C promueven cambios homeóticos en los órganos florales de dos verticilos consecutivos (Fig. 1). La mayoría de los genes ABC pertenecen a la familia MADS-box, que codifica factores de

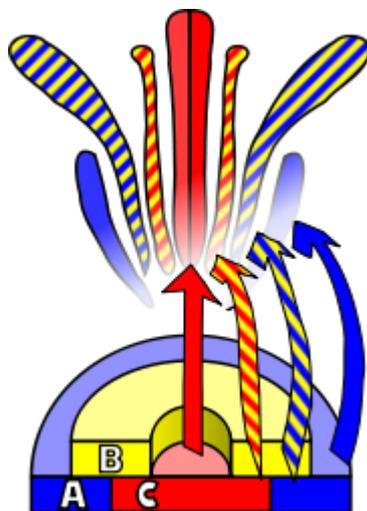


Figura 1 Diagrama de la expresión diferencial de los genes A, B y C en los distintos verticilos de una flor de

transcripción capaces de regular la expresión de otros genes. Las proteínas MADS se unen al ADN en forma de complejos multiméricos, controlando de esa forma el desarrollo de los órganos florales (Robles y Pelaz, 2005).

La caracterización de mutaciones homeóticas y de plantas transgénicas de anulación de función o de sobreexpresión de genes homólogos del tipo ABC ha confirmado este modelo en tomate (Tabla 6). *MACROCALIX* (*MC*) un homólogo de *APETALA1* (*API*) de *Arabidopsis*, es un gen de clase A (Vrebalov y col., 2002), la expresión de *MC* se detecta en sépalos y el silenciamiento de este gen en tomate provoca una conversión homeótica de sépalos a estructuras tipo hoja

(Rick y Butler, 1956).

Se han identificado diversos mutantes de clase B en tomate que exhiben transformaciones parciales o completas en el segundo y tercer verticilo floral (Nash y col., 1985; Sawhney, 1992). Entre ellos, *stamenless* (*sl*) y su mutante alélico *corollaless* (*cs*) desarrollan sépalos en vez de pétalos en el segundo verticilo y carpelos en lugar de estambres en el tercer verticilo (Gómez y col., 1999). *SL* es un gen de clase B homólogo a *DEFICIENS* (*DEF*) en *Antirrhinum* y *APETALA3* (*AP3*) en *Arabidopsis*, ambos relacionados con el desarrollo de pétalos y estambres.

Hasta la fecha, no se han descrito mutantes que afecten a genes de clase C de tomate, y cuyo fenotipo se caracteriza por la aparición de cambios homeóticos que afectan a la identidad de los carpelos (convertidos en sépalos) y de estambres (convertidos en pétalos) en los órganos reproductivos. Sin embargo, se ha clonado el gen *AGAMOUS1* de tomate (*TAG1*), un ortólogo del gen *AGAMOUS* (*AG*) de *Arabidopsis*. El fenotipo de las plantas transgénicas de tomate que sobreexpresan o silencian el gen *TAG1* corrobora el papel que desempeña este gen en el control de la identidad de los estambres y carpelos (Pnueli y col., 1994a).

Actualmente, el descubrimiento de dos nuevas clases de genes ha obligado a extender el modelo ABC. Los genes de clase D, que controlan la identidad de los óvulos, se describieron por primera vez en petunia tras la caracterización molecular y funcional de los genes *FLORAL BINDING PROTEIN7* (*FBT7*) y *FBP11* (Angenent y col., 1995). Asimismo, se ha podido comprobar que los genes de clase A, B y C requieren una función adicional para que se produzca el adecuado desarrollo de los cuatro verticilos florales. Esta función la llevan a cabo los genes *SEPALLATA* (*SEP*) de clase E. Sobre la base de sus patrones de expresión y de sus fenotipos de anulación de función, *TM5* (Pnueli y col., 1994a) y *TM29* (Ampomah-Dwamena y col., 2002) han sido descritos como dos genes de tomate tipo *SEPALLATA*.

La actividad de genes de identidad de órgano floral (*TM5*, *TM6* y *TAG1*) parece depender de *FA* (Kato y col., 2005). Por tanto, *FA* desempeña un importante papel en el control de la identidad del meristemo floral aunque también promueve la inducción de genes de identidad de órgano floral.

Desarrollo del óvulo y del carpelo

Los genes involucrados en el control del desarrollo de los carpelos y óvulos descritos en tomate han sido *SEPALLATA*, *TM5* y *TM29 (TAGL2)* (Tabla 6) los cuales regulan la identidad de los órganos florales y el desarrollo del fruto (Pnueli y col., 1994b; Ampomah-Dwamena y col., 2002). La anulación de función de estos genes da lugar a alteraciones homeóticas en los tres verticilos internos.

Después de la fertilización, la expresión de *TM29* es limitada al ovario, particularmente para el desarrollo de semillas y haces vasculares, que unen este proceso con la formación del fruto del tomate (Lozano y col., 2009).

El gen *TAG1* del tomate, ortólogo de *AG* en *Arabidopsis*, es requerido para el correcto desarrollo de los carpelos en el cuarto verticilo de la flor (Pnueli y col. 1994a). Puesto que, el desarrollo de los verticilos de la flor y su estructura reproductiva determinada implica que, la determinación del meristemo floral debe ser alcanzada una vez ha sido adquirida la identidad del carpelo, la anulación de función de *TAG1* promueve indeterminación de la flor y sustitución de los carpelos por estructuras florales ectópicas. Por tanto, tales cambios homeóticos confirman el papel que desempeña este gen en la determinación del meristemo floral (Pnueli y col., 1994a).

Si bien, los modelos de expresión de *TAGL1* y *TAGL11* son muy similares, siendo sus transcripciones detectadas en el tegumento de las paredes de los óvulos y carpelos. Todos estos resultados sugieren una actuación solapada de ambos genes en la identidad del óvulo y en el control de desarrollo de fruto, tal y como ocurre con sus homólogos *SHP1 (AGL1)* y *STK (AGL11)* en *Arabidopsis* (Lozano y col., 2009).

Por tanto, genes tales como *FA* y *TAG1*, los cuales mantienen la identidad del meristemo floral, pueden aportarnos evidencias sobre la conservación de las rutas genéticas que regulan la determinación del meristemo en las diferentes especies de plantas (Lozano y col., 2009).

Tabla 6. Mutantes y genes de tomate implicados en el desarrollo de la flor

Mutante o gen	Fenotipo	Gen	Referencia	Ortólogo de Arabidopsis
Clase A <i>macrocalyx (mc)</i>	Sépalos largos, inflorescencia indeterminada	<i>LeMADS-MC (MC)</i>	Rick y Sawant, 1955	<i>APETALA1</i>
Clase B <i>stamenless</i>	Conversión homeótica de sépalos y estambres en sépalos y carpelos <i>revertivamente</i>	<i>SL</i>	Nash <i>col.</i> , 1985 Gomez <i>col.</i> , 1999	<i>APETALA3</i>
<i>TM6</i>	El silenciamiento de <i>TM6</i> altera el desarrollo de	<i>TM6</i>	De Martino <i>col.</i> , 2006	<i>APETALA3-like</i>
Clase C <i>TAG1</i>	La anulación de función de <i>TAG1</i> ocasiona transformaciones homeóticas	<i>TAG1</i>	Pnueli <i>col.</i> , 1994 ^a	<i>AGAMOUS</i>
Clase E <i>TM5</i>	La anulación de función altera la diferenciación de órganos en los tres verticilos internos	<i>TM5</i>	Pnueli <i>col.</i> , 1994b	<i>SEPALLATA3</i>
<i>TM29</i>	La anulación de función de <i>TM29</i> afecta al	<i>TM29</i>	Ampomah-Dwamena <i>col.</i> , 2002	<i>SEPALLATA</i>

Desarrollo del fruto

Tras la fertilización de los óvulos, los carpelos se transforman en un órgano complejo cuyo crecimiento da lugar a un fruto maduro. El desarrollo del fruto asegura la dispersión de las semillas y la posterior supervivencia de la planta. Las plantas de tomate producen frutos rojos carnosos como resultado de un proceso de desarrollo que incluye tres fases (Gillaspy y *col.*, 1993). La primera fase comienza con el estadio de antesis de la flor y está relacionada con el desarrollo del ovario y la decisión de abortar o continuar con el desarrollo del fruto (cuajado). En la segunda fase, el crecimiento del fruto ocurre como consecuencia de divisiones celulares, siendo en esta fase donde comienzan a desarrollarse los embriones. En la tercera fase cesa la división celular y el fruto continúa creciendo a través de la expansión celular hasta que alcanza el tamaño final. Una vez que el fruto está completamente desarrollado y las semillas alcanzan la madurez, aumenta la respiración y la síntesis de etileno, lo que conduce a la maduración. Como consecuencia, se producen cambios bioquímicos y fisiológicos que afectan al color, textura, sabor, aroma y contenido nutricional. Posteriormente, tiene lugar un proceso de reblandecimiento debido a la degradación de paredes celulares en diferentes compartimentos del fruto (Giovannoi, 2004).

Control hormonal del desarrollo del fruto y partenocarpia

La fertilización de los óvulos desencadena un proceso de desarrollo que culmina con la formación de un ovario en fruto, y en el cual la germinación del polen genera los estímulos adecuados para que comience su crecimiento (Gillaspy y *col.*, 1993). Las auxinas y las giberelinas son algunos de los reguladores que controlan el cuajado del fruto. Además, las auxinas y el etileno controlan los estadios tempranos del desarrollo del fruto induciendo la expresión de varias familias génicas (Balbi y Lomax, 2003). Sin embargo, el cuajado de un fruto puede ocurrir en ausencia de fertilización, un evento fisiológico al que se le denomina partenocarpia y que concluye con el desarrollo de frutos sin semillas (Lukyanenko, 1991).

Los primeros estudios fisiológicos sugerían que la partenocarpia en tomate estaba relacionada con desajustes en el balance hormonal (Gorguet y *col.*, 2005). El bajo nivel de citoquininas y giberelinas detectado en el mutante estéril de tomate *stamenless-2* sugiere que esas hormonas pueden alterar la fertilidad (Sawhney y Shukla, 1994).

Cuando se altera de forma específica la ruta de señalización de citoquininas o giberelinas en anteras o polen de plantas transgénicas de maíz, tabaco y *Arabidopsis* se produce el aborto de estos órganos. Esto parece indicar la existencia de implicaciones funcionales de las citoquininas y giberelinas en el desarrollo reproductivo de las plantas (Huang y col., 2003). De igual forma, se ha descrito que el ácido jasmónico y el etileno están implicados en la maduración del polen, dehiscencia de la antera y antesis de la flor (Gorguet y col., 2005).

Las giberelinas desempeñan un papel clave durante el cuajado y desarrollo del fruto de tomate. Las giberelinas producidas por las semillas en desarrollo promueven el desarrollo normal del fruto (García-Martínez y col., 1991). Las auxinas también están implicadas en el desarrollo de frutos partenocárpico, de hecho, la actividad enzimática relacionada con la biosíntesis de giberelinas está regulada por auxinas siendo estas necesarias para mantener un nivel adecuado de giberelinas activas (García-Martínez y col., 1997; Ross y col., 2000). Se ha demostrado que las etapas tempranas del desarrollo del fruto en tomate dependen de genes cuya expresión está mediada por auxinas y etileno. Por tanto, es probable que las giberelinas estén implicadas en etapas posteriores del desarrollo del fruto y de las semillas, mientras que el resto de las hormonas regulen los primeros estadios de este proceso (Lozano y col., 2009).

Los mecanismos fisiológicos que desencadenan el desarrollo partenocárpico del fruto son en gran parte desconocidos. Sin embargo, la caracterización de mutantes partenocárpico ha permitido entender mejor las bases moleculares y genéticas de este proceso (Tabla 7). El mutante recesivo *pat* exhibe un desarrollo anormal de las flores y se caracteriza por un prematuro crecimiento del ovario, un reducido número de óvulos viables y un incremento del número de capas celulares en el pericarpio (Soressi y Salamini, 1975; Mazzucato y col., 1998). La mutación recesiva *pat-2* también induce partenocarpia (Philouze y Maisonneuve, 1978; Nuez y col., 1986), y tiene efectos pleiotrópicos sobre otros caracteres (p.e.: reducción del vigor de la planta, de la fructificación y de la producción) dependiendo del acervo genético. La tercera fuente genética de partenocarpia es de naturaleza multigénica, en ella participan los genes *pat-3* y *pat-4* como los determinantes principales de este carácter (Nuez y col., 1986).

Cambios en los niveles de expresión de genes MADS-box mediados por las giberelinas podrían ser el origen de la partenocarpia en tomate, ya sea regulando el

desarrollo de los órganos reproductivos (estambres o carpelos) o a través de cambios en la señalización o biosíntesis de las GAs (Lozano y col. 2009).

Las interacciones de las GAs con *PAT* pueden regular el desarrollo sincrónico del polen y del ovario y, por tanto, la formación del fruto. El incremento de los niveles biosintéticos de GAs observado en *pat-2* y *pat-3/pat-4* podría ser el responsable del desarrollo de frutos de tipo partenocárpico de estos mutantes (Fos y col., 2000; Fos y col., 2001). Se ha comprobado que el alelo mutante *lateral supressor* inhibe el desarrollo de frutos partenocárpicos en *pat-2* (Philouze, 1983), de lo que se deduce que este proceso en el mutante *pat-2* requiere de la actividad del gen *LATERAL SUPPRESSOR*. El resultado concuerda con la función propuesta para *LS* como regulador de la sensibilidad a GAs (Schumacher y col., 1999). Por tanto, los mecanismos que explican el desarrollo partenocárpico en *pat-2* y *pat-3/pat-4* podrían estar relacionados con cambios en la regulación de las GAs.

Regulación genética de la maduración del fruto

La maduración en tomate se produce cuando el desarrollo del ovario ha finalizado y las semillas son maduras. El proceso de maduración se caracteriza por una elevada respiración y por la síntesis autocatalítica de etileno (Leievre y col., 1997). La síntesis autocatalítica de etileno es el principal determinante de los cambios fenotípicos que alteran el color, textura, aroma y susceptibilidad a patógenos en el fruto.

Por lo que respecta a la biosíntesis, el etileno se sintetiza a partir de S-adenosilmetionina (SAM). La etapa limitante de la ruta es la síntesis de ácido-1-aminociclopropano-carboxílico (ACC), catalizado por la ACC sintasa. La última etapa de la vía la cataliza una oxidasa (ACC oxidasa) que requiere oxígeno como sustrato. Las primeras estrategias para tratar de retrasar la maduración de frutos han estado relacionadas con la alteración de genes implicados en esta ruta (Fig. 2).

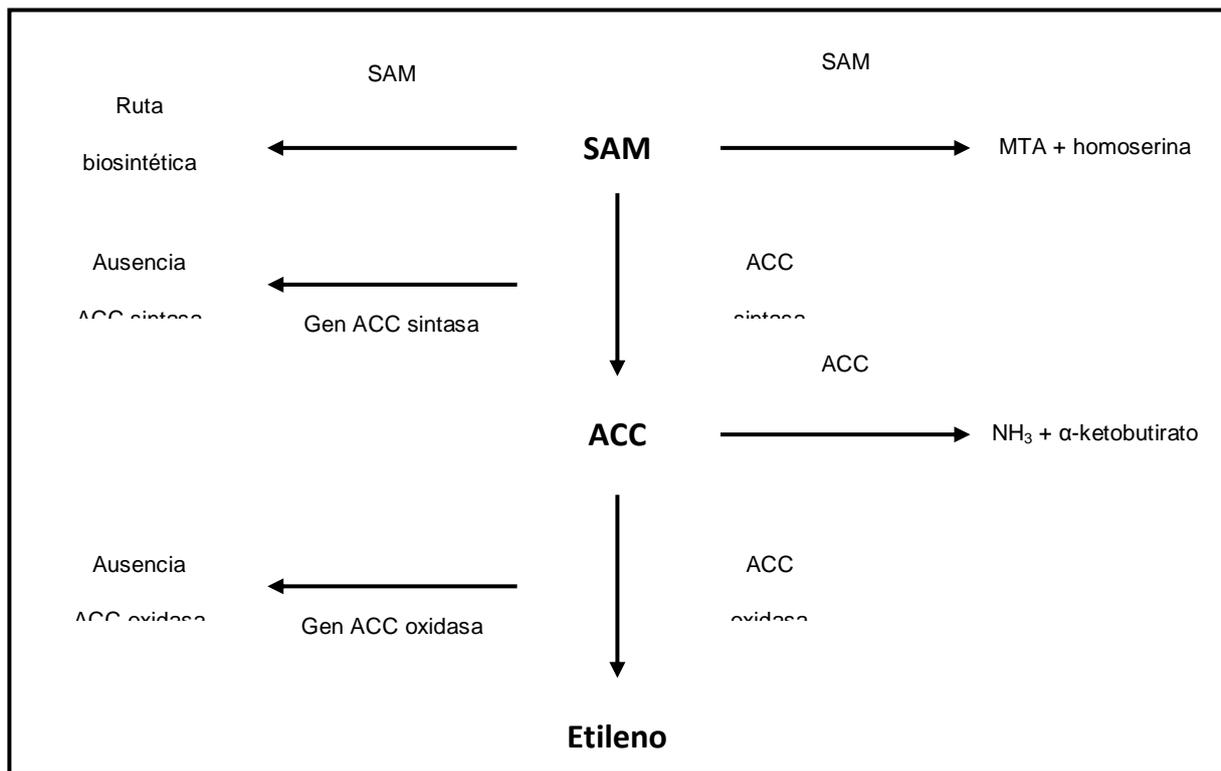


Figura 2. Síntesis y alteración de los niveles de etileno a partir del SAM (revisado por Stearns y Glick, 2003). El enzima SAM descarboxilasa convierte el SAM en SAM descarboxilado que puede ser usado para la síntesis de poliaminas (Kumar y col., 1996). El enzima SAM hidrolasa convierte el SAM en 5' metil-tioadenosina (MTA) y homoserina (Good y col., 1994). El enzima ACC deaminasa, descubierto en organismos del suelo (Honma y Shimomura, 1978), convierte el ACC en amonio (NH₃) y α-ketobutirato. Mayores niveles de expresión de estos enzimas reducen la disponibilidad de precursores para la síntesis de etileno. A la izquierda, se presentan las estrategias para reducir los niveles de etileno sobre la base de la anulación de función de los dos enzimas de la ruta de biosíntesis de esta hormona.

En *Arabidopsis*, el etileno es percibido por una familia de seis receptores de etileno. Uno de esos receptores se identificó a partir del mutante *Never-ripe* (*Nr*) de tomate. El gen *NR* (*Le-ETR3*) codifica una proteína homóloga al receptor de etileno en *Arabidopsis ETR1* (Wilkinson y col., 1995; Hackett y col., 2000). También se ha observado que la transformación genética de tomate con la versión mutada del gen *ETR1* (*etr1-1*) de *Arabidopsis* da lugar a plantas que exhiben un retraso de la maduración de los frutos (Wilkinson y col., 1997). El resto de los receptores en tomate se han clonado por homología de secuencias con los genes *ETR1* y *ETR2* de *Arabidopsis* y *NR* de tomate (Lashbrook y col., 1998; Tieman y Klee, 1999; Klee y Tieman, 2002). Aguas abajo de los receptores de etileno se encuentra una familia de reguladores negativos (proteínas kinasas) de la respuesta a etileno codificada por los

genes *CTR*. En tomate se han identificado tres genes *CTR*, a saber, *LeCTR1*, *LeCTR3* y *LeCTR4* (Leclercq y col., 2002; Adams-Phillips y col., 2004). En la ruta de señalización regulada por etileno participan los genes *EIN2* y *EIN3* (Alonso y col. 1999; Tieman y col., 2001; Yokotami y col., 2003). Actuando aguas abajo de los anteriores se encuentra la familia *ERF* (factores de respuesta a etileno). En tomate se han descrito cinco genes pertenecientes a esta familia (*LeERF1*, *LeERF2*, *LeERF3*, *LeERF4* y *LeERF3b*) capaces de unirse a cajas del tipo GCC de los genes regulados por etileno (Cara y Giovannoni, 2008).

Existen una serie de genes que actúan aguas arriba o en paralelo a la ruta regulada por etileno y que intervienen de forma dramática en el proceso de maduración del fruto de tomate. El gen *TDR4* está relacionado con el desarrollo del fruto de tomate (Seymour y col., 2002; Busi y col., 2003) y codifica un factor de transcripción tipo SQUAMOSA. *TDR4* se expresa en el meristemo floral a lo largo de sus primeros estadios de desarrollo, mientras que en estadios posteriores a la antesis se acumula principalmente en óvulos y paredes del carpelo. Tras la fructificación, la expresión de *TDR4* se observa en diferentes tejidos del ovario. Cuando se inicia la maduración se detectan niveles elevados del mensajero de este gen. Los genes MADS-box de tomate implicados en el desarrollo del fruto se expresan también en diferentes estadios del desarrollo de la flor, lo cual sugiere que el desarrollo del fruto y las semillas pueden ser considerados como una continuación del programa de desarrollo floral. *TM29*, *TAGL1* y *TAGL11* se inducen inmediatamente después de la antesis en el ovario (Busi y col., 2003). Esto los convierte en candidatos a participar en las rutas de señalización que desencadenan el desarrollo del fruto (Fig. 3).

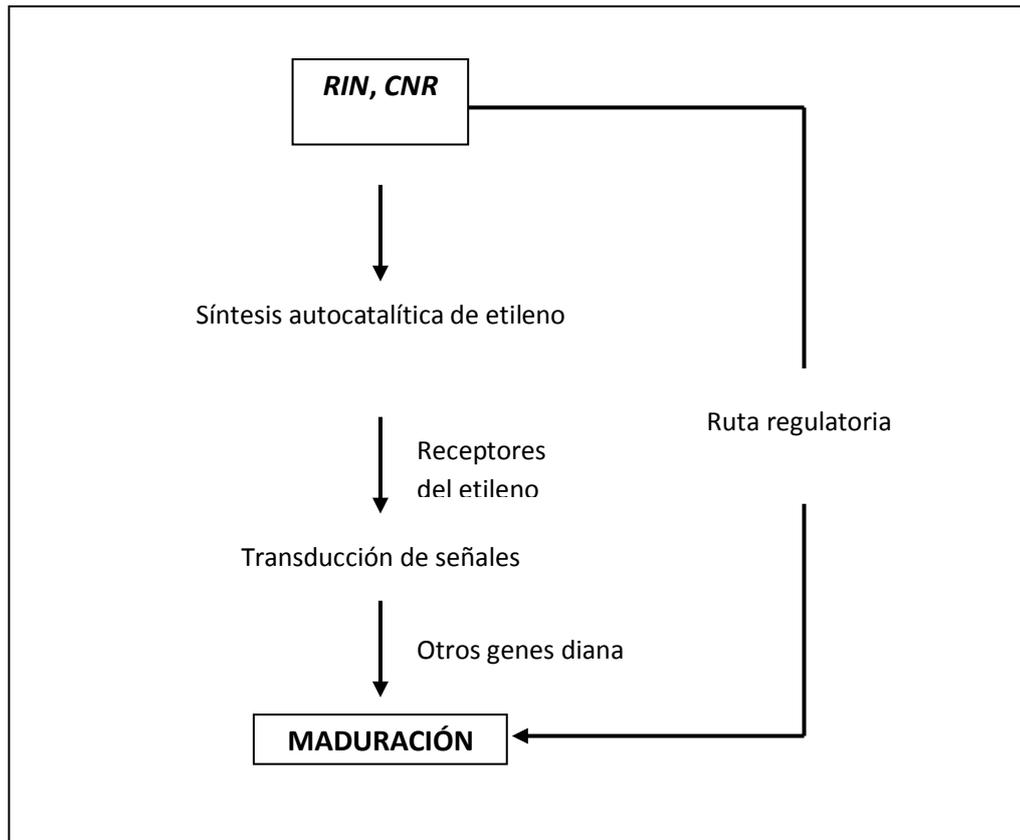


Figura 3. Regulación genética de la maduración en tomate. Los factores de transcripción codificados por *RIN* y *CNR* están implicados en el control de la maduración mediado por etileno, pero también participan en una ruta independiente de etileno. Presumiblemente, el gen *TDR4* también está implicado en este mecanismo de control de la maduración. Aún quedan por descubrir otros reguladores y genes diana. Los receptores de etileno implicados en la transducción de señal promueven una cascada de activación génica que permite la maduración de los frutos de tomate (modificado a partir Lozano y col., 2009).

Algunas de las evidencias de un control transcripcional del desarrollo del fruto proceden de la caracterización de mutantes alterados en el proceso de maduración (Giovannoni, 2004 y 2007). Los mutantes *ripening-inhibitor* (*rin*), *non-ripening* (*nor*) y *Colorless non-ripening* (*Cnr*) desarrollan frutos incapaces de madurar (Tabla 7) incluso después de un tratamiento con etileno. Estos mutantes comparten una serie de características, ausencia de producción de etileno e incremento de respiración climática (Vrebalov y col., 2002; Giovannoni y col., 2004; Manning y col., 2006). Esto indica que los genes afectados *RIN*, *NOR* y *CNR* promueven maduración en el fruto a través de una ruta reguladora que actúa corriente arriba de la biosíntesis y señalización del etileno. Los cambios de expresión de genes regulados por etileno en los

frutos de los mutantes *rin*, *nor* y *Cnr* (Giovannoni, 2007) indicarían que *RIN*, *NOR* y *CNR* podrían participar también en una ruta independiente de etileno (Fig. 3).

El nivel de transcrito de *TDR4* aumenta en los frutos de tomate cuando empiezan a madurar (Seymour y col., 2002; Eriksson y col., 2004). En los mutantes *rin*, *nor* y *Cnr* se produce una reducción del nivel de expresión de *TDR4*. La pérdida de función de *TDR4* produce un pequeño incremento de la firmeza de la pared celular en los frutos, lo que concuerda con el papel que desempeña en la regulación de la estructura de la pared celular (Eriksson y col., 2004).

Recientemente, se ha descrito que el gen *TAGL1* participa en el control genético de la maduración del fruto (Vrebalov y col. 2009; Itkin y col. 2009; Giménez y col. 2010) y su papel puede venir de la regulación que ejerce sobre el gen *ACS2*. El fenotipo del mutante Arlequín, etiquetado en dicho gen indica que *TAGL1/ALQ* actúa en rutas independientes de la maduración respecto a *RIN* y *NOR* (Giménez y col. 2010).

Tabla 7. Mutantes y genes de tomate implicados en el desarrollo del fruto.

Mutante o gen	Fenotipo	Gen	Referencia	Ortólogo de Arabidopsis
<i>Pat</i>	Frutos partenocárpicos, alteraciones homeóticas de los órganos florales reproductivos		Soressi y Salamini, 1975 Mazzucato y col., 1998	
<i>pat-2</i>	Frutos partenocárpicos (niveles de Gas alterados)		Phylouze y Maisonneuve, 1978 Fos et al., 2000	
<i>pat-3 / pat-4</i>	Frutos partenocárpicos (niveles de Gas alterados)		Nuez y col., 1986 Fos y col., 2001	
<i>TM29</i>	Frutos partenocárpicos	<i>TM29</i>	Ampomah-Dwamena y col., 2002	<i>SEPALLATA</i>
<i>TDR4</i>	estructura de la pared celular del fruto y éste no es capaz de completar el proceso de maduración	<i>TDR4</i>	Seymour y col., 2002 Eriksson y col., 2004	<i>FRUITFULL</i>
<i>nor</i>	Frutos que no maduran	<i>NAC</i>	Tigchelaar y col., 1978 Giovannoni y col., 2004	<i>NAC domain TF</i>
<i>rin</i>	Frutos que no maduran	<i>LeMADS-RIN (RIN)</i>	Dostal y col., 1974 Vrebalov y col., 2002	<i>SEPALLATA-like</i>
<i>Cnr</i>	Frutos que no maduran, pérdida de adhesión celular	<i>LeSPB-CNR (CNR)</i>	Thompson y col., 2006 Manning y col., 2006	<i>SBL3</i>

3. LA MUTACIÓN ARTIFICIAL O INDUCIDA

La mutación es una alteración o cambio en la información genética (genotipo) de un ser vivo y que, por lo tanto, va a producir un cambio de características, que se presenta súbita y espontáneamente, y que se puede transmitir o heredar a la descendencia. Una consecuencia de las mutaciones puede ser una enfermedad genética, sin embargo, aunque en el corto plazo puede parecer perjudiciales, a largo plazo las mutaciones son esenciales para nuestra existencia. Sin mutación no habría cambio y sin cambio la vida no podría evolucionar (Strickberger, 1985; Klug y Cummings, 2006).

Las mutaciones pueden clasificarse de acuerdo a su origen en mutaciones espontáneas o inducidas (Milton y Allen, 1995). Las mutaciones espontáneas son el resultado de procesos biológicos, físicos o químicos que ocurren de forma natural mientras que las inducidas pueden provocarse mediante factores externos, como productos químicos y radiaciones (Klug y Cummins, 2006).

La mutación natural es la base de la selección natural, y por consiguiente de la evolución, si bien ha sido así mismo de gran utilidad en la mejora genética de plantas y de la selección artificial. La mutación inducida es un complemento para incrementar la variación genética existente en el caso de que ésta se haya reducido excesivamente por una intensa selección o cuando la variación disponible sea insuficiente para los propósitos deseados. En ambos casos, la mutación ocurre totalmente al azar, por lo que no es posible conocer a priori cuál va a ser el resultado sea cual sea el tratamiento mutagénico aplicado (revisado por Cubero, 2003).

3.1 Los agentes mutagénicos

Determinados agentes ambientales físicos o químicos pueden dañar el ADN o interferir con la maquinaria replicativa de las células, de modo que provocan una mayor frecuencia de aparición de mutaciones. A dichos agentes se les llama mutágenos o agentes mutagénicos. Los mutágenos causan alguna alteración en el ADN que bien la célula no puede reparar convenientemente o es un daño extenso que sobrepasa la capacidad de los mecanismos celulares normales de reparación (Madigan y *col.*, 2003; Prescott y *col.*, 2004).

Desde la perspectiva de la mutagénesis como mecanismo para aumentar la variabilidad genética, un agente mutagénico debe ser lo suficientemente efectivo sobre el material hereditario para causar cambios numerosos en la secuencia del ADN y, al mismo tiempo, inocuo para el hombre. Hay un gran número de agentes, físicos y químicos que causan mutaciones; todos los cancerígenos lo son, aunque no a la inversa: no todo mutágeno resulta cancerígeno (revisado por Cubero, 2003). La capacidad mutagénica se mide por la dosis semiletal (DL_{50}) que es la dosis que impide o dificulta el crecimiento del 50% de los individuos tratados, de forma que DL_{50} muy bajas indican un alta toxicidad (Milton y Allen, 1995). Las tasas de mutación artificial son muy distintas de la natural. La frecuencia de mutación natural oscila entre 10^{-6} y 10^{-8} en microorganismos y entre 10^{-4} y 10^{-6} en plantas y animales (las frecuencias se dan por gen y generación), mediante mutagénesis artificial puede conseguir una tasa tan alta como se quiera, pero existe el riesgo de causar tantas mutaciones en el organismo que éste pierda toda capacidad de sobrevivir (revisado por Cubero, 2003). Los agentes mutagénicos pueden ser aplicados no sólo en semillas sino también en brotes, polen, tejidos somáticos y células, tubérculos o bulbos (Stoskopf y *col*, 1993).

3.1.1 Agentes mutagénicos físicos

a) Radiaciones ionizantes

Las radiaciones ionizantes producen un daño directo, esto es, roturas físicas en la cadena de ADN, que a veces conlleva la eliminación de fragmentos de éste, pero también causan un efecto indirecto a través de los iones producidos en el medio. Para su aplicación se precisan instalaciones especiales y la adecuación de los protocolos a una reglamentación específica y rigurosa (revisado por Cubero, 2003).

Al penetrar la radiación en las células, se expulsan electrones de los átomos y estos se transforman en radicales libres y en iones reactivos. A lo largo del camino seguido por el rayo de energía queda una estela de iones que pueden iniciar diversas reacciones químicas. Estas reacciones pueden afectar directa o indirectamente al material genético alterando las purinas y las pirimidinas del ADN dando lugar a mutaciones puntuales. Estas reacciones ionizantes también pueden romper los enlaces fosfodiéster, interrumpiendo la integridad del cromosoma, dando lugar a diversas aberraciones cromosómicas, como deleciones, traslocaciones y fragmentación

cromosómica (Klug y Cummins, 2006). Los rayos X y γ son los más utilizados y efectivos, habiéndose utilizado también los α , β , neutrones, protones, etc. (Tabla 8). El tipo de radiación a aplicar viene frecuentemente obligado por las características del material (tipo de tejido, ciclo de división, número de cromosomas, volumen nuclear, etc.). Sus efectos dependen así mismo de factores externos como la temperatura, el contenido de agua o la proporción de oxígeno del tejido u órgano tratado (revisado por Cubero, 2003).

La posibilidad de inducir mutaciones utilizando rayos X fue demostrada por Muller (1927) en la mosca del vinagre (*Drosophila melanogaster*) y por Stadler (1928,1929) en cultivos de plantas. Gustafsson (1975) estudió el efecto de la mutagénesis en la cebada donde algunas mutaciones obtenidas producían incremento en la producción de grano, afectaban al tamaño de la semilla, altura de la planta, maduración, morfología de la hoja y calidad de la malta. A pesar del esfuerzo considerable en el desarrollo de mutantes en diversos cultivos, se han obtenido pocos resultados agrónomicamente útiles. Aún así, en 1944 se introdujo el cultivar *Jutta* de cebada como el primero en ser desarrollado mediante irradiación con rayos X (Sigurbjornsson, 1975) y el cultivar de *Pallas* que fue explotado como parental para otros seis cultivares (Konzak, Kleinhofs y Ullrich, 1984).

Tabla 8. Características de las radiaciones ionizantes más utilizadas

Tipo de radiación	Fuente	Riesgo	Penetración en tejidos
Rayos X	Equipo de rayos-X	Peligroso	Varios centímetros
Rayos γ	Radioisotopos y reactores nucleares	Peligroso	Muy penetrante
Neutrones	Reactores nucleares o aceleradores	Muy peligroso	Varios centímetros
Partículas β	Isótopos radioactivos o aceleradores	Puede ser peligroso	Algunos centímetros
Partículas α	Radioisótopos	Muy peligroso	Menos de un milímetro
Protones y deuterones	Reactores nucleares o aceleradores	Muy peligroso	Varios centímetros

En cualquier caso, la dosis adecuada de mutágeno, en el órgano o tejido a tratar y la duración de dicho tratamiento, han de ser objeto de análisis previo a cualquier programa de mutagénesis.

b) Radiaciones no ionizantes

Entendemos como radiaciones no ionizantes aquellas ondas o partículas que no son capaces de arrancar electrones de la materia que ilumina produciendo, como mucho, excitaciones electrónicas (p.e: radiaciones electromagnéticas).

Son el mutágeno físico más utilizado en el laboratorio para obtener mutaciones en bacterias. Estas radiaciones originan dímeros de pirimidina intracatenarios. Las mutaciones aparecen principalmente como consecuencia del mecanismo post-replicativo de reparación y normalmente se trata de transiciones y transversiones (Madigan y *col.*,2003; Prescott y *col.*, 2004).

Los rayos ultravioleta (UV) son los de máxima eficacia en cuanto a producción de mutaciones y los más utilizados debido a su facilidad de manejo y sencillez de las instalaciones requeridas. No obstante, la radiación UV sólo es efectiva para capas celulares de escasa profundidad (revisado por Cubero, 2003). El efecto más importante reside en la formación de dímeros de pirimidina, especialmente entre dos residuos de timina, aunque en menor medida se pueden formar dímeros citosina-citosina y timina-citosina. Los dímeros distorsionan la conformación del ADN y promueven errores durante la replicación que finalmente afectan en la secuencia de bases del ADN. Se sabe que la dimerización inducida por UV es responsable, al menos en parte, de los efectos letales de radiación UV sobre las células (Klug y Cummins, 2006).

Los ultrasonidos también pueden causar roturas celulares y cromosómicas pero sus efectos son inapreciables, de ahí su poca utilidad en mutagénesis inducida. En el caso de las corrientes de alta tensión y las radiaciones electromagnéticas de onda corta, como las de las emisoras de radio y similares, no se ha podido demostrar que causen mutaciones a pesar de las numerosas alertas en la prensa diaria (revisado por Cubero, 2003).

c) Otros agentes físicos

Los choques térmicos se han escrito como mutagénicos, pero su efecto principal es la producción de mutaciones cromosómicas (poliploidía) y de algunas anomalías fisiológicas (revisado por Cubero, 2003).

3.1.2 Mutágenos químicos

Diferentes sustancias químicas tienen efectos mutagénicos de mayor o menor importancia. Entre las sustancias más conocidas se encuentran las mostazas nitrogenadas, los agentes alquilantes, los derivados de purinas y pirimidinas, etc. El tipo de acción es muy variada desde un efecto directo sobre el ADN (p.e: ácido nitroso), por semejanza estructural con algunos de los nucleótidos que forman el ADN (p.e: el 5-bromouracilo, la adición o delección de bases (p.e: acridinas), o la alteración del metabolismo (p.e: la cafeína), etc.

Algunas de estas sustancias producen mutaciones génicas mediante el cambio o sustitución de una base por otra en el ADN, ya sean transiciones (cambio de una purina por otra purina o cambio de una pirimidina por otra pirimidina) y transversiones, (cambio de una purina por una pirimidina o viceversa) (Madigan y *col.*, 2003; Prescott y *col.*, 2004). A su vez, estos agentes químicos se pueden agrupar en varias categorías.

- Análogos a las bases: sustancias con una estructura en anillo similar a las bases naturales de los ácidos nucleicos, pero con propiedades químicas diferentes. El 5-bromouracilo (5-BrU) análogo de la timina (T), propicia transiciones TA→GC, la 2-aminopurina (2AP), análogo de la adenina (A), que provoca transiciones AT→CG.
- Agentes hidroxilantes o desaminantes de las bases nitrogenadas: estas sustancias alteran las purinas o pirimidinas de modo que causan errores en el emparejamiento o bien, labilizan las bases de modo que éstas espontáneamente se modifican químicamente con gran frecuencia. El ácido nitroso provoca una desaminación oxidativa de A (amina) y C (citosina). La hidroxilamina (NH₂OH) actúa específicamente sobre la citosina añadiéndole un hidroxilo a su grupo -NH₂; produce específicamente transiciones GC→AT.
- Sustancias intercalantes: estas sustancias se introducen entre los pares de bases del ADN dando origen a la pérdida o ganancia de nucleótidos. Los derivados de la acridina, como el naranja de acridina, el bromuro de etidio y derivados de la flavina como la proflavina, estabilizan emparejamientos erróneos durante la replicación y la recombinación del ADN, dando origen a emparejamientos en la pauta de lectura.

- Agentes que bloquean totalmente el emparejamiento de las bases: modifican purinas, provocando grandes lesiones en el ADN, que inducen el sistema SOS de reparación, lo que finalmente implica reparación propensa a error. Este grupo incluye potentes carcinógenos como el benzo-a-pireno y la aflatoxina-B₁.
- Agentes alquilantes: dichos agentes introducen radicales alquílicos en una cadena o en las dos cadenas del ADN, produciendo efectos letales o mutagénicos. Algunos agentes alquilantes empleados son: gas mostaza (mostazas nitrogenadas y sulfuradas), Etil-etano-sulfonato (EES) (CH₃-CH₂-SO-O-CH₂-CH₃), Etil-sulfonato de etilo (EMS) (CH₃-SO-O-CH₂-CH₃) o Nitrosoguanidina (NTG) (es la N-metil, N-nitro, N-nitrosoguanidina).

El agente mutagénico más utilizado en la actualidad es el metanosulfonato de etilo (EMS) por su relativa inocuidad para el operario y la facilidad de adquisición y manejo en el laboratorio (revisado por Cubero, 2003). Se trata de un agente alquilante que presenta una gran capacidad mutagénica asociada a una baja tasa de esterilidad o letalidad (Rédei y Koncz, 1992); además parece acceder por igual a todas las regiones del genoma. El EMS promueve una alta frecuencia de mutación en un amplio rango de organismos en ausencia de anomalías cromosómicas (Waugh y col., 2006). Aunque el EMS produce fundamentalmente transiciones, puede ocasionar también pequeñas inserciones y deleciones (Greene y col., 2003; Till y col., 2003). Este compuesto ha sido utilizado en cultivos como soja (Wang y col., 1984) y arroz (Micke y col., 1986) y tomate (Watanabe y col., 2007).

3.1.3 Mutagénesis insercional

Los agentes mutágenos han contribuido enormemente en el campo de la mejora genética durante todos estos años generando una gran variabilidad de poblaciones de mutantes inducidos a través de, neutrones rápidos (Verkerk, 1971; Enmanuel y Levy, 2002; Menda y col., 2004), EMS (Menda y col., 2004; Watanabe y col., 2007) o radiación gamma. Sin embargo, detectar y clonar los genes alterados en estas colecciones resulta técnicamente complicado debido a que, con este tipo de mutación los genes no están localizados lo que hace necesario recurrir a estrategias tales como el mapeo posicional o la elección de posibles genes candidatos.

La mutagénesis insercional, presenta una de las alternativas más prometedoras dentro del campo de la mejora genética ya que soluciona el inconveniente que existe con los agentes mutagénicos permitiendo la identificación y caracterización funcional de los genes que regulan dichos procesos (Enmanuel y Levy, 2002) mediante el etiquetado del gen alterado para su posterior aislamiento y clonación.

Actualmente, dicha técnica ya ha sido aplicada con resultados satisfactorios en *Arabidopsis* (Alonso y Ecker, 2006), arroz (Jung y *col.*, 2008) o maíz (Candela y Hake, 2008).

4 LA MUTAGÉNESIS INSERCIONAL

La mutagénesis insercional constituye una herramienta básica para la identificación y etiquetado de genes, así como para el análisis de su función. Esta estrategia se basa en el hecho de que la interrupción de un gen endógeno o la integración del T-DNA en la vecindad del mismo pueden ocasionar la anulación o alteración de función. Otra aplicación de la mutagénesis insercional por T-DNA estriba en la detección de elementos de regulación mediante el empleo de los denominados “sistemas trampa” (trapping), que permiten detectar secuencias reguladoras y asignar una función a partir de datos de expresión génica. En ambos casos, el gen queda etiquetado por el T-DNA, facilitando la clonación del mismo (Pineda y *col.*, 2010).

4.1 Mutagénesis con transposones

Los transposones son secuencias de ADN que tienen la propiedad de cambiar de posición dentro del genoma, por tal causa también reciben el nombre de elementos genéticos móviles. Por tanto, cuando cambian de posición y abandonan el lugar en el que estaban, en ese sitio, se produce una deleción o pérdida de bases. Si el elemento transponible estaba insertado en el interior de un gen, puede que se recupere la función de dicho gen. De igual forma, si el elemento genético móvil al cambiar de posición se inserta dentro de un gen se produce una adición de una gran cantidad de nucleótidos que tendrá como consecuencia la pérdida de la función de dicho gen. Por consiguiente, los elementos genéticos transponibles producen mutaciones.

El sistema *Ac-Ds* (Activador-Disociación) descubierto por Barbara McClintock (1953) en maíz se dividen en dos clases, *Ac* o elemento autónomo (capaz de escindirse

de la sede donadora y transponerse) y *Ds* o elemento no autónomo (estable, solamente se vuelve inestable en presencia de los autónomos en posición trans).

Mediante el uso de estos elementos han podido aislarse genes en petunia (Robbins y col., 1994), tabaco (Hehl y Baker, 1990), arroz (Enoki y col., 1999), *Arabidopsis*, tomate y lino (Sundaresan, 1996).

Además del sistema *Ac-Ds* en maíz se han descrito otros sistemas como el *Mu* (Mutador) caracterizado por su elevada frecuencia de inducción de mutaciones germinales así como por la diversa naturaleza de los mutantes aislados (Bennetzen y col., 1993), siendo uno de los preferidos para la obtención de mutaciones insercionales de maíz (Cresse y col., 1995). Si bien, comentar también la existencia de otros sistemas tales como *Spm* (Supresor-Mutador), sistema *R-stippled* y sistema *MrRm*.

Un inconveniente del uso de estos elementos es la tendencia que tienen a transponerse preferentemente en posiciones del mismo cromosoma tal y como se ha visto en maíz (Greenblatt, 1984; Dooner y Belachew, 1989), tabaco (Jones y col., 1990; Dooner y col., 1991) y *Arabidopsis* (Keller y col., 1993).

En tomate, los experimentos de mutagénesis insercional con transposones se han llevado a cabo principalmente con el sistema *Ac/Ds* (Yoder y col., 1988; Yoder, 1990; Osborne y col., 1991; Rommens y col., 1992; Carroll y col., 1995). El primer gen clonado mediante esta estrategia fue *Cf-9* (Jones y col., 1994), relacionado con la resistencia a diferentes razas de *Cladosporium fulvum*. Posteriormente, se han clonado los genes *Dwarf*, que codifica para un citocromo P₄₅₀ (Bishop y col., 1996), *DCL* (*DEFECTIVE CHLOROPLASTS AND LEAVES*), que controla el desarrollo de los cloroplastos (Keddie y col., 1996), *FEEBLY*, relacionado con metabolismo y desarrollo (van der Biezen y col., 1996), *DEM* (*DEFECTIVE EMBRYO AND MERISTEMS*), requerido para la organización del tejido apical durante el desarrollo de los embriones así como para el correcto patrón de divisiones celulares y mantenimiento del meristemo en la raíz (Keddie y col., 1998) y *Cf-4*, relacionado con la resistencia a *Cladosporium fulvum* (Takken y col., 1998).

Meissner y col., (2000) obtuvieron una colección de 2932 familias de tomate (Microtom) con el sistema *Ac/Dc*. A partir de esta colección, se logró clonar el gen

TAP3, un factor de transcripción de la familia MADS-box requerido para la especificación de la identidad de pétalos y estambres. Más aún, Gidoni y col., (2003) generaron una colección de 405 líneas transgénicas de tomate con la construcción multifuncional pJasm13, que contenía un T-DNA y el elemento transponible *Ds* (modificado) a través de la cual se clonó el gen *Tm-2²*, que dota de resistencia al virus del mosaico del tomate (Lanferneijer y col., 2003).

4.2 Mutagénesis con T-DNA

El T-DNA es un pequeño segmento del plásmido inductor de tumores Ti (Tumor inducer) de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* (Fig. 4) que, tras la infección de las plantas, se integra de forma estable en su genoma (Raven y col., 2005). En la integración, es imprescindible la integridad de dos regiones, cada una en un extremo del T-DNA a integrar, borde izquierdo (LB) y derecho (RB) (Zambryski y col., 1982, 1983; Gelvin, 2000).

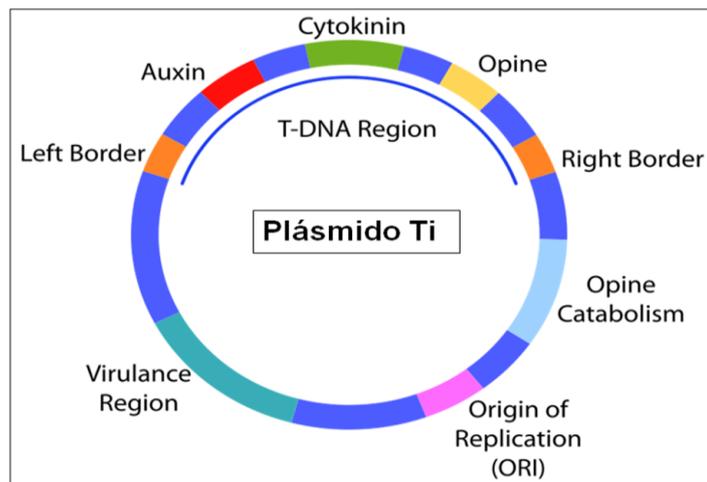


Figura 4. Plásmido Ti con la región T-DNA definida

Este método, fue aplicado por primera vez en *Drosophila melanogaster* (Balliger y Benzer, 1989; Kaiser y Goodwin, 1990), resultando también satisfactorio en diferentes especies vegetales (Bensen y col., 1995; Koes y col., 1995; McKinney y col., 1995; Krysan y col., 1996; Mena y col., 1996; Frey y col., 1998). El inserto T-DNA tiene la valiosa ventaja de que sus inserciones permanecen estables a lo largo de las generaciones (Radhamony y col., 2005). Otra de las ventajas de esta estrategia es que la distribución del T-DNA a lo largo del genoma es aleatoria sin haber puntos preferenciales de integración (Franzmann y col. 1995). En *Arabidopsis*, el análisis de las secuencias flanqueantes al T-DNA sugiere que las inserciones ocurren principalmente en regiones ricas en AT (Brunaud y col., 2002; Qin y col., 2003a). En tomate, el análisis de las secuencias flanqueantes de 174 insertos de T-DNA indicaron que en un 40% de los casos (69 insertos) la inserción ocurría en genes que se transcriben (Gidoni y col., 2003).

En los últimos años, se han generado distintas colecciones de mutantes de T-DNA en cultivos tales como *Arabidopsis* y arroz. En menor escala, la estrategia está siendo utilizada en otras especies como *Lotus japonicus* (Webb y col., 2000), *Medicago truncatula* (Trieu y col., 2000; Scholte y col., 2002), tomate (Mathews y col., 2003; Gidoni y col., 2003), *Salvia miltiorrhiza* (Lee y col., 2008), *Brachypodium distachyon* (Vain y col., 2008), álamo (Harrison y col., 2007; Groover y col., 2004), *Brassica rapa* (Lee y col., 2004), *Brassica napus* (Bade y col., 2003), cebada (Zhao y col., 2006) y fresa (Oosumi y col., 2006).

En tomate, el único gen clonado mediante etiquetado por T-DNA ha sido *ANT1*, que codifica para un factor de transcripción tipo MYB que actúa en la ruta biosintética de antocianinas (Mathews y col., 2003).

Por tanto, este recurso posibilita la rápida obtención de nuevos alelos para un determinado locus, y es de gran utilidad en estrategias de genética inversa (Sessions y col., 2002; Alonso y col., 2003; Rosso y col., 2003; Strizhov y col., 2003).

4.1.1 Naturaleza de las mutaciones promovidas por T-DNA en las plantas transgénicas

Las alteraciones fenotípicas observadas en las plantas transgénicas no siempre están ocasionadas por la inserción del T-DNA, según Azpiroz-Leehan y Feldmann (1997) tan sólo el 35-40% de las alteraciones visibles en plantas transgénicas de *Arabidopsis* que exhiben un fenotipo mutante se deben a este inserto.

Ha podido demostrarse que la inserción del T-DNA genera distintos tipos de reordenaciones cromosómicas, tales como translocaciones y duplicaciones (Castle y col., 1993; Laufs y col., 1999; Tax y Vernon, 2001), que pueden estar provocadas por recombinación entre repeticiones de las regiones flanqueantes del T-DNA y regiones homólogas del genoma de la planta (Tax y Vernon, 2001).

La transformación con *Agrobacterium* puede originar diversas mutaciones cromosómicas tales como inversiones (Laufs y col., 1999), duplicaciones, deleciones (Negruk y col., 1996) o translocaciones (Tax y Vernon, 2001) debiéndose la letalidad embrionaria de muchos mutantes de T-DNA a este tipo de aberraciones cromosómicas (Castle y col., 1993)

También puede ocurrir que realmente el elemento integrado consista en secuencias del ADN de la propia bacteria (Peterhans y *col.*, 1990; Svitashhev y Somers, 2002) o fragmentos de ADN correspondientes al cuerpo del vector. Por tanto, podrían dar lugar a fenotipos mutantes no causados por el T-DNA.

Además de lo anteriormente expuesto, las alteraciones fenotípicas en los individuos transgénicos podrían estar ocasionadas por la activación de transposones endógenos (Hirochika y *col.*, 1996), variación epigenética debida a una alteración en el proceso de metilación del ADN (Jain, 2001) o causas relacionadas con la variación somaclonal como consecuencia del cultivo *in vitro* (Moreno, 1997).

4.3 Mutagénesis insercional con vectores modificados de T-DNA

En los casos en los que un gen cumple más de una función, con solamente el uso de insertos de T-DNA puede ser muy difícil llegar a averiguar las funciones del gen alterado. Este tipo de problemas puede solucionarse mediante el uso de vectores modificados.

4.3.1 Etiquetado mediante activación transcripcional

La activación transcripcional es una estrategia de mutagénesis insercional que genera mutantes dominantes de ganancia de función. Generalmente, se suele utilizar un T-DNA que contiene múltiples promotores tales como el gen 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) usado con éxito en *Arabidopsis* (Weigel y *col.*, 2000) u otros alternativos, como el del virus del moteado de las venas del clavel (CVMV) (Quin y *col.*, 2003b). La integración del grupo de intensificadores en la proximidad de un gen endógeno debería aumentar el nivel de expresión de ese gen (Fig. 5).

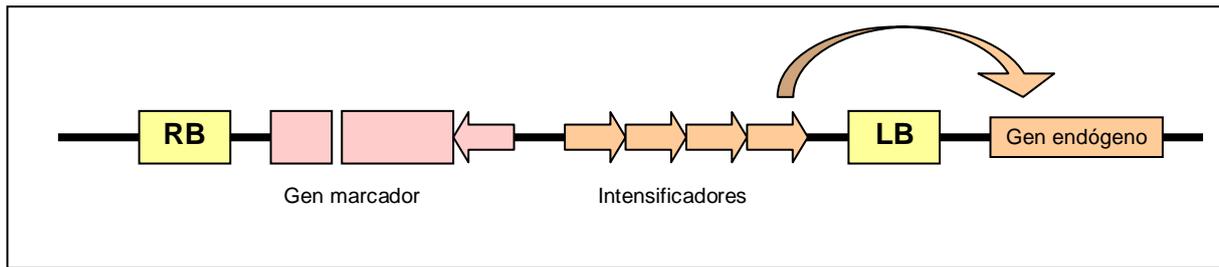


Figura 5. Vector típico de activación transcripcional. En este caso el vector contiene 4 intensificadores 35S. Provoca la activación transcripcional de genes cercanos, por lo que en principio debería dar mutantes dominantes de ganancia de función.

En principio, el uso de este tipo de construcciones ofrece algunas ventajas respecto al uso de construcciones simples de T-DNA. Como los mutantes son de ganancia de función, se puede analizar la función de genes redundantes. Se han identificado varios genes mediante esta estrategia que no generan fenotipo alguno en organismos que no expresan el gen diana en un tejido específico o en el organismo completo, esto es, en mutantes *knock-out* (YUCCA-Zhao y col., 2001; DVLI-Wen y col., 2004; LEP y VAS-Van der Graaff y col., 2002; DSLI-Chalfun-Junior y col., 2005) sin embargo, menos del 2% de los mutantes *knock-out* generan un fenotipo mutante claro (Bouche y Bouchez, 2001). Por tanto, a la hora de identificar mutantes etiquetados, este tipo de aproximaciones podría ser la más conveniente para las especies poliploides.

Por otro lado, la sobreexpresión de un gen endógeno puede generar un fenotipo de interés para la mejora de ciertos caracteres. Si la integración provoca la interrupción de un gen endógeno, entonces lo que se generaría sería un mutante de anulación de función. Se pueden utilizar promotores específicos de tejido o inducibles para generar un incremento de expresión de los genes etiquetados en los tejidos de interés o en un momento concreto del ciclo de vida de la planta (Weigel y col., 2000).

La activación transcripcional ha sido predominantemente utilizada en *Arabidopsis* (Ayliffe y Pryor, 2007) aunque también ha sido utilizada en *Craterostigma plantagineum* (Furini y col., 1997), *Catharanthus roseus* (Van der Fits y Memelink, 2000), petunia (Zubko y col., 2002), álamo (Busov y col., 2003), tomate (Mathews y col., 2003), tabaco (Ahad y col., 2003) y *Lotus japonica* (Imaizumi y col., 2005). En cereales, esta estrategia se ha utilizado principalmente en arroz (Jeong y col., 2002).

A través de esta estrategia se han clonado 41 genes de *Arabidopsis*, varios de arroz, *Cratogeomys plantagineum*, tabaco, *Catharanthus roseus*, álamo y tomate (Ayliffe y Pryor, 2007).

A pesar de todo, este tipo de aproximaciones tiene algunas dificultades, la más importante es que puede no quedar claro si un fenotipo refleja la función real de un gen o, por el contrario, la mutación ha sido causada por interferencia con un proceso no relacionado (Riechmann y Ratcliffe, 2000). Tales problemas pueden ser corrientes con factores de transcripción (Kubo y col., 1999; Weigel y col., 2000).

Por lo que respecta al tomate, Mathews y col., (2003) generaron una colección de 10.427 líneas transgénicas independientes con una construcción de activación transcripcional que portaba 4 copias del intensificador 35S (CaMV) (Weigel y col., 2000). A partir de esa colección identificaron 1.338 líneas transgénicas (12,83%) con alteraciones fenotípicas relacionadas con el desarrollo de la planta (tamaño, morfología de hojas y frutos o color de hojas y frutos) en uno o más caracteres. Asimismo, identificaron algunos mutantes de pérdida de función en la descendencia de algunas plantas que no exhibían alteraciones fenotípicas. Como resultado de este trabajo, los autores clonaron el gen *ANTI*, un factor de transcripción de la familia MYB que regula transcripcionalmente la biosíntesis y el transporte de antocianinas.

4.3.2 Etiquetado de genes mediante “trampas génicas”

Esta estrategia es la más exitosa para la obtención de información sobre la función génica a partir de la expresión fenotípica del mutante (Springer, 2000). La técnica consiste en introducir al azar en el genoma de una especie, construcciones génicas que portan, además del gen marcador, un gen delator con un promotor mínimo, sin promotor o unido a un sitio aceptor de “splicing. Se trata de analizar las secuencias genómicas adyacentes a la secuencia que se inserta y las propiedades de expresión que confiere ésta al gen delator. Tras la detección de secuencias reguladoras capaces de conferir al gen delator un patrón de interés, el conocimiento de la secuencia de la construcción insertada permite clonar las secuencias genómicas en las que se ha insertado. La identificación del gen endógeno es aún más sencilla si se conoce la secuencia completa del genoma.

El delator más utilizado es el gen bacteriano *uidA* que codifica para la proteína GUS aunque también se usa proteína fluorescente verde *GFP* (Haseloff y col., 1997) o del gen *Lc* de maíz (Goldsbrough y col., 1996). Sin embargo, la observación microscópica de la tinción GUS es más sensible que la de otros genes delatores ya que permite su detección en unas pocas células (Topping y col., 1994; Sundaresan y col., 1995; Campisi y col., 1999; He y col., 2001). Si bien, la detección de la actividad GUS es muy sensible pudiendo detectarse la expresión en una única célula mediante técnicas histoquímicas (Jefferson y col., 1987).

Tal y como cita en su estudio Springer (2000), existen tres tipos de trampas génicas (Fig. 6), cuya diferencia reside en las construcciones de genes marcadores usadas, a saber, trampas de intensificadores, promotores y genes.

La trampa de intensificadores consiste en un T-DNA sencillo que, aparte del gen marcador, contiene un promotor mínimo (caja TATA + inicio de transcripción) al que se encuentra fusionada la región estructural del gen *uidA* justo al lado del borde derecho. La inserción del promotor mínimo en el área de actuación de un determinado intensificador, y en la dirección correcta, activa la expresión del gen delator mimetizando el patrón de expresión que dicho intensificador confiere al gen endógeno (Fig. 6A) es decir, permite identificar y analizar el patrón de expresión de un gen analizando la expresión del delator. La trampa de promotores es idéntica a la anterior eliminando el promotor mínimo. El T-DNA debe insertarse dentro de uno de los exones de un gen (Fig. 6B). En cuanto a la trampa de genes, ésta posee un sitio aceptor de *splicing* justo antes de la región estructural del gen delator, de forma que sólo funciona cuando el T-DNA se integra dentro de un intrón (Fig. 6C).

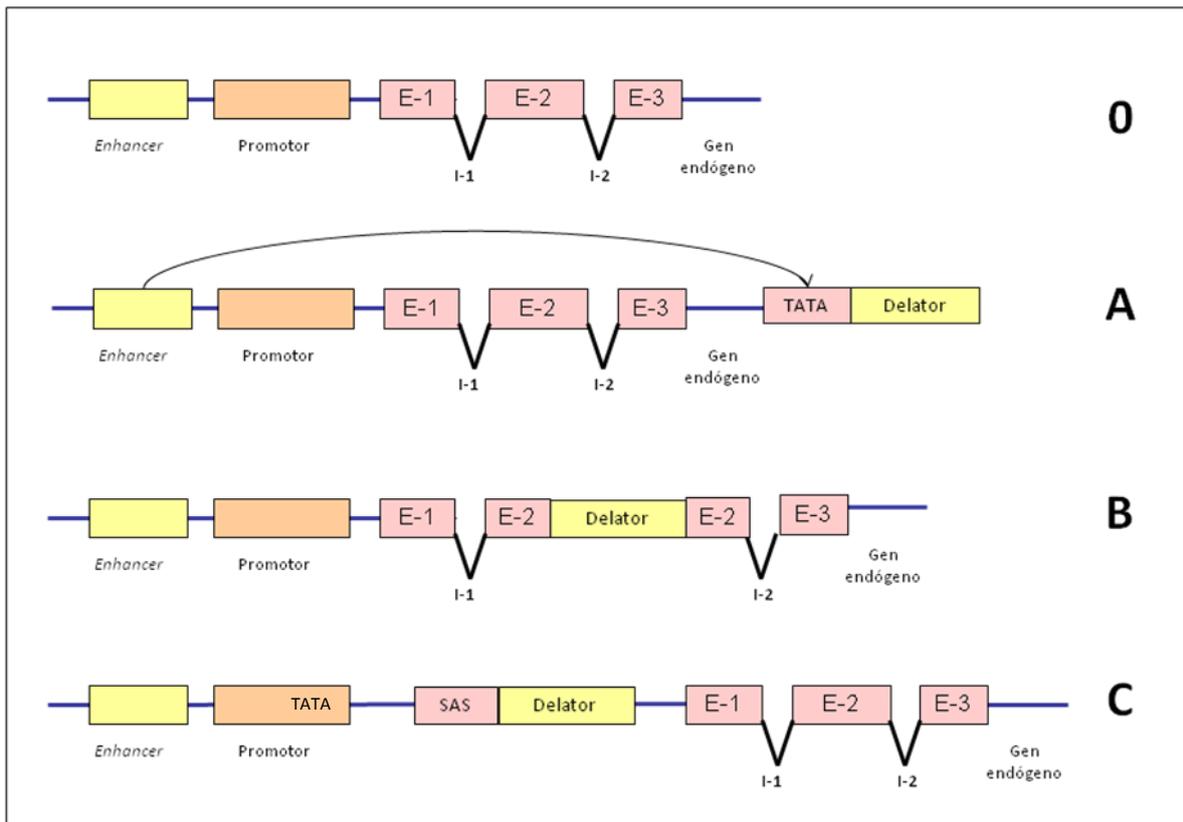


Figura 6. Esquema de las construcciones utilizadas para obtener colecciones de plantas con trampas génicas. **O**, estructura de un gen en un cromosoma donde E-1, E-2 y E-3 son exones mientras que I-1 y I-2 son intrones. **A**, trampa de intensificadores donde el mínimo promotor TATA del gen delator es activado por el intensificador. **B**, trampa de genes, es insertado en un exón. **C**, trampa de promotores. Donde **TATA**

Cada tipo de trampa tiene sus ventajas e inconvenientes, la ventaja de la trampa de intensificadores es que, como para que funcione basta que se inserte en el área de actuación de un intensificador, el número de genes que se detectan es mayor (Springer, 2000). Estudios realizados por Kertbundit y *col.*, (1991) y Topping y Lindsey (1995) revelaron que la proporción de insertos que desencadenan expresión del gen delator estaba en torno al 25% usando una trampa de promotores y al 50% con una trampa de intensificadores. El inconveniente es que a la hora de clonar el gen, el esfuerzo requerido puede ser mayor debido a que este tipo de trampa puede funcionar a una distancia considerable, además, puede resultar difícil determinar qué secuencia genómica es responsable de tal patrón de expresión. Otro aspecto a tener en cuenta su versatilidad, ya que puede actuar como una trampa de promotores cuando se inserta dentro de uno de los exones del gen, o como una trampa de genes cuando se inserta dentro de un intrón. Por lo que respecta a las trampas de promotores y de genes, el inconveniente reside en la necesidad de integrarse dentro de un exón si hablamos de

trampas de promotores o un intrón si nos referimos a las de genes, por lo que el número de genes que se detectará será menor. Por otra parte, la ventaja de estas trampas es que el gen queda estrictamente etiquetado por lo que, si se produce una fusión traduccional (producto del delator-producto total o parcial del gen endógeno) no sólo puede hacerse un análisis funcional del gen, sino que además pueden obtenerse datos de la localización intracelular del producto del gen endógeno.

El empleo de trampas permite la identificación de genes funcionalmente redundantes, es decir, se expresan en múltiples estados de desarrollo y producen efectos pleiotrópicos que generan confusión al llevar a cabo el fenotipado, genes cuya disrupción provoca letalidad temprana y genes cuya disrupción ocasiona un fenotipo tan sutil que a veces no llega a detectarse en el estudio fenotípico de las plantas. Si bien, la identificación del gen es independiente del nivel de expresión del mismo, evitando de esta manera el descartar genes de baja expresión pero con efectos muy relevantes. Además, resulta ser el mejor método para detectar genes que se activan o inactivan en respuesta a un estímulo externo o situaciones de estrés abiótico (Springer, 2000).

El uso de esta estrategia reside en la naturaleza dual de las trampas, es decir, generan mutaciones causadas por la inserción del T-DNA y, al mismo tiempo permiten estudiar el patrón de expresión del gen etiquetado de tal forma que no sólo se pueden hacer deducciones sobre la función del gen etiquetado a través del fenotipado en TG1 o TG2 del mutante en cuestión, sino que también puede obtenerse un panorama bastante preciso en torno al patrón de expresión espacio-temporal de dicho gen, ya que, gracias al diseño de las trampas, la expresión del gen delator mimetiza la expresión del gen endógeno etiquetado.

Se han utilizado con éxito dos tipos de trampas: las mediadas por T-DNA (Kerbundit *y col.*, 1991; Topping *y col.*, 1991; Lindsey *y col.*, 1993; Campisi *y col.*, 1999) y las mediadas por transposones (Fedoroff y Smith, 1993; Klimyuk *y col.*, 1995; Sundaresan *y col.*, 1995). En ambos sistemas, la presencia de un alto número de copias insertadas en distintas regiones del genoma complica la identificación de las secuencias de interés y, la interpretación de los patrones de expresión. Esto ha limitado la utilización de los sistemas de tranposición al uso del sistema *Ac/Ds* debido al bajo número de copias que integra en el genoma (Bancroft *y col.*, 1993).

Análisis preliminares de colecciones de plantas con sistemas de trampas génicas han conducido a la identificación de genes y secuencias reguladoras específicas, tales como raíces laterales (Malamy y Benfey, 1997), embriones en desarrollo (Topping y Lindsey, 1997), tejidos infectados por nematodos (Barthels y col., 1997), células guarda (Plesch y col., 2000) o células en proceso de senescencia (He y col., 2001). El gen *PROLIFERA* (*PRL*) de *Arabidopsis* se identificó a través de *trapping* (Springer y col., 1995) también, la expresión del gen delator *Uida* en células en división ofreció las primeras pistas sobre la posible función de *PRL* (codifica una proteínas de la familia MCM relacionada con la iniciación de la replicación del ADN). Otros genes identificados han sido *FRUITFULL* (*FUL*) (Gu y col., 1998), *POLARIS* (*PLS*) (Casson y col., 2002), *LATERAL ORGAN BOUNDARIES* (*LOB*) (Shuai y col., 2002) y *EXORDIUM* (*EXO*) (Farrar y col., 2003). Por otro lado, los sistemas basados en el empleo de trampas han permitido la clonación de promotores específicos de la cubierta de la semilla en tabaco (Fobert y col., 1994) y, en *Arabidopsis*, de embriones (Topping y col., 1994), tejidos vasculares (Wei y col., 1997), células guarda (Plesch y col., 2000), raíces (Mollier y col., 2000), tejidos en crecimiento y hojas jóvenes (De Greve y col., 2001) y de células meristemáticas (Farrar y col., 2003) también de raíces en *Lotus japonica* (Webb y col., 2000).

En *Arabidopsis* existe una amplia colección de líneas *trapping*, generadas con trampas génicas (Sundaresan y col., 1995; Campisi y col., 1999; Alvarado y col., 2004), también en arroz (Jeon y col., 2000; Jeong y col., 2002; Wu y col., 2003; Sallaud y col., 2003; Sallaud y col., 2004; Yang y col., 2004; Peng y col., 2005), tomate *Microtom* (Meissner y col., 2000) y álamo (Groover y col., 2004).

La información obtenida del análisis de los genes y promotores identificados puede ser utilizada para el estudio de patrones de desarrollo en los que es crucial disponer de marcadores específicos de células y tejidos (Hueros y Jouve, 2000). Aunque aún queda mucho camino por recorrer, los trabajos realizados hasta la fecha ilustran el potencial de esta tecnología genómica funcional.

C. MATERIAL Y MÉTODOS

C. MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL VEGETAL

En el presente proyecto se ha llevado a cabo el análisis de una población compuesta por familias segregantes TG2. Estas se obtuvieron mediante autopolinización de la primera generación mutageneizada TG1 procedente de un programa de mutagénesis insercional llevado a cabo por el Departamento de Biotecnología de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de la Universidad Politécnica de Valencia junto con el Grupo de Genética y Fisiología del Desarrollo Vegetal (AGR176) que dirige el Prof. Rafael Lozano.

Para el programa de mutagénesis insercional, se utilizaron semillas de la variedad de tomate p73 y Moneymaker a las que se aplicó un tratamiento de mutagénesis insercional de T-DNA con vectores convencionales (*nptII*-delator) y con una trampa de intensificadores (vector pD991, que contiene un promotor mínimo fusionado a la región estructural del gen delator *uidA*).

El tratamiento fue desarrollado para la tesis doctoral de doña María del Pilar Angarita Díaz consistente en la generación de plántulas axénicas mediante cultivo *in vitro* a partir de semillas previamente esterilizadas. Una vez obtenidas las plántulas se extrajeron los explantes para la regeneración de las plantas en un medio de cultivo, posterior propagación clonal y, finalmente, aclimatación y trasplante. Tras ello, se procedió a la transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens*, con una cepa que llevaba integrados tres vectores, dos de ellos para el gen marcador *nptII* y un tercer vector pD991 previamente citado. Los explantes de cotiledón procedentes de las plántulas germinadas *in vitro* fueron sumergidos en el cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* para ser inoculados. Tras su evaluación y análisis, las plantas transgénicas fueron cultivadas en invernaderos de cristal en condiciones climáticas controladas.

El código de los mutantes obtenidos con la trampa de intensificadores para su posterior etiquetado consistió en un número (que alude al orden con que se han ido generando las líneas T-DNA) las letras ET (que aluden a que se han obtenido con la trampa de intensificadores; enhancer trapping) y la parte final (73 ó MM) que alude al cultivar (p73 o Moneymaker). Por último, este código irá seguido de un número que

alude a la posición de siembra que ocupa la planta dentro de la familia y estará rodeado por un círculo en caso de que sea una planta que presenta fenotipo y por tanto sea presuntamente una planta mutante. A modo de ejemplo, la figura 1 ilustra como

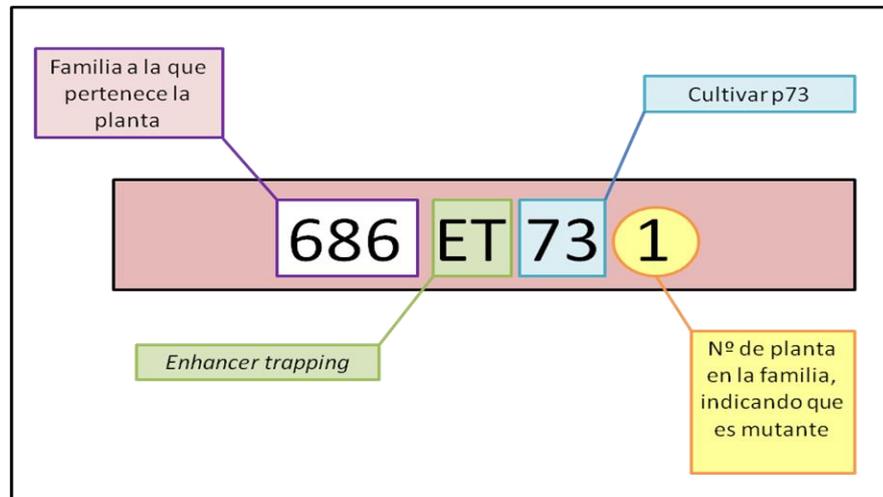


Figura 1 Ejemplo del código que llevaría la etiqueta de una planta que ocupa la primera posición dentro de la familia 686 en ser plantada en el invernadero obtenida mediante una trampa de intensificadores (*enhancer trapping*) perteneciente al cultivar p73 y calificada como posible mutante ya que ha sido rodeada con un círculo.

quedaría la etiqueta de una planta de fenotipo mutante perteneciente a la familia 686 de la variedad p73.

El ensayo se dividió en dos campañas, siguiendo el mismo diseño experimental:

- Campaña Otoño-Invierno (2008-2009): se caracterizó una población compuesta por 280 familias TG2 de la variedad p73.
- Campaña Primavera-Verano (2009): se caracterizó una población compuesta por 95 familias TG2 y 15 familias TG3 (procedentes de familias de la campaña anterior), de la variedad p73 y una población de 97 familias TG2 pertenecientes a la variedad Moneymaker.

2. DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental de este proyecto se dividió en tres fases, la primera de ellas fue el diseño del cultivo, la segunda fase consistió en el fenotipado de las semillas y por último, el tratamiento de las familias de interés seleccionadas.

2.1 Diseño del cultivo

El diseño del cultivo consta de dos fases, la primera de ellas fue el diseño de la siembra y, seguidamente el diseño de la plantación y cultivo.

Siembra

La siembra se llevó a cabo en un semillero situado en San Isidro, Término Municipal de Níjar, Almería. Las semillas se sembraron en bandejas de polietileno expandido de 150 alvéolos (10x15) con sustrato de turba y fibra de coco. La germinación y desarrollo se llevó a cabo, bajo condiciones controladas, en los invernaderos del semillero. Una vez las plantas desarrollaron entre 4 ó 5 hojas verdaderas, fueron trasplantadas al invernadero.

Plantación y cultivo

Tanto la plantación de la campaña Otoño-Invierno 2008-2009 (280 familias TG2) como la de Primavera-Verano 2009 (95 familias TG2 y 15 familias TG3 de p73 y 97 familias TG2 de Moneymaker) se llevaron a cabo en un invernadero perteneciente a la fundación “Finca Experimental UAL-ANECOOP” ubicada en el paraje “Los Goterones” de la localidad de Retamar (Término Municipal de Almería). La extensión total de la finca es de 14 hectáreas de las que actualmente se encuentran transformadas 8 hectáreas, con 18 módulos de invernaderos de diferentes características (Fig. 2).



Figura 2 Mapa de situación de la finca UAL-ANECOOP (recuadro en amarillo)

El invernadero utilizado en las dos campañas fue el módulo U10 (Fig. 3) orientado Noreste-Suroeste, de 1.500 metros cuadrados, con estructura multitúnel, dotado de pantallas de sombreo aluminizadas, riego por goteo y nebulizadores. Como sistemas de cultivo se utilizaron el sistema enarenado convencional y contenedores lineales de fibra de coco (canalones de 50 cm de ancho y longitud variable) sobre estructura metálica de acero galvanizado (Fig. 4).

Las labores de cultivo fueron el entutorado de las plantas utilizando rafia, eliminación de los tallos secundarios y deshojado. Debido a la aparición del virus del rizado amarillo de tomate (TYLCV), conocido como “virus de la cuchara”, también se procedió al corte y eliminación de las plantas infectadas de forma puntual.



Figura 3 Situación del módulo U10 rodeada por el círculo en amarillo dentro de la finca UAL-ANECOOP

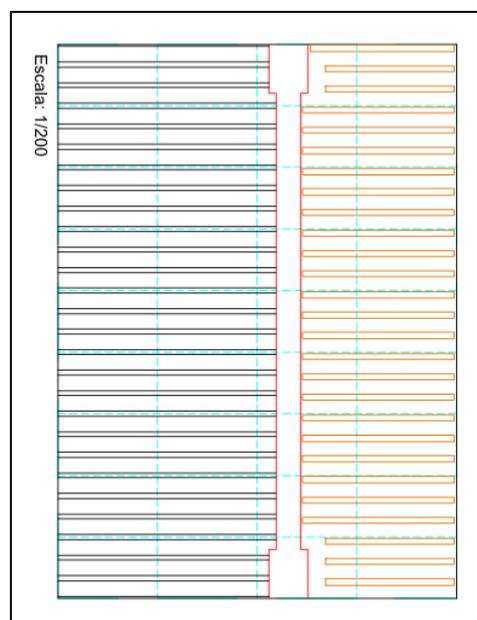


Figura 4 Plano del invernadero U10. La parte izquierda de azul pertenece a la parte de suelo enarenado y la derecha en rojo los contenedores de fibra de coco

Debido a la alta presión de la plaga del tomate *Tuta absoluta*, se dispusieron en el invernadero trampas de captura de agua con feromonas y placas amarillas para seguimiento y monitoreo de plagas tales como mosca blanca (*Bemisia tabaci*), trips (*Frankiniella occidentalis*) así como otras de menor presión.

2.2 Fenotipado de las plantas

Durante el crecimiento y desarrollo de las plantas se llevó a cabo su caracterización y descripción fenotípica individual dentro de cada familia para la detección y evaluación de posibles mutantes.

La periodicidad de visitas a la finca fue de una media de tres veces por semana durante toda la campaña Otoño-Invierno 2008-2009 y Primavera-Verano 2009 dedicando las últimas semanas de cultivo a la selección y recolección de frutos de todas las familias de interés.

Caracteres analizados

Para el estudio fenotípico de las familias T-DNA, se definieron una serie de caracteres ubicados dentro de las categorías: desarrollo vegetativo y desarrollo reproductivo. Todos estos caracteres son descritos y clasificados a continuación.

a) Desarrollo vegetativo

Para la detección de posibles mutaciones relacionadas con el desarrollo vegetativo de la planta se analizaron y evaluaron los siguientes parámetros respecto a una planta de su mismo cultivar (p73 o MM) sembrada y plantada al mismo tiempo:

Tabla 1. Caracteres del desarrollo vegetativo considerados para el fenotipado de las líneas TG2

Categoría	Carácter
Crecimiento vegetativo	Menor vigor
	Planta enana
Desarrollo de la hoja	Tamaño de la hoja
	Desarrollo y número de folíolos
	Textura de la hoja (cérea, etc.)
	Otros
Color de la hoja	Clorótico
	Jaspeado
	Verde intenso
	Otros

Tabla 1. (Continuación)

Hábito de crecimiento	Velocidad de crecimiento
	Ramificación lateral
	Otros
Desarrollo del tallo	Grosor
	Color
Longevidad	Senescencia temprana
	Envejecimiento retrasado
	Otros

a) Desarrollo reproductivo

Para la detección de posibles mutaciones relacionadas con el desarrollo reproductivo de la planta se analizaron y evaluaron los siguientes caracteres respecto al de una planta de su mismo cultivar (p73 o MM) sembrada y plantada al mismo tiempo:

Tabla 2. Caracteres del desarrollo reproductivo considerados para el fenotipado de las líneas TG2

Categoría	Carácter
Floración	Tiempo de floración (transición floral)
Inflorescencia	Arquitectura de la inflorescencia
	Número de flores por inflorescencia
Desarrollo de la flor	Tamaño de los órganos florales
	Número de órganos por verticilo floral
	Otros
Color de la flor	Color más / menos intenso
Esterilidad	Esterilidad masculina o femenina
Desarrollo del fruto	Tamaño del fruto
	Morfología del fruto
Maduración del fruto	Color del fruto
	Maduración acelerada o retardada
Partenocarpia	Desarrollo de frutos sin semilla

2.3 Tratamiento de las familias seleccionadas

Una vez seleccionadas todas las familias con posibles mutaciones de interés se procedió a la toma de muestras de material vegetal y a la recolección de frutos para obtención de semillas.

Para la recolección de las semillas procedentes de las familias mutantes de interés se, actuó de la siguiente manera:

1. Recolección de una media de 3 ó 4 frutos, dependiendo del tamaño y contenido en semillas de éstos, de diferentes ramos por planta. Se recolectarán los frutos de todas las plantas de fenotipo alterado (posibles mutantes), así como de sus hermanas de fenotipo silvestre.
2. Etiquetado de los frutos mediante el patrón previamente descrito, a saber, el número de familia seguido de ET (*enhancer trapping*) y 73 (cultivar p73) o MM (cultivar Moneymaker). Tras ello un guión y el número de planta a la que pertenece el fruto, rodeándolo con un círculo si la planta presenta fenotipo mutante. En la figura 5 se muestra un ejemplo de tomates etiquetados y recolectados.



Figura 5 Ejemplo de frutos de tomate recolectados y etiquetados. Ambos frutos pertenecen a la familia con el código 264ET73, el fruto de la izquierda pertenece a la quinta planta, en orden de plantación dentro de la familia 264ET73, de fenotipo no mutante. El fruto de la derecha procede de una planta de posible fenotipo mutante plantada en la segunda posición dentro de su familia.

3. Extracción de las semillas. Para ello cada fruto fue cortado por la mitad donde seguidamente y con ayuda de una cuchara, se le extrajeron todas las semillas integradas en el mucílago. Éstas fueron depositadas en botes de cristal añadiéndoles una disolución de ácido clorhídrico al 20% y dejando reposar la mezcla resultante un mínimo de 24 horas.
4. Introducción del producto en bolsas de malla metálica y aplicación de agua a presión para lograr la separación de las semillas del mucílago.

5. Secado de las semillas limpias dentro de las bolsas de malla metálica y su posterior embolsado y etiquetado para almacenamiento y conservación hasta su utilización.

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos de nuestro ensayo consistió en una prueba chi cuadrado (χ^2) para evaluar el patrón de herencia de los caracteres mutantes encontrados. Para ello se utilizó el programa “Microsoft Excell versión 2007”.

D. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

D. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Descripción de los fondos genéticos: cultivares P73 y Moneymaker

El estudio de la variabilidad genética constituye el principal punto de partida de un programa de mejora genética de plantas. Gran parte de esta variabilidad, al menos en cultivos hortícolas como tomate, está siendo generada a través de programas de mutagénesis artificial (Watanabe y *col.*, 2007; Pino-Nunes y *col.* 2009; Mathews y *col.*, 2003) en los que la caracterización fenotípica de nuevos mutantes, ya tengan estos un interés científico para la investigación de procesos clave en el desarrollo vegetal, o ya tengan un interés agronómico directo, constituye uno de los principales objetivos para centros públicos y empresas del sector biotecnológico.

La identificación y caracterización fenotípica y genética de un posible mutante parte del conocimiento de los patrones morfogénéticos que caracterizan el desarrollo vegetativo y reproductivo de las plantas de fenotipo silvestre en aquellos cultivares de tomate objeto de estudio y con los que dicho fenotipo alterado debe ser comparado.

Los cultivares o fondos genéticos en los que se ha llevado a cabo el programa de mutagénesis, una parte del cual constituye el resultado de esta memoria, han sido P73 (Fig. 1) y Moneymaker (Fig. 2).

Respecto al desarrollo vegetativo, el crecimiento del cultivar P73 es semi-determinado y claramente simpodial, como es característico en tomate. Antes del inicio de la floración, este desarrolla de 10 a 11 hojas en el segmento inicial sin embargo, el cultivar Moneymaker muestra un hábito de crecimiento indeterminado.

Las hojas en ambos son compuestas y pinnadas de borde lobulado y coloración verde oscura.

En cuanto al desarrollo reproductivo, las inflorescencias de la variedad Moneymaker son algo más pilosas y sus flores de menor tamaño que las del cultivar P73.



Figura 1. Fenotipo silvestre (normal) de una planta de tomate del cultivar P73.



Figura 2. Fenotipo normal (silvestre) de una planta de tomate del cv. Moneymaker.

Los frutos producidos por el cultivar Moneymaker son redondos, lisos y de calibre mediano de coloración verde pálida al inicio de la maduración y con hombros para el cultivar Moneymaker y con buena formación de ramillete. Los frutos del cultivar P73 son también redondos, de color verde oscuro y rojo vivo al final del proceso de maduración, de textura menos suave. En ambos casos, los frutos son de calibre mediano e insertos en ramilletes en forma de raspa de pescado. Ambos cultivares no presentan problemas de cuajado.

2. Detección y caracterización fenotípica de posibles mutantes a partir del análisis de familias TG2

En este apartado se describen los caracteres objeto de estudio del proyecto y que han podido resultar alterados como consecuencia de una mutación insercional en el gen o genes responsables de dichos caracteres. En esta memoria, nos hemos centrado en caracteres relacionados con el desarrollo vegetativo y reproductivo del tomate.

2.1 Caracteres fenotípicos analizados

El análisis fenotípico de cada uno de los caracteres analizados se ha llevado a cabo teniendo como referencia las descripciones antes realizadas de los cultivares P73 y Moneymaker (genotipos control o silvestres). Cualquier variación significativa respecto al patrón de desarrollo de estos cultivares se ha considerado como una posible alteración causada por una mutación insercional del elemento T-DNA con el que se ha realizado la transformación genética (TG) de dichos cultivares.

Los caracteres agronómicos relativos al desarrollo vegetativo de tomate que han sido evaluados en cada una de las familias TG2 fueron los siguientes:

- Tamaño de la planta: a las dos semanas de cultivo se llevó a cabo la observación de posibles diferencias en el tamaño de las plantas procediendo a identificar aquellas con síntomas de enanismo o desarrollo retrasado del crecimiento.
- Morfología y color de la hoja: se evaluó el tamaño de la hoja así como de sus folíolos, existencia de mayor o menor número de folíolos por hoja, coloración diferente de hojas, presencia de necrosis precoz o síntomas extremos consecuencia de una presión ambiental (p.e. reacción a temperaturas extremas) o cualquier alteración no presente en hojas de fenotipo silvestre bajo las mismas condiciones ambientales.
- Hábito de crecimiento: se estudió si la planta seguía un patrón de crecimiento diferente, presencia de ramificaciones laterales fuera de lo normal y cualquier otra alteración fuera de lo común.
- Morfología del tallo: se analizó el grosor, coloración y necrosis precoz del tallo.
- Longevidad de la planta: se observó si la planta presentaba síntomas de senescencia temprana o retrasada.

Junto a ello, se han evaluado caracteres relativos al desarrollo reproductivo, a saber:

- Tiempo de floración: para la comprobación de una floración temprana o tardía de la planta, se contó el número de nudos, comenzando a partir de los cotiledones hasta la aparición de la primera inflorescencia. Seguidamente, se contaron también el número de nudos hasta la segunda y hasta la tercera inflorescencia.
- Morfología de la inflorescencia: se examinó la arquitectura de la inflorescencia y evaluó si el número de flores por inflorescencia era mayor o menor.
- Morfología de la flor: se realizó un estudio visual en busca de posibles alteraciones en la flor tales como tamaño, morfología de los órganos florales, número de órganos por verticilo y coloración.
- Esterilidad: se buscaron alteraciones en los órganos reproductivos masculinos y femeninos que pudieran dar lugar a la esterilidad de la planta.

- Morfología del fruto: Se analizaron los frutos para la detección de diferencias en tamaño, coloración y número de lóculos.
- Maduración del fruto: se observó si el fruto presentaba retraso o precocidad en la maduración respecto a una planta de fenotipo silvestre a través del viraje de la coloración del fruto de verde a rojo.
- Partenocarpia: para comprobar si los frutos presentaban o no partenocarpia, se procedió a realizar un corte longitudinal en la mitad de la baya examinando la presencia o inexistencia de semillas en los lóculos del fruto. De ser partenocárpico el fruto examinado, se comprobaría que este carácter fuera general en todos los frutos de la planta.

Para la mayoría de los caracteres analizados, se ha realizado una evaluación subjetiva, siempre en relación al fenotipo de los cultivares utilizados como referencia

2.2 Identificación de familias TG2 candidatas

Las familias TG2 fueron sembradas en dos campañas sucesivas, otoño-invierno 2008-2009 y primavera-verano 2009. En la primera campaña, se partió inicialmente de 300 familias TG2 de las cuales, 280 fueron trasplantadas a invernadero, con una media de 6 a 12 plantas por familia. Las semillas de las 20 familias restantes, todas pertenecientes al cv. P73, no llegaron a germinar en número suficiente para su evaluación agronómica y fenotípica.

Por su parte, en la campaña primavera-verano 2009 se sembraron 103 familias TG2 del cultivar P73, de las cuales 95 fueron trasplantadas a invernadero con una media de 12 plantas por familia. Las 8 familias restantes no llegaron a germinar adecuadamente. Así mismo, fueron sembradas 100 familias TG2 del cultivar Moneymaker, de las cuales 97 fueron trasplantadas a invernadero en una media de 12 plantas por familia. La germinación de las 3 familias restantes no se consideró adecuada para los objetivos del proyecto.

En la siguiente tabla quedan reflejadas todas las familias identificadas en ambas campañas (tabla 1):

Tabla 1. Familias TG2 identificadas durante la campaña de otoño-invierno 2008-2009 y primavera-verano 2009

Otoño-invierno 2008-2009		Primavera-verano 2009	
12ET73	420ET73	183ET73	725ET73
62ET73	460ET73	206ET73	892ET73
108ET73	502ET73	256ET73	901ET73
149ET73	526ET73	259ET73	904ET73
150ET73	631ET73	260ET73	918ET73
158ET73	651ET73	266ET73	927ET73
172ET73	686ET73	272ET73	904ET73
236ET73	797ET73	327ET73	918ET73
247ET73	809ET73	386ET73	927ET73
248ET73	818ET73	399ET73	945ET73
264ET73	823ET73	403ET73	951ET73
277ET73	839ET73	434ET73	125ETMM
281ET73	861ET73	522ET73	294ETMM
		536ET73	348ETMM
		557ET73	504ETMM
		561ET73	509ETMM
		623ET73	512ETMM
		700ET73	513ETMM

2.3 Identificación de mutantes alterados en el desarrollo vegetativo

Familia 172ET73

Analizando las plantas pertenecientes a la familia 172ET73, encontramos dos fenotipos que diferían significativamente del cultivar de referencia P73. Para diferenciarlos se denominó *mut-1* al primer fenotipo mutante y *mut-2* al segundo.

Las plantas de fenotipo *mut-1* se caracterizaron por presentar menor tamaño y porte más débil. Tanto la longitud de la hoja como en el calibre de los folíolos eran menores que las plantas normales (Fig. 3) además, el tallo era más delgado y los

entrenudos más largos. Estas plantas presentaron, un desarrollo vegetativo retrasado respecto al patrón normal.

Por su parte, las plantas de fenotipo *mut-2* exhibieron una coloración morada muy intensa en las hojas (Fig. 4), posiblemente como consecuencia de una mayor susceptibilidad a las temperaturas bajas. No obstante, conviene señalar que las plantas, tanto de la familia 172ET73 como el resto de familias plantadas en la misma campaña, no presentaron estos síntomas tan extremos.



Figura 3. Morfología de la hoja de una planta de fenotipo mutante *mut-1* (derecha) en relación a la de una hoja normal (izquierda), de la familia 172ET73. Se observa la diferencia en longitud y



Figura 4. Morfología de una hoja de fenotipo normal (izquierda) y una de posible fenotipo mutante *mut-2* (izquierda) de la familia 172ET73. Se observa la coloración morada intensa, posiblemente causada por las temperaturas bajas.

Familias 260ET73 y 561ET73

Estas dos familias, evaluadas durante la campaña primavera-verano 2009, incluían individuos con alteraciones fenotípicas muy similares, se ahí que se describan conjuntamente. Los individuos mutantes se caracterizaron por ser plantas de tamaño mediano, tallo fino y mayor longitud de los entrenudos que cv. P73. Las hojas desarrollaron folíolos de calibre algo más pequeño. Por su parte, estas plantas no se vieron afectadas en el desarrollo de flores y frutos normales (Fig. 5).

La familia 260ET73 a su vez, exhibió dos fenotipos mutantes diferentes, a los cuales denominamos *mut-1* al primero y *mut-2* al segundo. El fenotipo mutante *mut-1* se encontraba alterado también en su desarrollo reproductivo que serán descritas en el apartado 2.5.

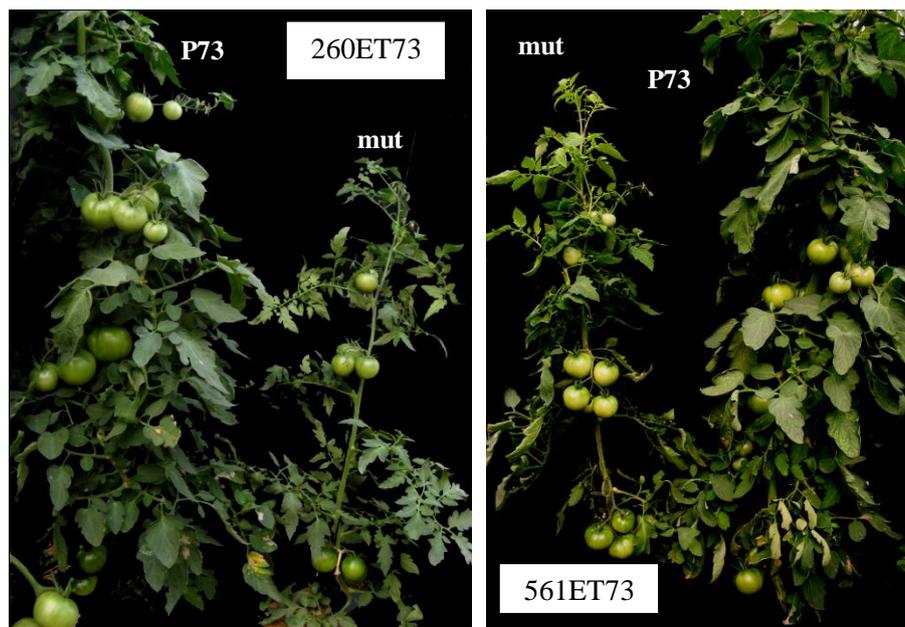


Figura 5. Dos posibles fenotipos mutantes (mut) y mut-2) detectados en las familias 260ET73 (izquierda) y 561 ET73 (derecha), en relación al fenotipo normal del cv. P73

Familia 266ET73

Las plantas presuntamente mutantes encontradas en esta familia, también durante la campaña Primavera-Verano 2009, mostraron un crecimiento reducido y por ende, un menor tamaño que el cultivar P73. Estas plantas eran asimismo de porte compacto debido a la corta longitud de los entrenudos, y en ellas era característica la ondulación del raquis de sus hojas (Fig. 6), más evidente en el ápice de las plantas (Fig. 7). Las hojas exhibieron un tamaño normal aunque sus folíolos eran ligeramente más pequeños que los de fenotipo normal. En cuanto al desarrollo reproductivo, éste no presentaba alteraciones significativas.

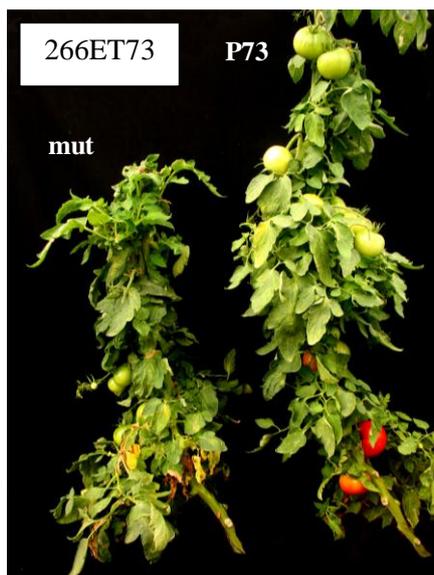


Figura 6. Planta de fenotipo mutante de la familia 266ET73 (mut) de menor tamaño y porte compacto.



Figura 7. Ápice de una planta de la familia 266ET73, de fenotipo compacto.

Familia 272ET73

En la familia 272ET73 se detectó una planta de menor altura respecto al cultivar P73 (Fig. 8). El tallo era de menor tamaño al igual que las hojas (Fig. 9). El hábito de crecimiento era normal. Durante el desarrollo reproductivo las flores y frutos mostraron



Figura 9. Hoja de una planta mutante (mut) detectada en la familia 272ET73, de menor tamaño que la silvestre (cv. P73). un desarrollo normal.



Figura 8. Planta mutante (mut) de la familia 272ET73, de menor altura y vigor que la planta normal (cv. P73).

Familia 725ET73

El tallo de la única planta afectada en esta familia era de menor grosor y en él resulta apreciable la mayor longitud de los entrenudos respecto al cultivar P73. Las hojas fueron siempre de menor tamaño (menor calibre de los folíolos) (Fig. 10). Si bien la altura total de la planta no parece verse afectada, probablemente debido al menor número de hojas desarrolladas.



Figura 10. Fenotipo mutante (mut) de la familia 725ET73, caracterizado por desarrollar un tallo más delgado y mayor longitud de entrenudos que el cv.P73.

Familia 797ET73

En la familia 797ET73 hallamos una planta cuyo fenotipo difería significativamente del cultivar utilizado como control (cv. P73), si bien la alteración observada se refiere únicamente a la pigmentación de las hojas. Estas mostraron un color verde oscuro y brillo intenso bastante alejado de lo observado en los cultivares normales de tomate (Fig. 11). Dicho fenotipo podría estar relacionado con alteraciones en la síntesis de pigmentos y ceras característicos de las hojas de tomate (Fig. 12). Merece señalar que el resto de las características son completamente normales, y lo que es más importante, que dicha planta no mostró síntomas evidentes de senescencia o enfermedad alguna, incluso en fase muy avanzada del cultivo.



Figura 11. Planta mutante de la familia 797ET73, en una fase final del cultivo, y en la que no se observan evidencias de envejecimiento ni de enfermedad alguna; en esta fase las normales mostraron el envejecimiento característico y alguna que otra enfermedad.



Figura 12. Hoja de fenotipo mutante (izquierda) con otra de fenotipo normal (derecha). La hoja mutante tiene un color más intenso, oscuro y brillante que la de fenotipo silvestre ya senescente, verde más claro y sin apenas brillo.

Familia 901ET73

Las plantas de fenotipo diferente encontradas en esta familia exhibieron un tamaño mediano respecto al cultivar P73 (Fig. 13). Las hojas mostraron pérdida de turgencia dando a la planta un aspecto debilitado, estas eran menos complejas que las de fenotipo normal debido al menor número y tamaño de sus folíolos (Fig. 14). El tallo era ligeramente más fino con una distancia normal de los entrenudos.



Figura 13. Fenotipos de dos plantas hermanas de la familia 901ET73. Una de ellas muestra un menor desarrollo vegetativo y porte más débil (mut) en relación al fenotipo silvestre (P73).

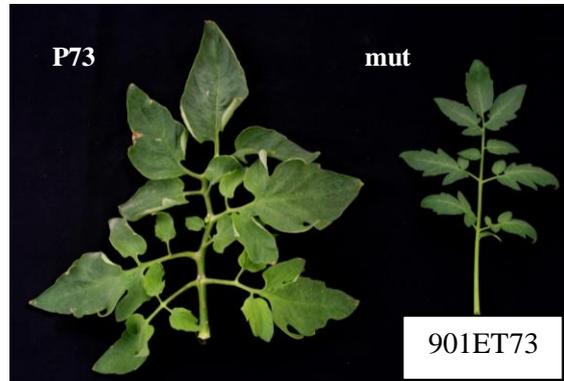


Figura 14. Hoja de fenotipo mutante (mut) de la familia 901ET73, con foliolos más pequeños que los desarrollados por una hoja normal del cv. P73.

Familia 918ET73

Los posibles mutantes encontrados en esta familia mostraron un crecimiento normal si bien en ellas se observó alteración en la morfología y tamaño de las hojas. Los foliolos de éstas eran mayores que las desarrolladas por el cultivar P73, de bordes dentados, algunos más pequeños y de forma acorazonada (Fig. 15). Estas hojas nos recuerdan en su morfología a las hojas de patata.



Figura 15. Hoja de fenotipo mutante (mut) en la familia 918ET73, en la que se observan foliolos de mayor superficie y menor complejidad que los desarrollados por el cv. P73.

Familia 125ETMM

Las plantas de esta familia de fenotipo mutante mostraron menor estatura que los del cultivar Moneymaker (Fig. 16), así como un menor vigor caracterizado por tallos finos y entrenudos largos. Las hojas fueron de menor tamaño, lo que hacía que la planta exhibiese menor superficie foliar. Este menor desarrollo vegetativo posiblemente fue el causante del retraso en el desarrollo y maduración de los frutos.



Figura 16. Planta mutante (mut) de la familia 125ETMM, de escaso vigor y desarrollo vegetativo respecto al que muestra el cultivar Moneymaker (MM).

Familia 348ETMM

La presunta planta de fenotipo mutante, detectada en esta familia, mostraba inferior la longitud del raquis y el calibre de los foliolos de la hojas también era menor que el del fenotipo normal (Fig. 17).

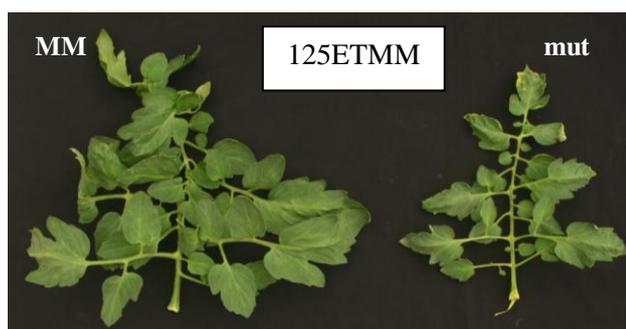


Figura 17. Hoja de una planta mutante (mut) de la familia 348ETMM, más pequeña que la normal (cv. MM).

Familia 504ETMM

En esta familia se detectó un presunto mutante de estatura media respecto al fenotipo silvestre. El tallo era de menor grosor y las hojas más pequeñas (menor calibre de los foliolos) (Fig. 18) y de color verde más claro que las del cv. Moneymaker. En cuanto al desarrollo reproductivo, la planta desarrolló flores y frutos normales.



Figura 18. Hoja de una planta mutante (mut) de la familia 504ETMM, de menor tamaño que el observado en una planta normal (MM).

Familia 509ETMM

La planta de fenotipo mutante identificada en esta familia presentó una altura normal, si bien el tallo era significativamente más delgado que el cultivar Moneymaker (Fig. 19), lo que confería a la planta un aspecto débil y poco vigoroso. Las hojas fueron de menor tamaño debido al escaso desarrollo de sus folíolos.

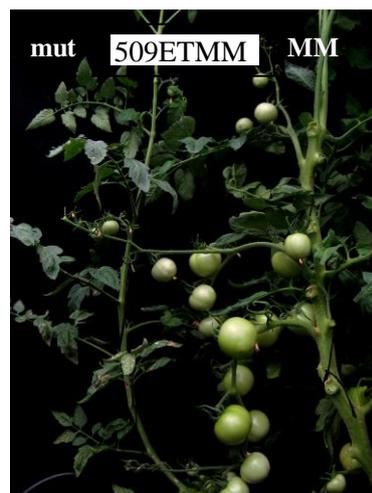


Figura 19. Planta mutante (mut) de la familia 509ETMM, de menor grosor y densidad foliar, que la mostrada por una planta normal (cv. MM).

2.4 Identificación de mutantes alterados en el desarrollo reproductivo

En este apartado se describen aquellas familias TG2 en las que algunas de las plantas que las componen presentaban variaciones significativas en caracteres relativos al desarrollo reproductivo, los cuales a su vez fueron descritos en el apartado 2.1.

Familia 12ET73

En esta familia, los órganos florales de los individuos mutantes se desarrollaron con normalidad. Sin embargo, los frutos fueron más pequeños que los del cultivar P73. En ellos resulta evidente la ausencia de semillas, fenómeno conocido como partenocarpia (Fig. 20). Así mismo, estos frutos partenocárpicos carecen de tejido placentario, aunque no mostraron cambios notables en el número de lóculos (Fig. 20).

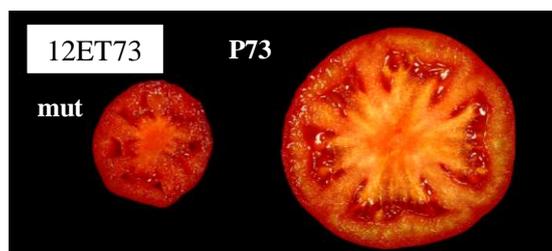


Figura 20. Sección transversal de un fruto mutante (mut) familia 12ET73 y uno de fenotipo normal (P73). El fruto mutante es de menor tamaño y no desarrolla semillas (partenocarpia).

Familia 108ET73

Las flores de los fenotipos mutantes de esta familia desarrollaron un mayor número de carpelos, y éstos a su vez se encontraban mal fusionados lo que daba lugar a un gineceo irregular con excesivo número de lóculos (Fig. 21). El mayor diámetro del ovario de la flor parece ser la causa de que los estambres no puedan fusionarse correctamente para formar el cono estaminal (Fig. 22). Aún a pesar del mayor tamaño del ovario, los frutos que finalmente se desarrollaron mostraron menor tamaño y forma semi-cúbica comparados con los de fenotipo normal (Fig. 23), y todos ellos se desarrollaron de forma partenocárpica, con ausencia total de placenta, lo que hacía que los lóculos apareciesen completamente vacíos y huecos (Fig. 24).

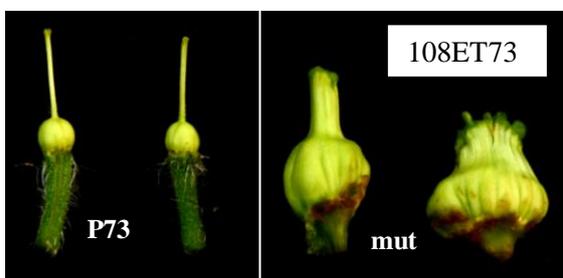


Figura 21. Ovarios de un mutante (mut) familia 108ET73 y de fenotipo normal (P73). El mutante exhibe mayor número de carpelos mal fusionados.



Figura 22. Flor mutante (mut) familia 108ET73 junto a una normal (P73). Los estambres del mutante no forman el cono estaminal.



Figura 23. Fruto de un mutante de la familia 108ET73 (mut) con uno normal (P73). El fruto mutante es más pequeño y de forma semi-cúbica.



Figura 24. Sección transversal del fruto mutante de la familia 108ET73 (mut) y de uno normal (P73). El mutante no desarrolla semillas (partenocarpia).

Familia 206ET73

En la campaña primavera-verano 2009, los fenotipos mutantes de esta familia mostraron alteraciones en el desarrollo de los estambres (tercer verticilo floral) dado que estos conformaban un cono estaminal más corto (Fig. 25), del cual sobresalía el pistilo (exerción estigmática). Tanto el desarrollo vegetativo como la formación del fruto transcurrieron de forma normal.



Figura 25. Cono estaminal de una flor mutante de la familia 206ET73 (mut) y otro de una flor normal (P73). Se observa la menor longitud de los estambres del fenotipo mutante.

Familia 236ET73

Al final del cultivo de la campaña otoño-invierno 2008-2009, llegada la fase de maduración, la totalidad de los frutos de las plantas mutantes de esta familia experimentan un desarrollo reproductivo anómalo caracterizado por la formación de “nuevos carpelos” que surgen del interior del fruto principal (Fig. 26). Se trata pues de una alteración que afecta a la determinación del meristemo floral en los órganos del cuarto verticilo floral. Ello impide un cierre pistilar adecuado, y como consecuencia, el desarrollo de un fruto normal. Resulta importante mencionar que la floración es normal.



Figura 26. Frutos de fenotipo mutante (mut) de la familia 236ET73 y de fenotipo normal (P73). El fruto mutante muestra un inadecuado cierre pistilar debido al crecimiento indeterminado de los carpelos en su interior.

Familia 248ET73

Tres de las plantas de esta familia mostraron alteraciones en el desarrollo de los estambres; estos se encuentran parcialmente transformados en carpelos, no llegando a fusionarse para poder formar el cono estaminal (Fig. 27). Asimismo, el ovario es algo más grande que el de fenotipo normal (Fig. 28).



Figura 27. Estambres del mutante de la familia 248ET73 junto con unos de fenotipo normal (P73). Los estambres del mutante semi-transformados en carpelos no forman el cono estaminal

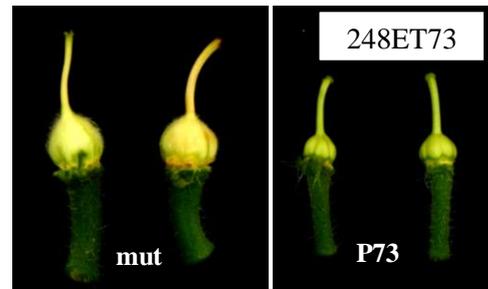


Figura 28. Ovarios del mutante de la familia 248ET73 con unos de fenotipo normal (P73). Los mutantes son más grandes que los de fenotipo normal

Por otra parte, los frutos no contenían semillas (partenocarpia) (Fig. 29), resultando característico el hecho de que los pétalos permanezcan adheridos a los frutos durante periodos prolongados de tiempo (Fig. 30).

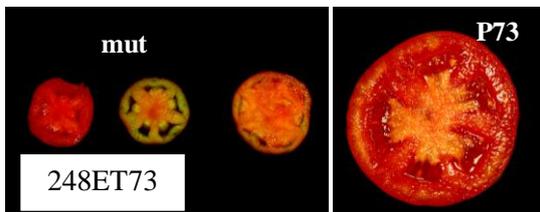


Figura 29. Sección transversal de los frutos de una planta mutante (mut), de menor tamaño y partenocárpica, comparados con el de otra de fenotipo normal (P73), de la familia 248ET73.



Figura 30. Los mismos frutos que la fig.29. Los pétalos senescentes se mantienen sin caerse adheridos a los frutos ya maduros.

Familias 256ET73, 386ET73 y 522ET73

Algunos de los individuos tipificados como mutantes en estas familias, todas ellas sembradas durante la campaña primavera-verano 2009, exhibieron un fenotipo similar. Si bien las primeras etapas del desarrollo floral transcurrieron de forma normal, al final del mismo, no hubo cuajado alguno de los frutos (Figs. 31, 32 y 33).



Figura 31. Inflorescencia del mutante de la familia 522ET73 respecto a una normal (P73) Ningún fruto llega a cuajar.



Figura 32. Inflorescencia mutante (mut) y una normal (P73) de la familia 256ET73. Resulta evidente la ausencia total de cuajado en algunas plantas de esta familia.



Figura 33. Planta mutante de la familia 386ET73. Ninguna inflorescencia desarrolla frutos

Familia 281ET73

El fenotipo mutante de esta familia se caracteriza por presentar frutos de menor tamaño que los de fenotipo silvestre, en cuyo interior no se observó formación alguna de semillas (partenocarpia) (Fig. 34).

No obstante, en esta familia parece existir, junto al fenotipo partenocárpico, otro fenotipo intermedio caracterizado por la maduración de frutos similar al cultivar P73, con pocas semillas en algunos de sus lóculos (Fig. 35).



Figura 34. Sección transversal de un fruto mutante de la familia 281ET73 más pequeño sin semillas (partenocarpia) con uno normal (P73).

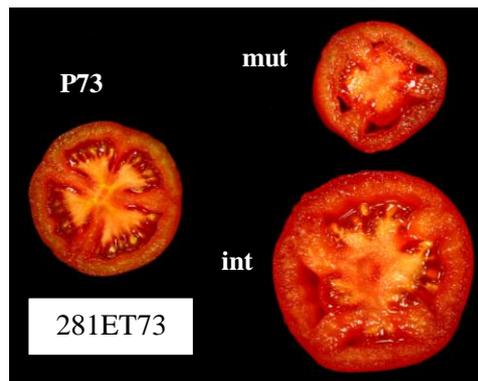


Figura 35. Sección transversal de los frutos del mutante (mut) de fenotipo intermedio (int) y fenotipo normal (P73) de la familia 281ET73. El fruto mutante es partenocárpico mientras que el de fenotipo intermedio contiene pocas semillas.

Familia 327ET73

Esta familia (campaña primavera-verano 2009) presentó una planta con alteraciones en el desarrollo de los órganos florales, a saber, pétalos de mayor tamaño que los del cv. P73, y además, se observó un elevado número de estambres mal fusionados en el cono estaminal (Fig. 36). Además, los pocos frutos que llegaron a cuajar eran partenocápicos (Fig. 37).



Figura 36. Familia 327ET73. Estambres del mutante (mut) mal fusionados comparados con los de P73.



Figura 37. Inflorescencia mutante (mut) y P73 de la familia 327ET73 cuyos frutos no han llegado a cuajar, los que lo han hecho son partenocápicos.

Familia 399ET73

El fenotipo mutante de esta familia (campaña primavera-verano 2009), no presentó alteraciones durante el desarrollo floral, sin embargo, las flores presentaron problemas durante el cuajado del fruto. Así los pocos frutos obtenidos al final del cultivo mostraron menor tamaño, lóculos bien marcados, ausencia total de semillas (partenocarpia) y de tejido placentario (Fig. 38).



Figura 38. Sección transversal de un fruto normal (P73) y uno mutante (mut) de la familia 399ET73 con partenocarpia.

Familia 403ET73

En esta familia (campaña primavera-verano 2009), el desarrollo floral ocurrió normalmente, si bien los frutos difirieron en forma y tamaño. Respecto al fenotipo control (cv. P73), los frutos mutantes fueron trilobulados y de forma ligeramente cónica (Fig. 39), y lo que es más importante, ninguno presentó semillas (partenocarpia) (Fig. 40).



Figura 39. Ramo con frutos normales (P73) y otro de una planta mutante (mut) de la familia 403ET73. Los frutos mutantes tienen forma trilobular y son de menor tamaño.

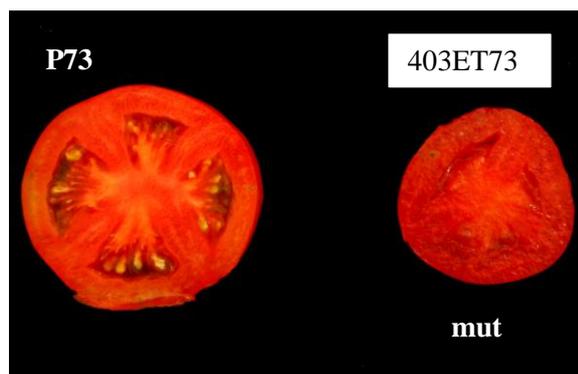


Figura 40. Sección transversal de un fruto de fenotipo normal (P73) y uno mutante (mut) con ausencia de semillas (partenocarpia), ambos detectados en plantas de la familia 403ET73

Familia 502ET73

Los presuntos mutantes de esta familia (campaña otoño-invierno 2008-2009), desarrollaron frutos sin semillas (partenocarpia) aún cuando no se apreciaron alteraciones en el desarrollo floral. Los frutos fueron más pequeños y de forma semi-cúbica con respecto al cultivar P73 (Fig. 41).



Figura 41. Ramo de una planta mutante de la familia 502ET73, con frutos más pequeños y de forma semi-cúbica, además de partenocárpicos. Estas no suelen ser características del cultivar control (PT73).

Familia 557ET73

Durante el desarrollo floral, ocho plantas de esta familia exhibieron alteraciones en el desarrollo de los pétalos. Éstos mostraron una línea longitudinal, de grosor medio y color verde claro, que recorre longitudinalmente cada pétalo (Fig. 42). Podría tratarse de un cambio en la identidad



Figura 42. Envés y reverso de flor mutante de la familia 557ET73 donde se ve la línea de coloración verde en el centro de los pétalos.

de las células que ocupan esta zona media del pétalo, las cuales se desarrollarían como si de un sépalo se tratara. Esta alteración no influyó en el desarrollo de los frutos los cuales exhibieron un aspecto normal.

Familia 623ET73

En esta familia encontramos dos fenotipos mutantes diferentes a los cuales denominamos *mut-1* y *mut-2*. El fenotipo *mut-2* será descrito en el siguiente apartado.

El presunto mutante *mut-1* se caracterizó por una alteración en el desarrollo de la inflorescencia, de manera que ésta adquirió un patrón excesivamente ramificado y el desarrollo de un número excepcionalmente elevado de



Figura 43. Inflorescencia del mutante *mut-1* (derecha) respecto a una normal (izquierda). La inflorescencia, altamente ramificada, desarrolla un gran número de flores, muchas de ellas desprendidas.

flores. Éstas mantuvieron un desarrollo normal, si bien tras la fecundación mostraron facilidad para desprenderse de la planta lo que impidió el cuajado y formación del fruto (Fig. 43). De hecho, durante la campaña primavera-verano 2009 en la que se caracterizó esta familia, no fue posible recoger ni un solo fruto de la planta *mut-1*.

Familia 686ET73

Los órganos florales de los presuntos mutantes de esta familia (campaña otoño-invierno 2008-2009) mostraron cambios homeóticos evidentes. Así, algunos de los sépalos y pétalos desarrollaban características foliares (Fig. 44), y en especial, los estambres aparecían mal fusionados y transformados en carpelos (con diferente grado de transformación) (Fig. 45). Los frutos, de menor tamaño que el cultivar P73, iban acompañados de un cierto grado de malformación y, todos se desarrollaron de forma partenocárpica, con ausencia total de semillas.



Figura 44. Fenotipo de una flor mutante (*mut*) de la familia 686ET73, comparado con el de una flor normal (P73). El mutante presenta cambios homeóticos de los órganos florales..



Figura 45. Estambres de un mutante (*mut*) de la familia 686ET73 respecto a unos normales (P73). Estos, transformados en carpelos, no forman un cono estaminal característico.

Familia 809ET73

El presunto mutante de esta familia estudiada en la campaña otoño-invierno 2008-2009, mostró flores de mayor tamaño que las del cultivar P73. En el ovario es posible encontrar un mayor número de carpelos (Fig. 46) mal fusionados que comenzaron a desarrollarse y crecer significativamente antes de la senescencia de la flor (Fig. 47). Una de las características más notables, que asemeja este mutante al descrito en la familia 236ET73, lo constituye el desarrollo de frutos en el interior del fruto principal, o lo que es lo mismo, la indeterminación asociada al desarrollo de los

carpelos (Fig. 48). Junto a ello, la partenocarpia representó una característica común en los frutos anómalos de este mutante (Fig. 49).



Figura 46. Algunas flores mutantes de la familia 809ET73 de tamaño mayor, ovario grande y estambres mal fusionados



Figura 47. Fruto mutante (mut) de la familia 809ET73. El ovario ha engordado antes de la senescencia de la flor.



Figura 48. Frutos mutantes (mut) familia 809ET73 con desarrollo de frutos en el interior del mismo junto a uno de fenotipo normal (P73).



Figura 49. Sección transversal de los frutos de la fig.48 de la familia 809ET73. Muestran ausencia total de semillas (partenocarpia)

Familia 818ET73

El fenotipo de los frutos de tres de los individuos de esta familia, cuyo ciclo de cultivo se desarrolló durante otoño-invierno 2008-2009, presentó ausencia de semillas (partenocarpia) siendo los frutos de tamaño muy pequeño respecto a los de fenotipo normal (P73). Estos frutos mostraron los lóculos muy marcados (Fig. 50).

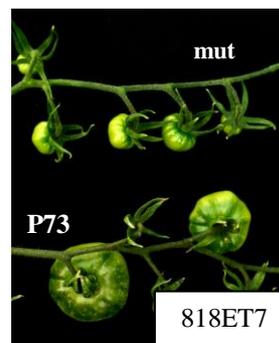


Figura 50. Frutos no maduros en el ramo de un mutante de la familia 818ET73 con uno normal (P73). Los frutos mutantes son partenocárpicos, muy pequeños con sus lóculos muy marcados.

Familia 861ET73

La flor del presunto individuo mutante de esta familia, sembrada en la campaña otoño-invierno 2008-2009, mostró un desarrollo normal de sépalos y pétalos sin embargo, los estambres exhibieron malformaciones impidiendo la formación del cono estaminal (Fig. 51). Al final del desarrollo reproductivo, el mutante da frutos



Figura 51. Cono estaminal del mutante de la familia 861ET73 (mut), en el que se observa la malformación de los estambres y el cono estaminal.

produjo frutos indeterminados, de fenotipo similar los descritos en las familias 236ET73 y 809ET73 (Fig. 52). Al igual que ocurrió en el mutante de la familia 809ET73, los frutos no desarrollaron semillas (Fig. 53).

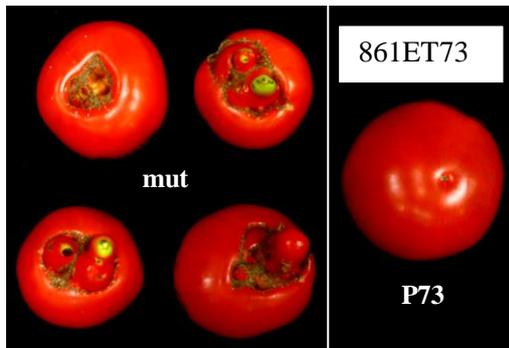


Figura 52. Frutos del mutante (mut) de la familia 861ET73 en los que se observa el carácter indeterminado que conlleva la formación de carpelos dentro de carpelos, fenotipo nunca observado en el cv. P73.

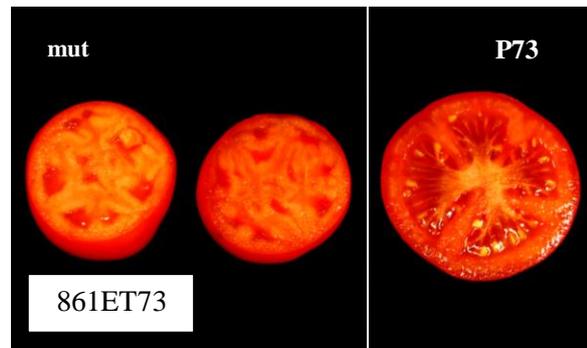


Figura 53. Sección de los frutos de la Fig.52 en la que se muestra la ausencia de semillas del mutante.

Familia 951ET73

Las dos plantas con fenotipo mutante, encontradas durante la campaña primavera-verano 2009, exhibieron inflorescencias con flores de fenotipo normal, la gran mayoría de las cuales no llegó a cuajar y desarrollar frutos. Las pocas que sí lo hicieron desarrollaron frutos pequeños, de lóbulos marcados y ausencia total de semillas (partenocarpia) (Fig. 54).



Figura 54. Frutos del mutante (mut) con lóbulos marcados y de menor tamaño respecto al cv. P73.

En su conjunto, los mutantes afectados en el desarrollo floral tienen en común la presencia de cambios homeóticos que afectan esencialmente a la formación de los estambres. Se sabe que las bajas temperaturas pueden estar en el origen de estos cambios homeóticos a través de alteraciones en los niveles de expresión de genes reguladores de la identidad de los órganos florales (Lozano y col., 1998). En concreto, serían genes de la familia MADS-box, de clase B (homólogos a *DEFICIENS/APETALA3* y *GLOBOSA/PISTILLATA*) los que podrían estar implicados, o más probablemente genes diana de estos. Entre tales genes regulados por factores de tipo MADS-box podrían estar algunos de la ruta de señalización mediada por giberelinas y que, además del desarrollo de estambres, fuesen responsables de la correcta formación y fertilidad del polen. Por el momento, no se han identificado los genes implicados en la fusión de estambres y la formación del cono estaminal, como tampoco lo han sido, aquellos cuya función está directamente relacionada con la fertilidad de polen, por lo que los mutantes aquí descritos constituyen un buen material para la disección genética de este carácter.

En lo relativo a los mutantes partenocárpicos descritos en este trabajo, estos responden a dos patrones de desarrollo distintos, ambos caracterizados por el menor tamaño del fruto. La diferencia esencial entre ambos patrones estriba en el desarrollo de tejidos placentario y conectivo en el interior de los lóculos del ovario, completamente ausentes en las familias 108ET73, 399ET73 y 951ET3, parcialmente desarrollados en las líneas 12ET73, 248ET73 y 281ET73, y bien desarrollados, aunque con ausencia de semillas en el resto. A este respecto, conviene señalar los distintos mutantes partenocárpicos *pat1*, *pat2*, *pat3* y *pat4* que han sido descritos en diferentes cultivares, y en los cuales la implicación de rutas de señalización hormonal parece ser evidente, en particular de las giberelinas (ver revisión de Lozano y col., 2009). En estos mutantes, podría ocurrir que la falta de polinización debida a infertilidad del polen producido en condiciones de temperaturas bajas sea la causante principal del fenotipo partenocárpico. Por su parte, se sabe que las semillas en formación constituyen la principal fuente de giberelinas durante el desarrollo del fruto (Gillaspy y col., 1993; Fos y col., 2001), por lo que cabe pensar que la ausencia de las primeras sea la responsable directa del menor tamaño del fruto observado en todos los mutantes partenocárpicos.

2.5 Identificación de mutantes alterados en el desarrollo vegetativo y reproductivo

Familia 62ET73

Las hojas de los presuntos mutantes de la familia 62ET73, campaña otoño-invierno 2008-2009, exhibieron tricomas con la base engrosada en el haz de las hojas, semejantes a los presentes en los sépalos (Figs. 55 y 56).

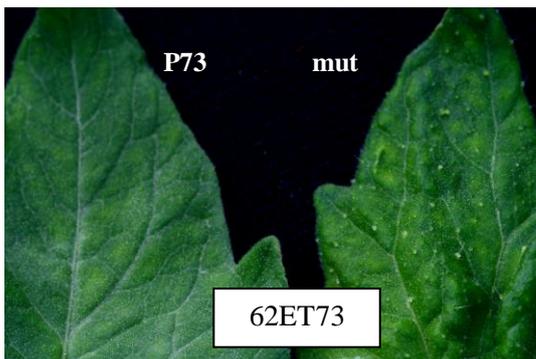


Figura 55. Hoja mutante (mut) de la familia 62ET73 y una de fenotipo normal (P73). Se observa el grosor de la base de los tricomas en el haz del mutante, a modo de puntos blancos.

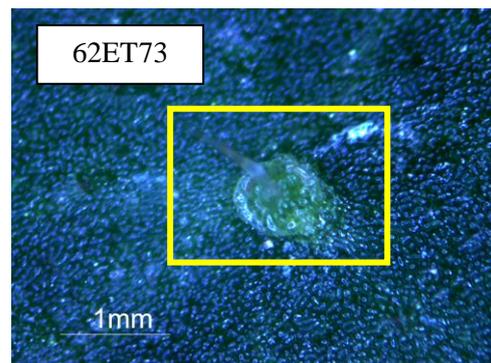


Figura 56. Detalle de un tricoma engrosado de la hoja del mutante 62ET73.

Por su parte, las flores mostraron engrosamientos en el cono estaminal blanquecinas (Fig. 57). Los demás órganos florales mantuvieron un desarrollo normal. Los frutos mostraron una textura escriturada en la epidermis, no completaron el viraje de color verde a rojo al final de la maduración (Fig. 58). Al extraer las semillas de los frutos, éstos presentaron un número muy reducido la mayoría inviables

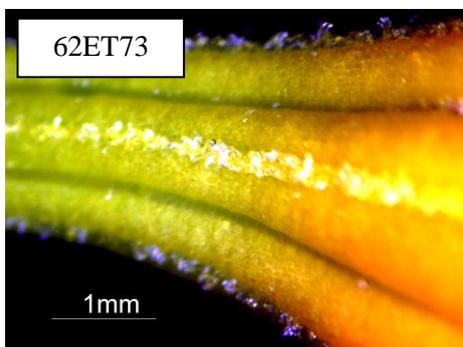


Figura 57. Cono estaminal de una planta mutante de la familia 62ET73.

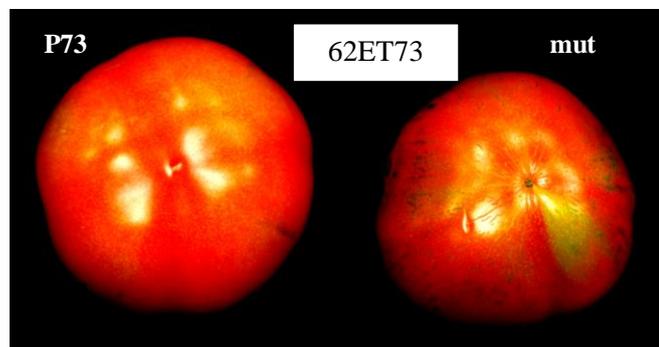


Figura 58. Fruto de fenotipo mutante (mut) de la familia 62ET73 comparado con un fruto normal (P73). El fruto mutante exhibe escriturado en la epidermis y pigmentación heterogénea.

Familia 149ET73

El único mutante de esta familia, (campaña otoño-invierno 2008-2009), mostró alteraciones en el crecimiento en el que destacó el reducido grosor del tallo y el menor calibre de los folíolos.

Durante el desarrollo reproductivo, el mutante exhibió flores normales sin embargo, los frutos tuvieron una distribución de los lóculos irregular (Fig. 59). La maduración se vio retrasada significativamente. Para ilustrar este carácter, en la figura 60 mostramos dos frutos, recogidos ambos, del tercer ramo de una planta normal y del presunto mutante, se observa como el fruto de fenotipo normal ha completado la maduración mientras que el fruto del individuo mutante está al inicio de la maduración (viraje de verde a rojo).



Figura 59. Sección transversal del fruto mutante (mut) de la familia 149ET73, en la que se observa el mayor número de lóculos en relación a un fruto normal (P73).



Figura 60. Frutos de plantas mutantes (mut) y normales (P73) de la familia 149ET73. El mutante exhibe retraso en la maduración respecto al cv. P73.

Familia 150ET73

Las plantas que presentan un posible fenotipo mutante (campaña otoño-invierno 2008-2009), mostraron los folíolos poco lobulados y retorcidos en particular en las primeras hojas. Las hojas desarrolladas posteriormente fueron simples y filiformes y por tanto muy distintas a las del cultivar P73 de morfología compuesta. Además, la planta presentó pérdida en la dominancia apical y un hábito de crecimiento aparentemente rastroso. Las plantas mutantes fueron de menor tamaño y vigor que las plantas de fenotipo P73



Figura 61. Comparación de una planta de fenotipo normal (P73) con una mutante (mut) ambas de la familia 150ET73.

(Fig. 61). También se observaron cambios en el desarrollo reproductivo. Los ápices meristemáticos se determinaron en inflorescencias poco desarrolladas y muy ramificadas con un gran número de flores (Fig. 62). Estas últimas presentaron alteraciones en todos sus órganos, los pétalos y sépalos fueron filiformes, pequeños y dispuestos de forma espaciada, los estambres, muy finos, no estaban fusionados por lo que nunca se llegó a formar un verdadero cono estaminal (Fig. 63). Respecto a los frutos, estas plantas produjeron frutos de morfología y tamaño irregular los cuales contenían semillas aparentemente normales (Fig. 64).



Figura 62. Detalle de la inflorescencia de una planta mutante de la familia 150ET73 (izquierda). En el panel mutante (mut) y otra de fenotipo normal derecho se comparan las inflorescencias mutante (mut) y (P73). La primera presenta pétalos silvestre (P73), pudiéndose comprobar el mayor número de flores y la excesiva ramificación de la primera respecto a la segunda.

Figura 63. Detalle de una flor de fenotipo mutante (mut) y otra de fenotipo normal (P73). La primera presenta pétalos filiformes y estambres mal fusionados y retorcidos, que no llegan a formar el cono estaminal.

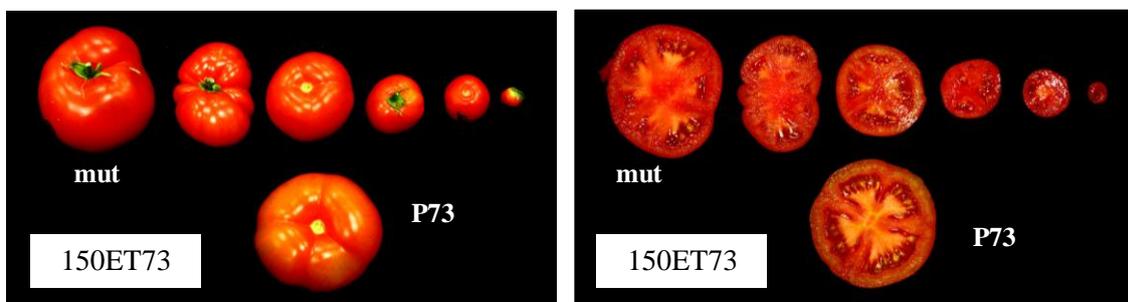


Figura 64. En el panel izquierdo se muestra una gama de frutos alterados en el tamaño y la forma (arriba) en relación a un fruto normal del cv. P73 (abajo). En el panel derecho puede verse la sección transversal de los mismos frutos del panel izquierdo. Destaca el mayor número de carpelos de los frutos mutantes, si bien estos producen semillas aparentemente normales.

Familia 158ET73

Analizando las plantas pertenecientes a esta familia, sembrada durante el periodo otoño-invierno 2008-2009, encontramos dos fenotipos diferentes, denominados *mut-1* y *mut-2*.

Las plantas de fenotipo *mut-1* se caracterizaron por ser enanas y de porte más débil (Fig. 65). Las hojas fueron menores que las plantas normales (Fig. 66). Estas plantas no desarrollaron ni flores ni frutos (Fig. 67).



Figura 67. Planta mutante de la familia 158ET73, enana, de porte débil y que no desarrolla flores ni frutos

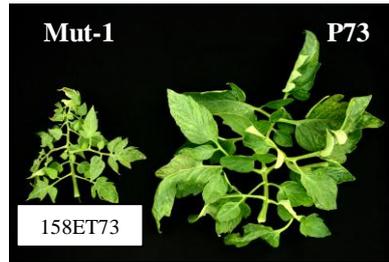


Figura 66. Menor tamaño de la hoja detectada en una planta mutante (*mut-1*) de la familia 158ET73, respecto a una de fenotipo normal (P73).



Figura 65. Planta de fenotipo normal (P73) junto a la mutante enana (*mut-1*) de la familia 158ET73.

Por su parte, las plantas de fenotipo *mut-2* exhibieron una altura mediana respecto a una planta normal. El tallo fue de menor grosor y la longitud de los entrenudos larga. Los demás órganos vegetativos se desarrollaron con normalidad (Fig. 68). Con respecto a los órganos florales, los sépalos no llegaron a abrirse por completo (Fig. 69) y, al examinar los ovarios, estos maduraban muy prematuramente, aún sin alcanzar un desarrollo normal (Fig. 70). Consecuencia de estas alteraciones, la planta no llegó a desarrollar ningún fruto fértil.

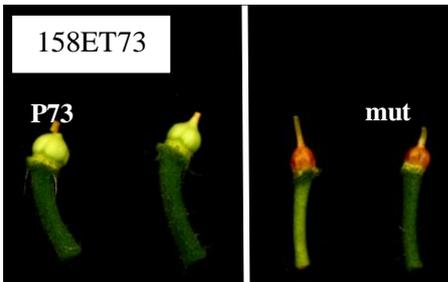


Figura 70. Ovarios necrotizados del mutante de la familia 158ET73 respecto a unos normales (P73).



Figura 69. Inflorescencia mutante de la familia 158ET73 respecto a una normal (P73).



Figura 68. Planta mutante de la familia 158ET73. De tallo fino y entrenudos largos.

Familia 183ET73

Al poco tiempo de ser trasplantada al invernadero durante la campaña primavera-verano 2009, esta familia mostró una planta de fenotipo mutante enano y con senescencia muy temprana (Fig. 71). Este individuo presentó hojas pequeñas, totalmente necrotizadas y de folíolos pequeños y arrugados a causa de la necrosis. El tallo fue de menor grosor que el del cultivar P73 y marchito. La planta no desarrolló ni flores y ni frutos.



Figura 71. Planta mutante de la familia 183ET73 enana necrótica.

Familias 259ET73; 260ET73; 904ET73; 927ET73 y 929ET73

Estas familias se describen de manera conjunta habida cuenta que en todas ellas se encontró alguna planta con alteraciones fenotípicas muy similares. Los individuos alterados exhibieron un fenotipo muy similar al de familia 183ET73 a diferencia de que éstos sí que desarrollaron flores normales de baja fertilidad cuyos frutos fueron de calibre menor que los del cultivar P73 (Fig. 72).

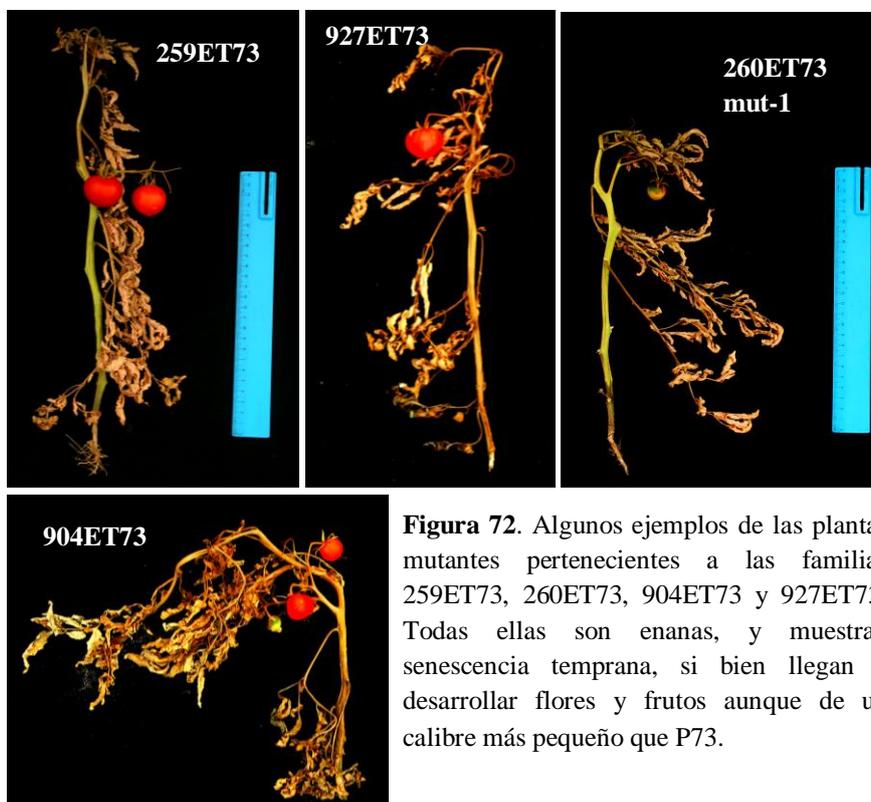


Figura 72. Algunos ejemplos de las plantas mutantes pertenecientes a las familias 259ET73, 260ET73, 904ET73 y 927ET73. Todas ellas son enanas, y muestran senescencia temprana, si bien llegan a desarrollar flores y frutos aunque de un calibre más pequeño que P73.

Cabe añadir que la familia 260ET73 a su vez, exhibió dos fenotipos alterados diferentes de los cuales, el denominado como *mut-1* es el descrito en este apartado.

Familia 247ET73

En esta familia (campaña otoño-invierno 2008-2009) se detectó una planta con fenotipo mutante caracterizado por su enanismo y foliolos de calibre menor. A su vez presentó tallo de escaso grosor y corta distancia de los entrenudos, dotando a la planta de un aspecto compacto (Fig. 73). Esta planta no desarrolló flores ni frutos. No obstante, en esta familia parece existir, junto al fenotipo enano, otro fenotipo intermedio caracterizado por presentar individuos de estatura media, los cuales sí desarrollaron flores y frutos.



Figura 73. Planta mutante de la familia 247ET73 pequeña de aspecto compacto.

Familia 264ET73

El fenotipo del mutante hallado (campaña otoño-invierno 2008-2009) mostró un hábito de crecimiento normal y misma altura que el cultivar P73. Si bien, la planta exhibió aspecto vigoroso portando sus hojas foliolos de mayor calibre y borde dentado a diferencia de los de un individuo P73 (Fig. 74).

Aunque la planta alterada desarrolló flores aparentemente normales, los frutos producidos mostraron una forma ovalada (Fig. 75) a diferencia de la forma globosa de los de fenotipo normal.



Figura 74. Hoja del mutante de la familia 264ET73 respecto a una normal (P73). Esta es más grande y sus foliolos de borde dentado.



Figura 75. Fruto mutante de la familia 264ET73 con uno de fenotipo normal (P73). El mutante tiene forma ovalada.

Familia 277ET73

Los dos individuos de fenotipo alterado de esta familia, fueron plantas extremadamente enanas (Fig. 76). Éstas exhiben un tallo de muy poco grosor y entrenudos cortos, hojas y folíolos pequeños. El desarrollo reproductivo se vio alterado ya que ninguna de los individuos desarrolló flores ni frutos (Fig. 77).

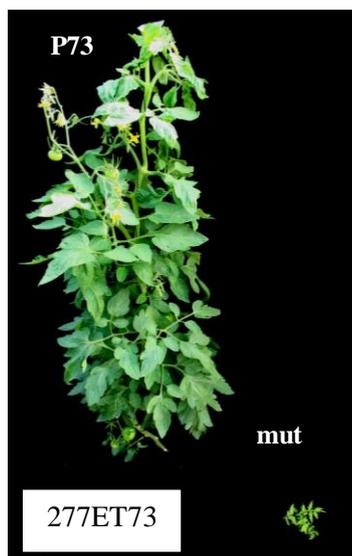


Figura 76. Planta de fenotipo normal (P73) con una mutante (mut) de la familia 277ET73



Figura 77. Planta mutante de la familia 277ET73, el tallo es muy fino y los entrenudos cortos. Hojas, pequeñas.

Familia 420ET73

La planta alterada de esta familia, descubierta durante la campaña otoño-invierno 2008-2009, exhibió un menor tamaño respecto al cv. P73. De porte débil y ligeros síntomas de marchitamiento en las hojas lo cual condujo a una pérdida de turgencia. El tamaño de las hojas fue menor que las de fenotipo normal presentando en algunas ocasiones un mayor grado de complejidad (mayor número de folíolos pequeños presentes en la hoja). El tallo fue de menor grosor y mayor distancia de los entrenudos (Fig. 78). La planta no llegó a desarrollar flores y por lo tanto tampoco frutos.

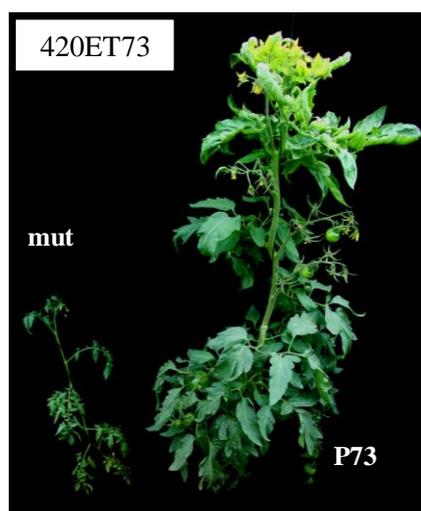


Figura 78. Escaso vigor de una planta mutante (mut) de la familia 420ET73, comparada con una de fenotipo normal (P73).

Familia 434ET73

Durante su desarrollo vegetativo, la planta mutante de esta familia (campaña primavera-verano 2009) mostró hojas cuyos folíolos eran de menor tamaño y arrugados (Fig. 79), este carácter se hizo más evidente en el ápice (Fig. 80). Si bien, durante desarrollo reproductivo, el individuo mostró sus primeras inflorescencias muy pequeñas cuyos sépalos no llegaron a abrirse (Fig. 81). No obstante, las posteriores inflorescencias presentaron alteraciones en casi todos sus órganos florales, a saber, pétalos malformados, mayor número de estambres que no llegaron a fusionarse y formar el cono estaminal (Fig. 82). Tales alteraciones impidieron a la planta desarrollar frutos.

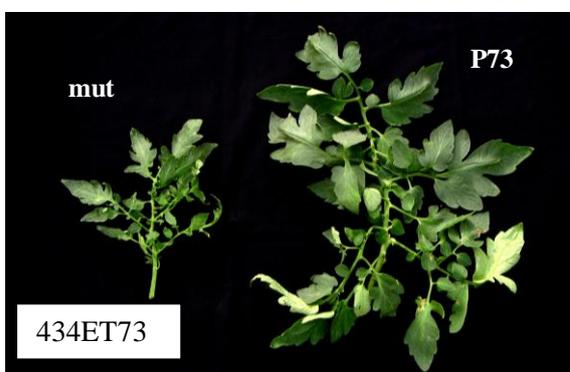


Figura 79. Hoja del mutante (mut) de la familia 434ET73 con una de fenotipo normal (P73). La hoja mutante es más pequeña.



Figura 80. Ápice del mutante de la familia 434ET73 donde los folíolos de las hojas tienden a arrugarse.

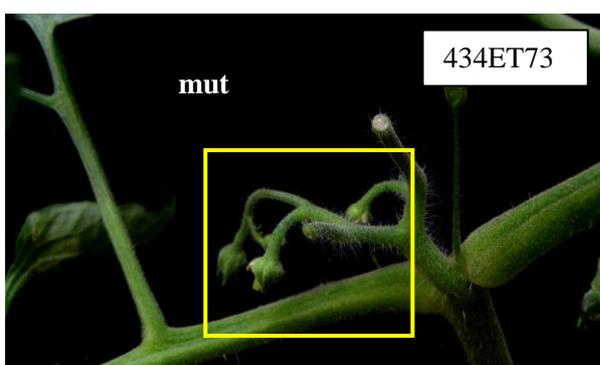


Figura 81. Primeras inflorescencias del mutante de la familia 434ET73, el que se observan cómo los sépalos permanecen fusionados, sin llegar a expandirse.



Figura 82. Diferentes estadios florales del mutante (mut) comparado con el fenotipo normal (P73). Se observan alteraciones en el desarrollo de los pétalos y un número elevado de estambres mal fusionados en el cono estaminal

Familia 460ET73

La planta mutante de esta familia (campaña otoño-invierno 2008-2009) se caracterizó por mostrar envejecimiento prematuro o senescencia temprana. A su vez, presentó menor tamaño que el cultivar P73, hojas pequeñas y de coloración más clara, si bien, las más viejas estaban totalmente senescentes mostrando las más jóvenes síntomas prematuros de necrosis (Fig. 83). Cabe señalar que el tallo no estuvo senescente. La planta desarrolló flores y frutos siendo estos últimos de menor tamaño, algo deformes sin llegar a completar la maduración (Fig. 84).



Figura 83. Fenotipos de una planta mutante (mut) de la familia 460ET73, y una de fenotipo normal (P73). El mutante muestra un débil desarrollo y síntomas de senescencia temprana. **Figura 84.** Fruto de una planta normal (P73) y de una planta mutante (mut) de la familia 460ET73, éstos últimos de menor tamaño e incapaces de madurar.

Familia 526ET73

Las plantas mutantes de esta familia no fueron muy longevas y debido a ello, ninguna sobrevivió hasta el final del cultivo otoño-invierno 2008-2009. Las presuntas plantas mutantes fueron enanas, de porte débil y tallo fino sin que éste llegara a presentar síntomas de marchitamiento. Las hojas pequeñas, con pérdida de turgencia debido al marchitamiento y necrosis en la periferia de algunos de sus folíolos, siendo estos de calibre pequeño y arrugado. Las plantas se vieron afectadas en su desarrollo reproductivo ya que ninguna llegó a desarrollar flores ni frutos (Fig. 85).



Figura 85. Dos plantas mutantes enanas de la familia 526ET73 con marchitamiento prematuro de las hojas y porte débil. No desarrollan ni flores ni frutos.

Familia 536ET73

Esta familia (campaña primavera-verano 2009) desarrolló tres plantas de fenotipo mutante.

Las plantas eran pequeñas sin llegar a ser enanas. Las hojas eran pequeñas (tanto en longitud de raquis como tamaño de los foliolos) existiendo necrosis temprana en alguna de ellas, esto se acentuaba en las más viejas. Todas estas alteraciones proporcionaban a las plantas una apariencia marchita (Fig. 86). Los mutantes desarrollaron flores de tamaño pequeñas sin ninguna alteración en sus órganos florales. En cuanto a los frutos, éstos fueron de menor calibre que los del cultivar P73.

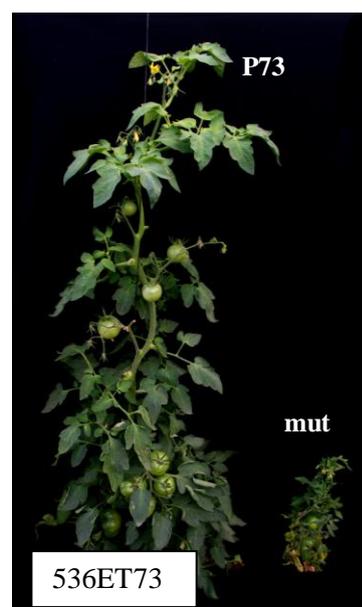


Figura 86. Fenotipo de una planta normal (P73) y otra mutante (mut) de la familia 536ET73.

Familia 623ET73

Los mutantes de esta familia que fueron descritos como *mut-2* exhibieron un tamaño mediano respecto al cultivar P73. Sus hojas fueron de coloración jaspeada a saber, cuando las plantas eran jóvenes el jaspeado fue verde y amarillo, sin embargo, conforme la planta fue creciendo, el jaspeado de las hojas pasó a ser verde y grisáceo (Fig. 87). A su vez, las hojas presentaron un tamaño menor en longitud y calibre de sus foliolos (Fig. 88). Si bien, no desarrollaron ni flores ni frutos.



Figura 87. Hoja mutante de la familia 623ET73 de jaspeado verde-verde claro.



Figura 88. Hojas de fenotipo mutante (mut) y normal (P73) desarrolladas por plantas de la familia 623ET73.

Familia 631ET73

Las plantas de fenotipo mutante halladas en esta familia durante la campaña otoño-invierno 2008-2009 presentaron porte enano. Todos los órganos vegetativos eran más pequeños que los del cultivar P73 (Fig. 89), las hojas mostraron un menor crecimiento y el tallo fue más delgado y de menor longitud entre nudos. En cuanto a los órganos reproductivos, las flores también se desarrollaron poco, si bien no se observaron alteraciones importantes en la identidad, número y disposición de los órganos florales. Los frutos fueron más pequeños pero morfológicamente iguales a los de fenotipo normal (Fig. 90) presentando una cantidad normal aparentemente de semillas.

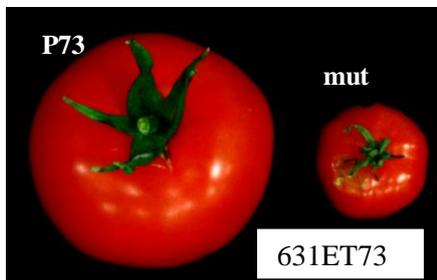


Figura 90. Fruto de una planta mutante de la familia 631ET73 (derecha). La única diferencia respecto a un fruto normal (izquierda) reside en el tamaño de este.



Figura 89. Comparación de una planta mutante (mut) con una de fenotipo normal (P73). La altura de la planta mutante no alcanza 1/3 de la altura de la planta de fenotipo normal..

Familia 651ET73

Los presuntos mutantes pertenecientes a esta familia, campaña Otoño-Invierno 2008-2009, desarrollan alteraciones en la coloración sus órganos vegetativos y reproductivos.

A principio del desarrollo, la planta muestra el ápice clorótico (Fig. 91). Durante el desarrollo reproductivo, los órganos florales exhiben una coloración diferente a la de fenotipo normal, los pétalos son blanquecino anaranjados y los estambres naranja intensos (Fig. 92). En cuanto a los frutos, éstos son de color naranja mandarina al final del proceso de maduración (Fig. 93).



Figura 91. Fenotipo amarillento de una planta mutante (mut) 651ET73 respecto a una de fenotipo normal (P73).



Figura 92. Flor desarrollada por una planta mutante (mut) de la familia 651ET73, cuyos pétalos son blancos-anaranjados y los estambres de color naranja.

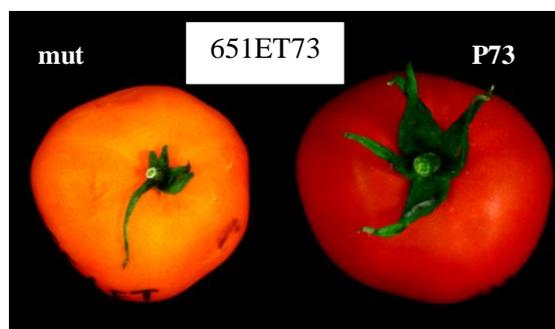


Figura 93. Fruto mutante (mut), de color amarillo-anaranjado observado en una planta mutante de la familia 651ET73.

Familia 700ET73

Las plantas mutantes pertenecientes a la familia 700ET73 sembrada en la campaña primavera-verano 2009, presentaron alteraciones en casi todos sus órganos vegetativos influyendo, como consecuencia, en el desarrollo reproductivo de la planta.

Las plantas de fenotipo mutante eran enanas sin llegar a superar la cuarta parte de la altura de una planta de fenotipo normal P73 (Fig. 94). Las plantas exhibieron un hábito de crecimiento indeterminado sin llegar a definirse un tallo principal (Fig. 95). En cuanto a las hojas, las más viejas tenían tendencia a ser como las de fenotipo normal pero con menor densidad foliar y mayor grado de complejidad debido a la enorme presencia de foliolos diminutos, algunos ondulados, arrugados y no lobulados, por otra parte, las hojas más jóvenes fueron filiformes con tendencia al enrollamiento (Fig. 95). El desarrollo reproductivo también mostró alteraciones, en las pocas flores que desarrolló el mutante, los sépalos no llegaron a abrirse (Fig. 96) por ello, la planta no desarrolló frutos.

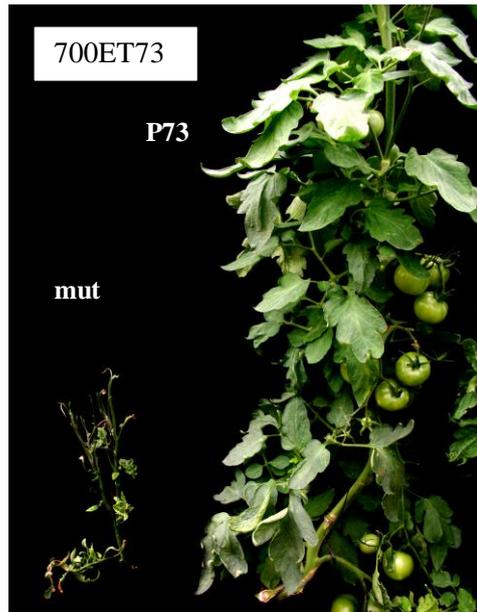


Figura 94. Planta mutante (mut), de fenotipo enano y poco vigoroso en relación al fenotipo normal (P73), detectado en la familia 700ET73.

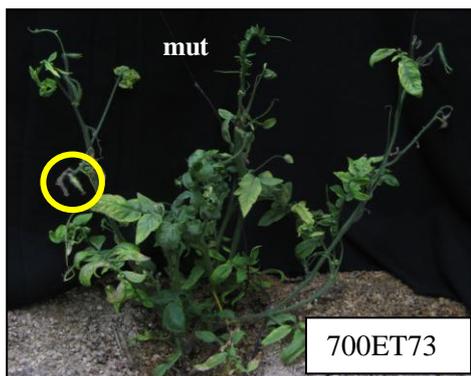


Figura 96. Planta mutante de la familia 700ET73. Rodeada por un círculo amarillo, una flor con los sépalos cerrados.



Figura 95. La planta mutante de la familia 700ET73 carece de un tallo principal bien definido. Las hojas son retorcidas, y los foliolos muy pequeños y simples, las superiores filiformes.

Familia 823ET73

Esta familia (campaña otoño-invierno 2008-2009) exhibió tres plantas mutantes de fenotipo similar. Las tres eran de menor tamaño que el cultivar P73 (Fig. 97). Las hojas de tamaño mediano con desarrollo normal y el tallo de menor grosor. Durante el desarrollo reproductivo, una de las plantas desarrolló flores y frutos normales, sin embargo en otra, la mayoría de sus flores abortaron o dieron lugar a frutos con ausencia de semillas (partenocarpia). La tercera planta desarrolló flores normales sin embargo estas no cuajaron sin dar lugar a frutos.



Figura 97. Planta mutante de la familia 823ET73, de pequeña estatura y tallo delgado. Todas las flores abortan.

Familia 839ET73

El fenotipo mutante mostraba escasa altura (no superó los 56 centímetros; Fig. 98). Las hojas exhibieron menor tamaño que las de fenotipo normal, desarrollando un crecimiento enrollado y algo de decoloración, sus folíolos fueron pequeños, arrugados y poco lobulados. No descartamos la infección por el virus del rizado amarillo de tomate (TYLCV). El tallo fue de un grosor normal y porte erecto. La planta no desarrolló ni flores ni frutos.

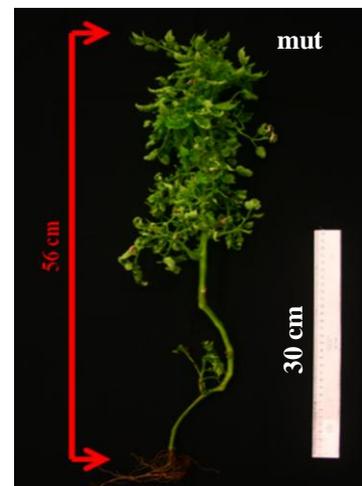


Figura 98. Planta mutante de la familia 839ET73 de 56 cm de altura.

Familia 892ET73

Los folíolos de las hojas de las plantas con fenotipo mutante, identificadas durante la campaña primavera-verano 2009, exhibieron bordes menos lobulados que los de fenotipo silvestre.

En cuanto al desarrollo reproductivo, las flores tenían los sépalos y pétalos más finos que los de una flor de fenotipo normal (Fig. 99) siendo los demás órganos florales normales. Los frutos presentaron forma ovalada (Fig. 100) con un número normal de semillas.

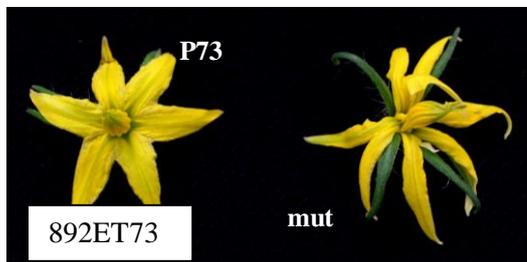


Figura 99. Flor mutante (mut) de la familia 892ET73 respecto a una de fenotipo silvestre (P73). La flor mutante desarrolla sépalos y pétalos filiformes.

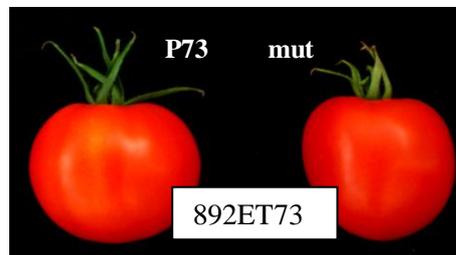


Figura 100. Fruto mutante (mut) de la familia 892ET73, de forma más ovalada que la de un fruto normal del cv. P73.

Familia 294ETMM

Los mutantes de esta familia (campaña primavera-verano 2009), desarrollaron un hábito de crecimiento pequeño y compacto, de aspecto acogollado (Fig. 101). El raquis de las hojas tuvo un desarrollo ondulado y retorcido (Fig. 102) al igual que sus folíolos, los cuales eran pequeños, arrugados y ondulados (Fig. 103) En cuanto al desarrollo reproductivo, las flores mostraron un fenotipo normal, sin embargo algunos de sus frutos presentaron ligeras malformaciones siendo de calibre menor que el de un fruto Moneymaker.



Figura 101. Fenotipo de una planta mutante (mut) detectada en la familia 294ETMM, en relación al fenotipo normal del cv. Moneymaker.

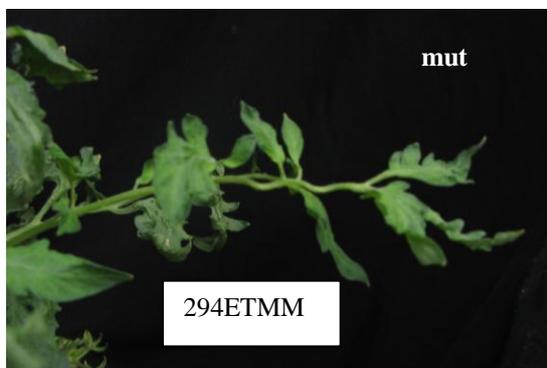


Figura 102. Hoja de la planta mutante de la familia 294ETMM con raquis y folíolos retorcidos.



Figura 103. Hoja mutante de la familia 294ETMM, menos desarrollada que la de fenotipo normal (cv. MM).

Familia 512ETMM

Los dos presuntos mutantes presentes en esta familia (campaña primavera-verano 2009) fueron de tamaño más pequeño que el cultivar Moneymaker. Además presentó clorosis en todos sus órganos (Fig. 104) a saber, hojas color verde claro y flores amarillo pálido (Fig. 105).

Además, las inflorescencias de las plantas fueron de menor tamaño que las de fenotipo normal (Fig. 106).

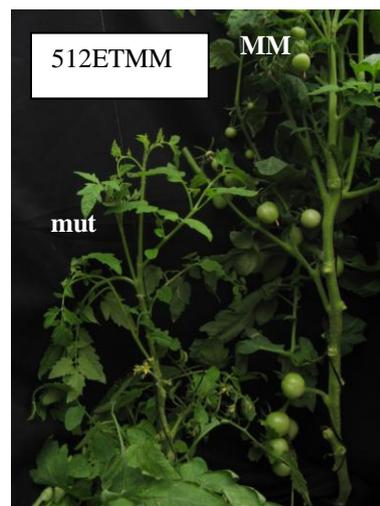


Figura 104. Planta mutante (mut), de menor porte que una de fenotipo normal (MM) de la familia 512ETMM.



Figura 105. Flor mutante (mut), de fenotipo clorótico, respecto a una normal (MM), de la familia 512 ETMM.



Figura 106. Inflorescencia mutante (mut) 512ETMM, más pequeña que una normal (MM).

Familia 513ETMM

Las plantas mutantes de esta familia, también sembradas durante la campaña primavera-verano 2009, fueron plantas albinas (no producen clorofila) en su totalidad. Las hojas eran de menor tamaño (longitud y calibre de los folíolos) y el tallo de menor grosor respecto a una planta de fenotipo normal. Además, las plantas fueron enanas y de porte débil. Los presuntos individuos mutantes no llegaron a desarrollar flores ni frutos.

Un número significativo de mutantes muestran alteraciones que afectan a caracteres vegetativos y reproductivos. En estos casos, los genes candidatos afectados por la mutación podrían ser los implicados en los patrones de desarrollo regulados por factores hormonales. Auxinas, giberelinas, citoquininas, brasinosteroides y otras

hormonas han demostrado tener un papel clave en el desarrollo vegetal, pudiendo actuar a distintos niveles de este. Es por ello que resulta complicado proponer una hipótesis más o menos plausible acerca de los genes responsables de los fenotipos descritos. No obstante, la variabilidad observada prueba la eficiencia del programa de mutagénesis llevado a cabo, pudiendo incluso en algunos casos haber proporcionado genotipos de aplicación directa en programas de mejora genética de tomate.

3. Análisis genético de los caracteres fenotípicos observados en las familias TG2

El análisis genético de los fenotipos identificados como posibles mutantes alterados en los caracteres objeto de estudio se ha realizado mediante ajuste de las proporciones fenotípicas observadas a las esperadas, asumiendo como hipótesis, la naturaleza monogénica de la mutación. Por consiguiente, la proporción fenotípica esperada en las familias TG2 seleccionadas para cada una de las alternativas del carácter considerado sería $\frac{3}{4}$ fenotipo normal : $\frac{1}{4}$ fenotipo mutante para una mutación recesiva (Fig.107), o bien $\frac{1}{4}$ fenotipo normal : $\frac{3}{4}$ fenotipo mutante, para una mutación de efecto dominante (Fig. 108). En el caso de la aparición de un fenotipo intermedio, o un modo de herencia codominante, la segregación esperada en las familias TG2 seleccionadas sería $\frac{1}{4}$ fenotipo normal : $\frac{1}{2}$ fenotipo intermedio : $\frac{1}{4}$ fenotipo mutante (Fig. 109).

Así pues, las proporciones observadas en las familias TG2 seleccionadas se compararon, mediante el test Chi-cuadrado (χ^2), con las esperadas según la hipótesis descrita en cada caso. El nivel de significación del test Chi-cuadrado se estableció en el 5%, y el número de grados de libertad fue de 1 (n° de clases fenotípicas – 1). Con estas premisas, el valor teórico ($\chi^2_{teo} = 3,84$) fue comparado con el valor experimental obtenido (χ^2_{exp}) en cada caso. Para la hipótesis de herencia monogénica codominante o herencia intermedia, el valor teórico, con un nivel de significación del 5%, y número de grados de libertad 2 es 5,99 que fue el comparado con el valor experimental del test Chi-cuadrado. Siempre que éste último fuera menor al valor χ^2 teórico esperado, se aceptó la hipótesis acerca del patrón de herencia del fenotipo alterado propuesto en cada caso.

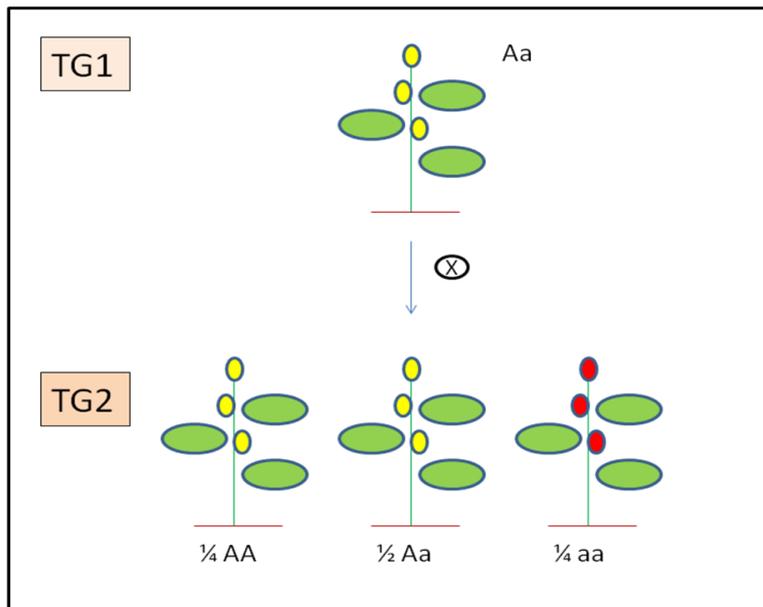


Figura 107. Segregación fenotípica esperada de un fenotipo alterado (mutante) que se hereda de forma monogénica y dominante (amarillos) La progenie TG1 mostrará fenotipo mutante y tras su autofecundación, su descendencia (TG2) mostrará una proporción de $\frac{3}{4}$ plantas con el fenotipo amarillo y $\frac{1}{4}$ plantas con el fenotipo rojo.

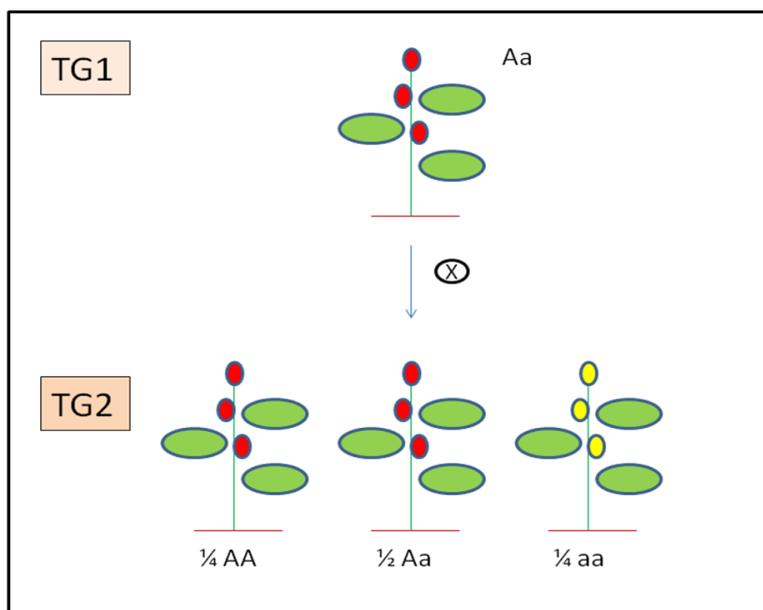


Figura 108. Segregación fenotípica esperada de un carácter mutante que se hereda de forma monogénica y recesiva. El alelo mutante (alelo **a**) que produce fenotipo amarillo en vez de rojo (alelo **A**). La progenie TG1 mostrará fenotipo normal (rojo) y tras su autofecundación, su descendencia (TG2) mostrará una proporción de $\frac{3}{4}$ de plantas con el carácter rojo y $\frac{1}{4}$ de plantas con el carácter amarillo.

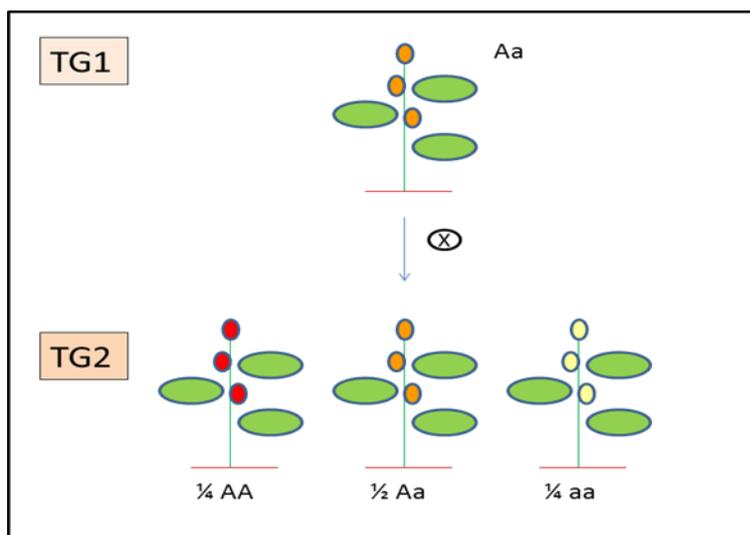


Figura 109. Segregación fenotípica esperada de un carácter mutante que se hereda de forma monogénica codominante o intermedia. El alelo mutante (alelo **a**) produce fenotipo blanco en vez de rojo. Tras la autofecundación de la progenie TG1, su descendencia (TG2) mostrará una proporción de $\frac{1}{4}$ plantas con el carácter rojo, $\frac{1}{2}$ plantas de fenotipo intermedio naranja y $\frac{1}{4}$ plantas con el carácter blanco.

El test Chi-cuadrado solamente se ha realizado en aquellas familias cuyo tamaño fuese superior o igual a 5 plantas, si bien este tipo de análisis estadístico deberá ser corroborado utilizando tamaños de progenie mayores, así como con análisis de descendencia en familias TG3 (ver apartado 6). A continuación, se exponen los resultados obtenidos en el análisis genético de las familias TG2 antes descritas y separadas según el ciclo de cultivo o campaña en la que se identificaron. En la tabla 2, se recogen las segregaciones de las familias TG2 de la campaña otoño-invierno 2008-2009 junto con sus resultados para el test Chi-cuadrado.

Cabe señalar que la gran mayoría de los fenotipos mutantes observados mostraron un patrón de herencia monogénica y recesiva, tal y como cabría esperar de los efectos producidos por el etil-metasulfonato en distintas especies de plantas. Se ha detectado una familia, de código 281ET73, en la que el fenotipo mutante sugiere un patrón de herencia más complejo. Cabe la posibilidad en este caso, de que el fenotipo mutante observado se deba a la interacción de varios genes, hipótesis que requeriría un análisis genético más detallado.

Tabla 2. Segregación fenotípica observada y esperada en las distintas familias TG2 seleccionadas en la campaña otoño-invierno 2008-2009.

Familia TG2	Nº de plantas	Segregación observada		Segregación esperada		χ^2_{exp}	P ⁽⁴⁾
		Normal	Mutante	Normal	Mutante		
12ET73	12	10	2	9,00	3,00	0,44 ⁽¹⁾	0,505
62ET73	9	7	2	6,75	2,25	0,04 ⁽¹⁾	0,847
108ET73	11	9	2	8,25	2,75	0,27 ⁽¹⁾	0,602
150ET73	12	7	5	9,00	3,00	1,78 ⁽¹⁾	0,182
149ET73	8	7	1	6,00	2,00	0,67 ⁽¹⁾	0,414
158ET73	<i>Mut-1</i>	11	1	8,25	2,75	1,48 ⁽¹⁾	0,223
	<i>Mut-2</i>	11	2	8,25	2,75	0,27 ⁽¹⁾	0,602
172ET73	<i>Mut-1</i>	9	2	6,75	2,25	0,04 ⁽¹⁾	0,847
	<i>Mut-2</i>	9	2	6,75	2,25	0,04 ⁽¹⁾	0,847
236ET73	5	0	5	1,25	3,75	1,67 ⁽²⁾	0,197
247ET73	9	4	4* 1	2,25	4,50* 2,25	2,11 ⁽³⁾	0,348
248ET72	12	9	3	9,00	3,00	0,00 ⁽¹⁾	1,00
264ET73	5	4	1	3,75	1,25	0,07 ⁽¹⁾	0,796
277ET73	8	6	2	6,00	2,00	0,00 ⁽¹⁾	1,000
281ET73	12	8	2* 2	3,00	6,00* 3,00	11,33 ⁽³⁾	0,004
420ET73	8	7	1	6,00	2,00	0,67 ⁽¹⁾	0,414
460ET73	12	10	2	9,00	3,00	0,44 ⁽¹⁾	0,505
502ET73	11	10	1	8,25	2,75	1,48 ⁽¹⁾	0,223
526ET73	12	6	6	9,00	3,00	4,00 ⁽¹⁾	0,046
651ET73	5	3	2	3,75	1,25	0,60 ⁽¹⁾	0,439
686ET73	8	5	3	6,00	2,00	0,67 ⁽¹⁾	0,414
797ET73	9	8	1	6,75	2,25	0,93 ⁽¹⁾	0,336
809ET73	11	10	1	8,25	2,75	1,48 ⁽¹⁾	0,223
818ET73	12	9	3	9,00	3,00	0,00 ⁽¹⁾	1,000
823ET73	13	10	3	9,75	3,25	0,03 ⁽¹⁾	0,873
839ET73	12	11	1	9,00	3,00	1,78 ⁽¹⁾	0,182
861ET73	10	9	1	7,50	2,50	1,20 ⁽¹⁾	0,273

*Fenotipo intermedio

(1) El valor teórico del test Chi-cuadrado es 3,84 calculado bajo la hipótesis de un modelo de herencia monogénico de fenotipo mutante recesivo (3:1).

(2) El valor teórico del test Chi-cuadrado es 3,84 calculado bajo la hipótesis de un modelo de herencia monogénico de fenotipo mutante dominante (1:3).

(3) El valor teórico del test Chi-cuadrado es de 5,99 calculado bajo la hipótesis de un modelo de herencia intermedia (1:2:1)

(4) Si $P > 0,05$ se acepta la hipótesis, si por el contrario $P < 0,05$ rechazamos la hipótesis

En la campaña de primavera-verano 2009, la segregación fenotípica en las familias seleccionadas junto con los resultados para el test Chi-cuadrado queda recogida en la tabla 3.

Tabla 3. Segregación fenotípica observada en las distintas familias TG2 seleccionadas en la campaña primavera-verano 2009.

FAMILIA TG2	Nº de plantas	Segregación observada		Segregación esperada		χ^2_{exp}	P ⁽³⁾
		Normal	Mutante	Normal	Mutante		
183ET73	12	11	1	9,00	3,00	1,78⁽¹⁾	0,182
206ET73	12	9	3	9,00	3,00	0,00⁽¹⁾	1,000
256ET73	12	11	1	9,00	3,00	1,78⁽¹⁾	0,182
259ET73	12	11	1	9,00	3,00	1,78⁽¹⁾	0,182
260ET73	<i>mut-1</i>	12	11	9,00	3,00	1,78⁽¹⁾	0,182
	<i>mut-2</i>	12	11	9,00	3,00	1,78⁽¹⁾	0,182
266ET73	12	10	2	9,00	3,00	0,44⁽¹⁾	0,505
272ET73	7	6	1	5,25	1,75	0,43⁽¹⁾	0,513
327ET73	12	5	7	3,00	9,00	1,78⁽²⁾	0,182
386ET73	8	7	1	6,00	2,00	0,67⁽¹⁾	0,414
399ET73	12	7	5	9,00	3,00	1,78⁽¹⁾	0,182
403ET73	12	9	3	9,00	3,00	0,00⁽¹⁾	1,000
434ET73	9	8	1	6,75	2,25	0,93⁽¹⁾	0,336
522ET73	12	10	2	9,00	3,00	0,44⁽¹⁾	0,505
536ET73	8	5	3	6,00	2,00	0,67⁽¹⁾	0,414
557ET73	12	3	9	3,00	9,00	0,00⁽²⁾	1,000
561ET73	12	9	3	9,00	3,00	0,00⁽¹⁾	1,000
623ET73	<i>mut-1</i>	12	11	9,00	3,00	1,78⁽¹⁾	0,182
	<i>mut-2</i>	12	10	9,00	3,00	0,44⁽¹⁾	0,505
700ET73	13	10	3	9,75	3,25	0,03⁽¹⁾	0,873
725ET73	12	10	2	9,00	3,00	0,44⁽¹⁾	0,505
892ET73	12	11	1	9,00	3,00	1,78⁽¹⁾	0,182
901ET73	12	6	6	9,00	3,00	4,00⁽¹⁾	0,046
904ET73	12	11	1	9,00	3,00	1,78⁽¹⁾	0,182
918ET73	7	3	4	1,75	5,25	1,19⁽²⁾	0,275
927ET73	12	11	1	9,00	3,00	1,78⁽¹⁾	0,182

Tabla 3 (continuación)

Familia TG2	Nº de plantas	Segregación observada		Segregación esperada		χ^2_{exp}	P ⁽³⁾
		Normal	Mutante	Normal	Mutante		
929ET73	12	11	1	9,00	3,00	1,78⁽¹⁾	0,182
945ET73	12	10	2	9,00	3,00	0,44⁽¹⁾	0,505
951ET73	12	10	2	9,00	3,00	0,44⁽¹⁾	0,505
125ETMM	12	11	1	9,00	3,00	1,78⁽¹⁾	0,182
294ETMM	12	8	4	9,00	3,00	0,44⁽¹⁾	0,505
348ETMM	12	10	2	9,00	3,00	0,44⁽¹⁾	0,505
504ETMM	12	11	1	9,00	3,00	1,78⁽¹⁾	0,182
509ETMM	12	9	3	9,00	3,00	0,00⁽¹⁾	1,000
512ETMM	9	7	2	6,75	2,25	0,04⁽¹⁾	0,847
513ETMM	11	9	2	8,25	2,75	0,27⁽¹⁾	0,602

(1) El valor teórico del test Chi-cuadrado es 3,84 calculado bajo la hipótesis de un modelo de herencia monogénico de fenotipo mutante recesivo (3:1).

(2) El valor teórico del test Chi-cuadrado es 3,84 calculado bajo la hipótesis de un modelo de herencia monogénico de fenotipo mutante dominante (1:3).

(3) P>0,05 se acepta la hipótesis, si por el contrario P<0,05 rechazamos la hipótesis

Al igual que en la campaña 2008-2009, la mayoría de los fenotipos mutantes identificados en esta campaña muestran un patrón de herencia monogénico y recesivo, si bien se han detectado 3 familias en las que la mutación tiene efectos dominantes. Por otra parte, la segregación fenotípica observada en las familias 526ET73, 901ET73 y 281ET73 no se ajusta a un patrón de herencia monogénico, por lo que requerirán de un análisis genético más detallado ya que podría tratarse de un fenotipo causado por mutaciones en diferentes loci de una mutación en la que intervenga más de un gen.

4. Análisis de progenies TG3 en los mutantes seleccionados

Para corroborar la naturaleza genética de las alteraciones fenotípicas observadas en las familias TG2, durante la campaña otoño-invierno 2008-2009 se llevó a cabo un test de progenie en familias TG3 en el que se incluyeron aquellos fenotipos mutantes que se consideraron de mayor interés científico y agronómico. En concreto, se eligieron las familias TG2 indicadas a continuación (tabla 4):

Tabla 4. Familias TG2 seleccionadas para el análisis de progenies TG3

Familias TG2 campaña otoño-invierno 2008-2009				
62ET73	158ET73	248ET73	460ET73	686ET73
108ET73	236ET73	264ET73	502ET73	809ET73
149ET73	247ET73	281ET73	651ET73	861ET73

Estas familias TG2 en las que se hallaron posibles mutaciones de interés, junto con sus respectivas descendencias TG3, se sembraron y germinaron en semillero bajo condiciones controladas, para después ser trasplantadas al invernadero de la finca UAL-ANECOOP.

Bajo la hipótesis de un modelo de herencia monogénica recesiva, toda la progenie de las plantas TG2 de fenotipo mutante deberían mostrar este mismo fenotipo (Fig. 110). El problema se presenta en los fenotipos partenocárpico, que no han dejado descendencia. En tal caso, para comprobar el modo de herencia del carácter alterado se sembraron los descendientes TG3 de plantas hermanas TG2 de fenotipo normal, asumiendo una probabilidad de 1/3 de plantas homocigóticas normales (genotipo AA), y 2/3 de plantas heterocigóticas portadoras del alelo mutante (genotipo Aa). Por tanto, toda la progenie TG3 mostraría un fenotipo normal en caso de que la planta TG2 seleccionada fuese homocigótica AA, mientras que la segregación fenotípica observada en la progenie TG3 sería $\frac{3}{4}$ fenotipo normal : $\frac{1}{4}$ fenotipo mutante (Fig. 111) si la planta TG2 seleccionada era heterocigótica para el alelo mutante (Aa).

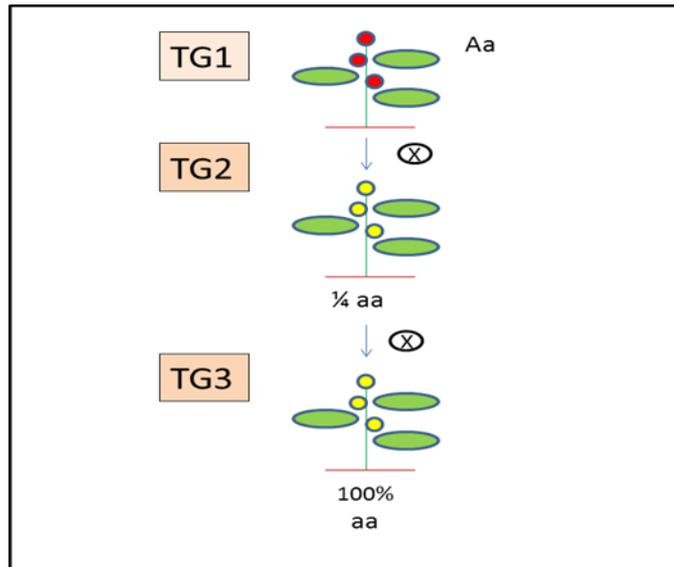


Figura 110. Herencia de un fenotipo mutante de herencia monogénica recesiva (aa). Mientras que la proporción esperada de plantas con fenotipo mutante en la progenie TG2 es de $\frac{1}{4}$; al autofecundarse, toda su descendencia TG3 deberá exhibir fenotipo mutante.

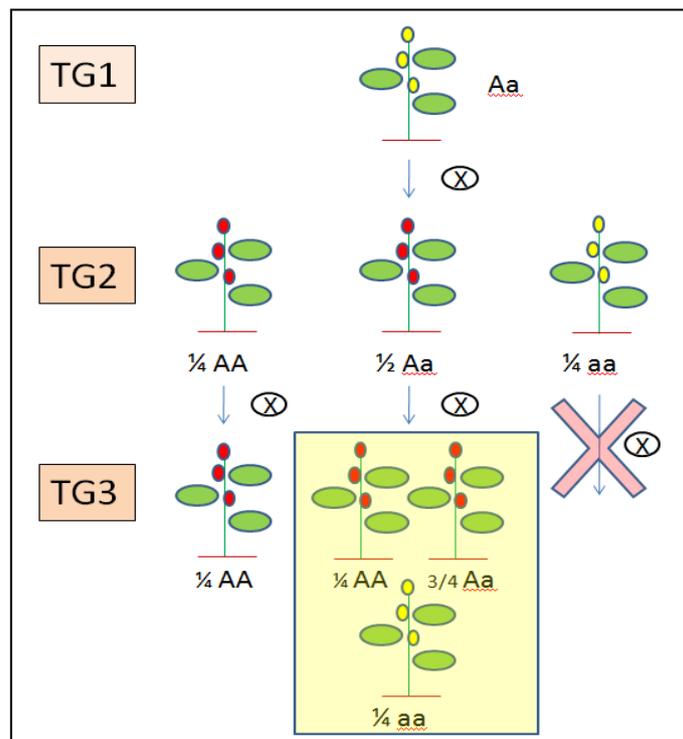


Figura 111. Herencia de un mutante de herencia monogénica recesiva (aa) que no deja descendencia. En caso de que el fenotipo mutante no pudiera dar descendencia (p.e: frutos partenocárpicos), hemos obtenido descendientes de plantas hermanas TG2 de fenotipo normal, los cuales al autofecundarse darían lugar a una proporción fenotípica totalmente (100%) si fueran homocigóticos, o bien a una progenie TG3 segregante $\frac{3}{4}$ normal : $\frac{1}{4}$ mutante si fueran heterocigóticos.

Seguidamente se describen los resultados obtenidos tras el análisis de progenies TG3 seleccionadas.

Familia 62ET73

El fenotipo mutante que exhibió esta familia se caracterizó por desarrollar su base engrosada los tricomas del haz de la hoja. En cuanto a la flor, a lo largo del cono estaminal aparecieron engrosamientos blanquecinos. Por último, la epidermis de los frutos estaba escriturada, éstos presentaron muy pocas semillas las cuales resultaron ser inviábiles.

La segregación observada en las descendencias TG3 de los individuos plantados de esta familia (tabla 5) fue la siguiente:

Tabla 5. Segregación observada en la familia TG2 62ET73 y su respectiva descendencia

Familia o planta TG2	Fenotipo	Segregación TG2/TG3	$\chi^2(1)$	P ⁽²⁾
62ET73 (oto-inv 2008-09)	Segregante	7 : 2	0,04	0,8474
62ET73 (prim-ver 2009)	Segregante	10 : 2	0,44	0,5050
62ET73-4	Normal	23 : 0		
62ET73-5	Normal	11 : 0		

- (1) En todos los casos el valor teórico del test Chi-cuadrado es 3,84 calculado bajo la hipótesis de un modelo de herencia monogénico de fenotipo mutante recesivo (3:1).
- (2) P>0,05 se acepta la hipótesis, si por el contrario P<0,05 rechazamos la hipótesis

Tal y como se observa en la tabla 5, el test Chi-cuadrado sugiere que el fenotipo mutante se hereda como un carácter monogénico recesivo tanto en la progenie TG2 sembrada en la campaña otoño-invierno 2008-2009 ($\chi^2_{exp} = 0,04 < \chi^2_{teo} = 3,84$) como durante la campaña primavera-verano 2009 ($\chi^2_{exp} = 0,44 < \chi^2_{teo} = 3,84$). Ninguno de los individuos de fenotipo mutante produjo semillas viables y, por lo tanto no se obtuvo descendencia TG3.

Las plantas TG2 62ET73-4 y 62ET73-5 mostraron un fenotipo normal, el mismo que el de toda su descendencia TG3 (Fig. 112), por lo tanto debía tratarse de plantas TG2 homocigóticas para el alelo silvestre.



Figura 112. Comparación de hojas y frutos p73 (P73) y de la descendencia TG3 de los individuos con fenotipo normal 62ET73-4 y 62ET73-5. Puede observarse como los descendientes TG3 no muestran las alteraciones de los tricomas en las hojas, ni el escriturado y producción de semillas inviables de los frutos.

Sin embargo, la estabilidad de la mutación queda demostrada al repetirse el mismo fenotipo mutante durante los dos ciclos de cultivo seguidos (otoño-invierno 2008-2009 y primavera-verano 2009) en los individuos TG2 caracterizados (Fig. 113 y 114).

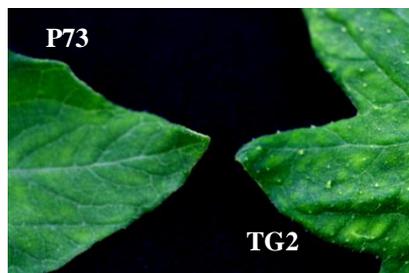


Figura 113. Detalle de las hojas de una planta normal del cv. P73 y una planta TG2 de fenotipo mutante. Puede observarse la presencia de tricomas con la base engrosada distribuidos por todo el haz de la hoja mutante

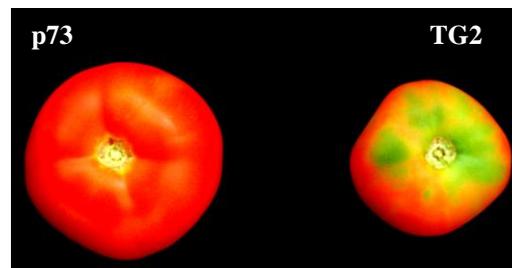


Figura 114. Detalle de un fruto normal del cv. P73 y uno producido por una planta TG2 con fenotipo mutante, en el que se observa que este no llega a completar su maduración y muestra textura escriturada sobre su epidermis.

Familia 108ET73

Las flores de las plantas TG2 de fenotipo mutante observadas en la campaña otoño-invierno 2008-2009 desarrollaron un mayor número de carpelos, mal fusionados, a partir de los cuales se formaron frutos pequeños y partenocárpicos. Sin embargo, las plantas TG2 hermanas que fueron caracterizadas durante la campaña de primavera-verano 2009 no mostraron este fenotipo, como tampoco lo hicieron los descendientes TG3 de las plantas 108ET73-9 y 108ET73-10 (Figura 115).



Figura 115. Detalle del corte transversal de un fruto p73 (p73) comparado con uno TG2 y dos TG3. Como se observa ni los individuos TG2 ni sus descendientes dieron lugar a frutos partenocárpicos.

La segregación de los individuos plantados de esta familia es la siguiente:

Tabla 6. Segregación observada en la familia TG2 108ET73 y su respectiva descendencia

Familia o planta TG2	Fenotipo	Segregación TG2 / TG3	$\chi^2(1)$	P ⁽²⁾
108ET73 (oto-inv 2008-09)	Segregante	9 : 2	0,27	0,6015
108ET73 (prim-ver 2009)	Normal	11 : 0		
108ET73-9	Normal	11 : 0		
108ET73-10	Normal	11 : 0		

- (1) En todos los casos el valor teórico del test Chi-cuadrado es 3,84 (1 grado de libertad, y nivel de significación 0,05) calculado bajo la hipótesis de un modelo de herencia monogénico y recesivo (3:1).
- (2) P>0,05 se acepta la hipótesis, si por el contrario P<0,05 rechazamos la hipótesis

En su conjunto, estos resultados sugieren que el fenotipo anómalo puede deberse a problemas de esterilidad del polen causado por bajas temperaturas.

Familia 149ET73

El fenotipo mutante observado en esta familia TG2 presentó el tallo fino, los foliolos pequeños y un desarrollo vegetativo y reproductivo ralentizado.

La segregación fenotípica observada en las progenies TG2 y TG3 se muestra en la siguiente tabla (tabla 7). En ella se indica que:

Tabla 7. Segregación observada en la familia TG2 149ET73 y su respectiva descendencia

Familia o planta TG2	Fenotipo	Segregación TG2/TG3	$\chi^2(1)$	P ⁽²⁾
149ET73 (oto-inv 2008-09)	Segregante	7 : 1	0,67	0,4142
149ET73-4	Mutante	30 : 0		
149ET73-6	Normal	3 : 0		
149ET73-7	Normal	5 : 0		

(1) En todos los casos el valor teórico del test Chi-cuadrado es 3,84 calculado bajo la hipótesis de un modelo de herencia monogénico de fenotipo mutante recesivo (3:1).

(2) P>0,05 se acepta la hipótesis, si por el contrario P<0,05 rechazamos la hipótesis

Los descendientes TG3 de la planta 149ET73-4, que mostró fenotipo alterado, no exhiben retraso en la maduración por tanto, esta presunta mutación observada en la campaña anterior no parece responder a un patrón de herencia claro, pudiendo deberse a causas ambientales.

Familia 158ET73

Esta familia exhibió dos fenotipos anómalos, uno caracterizado por el menor porte y senescencia temprana de las plantas (fenotipo *mut-1*) y otro por el desarrollo de plantas de altura media, tallo fino y entrenudos largos, y en las que los sépalos de las flores no se abrieron y sus ovarios estaban necrosados por lo que nunca desarrollaron frutos (fenotipo *mut-2*).

En la generación TG3 tan sólo se hallaron plantas con fenotipo mutante *mut-1*. La segregación fenotípica de los individuos plantados de esta familia fue la siguiente:

Tabla 8. Segregación observada en la familia TG2 158ET73 y su respectiva descendencia

Familia o planta TG2	Fenotipo	Segregación TG2/TG3	$\chi^{2(1)}$	P ⁽²⁾
158ET73 (oto-inv 2008-09)	Segregante	8 : 1 : 2	1,48 <i>mut-1</i>	0,2230
158ET73-8	Normal	13 : 3 : 0		

- (1) En todos los casos el valor teórico del test Chi-cuadrado es 3,84 calculado bajo la hipótesis de un modelo de herencia monogénico de fenotipo mutante recesivo (3:1).
 (2) P>0,05 se acepta la hipótesis, si por el contrario P<0,05 rechazamos la hipótesis

Ya que los presuntos mutantes TG2 no desarrollaron frutos, se estudió la presencia o no de la mutación en los descendientes TG3 de las plantas hermanas con fenotipo normal. Así, en la progenie TG3 obtenida de la autofecundación de la planta 158ET73-8 queda demostrada la presencia de la mutación para tres de sus descendientes (Fig. 116) que, junto con la prueba Chi-cuadrado, confirma la hipótesis de un patrón de herencia monogénica recesiva ($\chi^2_{\text{exp}} = 0,93 < \chi^2_{\text{teo}} = 3,84$).

Familia 236ET73

El fenotipo mutante de esta familia exhibió frutos los cuales experimentaron un desarrollo anómalo provocado por la formación de “nuevos carpelos” que surgen del interior del fruto principal. Esta alteración impidió un adecuado cierre pistilar.

La segregación fenotípica de los individuos TG2 y TG3 de esta familia queda reflejada a continuación:

Tabla 9. Segregación observada en la familia TG2 236ET73 y su respectiva descendencia

Familia o planta TG2	Fenotipo	Segregación TG2/TG3	$\chi^{2(1)}$	P ⁽²⁾
236ET73 (oto-inv 2008-09)	Mutante	0 : 5	1.67	0,1967
236ET73 (prim-ver 2009)	Segregante	3 : 1	5,33	0,0209
236ET73-3	Mutante	0 : 2		
236ET73-8	Mutante	3 : 3		

- (1) En todos los casos el valor teórico del test Chi-cuadrado es 3,84 calculado bajo la hipótesis de un modelo de herencia monogénico de fenotipo mutante dominante (1:3).
 (2) P>0,05 se acepta la hipótesis, si por el contrario P<0,05 rechazamos la hipótesis

Tal y como se observa en la tabla 9, las plantas TG2 sembradas durante la campaña otoño-invierno 2008-2009 como sus descendientes TG3 muestran el mismo fenotipo mutante (Fig. 117).



Figura 117. Detalle de un fruto normal cv. P73 comparado con frutos TG2 y TG3 de fenotipo mutante. Puede comprobarse que ambas generaciones exhiben la misma mutación consistente en la formación de “nuevos” carpelos en el interior del fruto provocando un mal cierre pistilar.

Dado que durante la campaña primavera-verano 2009, al menos una de las plantas TG2 sembradas de nuevo exhibió fenotipo alterado, queda demostrada la estabilidad de la mutación. Sin embargo, se observa que patrón de herencia monogénico dominante no es seguido por la TG2 durante esta campaña ya que la segregación no se ajusta a un patrón de herencia monogénico recesivo ($\chi^2_{\text{exp}} = 4,47 > \chi^2_{\text{teo}} = 3,84$). Por tanto, sería necesario volver a sembrar un mayor número de individuos TG2 para poder llegar a definir el modo de herencia del carácter mutante.

Familia 247ET73

Las plantas de fenotipo alterado presentes en esta familia eran de estatura enana, mostrando escasa distancia los entrenudos lo cual confería a la planta un aspecto compacto. Debe señalarse que, durante la campaña otoño-invierno 2008-2009, esta familia exhibió plantas de mediana estatura pudiendo ser este carácter fruto de un patrón de herencia intermedia.

Dado que los individuos alterados no desarrollaron ni frutos y, por tanto resultó imposible obtener descendencia de ellas, también fue sembrada la progenie de las plantas TG2 247ET73-1, 247ET73-3 y 247ET73-5 de fenotipo normal hermanas de los individuos alterados ya que si alguna de ellas resultara ser heterocigótica para el carácter alterado desarrollaría descendientes con fenotipo mutante.

La segregación fenotípica observada en las progenies TG2 y TG3 se muestra en la tabla 10 .

Tabla 10. Segregación observada en la familia TG2 247ET73 y su respectiva descendencia.

Familia o planta TG2	Fenotipo	Segregación TG2/TG3	χ^2	P ⁽³⁾
247ET73 (oto-inv 2008-09)	Segregante	9 : 4 : 1	2,11 ⁽¹⁾	0,3480
247ET73 (prim-ver 2009)	Segregante	5 : 7	1,78 ⁽²⁾	0,1824
247ET73-1	Normal	17: 2		
247ET73-3	Normal	12 : 7		
247ET73-5	Normal	16 : 3		

(1) Valor teórico del test Chi-cuadrado de 5,99 calculado bajo la hipótesis de un modelo de herencia intermedia (1:2:1)

(2) En todos los casos el valor teórico del test Chi-cuadrado es 3,84 calculado bajo la hipótesis de un modelo de herencia monogénico dominante (1:3).

(3) P>0,05 se acepta la hipótesis, si por el contrario P<0,05 rechazamos la hipótesis

Así pues tal y como observamos en la tabla 10, queda demostrada la presencia de la mutación en los descendientes TG3 procedentes de las plantas de fenotipo normal, lo cual demuestra que todas ellas fueron heterocigóticas para ese carácter. Sin embargo, no se observó fenotipo intermedio durante la campaña primavera-verano 2009, de modo que se repitió el test Chi-cuadrado bajo una nueva hipótesis de patrón de herencia monogénica recesiva donde los resultados no terminan de ser concluyentes ya que, aunque la progenie TG3 se ajusta al patrón de herencia propuesto, los nuevos individuos TG2 sembrados en la actual campaña no confirmaron esta hipótesis. Si bien, sería necesario volver a realizar una siembra de esta familia para aclarar su patrón de herencia.

Por tanto, podemos concluir que, al repetirse la mutación en ambas campañas, queda demostrada su estabilidad y que el fenotipo intermedio, hallado durante la campaña anterior, pudo ser consecuencia de un mal riego o inadecuada nutrición y no de origen genético.

Familia 248ET73

El fenotipo mutante de esta familia exhibió flores cuyos estambres, semi-transformados en carpelos, no llegaron a fusionarse en el cono estaminal. Además, estos individuos produjeron frutos partenocárpicos donde, durante el desarrollo de los carpelos, éstos dejaron atrapados a los pétalos ya senescentes.

A causa de desarrollar frutos sin semillas, este mutante no tuvo descendencia, por ello, durante la campaña otoño-invierno 2008-2009 se realizaron cruces polinizando a los individuos presuntamente mutantes con el polen de plantas de fenotipo silvestre del cultivar P73. Sin embargo, se obtuvo muy poca descendencia de estos cruces (de 1 a 3 individuos TG3 por cruce) sin exhibir ninguno de ellos el fenotipo mutante.

Debido a ello, y para demostrar la existencia de una causa genética para esta mutación, se estudió la progenie TG3 de las plantas TG2 hermanas con fenotipo normal 248ET73-2 y 248ET73-9 para ver si alguna de ellas era heterocigótica para ese carácter y mostrar así algunos de sus descendientes con el mismo fenotipo alterado.

La segregación fenotípica de la progenie de esta familia queda reflejada en la siguiente tabla:

Tabla 11. Segregación observada en la familia TG2 248ET73 y su respectiva descendencia

Familia o planta TG2	Fenotipo	Segregación TG2/TG3	$\chi^2(1)$	P ⁽²⁾
248ET73 (oto-inv 2008-09)	Segregante	9 : 3	0,00	1
248ET73 (prim-ver 2009)	Segregante	10 : 6	1,33	0,2482
248ET73-2	Normal	10: 10		
248ET73-9	Normal	16 : 3		

(2) En todos los casos el valor teórico del test Chi-cuadrado es 3,84 calculado bajo la hipótesis de un modelo de herencia monogénico de fenotipo mutante recesivo (3:1).

(3) P>0,05 se acepta la hipótesis, si por el contrario P<0,05 rechazamos la hipótesis

Si bien se observa que el mismo fenotipo alterado está presente en los individuos TG2 en ambas campañas, lo cual demuestra la estabilidad de la mutación. Cabe mencionar que las tres plantas TG2 de fenotipo normal resultaron ser heterocigóticas para el carácter alterado (Fig. 118 y 119) y que éste, en un principio, podría ajustarse a un patrón de herencia monogénico recesivo de la progenie TG2.

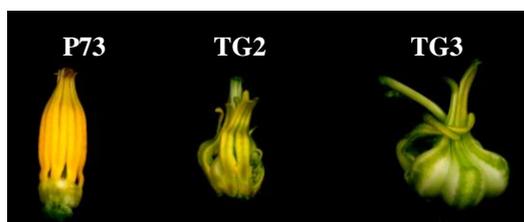


Figura 118. Detalle del cono estaminal de una flor de fenotipo normal cultivar P73 comparado con los TG2 y TG3 de fenotipo mutante. Los estambres, semi-transformados en carpelos, no forman el cono estaminal.

Figura 119. Detalle de un fruto de fenotipo normal cultivar P73 comparado con uno TG2 y TG3 de fenotipo mutante. Los pétalos senescentes quedan atrapados en los frutos partenocárpicos mostrando éstas malformaciones.

Familia 264ET73

Los presuntos mutantes de esta familia se caracterizaron por ser plantas de porte vigoroso cuyas hojas exhibieron foliolos de gran calibre en comparación con el cultivar P73. Si bien, los frutos obtenidos mostraban forma ovalada.

La segregación fenotípica tanto de la progenie TG2 como TG3 se detalla a continuación:

Tabla 12. Segregación observada en la familia TG2 264ET73 y su respectiva descendencia

Familia o planta TG2	Fenotipo	Segregación TG2/TG3	$\chi^2(1)$	P ⁽²⁾
264ET73 (oto-inv 2008-09)	Segregante	4 : 1	0,07	0,7963
264ET73-2	Mutante	1 : 8		
264ET73-3	Normal	9 : 0		
264ET73-5	Normal	11 : 0		

(1) En todos los casos el valor teórico del test Chi-cuadrado es 3,84 calculado bajo la hipótesis de un modelo de herencia monogénico de fenotipo mutante recesivo (3:1).

(2) P>0,05 se acepta la hipótesis, si por el contrario P<0,05 rechazamos la hipótesis

A la vista de los resultados que muestra la tabla 12, queda demostrada la naturaleza genética de la mutación ya que la progenie del mutante TG2 264ET73-2, exhibieron el mismo fenotipo alterado del parental (Fig. 120) a excepción de uno por tanto, a priori no puede aceptarse una hipótesis de herencia monogénica recesiva al no mostrar la totalidad de sus individuos fenotipo mutante. Para corroborar la naturaleza monogénica recesiva de este carácter sería necesario sembrar una población mayor de progenie del mutante TG2 para descartar posibles errores cometidos en la siembra de esta familia durante la campaña primavera-verano 2009.



Figura 120. Hojas y fruto de fenotipo normal cv. P73 con TG3 de fenotipo mutante el cual muestra mayor tamaño de hojas y forma ovalada del fruto.

Familia 281ET73

Los frutos desarrollados por las presuntas plantas mutantes de esta familia carecían de semillas (partenocarpia), sin embargo, esta familia exhibió un fenotipo intermedio en el cual algunos de sus frutos no llegaron al ser del todo partenocápicos ya que desarrollaron muy pocas semillas.

Ya que los presuntos mutantes no produjeron descendencia, estudiamos el fenotipo de la progenie de las plantas TG2 hermanas 281ET73-2, 281ET73-5 y 281ET73-10 de fenotipo normal P73 para demostrar la naturaleza genética de la mutación en el caso de que alguna de ellas fuera heterocigótica para ese carácter.

La tabla 13 resume la segregación fenotípica de esta familia:

Tabla 13. Segregación observada en la familia TG2 281ET73 y su respectiva descendencia

Familia o planta TG2	Fenotipo	Segregación TG2/TG3	$\chi^2(1)$	P ⁽²⁾
281ET73 (oto-inv 2008-09)	Segregante	8 : 2 : 2	11,33	0,0035
281ET73 (prim-ver 2009)	Normal	1 : 0 : 0		
281ET73-2	Normal	12 : 0 : 0		
281ET73-5	Normal	12 : 0 : 0		
281ET73-10	Normal	12 : 0 : 0		

(1) Valor teórico del test Chi-cuadrado de 5,99 calculado bajo la hipótesis de un modelo de herencia intermedia (1:2:1)

(2) $P > 0,05$ se acepta la hipótesis, si por el contrario $P < 0,05$ rechazamos la hipótesis

Ninguno de los descendientes TG3 de las plantas TG2 hermanas exhibió partenocarpia por tanto, estos resultados sugieren que el fenotipo anómalo puede deberse a problemas de esterilidad del polen causado por las bajas temperaturas que tuvieron lugar durante la campaña otoño-invierno 2008-2009 o que tal vez las plantas TG2 de fenotipo normal hermanas escogidas fueran todas ellas homocigóticas para ese carácter.

Familia 460ET73

Esta familia dio lugar a individuos mutantes cuyo fenotipo alterado consistió en estatura enana y aparición de senescencia temprana.

Los individuos TG2 seleccionados 460ET73-3 y 460ET73-7 mostraron fenotipo normal mientras que el individuo 460ET73-6 exhibió el presunto fenotipo mutante.

La segregación fenotípica de la progenie TG2 y TG3, plantada de esta familia es la siguiente:

Tabla 14. Segregación observada en la familia TG2 460ET73 y su respectiva descendencia

Familia o planta TG2	Fenotipo	Segregación TG2/TG3	$\chi^2(1)$	P ⁽²⁾
460ET73 (oto-inv 2008-09)	Segregante	10 : 2	0,44	0,5050
460ET73 (prim-ver 2009)	Segregante	8 : 2	0,13	0,7150
460ET73-3	Normal	8: 4		
460ET73-6	Mutante	1 : 0		
460ET73-7	Normal	12 : 0		

(1) En todos los casos el valor teórico del test Chi-cuadrado es 3,84 calculado bajo la hipótesis de un modelo de herencia monogénico de fenotipo mutante recesivo (3:1).

(2) P>0,05 se acepta la hipótesis, si por el contrario P<0,05 rechazamos la hipótesis

Tal y como se observa en la tabla 14, el único individuo TG3, progenie de la presunta planta de fenotipo mutante 460ET73-6 no llega a mostrar el mismo fenotipo que su parental. Si bien algunos de los descendientes de las otras plantas hermanas TG2 de fenotipo normal exhiben el fenotipo mutante objeto de estudio en esta familia (Fig. 121) lo cual demuestra que esta mutación no se debe a causas ambientales. Sin embargo, no podemos definir ningún patrón de herencia ya que disponemos de muy poco número de progenie para sacar conclusiones acertadas.

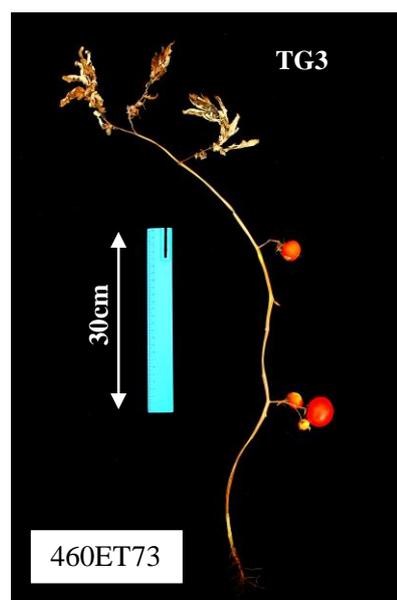


Figura 121. Detalle de una de las plantas TG3 de fenotipo mutante. Es pequeña y con senescencia temprana

Familia 502ET73

Los frutos producidos por las plantas TG2 de presunto fenotipo mutante carecían de semillas si bien también se caracterizaron por ausencia de mucílago en su interior.

Tal y como ha sucedido en otras familias, a consecuencia del fenotipo mutante no se obtiene descendencia de estas plantas, por tanto se estudió la progenie de la planta hermana TG2 502ET73-3 de fenotipo normal por si ésta resultara ser heterocigótica para el carácter anómalo.

La segregación fenotípica de esta familia se resume a continuación:

Tabla 15 Segregación observada en la familia TG2 502ET73 y su respectiva descendencia

Familia o planta TG2	Fenotipo	Segregación TG2/TG3	$\chi^2(1)$	P ⁽²⁾
502ET73 (oto-inv 2008-09)	Segregante	10 : 1	1,48	0,2230
502ET73 (prim-ver 2009)	Normal	9 : 0		
502ET73-3	Normal	12: 1		

(1) En todos los casos el valor teórico del test Chi-cuadrado es 3,84 calculado bajo la hipótesis de un modelo de herencia monogénica de fenotipo mutante recesivo (3:1).

(2) P>0,05 se acepta la hipótesis, si por el contrario P<0,05 rechazamos la hipótesis

Tal y como se observa en la tabla 15, tan solo un descendiente desarrolla el mismo fenotipo descrito en la campaña anterior (partenocarpia) (Fig. 122) por tanto, podemos afirmar la causa genética de la mutación en esta familia, a diferencia de las otras anteriormente descritas, la cual sigue aparentemente un patrón de herencia monogénico recesivo ($\chi^2_{exp} = 1,48 < \chi^2_{teo} = 3,84$). De todas formas, ya que no se ha detectado la mutación en la progenie TG2 sembrada de nuevo, sería conveniente repetir el ensayo para poder demostrar de una forma más firme la estabilidad de la mutación.



Figura 122. Corte transversal de un fruto de fenotipo normal cv.P73 y uno TG3 de fenotipo mutante partenocárpico,

Familia 651ET73

Los presuntos mutantes de esta familia se caracterizaron por presentar un ápice clorótico durante todo su desarrollo, flores cuyos pétalos mostraron una coloración blanquecina-anaranjada donde los estambres fueron de color naranja intenso. Posible consecuencia de ello fueron los frutos desarrollados de color naranja.

La segregación fenotípica para estas plantas queda reflejada en la tabla 16:

Tabla 16. Segregación observada en la familia TG2 651ET73 y su respectiva descendencia

Familia o planta TG2	Fenotipo	Segregación TG2/TG3	$\chi^2(1)$	P ⁽²⁾
651ET73 (oto-inv 2008-09)	Segregante	3 : 2	0,60	0,4386
651ET73 (prim-ver 2009)	Normal	1 : 0		
651ET73-1	Normal	14: 0		
651ET73-2	Normal	19 : 0		
651ET73-4	Mutante	0 : 30		

(1) En todos los casos el valor teórico del test Chi-cuadrado es 3,84 calculado bajo la hipótesis de un modelo de herencia monogénico de fenotipo mutante recesivo (3:1).

(2) P>0,05 se acepta la hipótesis, si por el contrario P<0,05 rechazamos la hipótesis

Si bien, ninguna de las plantas TG3 descendientes de las dos plantas hermanas 651ET73-1 y 651ET73-2 TG2 de fenotipo normal exhibió el fenotipo alterado, pudiendo no haber sido ninguna de ellas heterocigóticas para los caracteres alterados, la totalidad de la progenie del mutante TG2 651ET73-4 muestra el mismo fenotipo anómalo del parental (Fig. 123 y 124). Debido a ello, afirmar la naturaleza genética de la mutación la cual sigue un patrón de herencia monogénico dominante recesivo demostrado en el test Chi-cuadrado.



Figura 123. Detalle del ápice de una planta de fenotipo normal cv. P73 y una TG3 de fenotipo mutante donde se observa la clorosis que al igual que ahora, exhibió el mutante en la campaña anterior.



Figura 124. Detalle de una flor de fenotipo normal cv. P73 y una TG3 de fenotipo mutante. Vuelve a observarse la coloración blanquecina-anaranjada de los pétalos y el color naranja mandarinade los estambres

Familia 686ET73

El fenotipo mutante de esta familia TG2 se caracterizó por el desarrollo determinado de la planta y el desarrollo de flores con sépalos con rasgos foliares, pétalos de color amarillo-verdoso y estambres semi-fusionados y transformados en carpelos. Los frutos no se desarrollaron adecuadamente y carecían de semillas.

La segregación fenotípica de la progenie TG2 y TG3 de esta familia se expone en la siguiente tabla:

Tabla 17. Segregación observada en la familia TG2 686ET73 y su respectiva descendencia

Familia o planta TG2	Fenotipo	Segregación TG2/TG3	$\chi^2(1)$	P ⁽²⁾
686ET73 (oto-inv 2008-09)	Segregante	5 : 3	0,67	0,4142
686ET73 (prim-ver 2009)	Segregante	2 : 2	1,33	0,2482
686ET73-2	Normal	14: 4		
686ET73-8	Normal	15 : 2		

(1) En todos los casos el valor teórico del test Chi-cuadrado es 3,84 calculado bajo la hipótesis de un modelo de herencia monogénico de fenotipo mutante recesivo (3:1).

(2) P>0,05 se acepta la hipótesis, si por el contrario P<0,05 rechazamos la hipótesis

Tal y como ya sucedió en otras familias, debido a las características del mutante (estambres malformados) éste no dio lugar a una progenie. Como resultado, se procedió a la siembra de la progenie obtenida de las plantas TG2 de fenotipo normal que produjeron algunos individuos con fenotipo mutante muy similar al de la campaña anterior (Fig. 125).



Figura 125. Detalle de una flor p73 con unas TG2 y TG3 de fenotipo mutante las cuales muestran sépalos y pétalos semi-foliares y estambres semifusionados transformados en carpelos.

A la vista de los resultados podemos concluir que existe una estabilidad de la mutación al repetirse el mismo fenotipo anómalo tanto en la campaña otoño-invierno 2008-2009 como en la campaña primavera-verano 2009 el cual, a priori y tomando en consideración los resultado del test Chi-cuadrado, parece seguir un patrón de herencia monogénico recesivo.

Cabe destacar que durante el análisis del fenotipo de los individuos TG3 cuyo parental fue 686ET73-2, nos dimos cuenta de la existencia de una nueva alteración en las hojas de los presuntos mutantes. Éstas mostraron un nuevo fenotipo caracterizado por una forma acorazonada y borde no dentado de los folíolos. También se detectó un posible fenotipo intermedio en el cual las hojas se caracterizan por bordes menos lobulados que los del fenotipo normal P73 (Fig. 126). Estas alteraciones nos hace sospechar de un patrón de herencia de herencia intermedia para este carácter, por tanto le sometimos a una prueba Chi-cuadrado cuyo resultado fue el siguiente:

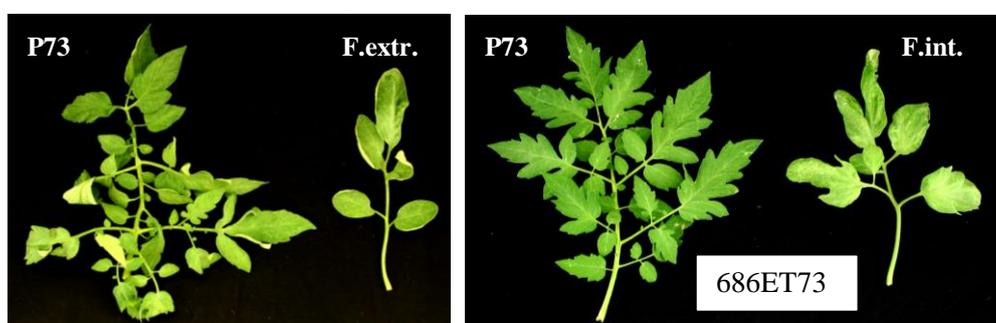


Figura 126. Comparación de una hoja de fenotipo normal cv. P73 con una TG3 de fenotipo mutante (F.extr) y una de fenotipo intermedio (F.int.) donde se aprecia la forma acorazonada de la hoja de fenotipo mutante mientras que la de fenotipo intermedio se encuentra menos lobulada.

Tabla 18. Test Chi-cuadrado de la progenie TG3 de la planta 686ET73-2 TG2

Planta TG2	N° plantas	Segregación (wt :int : mut)		χ^2_{exp} ⁽¹⁾
		Observada	Esperada	
686ET73-2	18	15 : 1 : 2	4,5 : 9 : 4,5	33,00

⁽¹⁾ El valor teórico del test Chi-cuadrado es 5,99 calculado bajo la hipótesis de un modelo de herencia monogénica de fenotipo mutante codominante (1:2:1).

Como resultado vemos que el patrón de herencia de este carácter no se ajusta a una herencia monogénica codominante ($\chi^2_{exp} = 33,00 > \chi^2_{teo} = 5,99$). Si bien esta anomalía no fue detectada en la campaña otoño-invierno 2008-2009 bien por pasar desapercibida o bien por deberse a factores ambientales y no de naturaleza genética, sería necesario el volver a plantar un mayor número de progenie TG2 y TG3 para corroborar la causa de esta alteración.

Familia 809ET73

Las flores de los presuntos mutantes de esta familia se caracterizaron por un gran tamaño, presencia en el ovario de un mayor número de carpelos mal fusionados, los cuales comienzan a crecer antes de la senescencia de la flor. En el interior del fruto se desarrollan indefinidamente “nuevos” carpelos que provocan un inadecuado cierre pistilar.

Resultado del fenotipo mutante presente en esta familia no fue posible obtener descendencia, por tanto se estudió la progenie de las plantas hermanas **809ET73-3** y **809ET73-5** TG2 de fenotipo normal

La segregación fenotípica de esta familia es mostrada en la siguiente tabla:

Tabla 19. Segregación observada en la familia TG2 809ET73 y su respectiva descendencia

Familia o planta TG2	Fenotipo	Segregación TG2/TG3	χ^2 ⁽¹⁾	P ⁽²⁾
809ET73 (oto-inv 2008-09)	Segregante	10 : 1	1,48	0,2230
809ET73 (prim-ver 2009)	Normal	18 : 0		
809ET73-3	Normal	14 : 0		
809ET73-5	Normal	12 : 0		

(1) En todos los casos el valor teórico del test Chi-cuadrado es 3,84 calculado bajo la hipótesis de un modelo de herencia monogénico de fenotipo mutante recesivo (3:1).

(2) $P > 0,05$ se acepta la hipótesis, si por el contrario $P < 0,05$ rechazamos la hipótesis

Ya que ninguno de los descendientes TG3 exhibió fenotipo mutante podemos concluir que, o bien las plantas TG2 no eran portadoras del alelo mutado en

heterocigosis, por tanto ninguna de ellas dio lugar a individuos homocigóticos para la mutación o, bien esta alteración fue probablemente resultado de las bajas temperaturas que sufrió la planta durante la campaña Otoño-Invierno 2008-2009.

Familia 861ET73

Las flores del presunto mutante tenían sus estambres malformados los cuales no pudieron formar el cono estaminal. En cuanto a sus frutos, debido al crecimiento indeterminado de “nuevos” carpelos en el interior del fruto, éste tiene un inadecuado cierre pistilar y no llega a formar semillas.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, causa de la inexistencia de progenie del mutante, se examinaron los descendientes de las plantas TG2 hermanas 861ET73-3 y 861ET73-6 de fenotipo normal para comprobar la estabilidad de la mutación siempre y cuando estas fueran heterocigóticas para el carácter alterado.

Los resultados de la segregación fenotípica se muestran a continuación:

Tabla 20. Segregación observada en la familia TG2 861ET73 y su respectiva descendencia

Familia o planta TG2	Fenotipo	segregación TG2/TG3	$\chi^2(1)$	P ⁽²⁾
861ET73 (oto-inv 2008-09)	Segregante	9 : 1	1,20	0,2733
861ET73 8prim-ver 2009)	Normal	8 : 0		
861ET73-3	Normal	16: 0		
861ET73-6	Normal	16 : 0		

- (1) En todos los casos el valor teórico del test Chi-cuadrado es 3,84 calculado bajo la hipótesis de un modelo de herencia monogénico de fenotipo mutante recesivo (3:1).
- (2) P>0,05 se acepta la hipótesis, si por el contrario P<0,05 rechazamos la hipótesis

A la vista de los resultados, y ya que ninguno de los individuos TG3 exhibió fenotipo mutante podemos sugerir que esta alteración estuviera probablemente producida por la infertilidad del polen causado por las bajas temperaturas que sufrió la planta durante la campaña anterior. Si bien no podemos descartar que esta ausencia de mutación pueda deberse a que las plantas hermanas escogidas resultaran no ser heterocigóticas para este carácter.

Para finalizar, y como resumen del análisis genético realizado, la tabla 21 recoge los resultados obtenidos de las pruebas de descendencia de las familias TG2

seleccionadas y las conclusiones acerca del modo de herencia del carácter objeto de estudio.

Tabla 21. Resumen del análisis de la herencia a todas las familias TG2 seleccionadas.

Familia T-DNA	Naturaleza de la alteración	Patrón de herencia
62ET73	Mutación	Monogénico recesivo
108ET73	No genética	-
149ET73	No genética	-
158ET73	Mutación	Monogénico recesivo
236ET73	Mutación	Desconocido
247ET73	Mutación	Monogénico recesivo
248ET73	Mutación	Monogénico recesivo
264ET73	Mutación	Desconocido
281ET73	No genética	-
460ET73	Mutación	Desconocido
502ET73	Mutación	Monogénico recesivo
651ET73	Mutación	Monogénico recesivo
686ET73	Mutación	Monogénico recesivo
809ET73	Por determinar	-
861ET73	Por determinar	-

Cabe señalar que algunos de los fenotipos alterados, en concreto los descritos en las familias 108ET73, 149ET73 y 281ET73, no parecen corresponder a verdaderas mutaciones heredables, antes bien podría tratarse de efectos causados por factores ambientales adversos.

D.CONCLUSIONES

E. CONCLUSIONES

La caracterización fenotípica y genética de una colección de mutantes insercionales de tomate realizada en este trabajo de investigación, ha permitido obtener las siguientes conclusiones:

PRIMERA.- De los 64 posibles mutantes identificados en ambas campañas un 60,9% de los individuos presentó alteraciones en su desarrollo vegetativo mientras que el 39,1% exhibió un desarrollo reproductivo alterado. Esta variabilidad demuestra la eficiencia del programa de mutagénesis llevado a cabo.

SEGUNDA.- Tras realizar el test Chi-cuadrado a las familias TG2 de fenotipo anómalo, sembradas en dos campañas sucesivas, el 94,9% de los posibles mutantes siguieron un patrón de herencia monogénico. El 5,1% restante de los posibles fenotipos mutantes podría deberse a alteraciones en varios genes (herencia poligénica), o bien a la intervención de factores ambientales.

TERCERA.- entre los mutantes monogénicos, el 89,9% se heredan de forma recesiva, lo que indicaría que las mutaciones insercionales detectadas promueven anulación o pérdida de función.

CUARTA.- Algunas de las mutaciones que afectan al desarrollo vegetativo y reproductivo podrían residir en genes reguladores que participan en la señalización hormonal; es el caso, de mutantes de fenotipo enano, o de aquellos que muestran un escaso vigor de planta y fruto.

QUINTA.- Se han detectado mutaciones que parecen afectar a la identidad de los órganos florales, los cuales constituyen excelentes candidatos para estudiar la función e genes homeóticos de la familia MADS-box, de los cuales se conoce su implicación en el establecimiento de los patrones de desarrollo floral.

SEXTA.- Los mutantes partenocárpicos detectados parecen dos fenotipos diferentes, ausencia de semillas en el interior del mucílago o bien, ausencia total de mucilago. En este estudio, de todos los posibles candidatos que presentaron partenocarpia, tan sólo

una familia exhibió la mutación en uno de sus descendientes TG3, ésta pudo estar causada por la alteración del alelo de un gen de carácter recesivo. El resto de fenotipos partenocárpico podrían haber sido causados por factores ambientales adversos.

SÉPTIMA.- El fenotipo mutante observado en la familia 651ET73 (clorosis en los ápices durante el desarrollo vegetativo, flores de pétalos blanquecinos y cono estaminal naranja, que cuajan frutos de color naranja) exhibe un fenotipo muy similar al descrito para el mutante *tangerine* (*t*), alterado en la biosíntesis de carotenoides. En este y otros casos similares, se requieren de análisis de complementación para determinar si trata de mutaciones que afectan al mismo o a distintos genes.

OCTAVA.- Se han identificado algunos mutantes que, o bien por su vigor, carácter partenocárpico del fruto, androesterilidad u otras características, podrían ser de utilidad en futuros programas de mejora genética de tomate.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams-Phillips L., Barry C., Giovannoni J. (2004). Signal transduction systems regulating fruit ripening. *Trends in Plant Science*. 9 (7): 331-338.
- Ahad A., Wolf J., Nick P. (2003). Activation-tagged tobacco mutants that are tolerant to antimicrotubular herbicides are cross-resistant to chilling stress. *Transgenic research*. 12 (5): 615-629.
- Allen K.D. and Sussex I.M. (1996). *Falsiflora* and *anantha* control early stages of floral meristem development in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Planta*. 200 (2): 254-264.
- Allen M. and Rick C.M. (1986). Genetics and breeding. p. 36-109. In: J.G. Atherton and J. Rudich (eds.). *The Tomato Crop*. Chapman and Hall, London and NY
- Alonso J.M. and Ecker J.R. (2006). Moving forward in reverse: genetic technologies to enable genome-wide phenomic screens in *Arabidopsis*. *Nature Reviews Genetic*. 7: 524-536.
- Alonso J.M., Hirayama T., Roman G., Nourizadeh S., Ecker J.R. (1999). *EIN2*, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis*. *Science* 284: 2148-2152.
- Alonso J.M., Stepanova A.N., Leisse T.J., Kim C.J., Chen H., Shinn P., Stevenson D.K., Zimmerman J., Barajas P., Cheuk R., Gadrinab C., Heller C., Jeske A., Koesema E., Meyers C.C., Parker H., Prednis L., Ansari Y., Choy N., Deen H., Geralt M., Hazari N., Hom E., Karnes M., Mulholland C., Ndubaku R., Schmidt I., Guzman P., Aguilar-Henonin L., Schmid M., Weigel D., Carter D.E., Marchand T., Risseuw E., Brogden D., Zeko A., Crosby W.L., Berry Ch.C., Ecker J.R. (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*. 301 (5633): 653-657.
- Alvarado M.C., Zsigmond L.M., Kovács I., Cséplő A., Konez C., Szabados L.M. (2004). Gene trapping with *Firefly Luciferase* in *Arabidopsis*. Tagging of stress-responsive genes. *Plant Physiology*. 134: 18-27.
- Ampomah-Dwamena Ch., Morris B.A., Sutherland P., Veit B., Yao J.L. (2002). Down-Regulation of *TM29*, a tomato *SEPALLATA* homolog, causes pathenocarpic fruit development and floral reversion. *Plant Physiology*. 130: 605-617.
- Angenent G.C., Franken J., Busscher M., van Dijken A., van Went J.L., Dons H.J., van Tunen A.J. (1995). A novel class of MADS box genes is involved in ovule development in petunia. *Plant Cell* 7: 1569–1582

- Anuario Fao 2008: <http://www.fao.org/economic/ess/ess-publications/ess-yearbook/anuario-estadistico-de-la-fao-2007-2008/es/>
- Atherton J.G. and Harris G.P. (1986). Flowering. In: The tomato Crop (ed. J.G. Atherton and J. Rudich), pp: 167-200. New York/London: Chapman and Hall.
- Ayliffe M. and Pryor A. J. (2007). Activation taggins in plants-generation of novel, gain-of-function mutations. *Australian Journal of Agricultural Research*. 58:490-497.
- Azpiroz-Leehan R. and Feldman K.A. (1997). T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis* going back and forth. *Trend in Genetics*. 13 (4): 152-156.
- Bade J., van Grinsven E., Custers J., Hoekstra S., Ponstein A. (2003). T-DNA tagging in *Brassica napus* as an efficient tool for the isolation of new promoters for selectable marker genes. *Plant Molecular Biology*. 52: 53-68.
- Balbi V. and Lomax T.L. (2003). Regulation of early tomato fruit development by *Diageotropica* gene. *Plant Physiology*. 131: 186-197.
- Ballinger D.G. and Benzer S. (1989). Targeted gene mutations in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 86: 9402-9406.
- Bancroft I., Jones J.D., Dean C.(1993). Heterologous transposon tagging of the *DRL1* locus in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 134(4): 1221-1229.
- Barthels N., van der Lee F.M., Klap J., Goddijn O.J.M., Karimi M., Puzio P., Grundler F.M. W., Ohl S.A., Lindsey K., Robertson W.M., van Montagu M., Gheysen G., Sijmons P.C. (1997). Regulatory sequences of *Arabidopsis* drive reporter gene expression in nematode feeding structures. *Plant Cell*. 9: 2119-2134.
- Bennetzen J.L., Springer P.S., Cresse A.D., Hendrickx M. (1993). Specificity and regulation of the Mutator transposable element system in maize. *Critical Review in Plant Science*. 12 (1-2): 57-95.
- Bensen R.J., Johal G.S., Crane V.C., Tossberg J.T., Schnable P.S., Meeley R.B., Briggs S.P. (1995). Cloning and characterization of the maize *An1* gene. *Plant Cell*. 7: 75-84.
- Bishop G.J., Harrison K., Jones J.D.G. (1996). The tomato *Dwarf* gene isolated by heterologous transposon tagging encodes the first member of a new cytochrome P450 family. *Plan Cell*. 8: 959-969.
- Bonnema G., Hontelez J., Versek R., Zhang Y.Q., van Daelen R., van Kammen A., Zabel P. (1996). An improved method of partially digesting plant megabase DNA suitable for YAC cloning: application to the construction of a 5.5 genome equivalent YAC library of tomato. *Plant Journal*. 9 (1): 125-133.

- Bouché N. and Bouchez D. (2001). *Arabidopsis* gene knockout: phenotypes wanted. *Current Opinion in Plant Biology*. 4: 111-117.
- Brunaud V., Balzergue S., Dubreucq B., Aubourg S., Samson F., Chauvin S., Bechtold N., Cruaud C., DeRose R., Pelletier G., Lepiniec L., Caboche M., Lecharny A. (2002). T-DNA integration into *Arabidopsis* genome depends on sequences of pre-insertion sites. *EMBO Reports*. 3 (12): 1152-1157.
- Budiman M.A., Mao L., Wood T.C., Wing R.A. (2000). A deep-coverage tomato BAC library and prospects toward development of an STC framework for genome sequencing. *Genome Research*. 10: 129-136.
- Busi M.V., Bustamante C., D'Angelo C., Hidalgo-Cuevas M., Boggio S., Valle E.M., Zabaleta E. (2003). MADS-box genes expressed during tomato seed and fruit development. *Plant Molecular Biology*. 52: 801-815.
- Busov V.B., Meilan R., Pearce D.W., Ma C., Rood S.B., Strauss S.H. (2003). Activation tagging of a dominant gibberellins catabolism gene (*GA2-oxidase*) from poplar that regulates tree stature. *Plant Physiology*. 132: 1283-1291.
- Campisi L., Yang Y., Yi Y., Heiling E., Herman B., Cassista A.J., Allen D.W., Xiang H., Jack T. (1999). Generation of enhancer trap lines in *Arabidopsis* and characterization of expression patterns in the inflorescence. *Plant Journal*. 17 (6): 699-707.
- Candela H. and Hake S. (2008). The art design of genetic screens: maize. *Nature Reviews Genetics*. 9 (3): 192-203.
- Cara B. and Giovannoni J.J. (2008). Molecular biology of ethylene during tomato fruit development and maturation. *Plant Science*. 175: 106-113.
- Carroll B.J., Klimyuk V.I., Thomas C.M., Bishop G.J., Harrison K., Scofield S.R., Jones J.D.G. (1995). Germinal transpositions of the maize element dissociation from T-DNA loci in tomato. *Genetics*. 139: 407-420.
- Casson S.A., Chilley P.M., Topping J.F., Evans I.M., Souter M.A., Lindsey K. (2002). The *POLARIS* gene of *Arabidopsis* encodes a predicted peptide required for correct root growth and leaf vascular patterning. *Plant Cell*. 14: 1705-1721.
- Castle L.A., Errampalli D., Atherton T.L., Franzmann L.H., Yoon E.S., Meink D.W. (1993). Genetic and molecular characterization of embryonic mutants identified following seed transformation in *Arabidopsis*. *Molecular and General Genetics*. 241: 504-514.
- Chalfun-Junior A., Franken J., Mes J.J., Marsch-Martinez N., Pereira A., Angenent G.C. (2005). *ASYMMETRIC LEAVES2-LIKE1* gene, a member of the AS2/LOB family,

- controls proximal-distal patterning in *Arabidopsis* petals. *Plant Molecular Biology*. 57 (4): 559-575.
- Coen E.S. and Meyerowitz E.M. (1991). The war of the whorls: genetics interactions controlling flower development. *Nature*. 353: 31-37.
- Cresse A.D., Hulbert S.H., Brown W.E., Lucas J.R., Bennetzen J.L. (1995). *Mu1* – related transposable elements of maize preferentially insert into low copy number DNA. *Genetics*. 140: 315-324.
- Cubero J.I. (2003). Introducción a la mejora genética vegetal. Mundi-Prensa Libros.
- De Greve H., Nguyen V.K., Deboeck F., Thia-Toong L., Karimi M., Hernalsteens J.P. (2001). T-DNA tagging of the translation initiation factor *Eif-4A1* of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*. 161 (4): 685-693.
- Dielen V., Marc D., Kinet J.M. (1998). Flowering in the *uniflora* mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.): description of the reproductive structure and manipulation of flowering time. *Plant Growth Regulation*. 25: 149-157.
- Dielen V., Quinet M., Chao J., Batoko H., Havelange A., Kinet J.M. (2004). *UNIFLORA*, a pivotal gene that regulates floral transition and meristem identity in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *New Phytologist*. 161:393-400.
- Dooner H.K. and Belachew A. (1989). Transposition pattern of the maize element *Ac* from the *bz-m2* (*Ac*) allele. *Genetics*. 122: 447-457.
- Dooner H.K., Keller J., Harper E., Ralston E. (1991). Variable patterns of transposition of the maize element activator in tobacco. *Plant Cell*. 3: 473-482.
- Emmanuel E. and Levy A.A. (2002). Tomato mutants as tool for functional genomics. *Current Opinion in Plant Biology*. 5: 112-117.
- Enoki H., Izawa T., Kawahara M., Komatsu M., Koh S., Kyojuka J., Shimamoto K. (1999). *Ac* as a tool for the functional genomics of rice. *Plant Journal*. 19 (5): 605-613.
- Eriksson E.M., Bovy A., Manning K., Harrison L., Andrews J., De Silva J., Tucker G.A., Seymour G.B. (2004). Effect of the *Colorless non-ripening*. *Plant Physiology*. 136: 4184-4197.
- FAOSTAT 2008: <http://faostat.fao.org/>
- Farrar K., Evans M., Topping J.F., Souter M.A., Nielsen J., Lindsey K. (2003). *EXORDIUM* – a gene expressed in proliferating cells and with a role in meristem function, identified by promoter trapping in *Arabidopsis*. *Plant Journal*. 33 (1): 61-73.
- Fedoroff N.V. and Smith D.L. (1993). A versatile system for detecting transposition in *Arabidopsis*. *Plant Journal*. 3 (2): 273-289.

- Fehleisen S. (1997). *Uniflora* and *conjunctiflora*: two new mutants in tomato. *Tomato Genetics Cooperative Reports*. 17: 26-28.
- Fobert P.R., Labbé H., Cosmopoulos J., Gottlob-McHugh S., Ouellet T., Hattori J., Sunohara G., Iyer V.N., Miki B.L. (1994). T-DNA tagging of a seed coat-specific cryptic promoter in tobacco. *Plant Journal*. 6 (4): 567-577.
- Fooland M.R. (2007). Genome mapping and molecular breeding of tomato. *International Journal of Plant Genomics*. 2007: 1-52.
- Forsbach A., Schubert D., Lechtenberg B., Gils M., Schmidt R. (2003). A comprehensive characterization of single-copy T-DNA insertions in the *Arabidopsis thaliana* genome. *Plant Molecular Biology*. 52 (1): 161-176.
- Fos M., Nuez F., Garcia-Martínez J.L. (2000). The gene *pat-2*, which induces natural parthenocarpy, alters the gibberellin content in unpollinated tomato ovaries. *Plant Physiology*. 122: 471-480.
- Fos M., Proano K., Nuez F., Garcia-Martinez J.L. (2001). Role of gibberellins in parthenocarpic fruit development induced by the genetic system *pat-3/pat-4* in tomato. *Pysiologia Plantarum*. 111: 545-550.
- Franzman L.H., Yoon E.S., Meinke D.W. (1995). Saturating the genetic map of *Arabidopsis thaliana* with embryonic mutations. *Plant Journal*. 7 (2): 341-350.
- Frey M., Stettner C., Gierl A. (1998). A general method of gene isolation in tagging approaches: amplification of insertion mutagenised sites (AIMS). *Plant Journal*. 13 (5): 717-721.
- Furini A., Koncz C., Salamini F., Bartels D. (1997). High level transcription of a member of a repeated gene family confers dehydration tolerance to callus tissue of *Craterostigma plantagineum*. *EMBO Journal*. 16: 3599-3608.
- García-Martínez J.L. and Hedden P. (1997). Gibberellins and fruit development. In: FA Toma's-Barbera'n, R.J Robins, eds, *Phytochemistry of Fruit and Vegetables*. Clarendon Press, Oxford, pp 263-286.
- García-Martínez J.L., Santes C., Croker S., Hedden P. (1991). Identification, quantitation and distribution of gibberellins in fruits of *Pisum sativum* L. cv. Alaska during pod development. *Planta*. 184: 53-60.
- Gelvin S.B. (2000). *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 51: 223-256.
- Gidoni D., Fuss E., Burbidge A., Speckmann G.J., James S., Nijkamp D., Mett A., Feiler J., Smoker M., Vroomen M.J., Leader D., Liharska T., Groenendijk J., Coppoolse E., Smit

- J.J.M., Levin I., Both M., Schuch W., Jones J.D.G., Taylor I.B., Theres K., Haaren M.J. J. (2003). Multi-functional T-DNA/Ds tomato lines designed for gene cloning and molecular and physical dissection of the tomato genome. *Plant Molecular Biology*. 51: 83-98.
- Gillaspy G., Ben-David H., Gruissem W. (1993). Fruits: A developmental perspective. *Plant Cell*. 5: 1439-1451.
- Giménez E., Pineda B., Capel J., Antón M.T., Atarés A., Pérez-Martín F., García-Sogo B., Angosto T., Moreno V., Lozano L. (2010). Functional Analysis of the *Arlequin* Mutant Corroborates the Essential Role of the *ARLEQUIN/TAGL1* Gene during Reproductive Development of Tomato. *PLoS ONE* 5(12): 14427
- Giovannoni J.J. (2004). Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell*. 16: 170-180.
- Giovannoni J.J. (2007). Fruit ripening mutants yield insights into ripening control. *Current Opinion in Plant Biology*. 10 (3): 283-289.
- Goldsbrough A.P., Tong Y., Yoder J.I. (1996). *Lc* as a non-destructive visual reporter and transposition excision marker gene for tomato. *Plant Journal*. 9 (6): 927-933.
- Gómez P., Jamilena M., Capel J., Zurita S., Angosto T., Lozano R. (1999). *Stamenless*, a tomato mutant with homeotic conversions in petals and stamens. *Planta*. 209: 172-179.
- Good X., Kellogg J.A., Wagoner W., Langoff D., Matsumura W., Bestwick R.K. (1994). Reduced ethylene synthesis by transgenic tomatoes expressing S-adenosylmethionine hydrolase. *Plant Molecular Biology*. 26: 781-790.
- Gorguet B., Van Heusden A.W., Lindhout P. (2005). Parthenocarpic fruit development in tomato. *Plant Biology*. 7 (2): 131-139.
- Greenblatt I.M. (1984). A chromosome replication pattern deduced from pericarp phenotypes resulting from movements of the transposable element, modulator, in maize. *Genetics*. 108: 471-485.
- Greene E.A., Codomo N.E., Taylor J.G., Henikoff, Till B.J. (2003). Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse-genetic screen in *Arabidopsis*. *Genetics*. 164: 731-740.
- Groover A., Fontana J.R., Dupper G., Ma C., Martienssen R., Strauss S., Meilan R. (2004). Gene and enhancer trap tagging of vascular-expressed genes in poplar trees. *Plant Physiology*. 134: 1742-1751.

- Gu Q., Ferrándiz C., Yanofsky M.F., Martienssen R. (1998). The *FRUITFULL* MADS-box gene mediates cell differentiation during *Arabidopsis* fruit development. *Development*. 125: 1509-1517.
- Gustafsson A., Kucera, J., Lundqvist U. (1975). Inheritance of breviaristatum mutants in barley. *Hereditas* 80:263-278.
- Hackett R.M., Ho Ch.W., Lin Z., Foote H.C.C., Fray R.G., Grierson D. (2000). Antisense inhibition of the *Nr* gene restores normal ripening to the tomato *Never-ripe* mutant, consistent with the ethylene receptor-inhibition model. *Plant Physiology*. 124: 1079-1085.
- Hamilton A.J. and Baulcombe D.C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*. 286 (5441): 950-952.
- Harrison E.J., Bush M., Plett J.M., McPhee D.P., Vitez R.O., Malley B., Sharma V., Bosnich W., Seguin A., MacKay J. (2007). Diverse developmental mutants revealed in an activation-tagged population of poplar. *Canadian Journal of Botany*. 85 (11): 1071-1081.
- Haseloff J., Siemering K.R., Prasher D.C., Hodge S. (1997). Removal of cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 94 (6): 2122-2127.
- He Y., Tang W., Swaim J.D., Green A.L., Jack T.P., Gan S. (2001). Networking senescence-regulating pathways by using *Arabidopsis* enhancer trap lines. *Plant Physiology*. 126: 707-716.
- Hehl R. and Baker B. (1990). Properties of the maize transposable element activator in transgenic tobacco plants: a versatile inter-species genetic tool. *Plant Cell* 2: 709-721.
- Hirochika H., Sugimoto K., Otsuki Y., Tsugawa H., Kanda M. (1996). Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 93: 7783-7788.
- Honma M. and Shimomura T. (1978). Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Agricultural and Biological Chemistry*. 43: 1825-1831.
- Huang S., Cerny R.E., Qi Y.L., Bhat D., Ayt C.M., Hanson D.D., Malloy K.P., Ness L.A. (2003). Transgenic studies on the involvement of cytokinin and gibberellins in male development. *Plant Physiology*. 131: 1270-1282.

- Hueros G. and Jouve N. (2002). Genómica funcional en plantas. En: Genómica y Mejora Vegetal. Junta de Andalucía, Ediciones Mundi Prensa D. L. (Sevilla, España). pp 331-364.
- Imaizumi R., Sato S., Kameya N., Nakamura I., Nakamura Y., Tabata S., Ayabe Sh., Aoki T. (2005). Activation tagging approach in a model legume, *Lotus japonicus*. *Journal of Plant Research*. 118 (6): 391-399.
- Itkin M., Seybold. H, Breitel. D, Rogachev I., Meir S., Aharoni A. (2009). *TOMATO AGAMOUS-LIKE 1* is a component of the fruit ripening regulatory network. *Plant Journal*. 60(6):1081-95.
- Jain S.M. (2001). Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica*. 118: 153-166.
- Jefferson J.S., Kavanagh T.A., Bevan M.W. (1987). *GUS* fusions: β -Glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal*. 6: 3901-3907.
- Jeon J.S., Lee S., Jung K.H., Jun S.H., Jeong D.H., Lee J., Kim Ch., Jang S., Lee Sh., Yang K., Nam J., An K., Han M.J., Sung R.J., Choi H.S., Yu J.H., Choi J.H., Cho S.Y., Cha S.S., Kim Sh.I., An G. (2000). T-DNA insertional mutagenesis for functional genomics in rice. *Plant Journal*. 22 (6): 561-570.
- Jeong D.H., An S., Kang H.G., Moon S., Han J.J., Park S., Lee H.S., An K., An G. (2002). T-DNA insertional mutagenesis for activation tagging in rice. *Plant Physiology*. 130: 1-9.
- Jones D.A., Thomas C.M., Hammond-Kosack K.E., Balint-Kurti P.J., Jones J.D.G. (1994). Isolation of the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science*. 266: 789-792.
- Jones J.D.G., Carland F., Lim E., Ralston E., Dooner H.K. (1990). Preferential transposition of the maize element activator to linked chromosomal locations in tobacco. *Plant Cell*. 2: 701-701.
- Jung K.H., Lee J., Dardick Ch., Seo Y.S., Cao P., Canlas P., Phetsom J., Xu X., Ouyang Sh., An K., Cho Y.J., Lee G.Ch., Lee Y., An G., Ronald P.C. (2008). Identification and functional analysis of light-responsive unique genes and gene family members in rice. *Plos Genetics*. 4 (8): 1-19.
- Kaiser K. and Goodwin S.F. (1990). "Site-selected" transposon mutagenesis of *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 87 (5): 1686-1690.

- Kato K., Ohta K., Somata Y., Araki T., Kanahama K., Kanayama Y. (2005). Morphological and molecular analyses of the tomato floral mutant leafy inflorescence, a new allele of *falsiflora*. *Plant Science*. 169: 131-138.
- Keddie J.S., Carrol B.J., Thomas C.M., Reyes M.E., Klimyukn V.I., Holtan H., Gruissem W., Jones J.D. (1998). Transposon tagging of the *Defective* embryo and meristems gene of tomato. *Plant Cell*. 10: 877-888.
- Keddie J.S., Carrol B., Jones J.D.G., Gruissem W. (1996). The *DCL* gene of tomato is required for chloroplast development and palisade cell morphogenesis in leaves. *EMBO Journal*. 15: 4208-4217.
- Keller J., Lim E., Dooner H.K. (1993). Preferential transposition of *Ac* to linked sites in *Arabidopsis*. *Theoretical and Applied Genetics*. 86 (5): 585-588.
- Kerbundit S., De Greve H., Deboeck F., Van Montagu M., Hernalsteens J.P. (1991). *In-vivo* random β -glucuronidase gene fusions in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 88: 5212-5216.
- Kerr E.A. (1982). *Single flower truss 'sft'* appears to be on chromosome 3. *Tomato Genetics Cooperative Reports*. 32: 31.
- Kinet J.M. and Peet M.M. (1997). Tomato. In: *The Physiology of Vegetable Crops*, H.C. Wien, ed. (Wallingford, UK: Commonwealth Agricultural Bureau (CAB) International). pp 207-258.
- Klee H. and Tieman D. (2002). The tomato ethylene receptor gene family. *Physiologia plantarum*. 115 (3): 336-341.
- Klimyuk V.I., Nussaume L., Harrison K., Jones J.D.G. (1995). Novel *GUS* expression patterns following transposition of enhancer trap *Ds* element in *Arabidopsis*. *Molecular and General Genetics*. 249 (4): 357-365.
- Klug W.S. and Cummings M.R. (2006). *Concepts of Genetics*. 8th edition. W.H. Prentice Hall
- Koes R., Souer E., van Houwelingen A., Mur L., Spelt C., Quattrocchio F., Wing J., Oppedijk B., Ashmed S., Maes T. (1995). Targeted gene inactivation in petunia by PCR-based selection of transposon insertion mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 92 (18): 8149-8153.
- Konzak C.F., Kleinhofs A., Ulrich S.E. (1984). Induced mutations in seed propagated crops. *Plant Bree. Rev.* 2: 13-72.

- Koorneef M., Bosma T.D.G., Hanhart C.J., van der Veen J.H., Zeevaart J.A.D. (1990). The isolation and characterization of gibberellins-deficient mutants in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*. 80: 852-857.
- Krysan P.J., Young J.C., Tax F., Sussman M.R. (1996). Identification of transferred DNA insertions within *Arabidopsis* genes involved in signal transduction and ion transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 93: 8145-8150.
- Kubo H., Peeters A.J., Aarts M.G., Pereira A., Koorneef M. (1999). *ANTHOCYANINELESS2*, a homeobox gene affecting anthocyanin distribution and root development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 11: 1217-1226.
- Kumar A., Taylor M.A., Mas S.A., Davies H.V. (1996). Potato plants expressing antisense and sense S-adenosylmethionine decarboxylase (*SAMDC*) transgenes show altered levels of polyamines and ethylene: antisense plants display abnormal phenotypes. *Plant Journal*. 9 (2): 147-158.
- Lanfermeijer F.C., Dijkhuis J., Sturre M.J.G., de Hann P., Hille J. (2003). Cloning and a characterization of the durable tomato mosaic virus resistance gene *Tm2²* from *Lycopersicon esculentum*. *Plant Molecular Biology*. 52 (5): 1039-1051.
- Lashbrook C.C., Tieman D.M., Klee H.J. (1998). Differential regulation of the tomato *ETR* gene family throughout plant development. *Plant Journal*. 15 (2): 243-252.
- Laufs P., Autran D., Traas J.A. (1999). Chromosomal paracentric inversion associated with T-DNA integration in *Arabidopsis*. *Plant Journal*. 18 (2): 131-139.
- Leclercq J., Adams-Phillips L., Zegzouti H., Jones B., Latche A., Giovannoni J.J., Pech J.C., Bouzayen M. (2002). *LeCTR1*, a tomato *CTR1-like* gene, demonstrates ethylene signaling ability in *Arabidopsis* and novel expression patterns in tomato. *Plant Physiology*. 130: 1132-1142.
- Lee C.Y., Agrawal D.C., Wang C.S., Yu S.M., Chen J.J., Tsay H.S. (2008). T-DNA activation tagging as a tool to isolate *Salvia miltiorrhiza* transgenic lines for higher yields of transhinones. *Plant Medicine*. 74 (7): 780-786.
- Lee M.K., Kim H.S., Kim S.H., Park Y.D. (2004). *Agrobacterium* mediated transformation system for large-scale production of transgenic Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp *pekinensis*) plants for insertional mutagenesis. *Journal of Plant Biology*. 47: 300-306.
- Lelievre J.M., Latche A., Jones B., Bouzayen M., Pech J.C. (1997). Ethylene and fruit ripening. *Physiologia Plantarum*. 101 (4): 727-739.

- Lifschitz E. and Eshed Y. (2006). Universal florigenic triggered by *FT* homologues regulate growth and flowering cycles in perennial day – neutral tomato. *Journal of Experimental Botany*. 57: 3405-3414.
- Lifschitz E., Eviatar T., Rozman A., Shalit A., Goldshmidt A., Amsellem Z., Alvarez J.P., Eshed Y. (2006). The tomato *FT* ortholog triggers systemic signals that regulate growth and flowering and substitute for diverse environmental stimuli. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103 (16): 6398-6403.
- Lindsey K., Wei W., Clarke M.C., McArdle H.F., Rooke L.M., Topping J.F. (1993). Tagging genomic sequences that direct transgene expression by activation of a promoter trap in plants. *Transgenic Research*. 2: 33-47.
- Linnaeus C. (1753). *Species Plantarum*. Holmiae. Stockholm, Sweden, 1st edition.
- Lozano R., Angosto T., Gómez P., Payan C., Capel J., Huijser P., Salinas J., Martínez-Zapater J.M. (1998). Tomato flower abnormalities induced by low temperatures are associated with changes of expression of MADS-box genes. *Plant Physiology*. 117: 91-100.
- Lozano R., Giménez E., Cara B., Capel J., Angosto T. (2009). Developmental genetics of tomato, a model species in plant biology. *Journal of Integrative Plant Biology*. 53(8-10):1635-48.
- Lukyanenko A.N. (1991). Parthenocarpy in tomato. In Genetic Improvement of Tomato, Monographs of Theoretical and Applied Genetics 14, G Kaloo, ed. (Berlin: Springer-Verlag). pp: 167-178.
- Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. (2003). Brock Microbiología de los microorganismos. 10^a Edición, ed. PEARSON. Madrid-España.
- Malamy J.E. and Benfey P.N. (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development*. 124: 33-44.
- Malayer J.C. and Guard A.T. (1964). A comparative developmental study of the mutant *sideshootless* and normal tomato plants. *American Journal of Botany*. 51: 140-143.
- Manning K., Tör M., Poole M., Hong Y., Thompson A., King G.J., Giovannoni J.J., Seymour G.B. (2006). A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. *Nature Genetics*. 38: 948-952.
- Mao L., Begum D., Chuang H.W., Budiman M.A., Szymkowiak E.J., Irish E.E., Wing R.A. (2000). *JOINTLESS* is a MADS-box gene in tomato controlling flower abscission zone development. *Nature*. 406; 910-913.

- Mathews H., Clendennen S.K., Caldwell C.G., Liu X.L., Connors K., Matheis N., Schuster D.K., Menasco D.J., Wagoner W., Lightner J., Wagner D.R. (2003). Activation tagging in tomato identifies a transcriptional regulator of anthocyanin biosynthesis, modification, and transport. *Plant Cell*. 15: 1689-1703.
- Mazzucato A., Taddei A.R., Soressi G.P. (1998). The parthenocarpic fruit (*pat*) mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) sets seedless fruits and has aberrant anther and ovule development. *Development*. 125: 107-114.
- McClintock, B. (1953). Induction of Instability at Selected Loci in Maize. *Genetics* 38 (6): 579–599.
- McKinney E.C., Ali N., Traut A., Feldman K.A., Belostotsky D.A., McDowel J.M., Meagher R.B. (1995). Sequence-based identification of T-DNA insertion mutations in *Arabidopsis*: actin mutants *act2-1* and *act4-1*. *Plant Journal*. 8 (4): 613-622.
- Meissner R., Changue V., Zhu Q., Emmanuel E., Elkind Y., Levy A.A. (2000). A high throughput system for transposon tagging and promoter trapping in tomato. *Plant Journal*. 22 (3): 265-274.
- Mena M., Ambrose B.A., Meely R.B., Briggs S.P., Yanofsky M.F., Schmidt R.J. (1996). Diversification of C-function activity in maize flower development. *Science*. 274 (5292): 1537-1540.
- Menda N., Semel Y., Peled D., Eshed Y., Zamir D. (2004). In silico screening of a saturated mutation library of tomato. *Plant Journal*. 38 (5): 861-872.
- Meyerowitz E.M., Bowman J.L., Brockman L.L., Drews G.N., Jack T., Sieburth L.E., Weigel D. (1991). A genetic and molecular model of flower development in *Arabidopsis thaliana*. *Development (Suppl.)* 1: 157-167.
- Micke A., Maluszynski M., Donini B. (1986). Genes for *semidwarfism* in rice induced by mutagenesis. In: Rice Genetics. IRRI. Manila. Pp: 729-737.
- Miller P. (1754). The Gardeners Dictionary. John and Francis Rivington. London, UK, 4th edition.
- Milton P.J. and Allen S.D. (1995). Breeding Field Crops. 4th edition. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA.
- Molinero-Rosales N., Latorre A., Jamilena M., Lozano R. (2004). *SINGLE FLOWER TRUSS* regulates the transition and maintenance of flowering in tomato. *Planta*. 218: 427-434.
- Molinero-Rosales N., Latorre A., Jamilena M., Zurita S., Gómez P., Capel J., Lozano R. (1999). *FALSIFLORA*, the tomato orthologue of *FLORICAULA* and *LEAFY*, controls flowering time and floral meristem identity. *Plant Journal*. 20 (6): 685-693.

- Mollier P., Hoffmann B., Orsel M., Pelletier G. (2000). Tagging of a cryptic promoter that confers root-specific gus expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports*. 19 (11): 1076-1083.
- Moreno V. (1997). La selección somaclonal, una alternativa biotecnológica para la mejora de plantas ornamentales. *Biotecnología y agricultura: las plantas del futuro*. Fundación Bancaixa. 59-96.
- Mueller L.A., Solow T.H., Taylor N., Skwarecki B., Buels R., Binns J., Lin Ch., Wright M., Ahrens R., Wang Y., Herbst E.V., Keyder E., Menda N., Zamir D., Tanksley S.D. (2005). The SOL genomics network, a comparative resource for solanaceae biology and beyond. *Plant Physiology*. 138: 1310-1317.
- Muller H.J. (1927). Artificial Transmutation of the Gene. *Science*. 96: 84-87.
- Nash A.F., Gardner R.G., Henderson W.R. (1985). Evaluation of allelism and seed set of eight *stamenless* tomato mutants. *HortScience*. 20: 440-442.
- Negruk V., Yang P., Subramanian M., McNevin J.P., Lemieux B. (1996). Molecular cloning and characterization of the *CER2* gene of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 9: 137-145.
- Nuez F., Costa J., Cuartero J. (1986). Genetics of the parthenocarp of tomato varieties "Sub-Artic Plenty", "75/59" and "Severianin". *Zeitschrift für Pflanzzüchtung*. 96: 200-206.
- Oosumi T., Gruszewski H.A., Blischak L.A., Baxter A.J., Wadl P.A., Shuman J.L., Veilleux R.E., Shulaev V. (2006). High-efficiency transformation of the diploid strawberry (*Fragaria vesca*) for functional genomics. *Planta*. 223: 1219-1230.
- Osborne B.I., Corr C.A., Prince J.P., Hehl R., Tanksley S.D., McCormick S., Baker B. (1991). *Ac* transposition from a T-DNA can generate linked and unlinked clusters of insertions in the tomato genome. *Genetics*. 129: 833-844.
- Paran I. and van der knap E. (2007). Genetic and molecular regulation of fruit and plant domestication traits in tomato and pepper. *Journal of Experimental Botany*. 58 (14): 3841-3852.
- Peng H., Huang H., Yang Y., Zhai Y., Wu J., Huang D., Lu T. (2005). Functional analysis of *GUS* expression patterns and T-DNA integration characteristics in rice enhancer trap lines. *Plant Science*. 168: 1571-1579.
- Peterhans A., Schlüpman H., Basse C., Paszkowski J. (1990). Intrachromosomal recombination in plants. *EMBO Journal*. 9 (11): 3437-3445.

- Philouze J. and Maisonneuve B. (1978). Heredity of the natural ability to set parthenocarpic fruits in the Soviet variety Severianin. *Tomato Genetics Cooperative Reports*. 28: 12-13.
- Philouze J. (1983). Epistatic relations between *ls* and *pat-2*. *Tomato Genetics Cooperative Reports*. 33: 9-12
- Pino-Nunes L.E., Figueira A.V.O., Tulmann Neto A., Zsögön A., Piotto F.A., Silva J.A., Bernardi W.F., Peres L.E.P. (2009). Induced mutagenesis and natural genetic variation in tomato 'Micro-Tom'. *Acta Hort.* 821:63-72.
- Plesch G., Kamann E., Mueller R.B. (2000). Cloning of regulatory sequences mediating guard-cell specific gene expression. *Gene*. 249 (1): 83-89.
- Pnueli L., Goren L.C., Hareven D., Gutfinger T., Alvarez J., Ganai M., Zamir D., Lifschitz E. (1998). The *SELF-PRUNING* gene of tomato regulates vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the ortholog of *CEN* and *TFL1*. *Development*. 125: 1979-1989.
- Pnueli L., Hareven A., Rounsley S.D., Yanofsky M.F., Lifschitz E. (1994a). Isolation of the Tomato *AGAMOUS* gene *TAG7* and analysis of its homeotic role in transgenic plants. *Plant Cell*. 6: 163-173.
- Pnueli L., Hareven D., Broday L., Hurwitz Ch., Lifschitz E. (1994b). The *TM5* MADS-box gene mediates organ differentiation in the three inner whorls of tomato flowers. *Plant Cell*. 6: 175-186.
- Prescott L.M., Harley J.P., Klein J.P. (2004). Microbiología. 5ª edición. Ed. Mc GrawHill-Interamericana.
- Quin G., Kang D., Dong Y., Shen Y., Zhang L., Deng X., Zhang Y., Li S., Chen N., Niu W., Chen C., Liu P., Chen H., Li J., Ren Y., Gu H., Deng X., Li-Jia Q., Chen Z. (2003). Obtaining and analysis of flanking sequences from T-DNA transformants of *Arabidopsis*. *Plant Science*. 165 (5): 941-949.
- Quin H., Dong Y., von Arnim A.G. (2003). Epigenetic interactions between *Arabidopsis* transgenes: Characterization in light of transgene integration sites. *Plant Mol. Biol.* 52: 217-231.
- Quinet M. and Kinet J.M. (2007). Transition to flowering and morphogenesis of reproductive structures in tomato. *International Journal of Plant Developmental Biology*. 1: 64-74.

- Quinet M., Dielen V., Batoko H., Boutry M., Havelange A., Kinet J.M. (2006a). Genetic interactions in the control of flowering time and reproductive structure development in tomato (*Solanum lycopersicum*). *New Phytologist*. 170: 701-710.
- Quinet M., Dubois C., Goffin M.C., Chao J., Dielen V., Batoko H., Boutry M., Kinet J.M. (2006b). Characterization of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) mutants affected in their flowering time and in the morphogenesis of their reproductive structure. *Journal of Experimental Botany*. 57
- Radhamony R.N., Prasad A.M., Srinivasan R. (2005). T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis*: a tool for functional genomics. *Electr J Biotech* 8, 82-106
- Raven P.H., Evert R.F., Eichhorn S.E. (2005). *Biology of Plants*, 7th Edition, W.H. Freeman and Company Publishers, New York
- Rédei G.P. and Koncz C. (1992). Classical mutagenesis. In *Methods in Arabidopsis Research* (Koncz C., Chua N-H. and Schell J. eds.). Singapore: World Scientific. Pp. 16-82.
- Rick C. (1978). El tomate. *Scientific American* (edición española) Investigación y Ciencia. 25: 44-55.
- Rick C. and Butler L. (1956). Cytogenetics of tomato. *Advances in Genetic*. 8: 267-382.
- Rick C.M. (1971). The tomato *Ge* locus: Linkage relations and geographic distribution of alleles. *Genetics*. 67:75-85
- Rick C.M. and Sawant A.C. (1955). Factor interactions affecting the phenotypic expression of the *jointless* character in tomatoes. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sc.* 66: 354-360.
- Riechmann J.L. and Ratcliffe O.J. (2000). A genomic perspective on plant transcription factors. *Current Opinion in Plant Biology*. 3 (5): 423-434.
- Robbins T.P., Jenkin M., Courtney-Gutterson N. (1994). Enhanced frequency of transposition of the maize transposable element Activator following excision from T-DNA in petunia hybrida. *Molecular and general genetics*. 244 (5): 491-500.
- Robles P. and Pelaz S. (2005). Flower and fruit development in *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Developmental Biology*. 49: 633-643.
- Rommens C.M., Rudenko G.N., Dijkwel P.P., van Haaren M.J., Ouwkerk P.B., Blok K. M., Nijkamp H.J., Hille J. (1992). Characterization of the *Ac/Ds* behavior in transgenic tomato plants using plasmid rescue. *Plant Molecular Biology*. 20 (1): 61-70.
- Ross J.J., O'Neill D.P., Smith J.J., Kerckhoffs L.H.J., Elliot R.C. (2000). An *Arabidopsis* promoters gibberellin A₁ biosynthesis in pea. *Plant Journal*. 21 (6): 547-552.

- Rosso M.G., Li Y., Strizhov N., Reiss B., Dekker K., Weisshaar B. (2003). An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Mol Biol.* 53(1-2):247-59.
- Sallaud C., Gay C., Larmande P., Bès M., Piffanelli P., Piegú B., Droc G., Regad F., Bourgeois E., Meynard D., Périn C., Sabau X., Ghesquière A., Glaszmann J.C., Delseny M., Guiderdoni E. (2004). High throughput T-DNA insertion mutagenesis in rice: a first step towards in silico reverse genetics. *Plant Journal.* 39 (3): 450-464.
- Sallaud C., Meynard D., Van Boxtel J., Gay C., Bès M., Brizard J.P., Larmande P., Ortega D., Raynal M., Portefaix M., Ouwerkerk P.B.F., Rueb S., Delsany M., Guiderdoni E. (2003). Highly efficient production and characterization of T-DNA plants for rice (*Oryza sativa* L.) functional genomics. *Theoretical and Applied Genetics.* 106: 1396-1408.
- Samach A. and Lotan H. (2007). The transition to flowering in tomato. *Plant Biotechnology.* 24: 71-82.
- Sawhney V.K. (1992). Floral mutants in tomato: development, physiology and evolutionary implications. *Canadian Journal of Botany.* 81: 1640-1647.
- Sawhney V.K. and Shukla A. (1994). Male sterility in flowering plants: Are plant growth substances involved? *American Journal of Botany.* 81: 1640-1647.
- Schmitz G., Tillman E., Carriero F., Fiore C., Cellini F., Theres K. (2002). The tomato Blind gene encodes a MYB transcription factor that controls the formation of lateral meristems. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 99 (2): 1064-1069.
- Schumacher K., Schimitt T., Rossberg M., Schmitz G., Theres K. (1999). The *Lateral suppressor (Ls)* gene of tomato encodes a new member of the VHIID protein family. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 96: 290-295.
- Sessions A., Burke E., Presting G., Aux G., McElver J., Patton D., Dietrich B., Ho P., Bacwaden J., Ko C., Clarke J.D., Cotton D., Bullis D., Snell J., Miguel T., Hutchison D., Kimmerly B., Mitzel T., Katagiri F., Glazebrook J., Law M., Goff S. A. (2002). A high-throughput *Arabidopsis* reverse genetics system. *Plant Cell.* 14: 2985-2994.
- Seymour G.B., Manning K., Eriksson E.M., Popovich A.H., King G.J. (2002). Genetic identification and genomic organization of factors affecting fruit texture. *Journal of Experimental Botany.* 53 (377): 2065-2071.
- Seymour G., Manning K., Eriksson E., Popovich A., King G. (2002). Genetic identification and genomic organization of factors affecting fruit texture. *J. Exp. Bot.* 53: 2065-2071.

- Shuai B., Reynaga-Peña C.G., Springer P.S. (2002). The *LATERAL ORGAN BOUNDARIES* gene defines a novel, plant-specific gene family. *Plant Physiology*. 129: 747-761.
- Sigurbjörnsson B. (1975). The improvement of Barley through induced mutation. In *Barley Genetics III (Proceedings of the Third International Barley Genetics Symposium, Garching, Germany)*. Ed. H. Gaul. Pp: 84-95. München: Verlag Karl Thiemig.
- SOL Genomics: <http://solgenomics.net/>
- Soressi G.P. and Salamini F. (1975). A monomendelian gene inducing parthenocarpic fruits. *Report Tomato Genetic Cooperative*. 25: 22.
- Springer P.S. (2000). Gene traps: tools for plant development and genomics. *Plant Cell*. 12: 1007-1020.
- Springer P.S., McCombie W.R., Sundaresan V., Martienssen R.A. (1995). Gene trap tagging of *PROLIFERA*, an essential *MCM2-3-5-like* gene in *Arabidopsis*. *Science*. 268:877-880.
- Stadler L.J. (1928). Mutation in barley induced by X-rays and radium. *Science*. 67: 186-187.
- Stadler L.J. (1929). Chromosome number and mutation rate in *Avena* and *Triticum*. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*. 15: 876-881.
- Stearns J.C. and Glick B.R. (2003). Transgenic plants with altered ethylene biosynthesis or perception. *Biotechnology Advances*. 21: 193-210.
- Stoskopf N.C., Tomes D.T., Christie B.R.** (1993). *Plant Breeding Theory and Practice*. Westview Press, Boulder, CO
- Strickberger M.W. (1985). *Genetics*. 3rd edition. Ed. Prentice Hall. Inc. Upper Saddle River. N.J.
- Strizhov N., Li Y., Rosso M. G., Viehoveer P., Dekker K.A., Weisshaar B. (2003). High-throughput generation of sequence indexes from T-DNA mutagenized *Arabidopsis thaliana* lines. *Bio techniques*. 35(6): 1164-1168.
- Sundaresan V. (1996). Horizontal Spreads of transposon mutagenesis: new uses for old elements. *Trends in Plant Science*. 1 (6): 184-190.
- Sundaresan V., Springer P., Volpe T., Haward S., Jones J., Dean C., Ma H., Martienssen R. (1995). Patterns of gene action in plant development by enhancer trap and gene trap transposable elements. *Genes and Development*. 9: 1797-1810.
- Svitashev S.K. and Somers D.A. (2002). Characterization of transgene loci in plants using FISH: a picture is worth a thousand words. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 69 (3): 205-214.

- Szymkowiak E.J. and Irish E.E. (2006). *JOINTLESS* suppresses sympodial identity in inflorescence meristems of tomato. *Planta*: 223 (4): 646-658.
- Tadege M., Wen J., He J., Tu H., Kwak Y., Eschstruth A., Cayrel A., Endre G., Zhao P.X., Chabaud M., Ratet P., Mysore K.S. (2008). Large-scale insertional mutagenesis using the *Tnt1* retrotransposon in the model legume *Medicago truncatula*. *The Plant Journal*. 54: 335-347.
- Takken F.L., Schipper D., Nijkamp H.J., Hille J. (1998). Identification and *Ds*-tagged isolation of a new gene at the *Cf-4* locus of tomato involved in disease resistance to *Cladosporium fulvum* race 5. *Plant Journal*. 14 (4): 401-411.
- Tanskley S.D., Ganai M.W., Prince J.P., Vicente M.C., Bonierbale M.V., Broun P., Fulton T.M., Giovannoni J.J., Grandillo S., Martin G.B., Messeguer R., Miller J.C., Miller L., Paterson A.H., Pineda O., Riider M.S., Wing R.A., Wu W., Young N.D. (1992). High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics*. 132: 1141-1160.
- Tax F.E. and Vernon D.M. (2001). T-DNA-associated duplication/translocations in *Arabidopsis*: implications for mutant analysis and functional genomics. *Plant Physiology*. 126: 1527-1538.
- Tieman D.M. and Klee H.J. (1999). Differential expression of two novel members of the tomato ethylene-receptor family. *Plant Physiology*. 120: 165-172.
- Tieman D.M., Ciardi J.A., Taylor M.G., Klee J. (2001). Members of the tomato *LeEIL* (*EIN3-like*) gene family are functionally redundant and regulate ethylene responses throughout plant development. *Plant Journal*. 26 (1): 47-58.
- Till B., Colbert T., Tompa R., Enns L., Codomo C., Johnson J., Reynolds S., Henikoff J., Greene E., Steine M. (2003). High-throughput *TILLING* for functional genomics. in *Plant functional genomics: Methods and protocols*, ed Grotewald E. (Humana Press, Totowa, NJ)
- TOMATO GENETIC RESOURCE CENTER: TGRC, Univ. California, Davis:
<http://tgrc.ucdavis.edu>
- Topping J.F. and Lindsey K. (1995). Insertional mutagenesis and promoter trapping in plants for the isolation genes and the study of development. *Transgenic Research*. 4 (5): 291-305.
- Topping J.F. and Lindsey K. (1997). Promoter trap markers differentiate structural and positional components of polar development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 9: 1713-1725.

- Topping J.F., Agyeman F., Henricot B., Lindsey K. (1994). Identification of molecular markers of embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* by promoter trapping. *Plant Journal*. 5 (6): 895-903.
- Topping J.F., Wei W., Lindsey K. (1991). Functional tagging of regulatory elements in the plant genome. *Development*. 112: 1009-1019.
- Trieu A.T., Burleigh S.H., Kardailsky I.V., Maldonado-Mendoza I.E., Versaw W.K., Blaylock L.A., Shin H., Chiou T.J., Katagi H., Dewbre G.R., Weigel D., Harrison M.J. (2000). Transformation of *Medicago truncatula* via infiltration of seedlings of flowering plants with *Agrobacterium*. *Plant Journal*. 22 (6): 531-541.
- Vain P., Worland B., Thole V., McKenzie N., Alves S.C., Opanowicz M., Fish L.J., Bevan M.W., Snape J.W. (2008). *Agrobacterium*-mediated transformation of the temperate grass *Brachypodium distachyon* (genotype *Bd21*) for T-DNA insertional mutagenesis. *Plant Biotechnology Journal*. 6 (3): 236-245.
- Van der Biezen E.A., Brandwagt B.F., Van Leewen W., Nijkamp H.J.J., Ilille J. (1996). Identification and isolation of the *FEEBLY* gene from tomato by transposon tagging. *Molecular and General Genetics*. 251: 267-280.
- Van der Fits L. and Memelink J. (2000). *ORCA3*, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. *Science*. 289 (5477): 295-297.
- Van der Graaff E., Hooykaas P.J., Keller B. (2002). Activation tagging of the two closely linked genes *LEP* and *VAS* independently affects vascular cell number. *Plant Journal*. 32 (5): 819-830.
- Van der Hoeven R., Ronning C., Giovannoni J., Martin G., Tanksley S. (2002). Deductions about the number, organization, and evolution of genes in the tomato genome based on analysis of a large expressed sequence tag collection and selective genomic sequencing. *Plant Cell*. 14: 1441-1456.
- Verkerk K. (1971). Chimerism of the tomato plant after seed irradiation with fast neutrons. *Netherlands Journal of Agricultural Science*. 19: 197-203.
- Vrebalov J., Pan I.L., Arroyo A.J., McQuinn R., Chung Mi.Y., M., Rose J., Seymour G., Grandillo S., Giovannoni J., Irish V.F. (2009). Fleshy fruit expansion and ripening are regulated by the tomato *SHATTERPROOF* gene *TAGL1*. *The Plant Cell*. 21:3041–3062
- Vrebalov J., Ruezinsky D., Padmanabhan V., White R., Medrano D., Drake R., Schuch W., Giovannoni J. (2002). A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato ripening-inhibitor (*rin*) locus. *Science*. 2096: 343-346.
- Wang A., Lu S-D., Mark D.F. (1984). *Science*. 224: 1431-1433.

- Watanabe Sh., Mizoguchi T., Aoki K., Kubo Y., Mori H., Imanishi Sh, Yamazaki Y., Shibata D., Ezura H. (2007). Ethylmethanesulfonate (EMS) mutagenesis of *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom for large-scale mutant screens. *Plant Biotechnology*. 24:33-38.
- Waugh R., Leader D.J., Mc Callum N., Caldwell D. (2006). Haversting the potential of induced biological diversity. *Trend Plant Sci*. 11(2): 71-79.
- Webb K.J., Skot L., Nicholson M.N., Jorgensen B., Mizen S. (2000). Mesorhizobium loci increases root-specific expression of a calcium-binding protein homologue identified by promoter tagging in *Lotus japonica*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 13: 606-616.
- Wei W., Twell D., Lindsey K. (1997). A novel nucleic acid helicase gene identified by promoter tapping in *Arabidopsis*. *Plant Journal*. 11 (6): 1307-1314.
- Weigel D., Ahn J.H., Blázquez M.A., Borevitz J., Christensen S.K., Fankhauser C., Ferrándiz C., Kardailsky I., Malancharuvil E.J., Neff M.M., Nguyen J.T., Sato S., Wang Z., Xia Y., Dixon R.A., Harrison M.J., Lamb C.J., Yanofsky M. F., Chory J. (2000). Activation tagging in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 122 (4): 1003-1014.
- Wen J., Lease K.A., Walker H.C. (2004). *DVL*, a novel class of small polypeptides: overexpression alters *Arabidopsis* development. *Plant Journal*. 37 (5): 668-677.
- Wilkinson J.K., Lanahan M.B., Yen H. Ch., Giovannoni J.J., Klee H.J. (1995). An ethylene-inducible component of signal transduction encoded by never ripe. *Science*. 270 (5243): 1807-1809.
- Wilkinson J.Q., Lanahan M.B., Clark D.G., Bleecker A.B., Chang C., Meyerowitz E.M., Klee H.J. (1997). A dominant mutant receptor from *Arabidopsis* confers ethylene insensitivity in heterologous plants. *Nat Biotechnol* 15: 444-447
- Wu Ch., Li X., Yuan W., Chen G., Kilian A., Li J., Xu C., Li X., Zhou D.X., Wang Sh., Zhang Q. (2003). Development of enhancer trap lines for functional analysis of the rice genome. *Plant Journal*. 35 (3): 418-427.
- Yang Y., Peng H., Huang H., Wu J., Jia Sh., Huang D., Lu T. (2004). Large-scale production of enhancer trapping lines for rice functional genomics. *Plant Science*. 167: 281-288.
- Yano K., Aoki K., Shibata D. (2007). Genomic databases for tomato. *Plant Biotechnology*. 24: 17-25.
- Yeager A.F. (1927). Determinate growth in the tomato. *Journal of Heredity*. 18: 263-265.

- Yoder J.L. (1990). Rapid proliferation of the maize transposable element Activator in transgenic tomato. (*Plant Cell*). 2: 723-730.
- Yoder J.L., Palys J., Alpert K., Lassner M. (1988). *Ac* transposition in transgenic tomato plants. *Molecular and General Genetic*. 213 (2-3): 291-296.
- Yokotani N., Tamura S., Nakano R., Inaba A., Kubo Y. (2003). Characterization of a novel tomato *EIN3-like* gene (*LeEILA*). *Journal of Experimental Botany*. 54 (393): 2775-2776.
- Zambryski P., Depicker A., Kruger K., Goodman H.M. (1982). Tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens*: analysis of the boundaries of T-DNA. *J Mol Appl Genet*. 1(4):361-370.
- Zambryski P., Joos H., Genetello C., Leemans J., Montagu M.V., Schell J. (1983). Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J*. 2(12):2143-2150
- Zhao T., Palotta M., Langridge P., Prasad M., Graner A., Schulze-Lefert P., Koprek T. (2006). Mapped Ds/T-DNA launch pads for functional genomics in Barley. *Plant Journal*. 47 (5): 811-826.
- Zhao Y., Christensen S. K., Fankhauser C., Cashman J. R., Cohen J. D., Weigel D., Chory J. (2001). A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. *Science*. 291: 306-309.
- Zubko E., Adams C.J., Machaekova I., Malbeck J., Scollan C., Meyer P. (2002). Activation tagging identifies a gene from *Petunia* hybrid responsible for the production of active cytokinins in plants. *Plant J*. 29: 797-808.