

TRABAJO FIN DE MASTER

Caracterización de mutantes de inserción en *Solanum* *lycopersicum*



TUTOR: JUAN CAPEL SALINAS

ALUMNO: INAMCULADA FERIA FERNÁNDEZ

VºBº TUTOR:

ALUMNO:

JUAN CAPEL SALINAS

INMACULADA FERIA FERNÁNDEZ

AGRADECIMIENTOS:

Antes de nada me gustaría dar las gracias a mi tutor por haberme ayudado siempre que lo he necesitado y por el buen trato recibido por su parte, al mismo tiempo dar las gracias también a todos mis compañeros del laboratorio en especial a Laura ya que sin ella todo esto no habría sido posible. Este trabajo tiene algo de cada uno ellos, gracias a todos por vuestra paciencia.

ÍNDICE:

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN

1.1.TOMATE

- 1.1.1. Origen e historia**
- 1.1.2. Descripción botánica de la especie**
- 1.1.3. Importancia económica**
- 1.1.4. Mejora genética**

1.2.MUTACIÓN

1.3.TIPOS DE MUTACIONES

- 1.3.1. Mutaciones naturales o espontaneas**
- 1.3.2. Mutaciones inducidas**

1.4.TRASFERENCIA GENÉTICA

- 1.4.1. Agrobacterium Tumefaciens**
- 1.4.2. Vectores binarios**

1.5.OBJETIVOS

2. MATERIA Y MÉTODO

2.1.ANÁLISIS FENOTIPICO

2.2.ANÁLISIS FENOTIPICO

- 2.2.1. Cuantificación del número de inserciones**
 - 2.2.1.1.Extracción de DNA**
 - 2.2.1.2.Digestión con endonucleasas de restricción**
 - 2.2.1.3.Southern Blot**
- 2.2.2. Caracterización funcional y clonación de genes etiquetados**

2.2.2.1.Análisis por PCR

2.2.2.2.Anchor PCR

2.2.2.3.Purificación del producto de PCR

2.2.2.4.Transformación

2.2.2.5.Purificación del plásmido

2.2.2.6.Chequeo de colonias

2.2.2.7.PCR de secuenciación

2.2.2.8.Precipitación

2.2.2.9.Secuenciación

2.2.2.10.Análisis de secuencias

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1.ANÁLISIS FENOTIPICO

3.1.1. ANÁLISIS COLORIMÉTRICO

3.2.CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

3.3.CORRELACIÓN GENOTIPO FENOTIPO

4. BIBLIOGRAFÍA

RESUMEN

En este Trabajo Fin de Máster se ha caracterizado genética y funcionalmente una familia de mutantes de inserción de tomate (*Solanum lycopersicum*). A partir de una línea transgénica que mostró un patrón de maduración alterado, en el que los frutos era de un color poco uniforme, se ha procedido a caracterizar sus descendientes TG2. Después del correspondiente cultivo se ha procedido al análisis fenotípico y molecular o genotípico, para poder llevar a cabo una correlación entre ambos.

Se ha corroborado que la familia de plantas TG2 muestra un patrón de maduración alterado en el que las plantas muestran colores no uniformes y muy diferentes de las plantas del tipo varietal en la que se ha realizado la mutagénesis insercional. Sin embargo, el fenotipo de maduración alterado ha mostrado una influencia ambiental muy elevada. Por ello serán necesarias nuevas caracterizaciones de los descendientes de las plantas TG2 analizadas que permitan discernir cual es el modo de herencia del carácter estudiado.

Para la caracterización molecular se han realizado técnicas como el Southern blot y Anchor-PCR que han permitido clonar los fragmentos genómicos flanqueantes a las distintas inserciones de T-DNA identificadas. Una vez determinada la secuencia de esos fragmento, se procede a la búsqueda en las bases de datos para averiguar en qué zona del genoma de tomate se encuentra la inserción. Este resultado debería haber permitido el diseño de cebadores que amplifiquen específicamente cada fragmento. Sin embargo, el elevado número de inserciones de T-DNA que se han encontrado en la línea mutante analizada ha hecho imposible esta correlación. Serán necesarias nuevas generaciones de cultivo, ya en marcha, para identificar cual de la inserciones del T-DNA, si es que alguna, es la responsable de la mutación de maduración alterada presente en el mutante caracterizado

1. INTRODUCCIÓN:

1.1. TOMATE:

El tomate cultivable pertenece a la familia de las Solanaceas. Hay gran variedad de especies, siendo fácil su cruzamiento entra ellas y gracias a esta cualidad, a su adaptación climática y debido a que es una planta ampliamente cultivada y de gran interés agronómico, es una de las especies más estudiadas.

1.1.1. Origen e historia:

El tomate se originó muy probablemente en las tierras altas de la costa occidental de Sudamérica. Investigaciones posteriores han precisado que ésta y otras hortalizas se cultivaron en forma continua por las culturas que florecieron en los Andes. Estas investigaciones coinciden en asignar el origen del tomate a esta zona apoyados no sólo en la antigüedad de las evidencias arqueológicas, sino también a la gran cantidad de variedades silvestres que se pueden hallar aún en campos de esta parte de Sudamérica.

En todo caso, el tomate llegó a América Central por diversos medios. Los mayas y otros pueblos de la región lo utilizaron para su consumo, y se cultivaba en México meridional, y probablemente en otras áreas hacia el siglo XVI.

Los españoles distribuyeron el tomate a lo largo de sus colonias en el Caribe después de la conquista de Sudamérica. También lo llevaron a Filipinas y por allí entró al continente asiático.

1.1.2. Descripción botánica de la especie:

El tomate cultivado, *Solanum lycopersicum L.*, es una planta autógama, muy ramificada, rastrera y perenne, aunque se cultiva como anual. La raíz es pivotante pero tiende a ser fasciculada cuando la planta proviene de trasplante. Todas las partes vegetativas aéreas, junto con los pedúnculos, pedicelos y cálices florales son densamente pubescentes y glandulares, lo que da a la planta su olor característico. Los tallos son gruesos y angulosos, de color verde, con nodos compuestos de dos o, más comúnmente, tres hojas y una inflorescencia. En la axila de cada hoja aparece un tallo secundario. Según el tipo de crecimiento, las plantas pueden ser determinadas o indeterminadas. En las plantas de hábito de crecimiento indeterminado, carácter silvestre de la especie, hay un crecimiento nodal continuo a partir de que aparece la primera inflorescencia, entre la séptima y décima hoja

verdadera. Las plantas determinadas se caracterizan porque la primera inflorescencia aparece relativamente pronto, hay tendencia a que existan no más de dos hojas nodales entre racimos y el tallo principal termina en una inflorescencia. Las hojas son anchas, planas y pinnatisectas, con 7-11 foliolos. Las inflorescencias, de tipo racimo o cima, tienen un número de flores variable, generalmente de 7 a 12. Además, las inflorescencias pueden estar divididas o ser indivisas. Las flores son hermafroditas, perfectas, hipoginas y regulares. Los pedicelos poseen articulación funcional que actúa como zona de abscisión. El cáliz tiene cinco o más sépalos lanceolados y fusionados en la base. La corola está formada por cinco o más pétalos de color amarillo, lanceolados y fusionados en la base. Los sépalos son más pequeños que los pétalos aunque, al ser el cáliz acrescente, alcanzan un mayor tamaño con el desarrollo del fruto. Los estambres, cinco o rara vez seis, están fusionados a la corola por sus filamentos. Poseen anteras largas de color amarillo, conniventes, que forman un tubo en forma de botella en cuyo interior queda encerrado el estilo. Cada antera posee una extensión apical generalmente también fusionadas entre ellas. El pistilo está formado por un ovario compuesto. El fruto es una baya, generalmente de color rojo, bi- o multiloculada, con una gruesa placenta en la que se encuentran numerosas semillas recubiertas de una sustancia mucilaginosa. Están descritas una gran diversidad de formas y tamaños de frutos (Domínguez, 2000).

1.1.3. Importancia económica.

En la actualidad el tomate es un producto básico de la horticultura española y tiene gran importancia a escala mundial. En 2005 se cultivaron 4550 miles de hectáreas en todo el mundo, con una producción total de 125015 miles de toneladas (FAO, 2006).

Los principales países productores de tomate fueron China y Estados Unidos de América, ocupando España el séptimo lugar a escala mundial y el segundo tras Italia en el ámbito europeo. España se sitúa en tercer lugar según el rendimiento de su producción tras Israel y Estados Unidos y se mantiene como el principal país exportador, dedicando una superficie de cultivo de 70.400 hectáreas y obteniendo una producción total de 4473 miles de toneladas. El principal destino del producto exportado es el resto de países europeos, tanto como producto de consumo en fresco como tomate procesado. Actualmente se cultivan varios cientos de cultivares e híbridos de tomate que se han ido desarrollando como respuesta a la diversidad de la demanda que presenta el mercado (Leonardi y col., 1996).

1.1.4. Mejora genética.

La creciente demanda de alimentos, como consecuencia del constante crecimiento de la población dentro de una superficie limitada ha dirigido los esfuerzos en el campo de la agricultura hacia el aumento de la productividad, mediante la selección del material vegetal, que constituye el principio de la mejora genética. Con la mejora genética lo que se intenta es conseguir variedades más resistentes a factores tanto bióticos como abióticos.

Aunque la mejora clásica en estas variedades ha dado buen resultado, el avance en la biotecnología ha hecho que vayamos mas allá, pudiendo no solo combinar características dentro de la misma especie sino que además podemos intentar introducir caracteres que produzcan algún beneficio de otras especies.

En este caso la mejora genética es usada para mapeo de genes. Ya que lo que se hace es caracterizar el número de inserciones del mutante para posteriormente saber en que lugar del genoma se encuentra. Estas inserciones no llevan incluido en sus genes ningún gen foráneo, sino que lo que hacen es interrumpir un gen de interés.

1.2. MUTACIÓN:

Alteración en la secuencia del DNA de un individuo que se trasmite por herencia a sus descendientes. Las mutaciones se producen por errores en la replicación, por la alteración espontanea de nucleótidos o debida a acción de agentes físicos o químicos. Las mutaciones tienen lugar en cualquier parte del genoma, ya sea esta codificante o no.

El concepto de mutación fue introducido en 1901 por Hugo de Vries al observar cómo inesperadamente entre la descendencia de una planta llamada *Oenothera lamarckiana* había individuos gigantes. Las mutaciones nos sirven para llevar a cabo una correlación entre genotipo y fenotipo.

1.3. Tipos de mutaciones.

Monod, en su libro "El azar y la necesidad", considera a la mutación como resultante de un azar esencial, definiendo a éste como intrínseco e independiente del entorno celular. Asimila el proceso de mutación a un accidente, azaroso e imprevisible, que compara con una

colisión o encuentro accidental entre dos líneas de eventos absolutamente independientes (Monod, 1971).

Los estudios genéticos realizados en las décadas de 1940-1950 demostraron, por diferentes métodos, y en forma indiscutible, que las mutaciones ocurren en las bacterias independientemente del medio selectivo (Luria y Delbrück, 1943; Lederberg y Lederberg, 1952). Éstos se basaron en la detección de mutantes resistentes a un agente letal, como un antibiótico o un bacteriófago, que mataba la población sensible. Demostraron que las mutantes resistentes preexisten en el cultivo de las bacterias, previamente a la exposición al agente selectivo. Las mutaciones se generan en forma aleatoria, con una frecuencia expresada como tasa de mutación (número de mutantes por célula y por generación).

1.3.1. Mutaciones naturales o espontáneas.

Son las que se producen en condiciones normales de crecimiento y del ambiente. Representan la base de la evolución biológica.

1.3.2. Mutaciones inducidas.

Son las mutaciones provocadas artificialmente por algún agente exógeno generalmente conocido llamado agente mutágeno. Entre los agentes mutágenos encontramos:

- Agentes físicos:

- Radiaciones ionizantes: Como los rayos ultravioleta, los rayos X, partículas alfa, beta y gamma de fuentes radiactivas como el radio, uranio, cobalto, rayos cósmicos que aumentan con la disminución de la capa de ozono.
- Choque térmico.
- Ultrasonidos de altísima energía.
- Centrifugación masiva.

- Agentes químicos: Análogos de bases de ácidos nucleicos como la 5-bromouracilo, alcaloides como la cafeína, agentes que atacan al ADN (formalina), ácido nitroso, agentes alquilantes como el gas mostaza, colorantes de acridina (proflavina, acridina), carcinógenos (benzopireno), sulfato de cobre, ácido bórico, ácido fórmico, colchicina, uretano, drogas como el LSD, nicotina, edulcorantes como el ciclamato, peróxidos como el agua oxigenada y otros muchos más.

- Agentes biológicos: Virus, bacterias.

1.4. TRANSFERENCIA GENETICA

Para llevar a cabo un programa de mutagénesis insercional mediante T-DNA hay que realizar un proceso muy laborioso. Existen dos tipos de transformación: Directa y mediada por Vectores. La transformación directa es por métodos físicos, como por ejemplo, la microinyección, la biolística y la transformación de protoplastos por electroporación. En la transformación mediada por vectores encontramos a los virus, menos usados por su alta patogenicidad y principalmente la transformación llevada a cabo por *Agrobacterium*.

Primero se lleva a un medio de regeneración de callos y a continuación se lleva a un medio selectivo para excluir a los callos no transformados. Los callos transformados con el T-DNA son capaces de crecer in vitro gracias a que portan el gen de resistencia al antibiótico selectivo del medio. No todas las plantas son susceptibles a ser transformadas con *Agrobacterium*, como por ejemplo, las leñosas y es en estos casos donde se usa la biolística y/o transformación de protoplastos (Trigiano R. N. and Gray D. J., 2005).

En el caso de este trabajo la mutagenesis insercional se lleva a cabo por medio de *A. tumefaciens*.

1.4.1. *Agrobacterium tumefaciens*.

La bacteria es un patógeno de plantas, induciéndoles una malformación llamada tumor de la agalla. Establece con la planta una especie de "colonización genética" que obliga a la planta a fabricar una sustancia de la que sólo se puede nutrir esta bacteria. El tumor es una especie de fábrica de esas sustancias, para el solo beneficio de *Agrobacterium*.

La bacteria es atraída por sustancias que la planta excreta en sus zonas abiertas por pequeñas heridas. Por allí se introduce, quedando en los espacios intercelulares, y es entonces cuando transfiere a la célula vegetal un trozo de su material genético: una porción de un plásmido (ADN circular extracromosómico bacteriano), que se integrará en alguna zona del genoma de la planta.

- Descripción del plásmido Ti:

Posee borde izquierdo (LB), borde derecho (RB), gen de biosíntesis de hormona vegetal, gen de síntesis de opina, genes vir que provocan la transferencia del

trozo T, genes de catabolismo de opinas (que permiten que la bacteria se nutra de estas sustancias).

El T-DNA entra al núcleo y se inserta al azar en algún sitio del genoma. Allí se expresan sus dos genes: el de las hormonas provoca crecimiento descontrolado de las células vegetales (de ahí el tumor); el otro obliga a esas células a fabricar grandes cantidades de opinas, una sustancia que la planta no puede aprovechar, y la excreta.

Así pues, las bacterias se encuentran con un nicho ideal para nutrirse y multiplicarse: la planta se ha convertido en una especie de esclava metabólica que mantiene el crecimiento de la bacteria en el seno del tumor de la agalla.

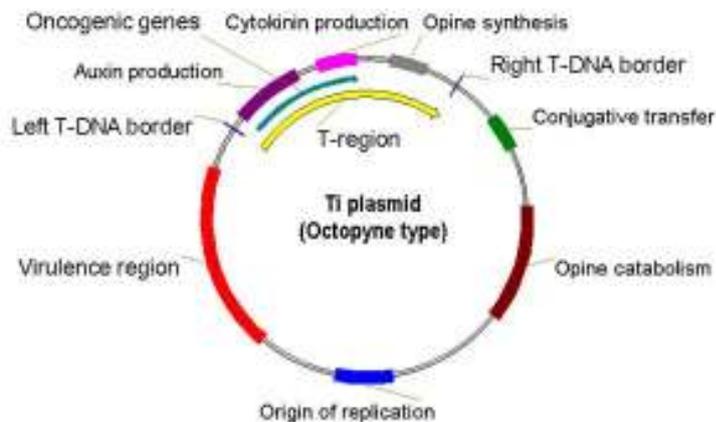


Fig.1 Plásmido de *Agrobacterium tumefaciens*. En esta figura podemos observar la región del plásmido que se inserta en la planta, está delimitada por left border y right border, además de los genes que provocan la infección en la planta

1.4.2. Vectores binarios:

Los vectores binarios, se caracterizan por tener dos orígenes de replicación, para multiplicarse tanto en *E. coli* como en *A. tumefaciens*, portan genes de resistencia a antibióticos usados para seleccionar la presencia del vector binario en la bacteria, no contienen genes de síntesis de auxinas, citoquininas ni de opinas, los cuales son sustituidos por el gen de interés, son plásmidos de menor tamaño y poseen sitios únicos de restricción localizados en un sitio de clonación múltiple (polilinker) (Lee L-Y. and Gelvin S.B., 2008).

El vector binario usado es el pD991, el cual tiene una construcción parecida al plásmido que porta *Agrobacterium*. Una vez introducido este plásmido en *Agrobacterium*, infectamos la planta y la bacteria es capaz de insertar un trozo del plásmido con bordes y

secuencia conocida y por lo que podemos buscarlo en DNA de la planta infectada, sabiendo así en que zona del DNA se encuentra posicionado este inserto.

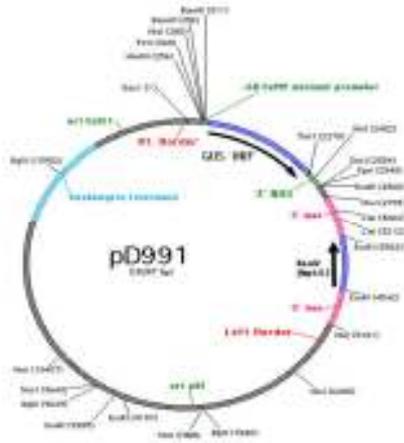


Fig.2 Plásmido pD991. Vector binario que posee extremos como los del plásmido Ti. Además posee zonas identificables en la zona de inserción.

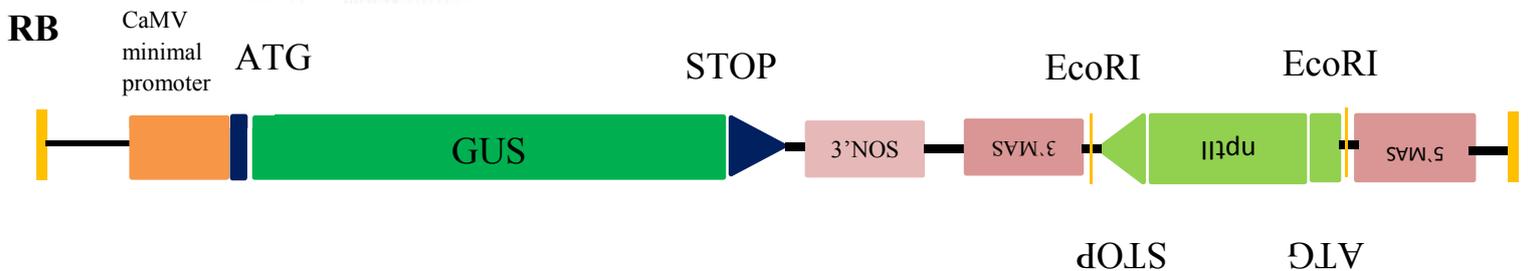


Fig 3. Esquema ampliado de la zona de inserción del plásmido pD991

1.5. OBJETIVOS:

Por medio de mutantes de inserción se pretende la caracterización de genes de interés agronómico en correlación con su fenotipo.

Para lograrlo vamos a buscar las regiones flanqueantes al T-DNA ya que el inserto va a provocar la interrupción de alguno de los genes del DNA de tomate, lo que va a producir un fenotipo que ira en relación al gen interrumpido.

Las plantas que tenemos son una TG2 que comenzaremos:

Caracterizando fenotípicamente observando que carácter se ha alterado con respecto al carácter original, viendo así el número de plantas que se encuentran alteradas.

Posteriormente se hará una caracterización molecular en la que buscaremos el número de inserciones y las zonas flanqueantes serán clonados para saber en qué zona del genoma de tomate se encuentran.

Una vez tengamos la información de que zona del DNA de tomate se encuentra alterando, se procederá a la producción de cebadores específicos, con lo que podremos correlacionar si tienen algo que ver estas inserciones con el fenotipo de los mutantes.

2. MATERIAL Y METODOS:

Para el análisis tanto fenotípico como molecular se ha procedido al cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*) en dos ambientes diferentes, para observar si las características fenotípicas cambian con el ambiente. Para ello se pusieron en semilleros 30 semillas de la TG2. De las cuales crecieron 18 plántulas con un desarrollo normal. 10 de estas plantas se trasplantaron a un invernadero de la dependencias de la Universidad, mientras que otras 8 fueron trasplantadas a la finca experimental de la FundaciónUAL-ANECOOP.

Con estas 18 plantas se comienza el siguiente estudio:

2.1 ANÁLISIS FENOTÍPICO:

Se han observado un total de 18 plantas TG2 que se encuentran alteradas en la maduración del fruto, las cuales presentan un patrón de coloración del fruto que no es uniforme.

Lo que se ha hecho es analizar como los frutos llevan a cabo su maduración en la planta sin recolectar, y alguno de ellos se ha observado su maduración después de su cosechado.

Además se le han hecho pruebas colorimétricas a algunos frutos de las plantas más representativas, para no quedarnos solamente con datos subjetivos sino que se pudiesen cuantificar. para este análisis se van a hacer medidas en un fruto de cada planta, tomando tres medidas de cada uno de ellos con lo que posteriormente se realizara una media. Además se harán las medidas en corona, ecuador y zona inferior del fruto.

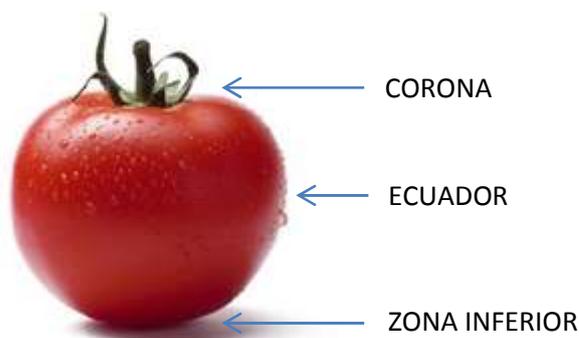


Fig.4 esquema de las zonas donde se ha realizado la colorimetría.

Una vez realizado esto se han extraído las semillas para una nueva plantación de este mutante.

2.2. ANÁLISIS MOLECULAR:

En este apartado se van a explicar las técnicas necesarias para poder localizar el número de inserciones que presenta el mutante y las regiones flanqueantes a estas inserciones.

2.2.1. Cuantificación del número de inserciones.

2.2.1.1. Extracción de ADN:

Se ha llevado a cabo por el protocolo de extracción de CTAB:

- Tomar muestras de hoja y poner en un eppendorf previamente rotulado y con una bola de tungsteno en su interior, ponerlo rápidamente en nitrógeno líquido.
- Poner las muestras en el agitador sin que se descongelen
- Una vez están las muestras pulverizadas se les añade una mezcla de 400µl de tampón de extracción CTAB y 2 µl de 2-mercaptoetanol, por cada muestra.
- Incubar en baño a 65-70°C durante 30 minutos. Mezclar por inversión de vez en cuando.
- Añadir 400 µl de Sevag (Cloroformo: alcohol isoamilico 24:1), mezclar con vortex hasta obtener una mezcla homogénea. Centrifugar a 10.000 rpm. durante 15 min. a 4°C.
- Transferir el sobrenadante a un tubo limpio, añadir 240 µl de isopropanol del congelador, y mezclar suavemente por inversión hasta observar unos hilos. Centrifugar a 13.000 rpm. durante 5 min. a 4°C. Quitar el sobrenadante y añadir 800 µl de tampón de lavado. Dejar lavando durante 20 min. en la nevera. (se puede dejar hasta el día siguiente en nevera)
- Centrifugar a 13.000 rpm. durante 5 min. a 4°C. Retirar el sobrenadante (volcar).
- Añadir 200 µl de etanol al 70% del congelador y centrifugar a 13.000 rpm durante 5 min. volcar el etanol rápidamente y dejar secar hasta que desaparezca el olor.
- Resuspender el pellet en 100 µl de MTE.
- Se puede dejar hasta el día siguiente
- Se le hace un tratamiento con RNAsa, se le añade 0.2 µl. Incubar a 37°C durante 1 hora

Después de la extracción hay que cuantificar el ADN, para ello necesitamos un gel de agarosa al 0.8% de agarosa. Se cargan las muestras y se les pone de marcadores $\lambda 100$ y $\lambda 500$, con estos marcadores vamos a poder saber que concentración de DNA hay en la muestra.

2.2.1.2. Digestión con endonucleasas de restricción.

El paso previo necesario para realizar una transferencia tipo Southern es la digestión enzimática del ADN genómico previamente aislado y purificado. En nuestro caso, el mapa de restricción del T-DNA nos ha conducido a utilizar las enzimas de restricción EcoRI, BamHI y HindIII. Se utilizaron entre 10-20 μg de ADN genómico para cada digestión, realizada en un volumen final de 150 μl que contenía 15 μl del Buffer 10X correspondiente a cada enzima, 60U de cada una de las tres enzimas elegidas, 1 μl de de una solución de ARNasa (10 mg/ml) y el volumen necesario de agua destilada estéril hasta completar el volumen final. Las reacciones se incubaron 8h a 37°C las digestiones con EcoRI y HindIII y a 30°C la digestión con BamHI. Las digestiones se precipitaron mediante la adición de 1/10 del volumen de Acetato de sodio 3M pH 5,2 y a continuación 2 volúmenes de etanol absoluto. Después de centrifugar y lavar el pellet, el ADN se resuspendió en 20 μl de TE 0,1N.

2.2.1.3. Southern Blot:

Utilizando una sonda podemos identificar un fragmento específico de la mezcla, mediante la técnica del papel secante desarrollado por E.M. Southern.

Después del fraccionamiento en gel de los fragmentos de DNA, se deposita una membrana absorbente sobre el gel se transfieren las bandas de DNA a la membrana por capilaridad. Una vez transferido a las membranas, las bandas de DNA ocupan las mismas posiciones relativas que en el gel. La membrana se sumerge en una solución con una sonda marcada, y luego se expone a una película sensible a rayos X para relevar la presencia de bandas que sean homologas a la sonda. El tamaño de las bandas en el gel pueden calibrarse corriendo en el mismo gel una mezcla de fragmentos de tamaño conocido.

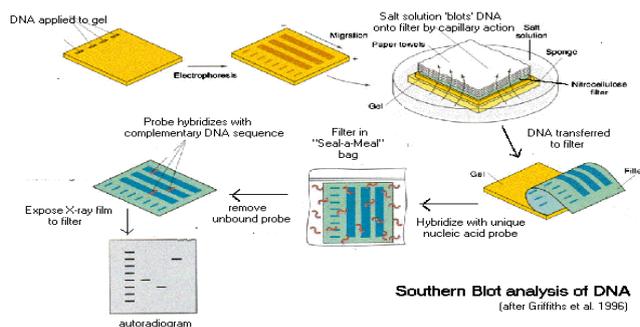


Fig.5 esquema de la realización de la técnica Southern Blot.

2.2.2. Caracterización funcional y clonación de genes etiquetados.

2.2.2.1. Análisis por PCR.

La reacción en cadena de la polimerasa, es una técnica de biología molecular desarrollada en 1986 por Kary Mullis (premio Nobel de química en 1993), cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento original, o molde.

Esta técnica sirve para amplificar un fragmento de ADN; su utilidad es que tras la amplificación resulta mucho más fácil identificar con una muy alta probabilidad virus o bacterias causantes de una enfermedad, identificar personas (cadáveres) o hacer investigación científica sobre el ADN amplificado.

Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar hebras de ADN, para lo cual emplea ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que vuelvan a unirse a polimerasas para que vuelvan a duplicarlas. La reacción en cadena de la polimerasa fue perfeccionada por Kary Mullis perteneciente a la Cetus Corporation en California SA, en la década de 1980.

Puesto que las temperaturas del ciclo (95 °C en las fases de desnaturalización del ADN), se emplean ADN polimerasas termoestables, extraídas de microorganismos adaptados a vivir a esas temperaturas, restrictivas para la mayoría de los seres vivos. Dichos microorganismos, generalmente arqueas, son: *Thermus aquaticus* (polimerasa Taq)

Todo el proceso de la PCR está automatizado mediante un aparato llamado termociclador, que permite calentar y enfriar los tubos de reacción para controlar la temperatura necesaria para cada etapa de la reacción.. Los tubos usados para PCR tienen una pared muy fina, lo que favorece una buena conductividad térmica, permitiendo que se alcance rápidamente el equilibrio térmico. Casi todos los termocicladores tienen un sistema que calienta la tapa de cierre con el fin de evitar la condensación sobre los tubos de reacción.

En este caso con esta técnica va a ser usada para la amplificación de fragmentos del T-DNA, para los cuales tenemos cebadores específicos.

Estas muestras posteriormente se cargan en un gel de agarosa junto con un marcador de tamaño conocido. Para saber si el fragmento de T-DNA se encuentra en la muestra de DNA de las plantas a estudiar.

2.2.2.2. Anchor PCR

Se usa para la clonación de las secuencias flanqueantes. Se trata de una PCR especial, en este caso es necesario previamente hacer una digestión de la muestra con enzimas de restricción.

Digestión: las enzimas de restricción provienen de bacterias que las utilizan para protección frente a fagos. Estas enzimas no cortan de manera aleatoria sino que cortan en dianas específicas del DNA.

Estas enzimas se mantienen junto con el DNA durante 3 horas a 37°C

Con esto vamos a tener diferentes fragmentos de cada uno de los DNAs de las plantas que estamos estudiando.

Posteriormente se le adhieren a esas secuencias unos adaptadores con una ligasa, para ello es necesario 1 hora a 37°C.

Con esto lo que conseguimos es hacer PCRs que se solapan, usando cebadores tanto del T-DNA como de los adaptadores sintéticos.

Una vez finalizado los pasos previos se procede a la PCR. Cada una de las PCR que vamos a hacer van a tener unos ciclos de tiempos y temperaturas diferentes.

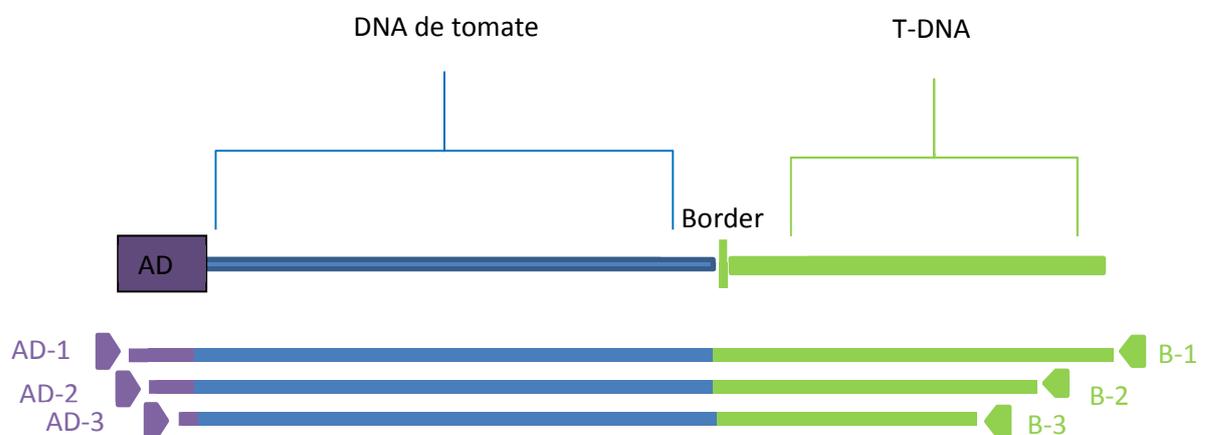


Fig. 6 Esquema de como actuarían los cebadores en las Anchor PCR.

PCR 1^a: en este caso se utiliza el DNA digerido y ligado directamente.

PCR 2^a: una vez realizada la PCR 1^a, se hace un dilución de la mezcla 1/50 y se utiliza 1µl de esta junto con los demás componentes en las cantidades ya dadas.

PCR 3^a: se hace lo mismo que en el caso anterior, pero en este caso la dilución es 1/100.

Una vez finalizada las tres PCR, los productos de las PCR 2^a y 3^a son cargadas en un gel de agarosa.

2.2.2.3. Purificación del producto de PCR:

Seleccionamos los productos de PCR del apartado anterior que se vean con mayor claridad. Para este paso vamos a utilizar un kit de purificación de plásmidos, se va a realizar según protocolo. (Genelute PCR Clean-Up Kit, Sigma Aldrich)

2.2.2.4. Transformación:

El PGEM-T es un vector que se encuentra de forma lineal, el cual posee en su extremo 3' que finaliza en una Timidina. Este extremo es el sitio de inserción que mejora la ligación, ya que previene la recircularización del vector.

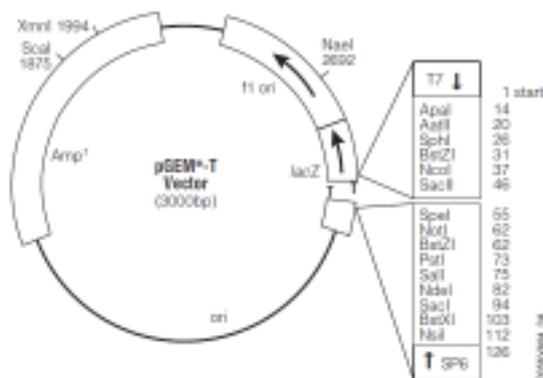


Fig.7 esquema detallado de las zonas que posee el vector pGEM-T

Se mezclan los componente y se deja a 37°C durante 1 hora o toda la noche a 4°C, para que los productos de PCR se inserten en el vector.

Una vez transcurrido ese tiempo vamos a poner esta reacción junto con 40µl de células competentes de *E.coli*. Para que estos plásmidos pasen al interior de las células es necesario abrir en las paredes celulares de estas pequeños poros que posteriormente para no producir la muerte de estas serán cerrados, para ello es necesario cambios bruscos de temperatura (Mandel e Higa 1970, J. Mol. Biol. 53, 159-162).

- 15 minutos en hielo
- 3 minutos a 37°C
- 5 minutos en hielo

Después se añade 900 µl de LB líquido autoclavado (10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl, y agua destilada hasta 1000 ml) y se mantiene a 37°C en agitación suave durante 1 hora.

En ese tiempo preparamos las placas que son de LB sólido autoclavado (igual al anterior pero a este se le añade agar) con ampicilina (0.1 mg/ml), a las que se les añade 40 µl X-Gal y 4 µl IPTG.

Los plásmidos que usamos tienen el gen de resistencia a ampicilina. Este gen codifica una β-lactamasa que hidroliza el anillo β-lactámico de la ampicilina, inactivándola. La ampicilina es una aminopenicilina con actividad antimicrobiana de amplio espectro. Inhibe la síntesis del péptidoglicano, constituyente de la pared bacteriana, en células en fase activa de crecimiento. Las bacterias que contienen este tipo de plásmidos se pueden seleccionar creciéndolas en presencia de ampicilina. Obviamente, las bacterias que no han incorporado el plásmido no crecerán en este medio de cultivo.

El añadir el X-Gal y el IPTG está basado en la expresión del Operón Lac y sirve para reconocer las bacterias recombinantes. Consiste en utilizar los reactivos IPTG y X-gal. El IPTG (isopropil-b-D-tiogalactósido) es un inductor artificial del gen lacZ, determinante de la b-galactosidasa. El sitio de clonación del plásmido se encuentra en el interior del gen lacZ, por lo tanto, cuando el plásmido sin inserto mantiene el gen lacZ intacto, la b-galactosidasa escinde el X-gal (un galactósido artificial), que le sirve como sustrato, las colonias tienen un aspecto azul por la degradación del X-gal. Si el gen lacZ es inactivado, por la presencia del inserto, las colonias presentan el color blanco.

Una vez transcurrido 1 hora, sembramos en las placas ya preparadas. En una de las placas vamos a poner 100 µl de la suspensión y en otra de las placas ponemos el resto previa centrifugación para concentrar la muestra.

Las placas estarán durante 24 horas en estufa a 37°C, tiempo necesario para que crezcan las colonias.

Vamos a obtener colonias blancas y azules, de las que nos interesan solamente las blancas. Las colonias seleccionadas serán aisladas, para obtener una única colonia.

Posteriormente vamos a poner en un tubo falcon cada una de estas colonias junto con 3000 μl de LB y 30 μl de ampicilina. Se mantiene en agitación a 37°C durante toda la noche.

2.2.2.5. Purificación del plásmido (Kit Promega).

Se lleva a cabo mediante un kit de purificación. Lo que conseguimos es que la células se rompan y sea expulsado al exterior todo el contenido de DNA, en este paso es importante el saber que el plásmido es de menor tamaño y superenrollado sufre menos daño y lo vamos a poder obtener intacto.

2.2.2.6. Chequeo de colonias.

Es una PCR especial, con esto lo que se pretende es saber si el fragmento que hemos clonado con el vector, es el que queríamos o ha sucedido alguna contaminación durante el proceso.

Ese producto de PCR será corrido en un gel de agarosa y tendrá que dar un tamaño superior al del fragmento que queremos clonar ya que hay que tener en cuenta también el tamaño del vector.

2.2.2.7. PCR de secuenciación.

Se preparan el doble de tubos de PCR que muestras tengamos, ya que para cada una de las muestras vamos a utilizar de forma independiente un cebador F y R.

2.2.2.8. Precipitación.

Se tienen que realizar en completa oscuridad. Se pone en un eppendorf todo el volumen de la PCR anterior, que en este caso son 10 μl , añadimos 1 μl de EDTA, 1 μl de Acetato 3 mM y 25 μl de etanol 100%. Mezclamos bien y se deja reposar durante 15 minutos. Una vez transcurrido ese tiempo se centrifuga a 14000 rpm durante 15 minutos, se retira el sobrenadante con pipeta y posteriormente se añade 35 μl de etanol en esta ocasión del 70%. Se centrifuga 10 minutos a 14000 rpm, se retira el sobrenadante y se deja seca. Una vez esta seca la muestra se le añade 10 μl de formamida para el envío de las muestras para ser secuenciadas.

2.2.2.9. Secuenciación.

La secuenciación de ADN es un conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuya finalidad es la determinación del orden de los nucleótidos (A, C, G y T) en un oligonucleótido de ADN.

Durante treinta años la mayor parte de la secuenciación de ADN se llevó a cabo con el método de terminación de la cadena desarrollado por Frederick Sanger y colaboradores en 1975. Antes del desarrollo de métodos rápidos de secuenciación del ADN a principios de los 70 por Sanger y Walter Gilbert y Allan Maxam, se utilizaban varios métodos de laboratorio. Por ejemplo, en 1975 Gilbert y Maxam publicaron una secuencia de 24 pares de bases utilizando un método conocido como "de punto corrido" (wandering spot).

Los secuenciadores automáticos de ADN llevan a cabo solamente separación del ADN basada en el tamaño (por electroforesis capilar), detección y registro de la coloración fluorescente, y los datos resultantes se dan como cromatogramas que registran los picos de fluorescencia.

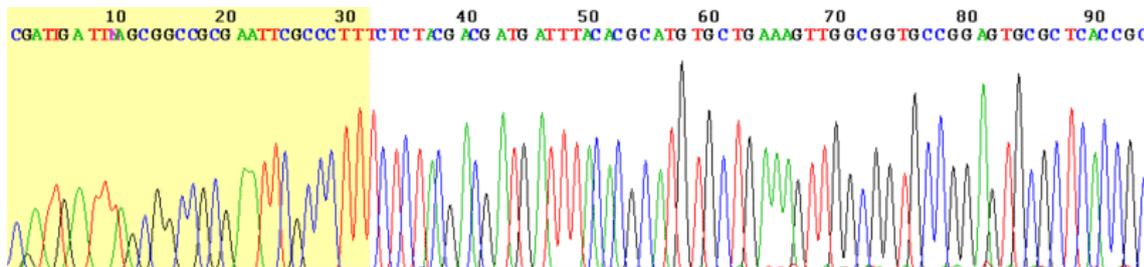


Fig.8 Ejemplo de un cromatograma

2.2.2.10. Análisis de las secuencias.

Una vez tenemos el cromatograma con las secuencias, con ayuda del blast (herramienta básica de alineamientos), podemos buscar en estas secuencias donde se encuentra el T-DNA y así con el DNA que se encuentra unido a esta secuencia y por medio de base de datos de genoma, podemos saber si este T-DNA se encuentra rompiendo algún gen con función conocida.

Con ello además podemos realizar cebadores con los que podemos saber cuál de nuestros individuos analizados poseen esa mutación en su genoma.

Con estos cebadores hacemos PCR junto con cebadores de plantas que no tuviesen la mutación y cebadores para NPTII como control.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

Tras la utilización de las técnicas descritas y sabiendo que se han cultivado en dos ambientes diferentes tenemos los siguientes datos:

3.1 ANÁLISIS FENOTIPICO:

Hemos podido observar que las 10 plantas cultivadas en el invernadero que se encuentra en la Universidad no han presentado un fenotipo claro, por lo que no la hemos tenido en cuenta en estudios posteriores de análisis molecular.

En el caso de las 8 plantas que cultivadas en la finca experimental de la Fundación UAL-ANECOOP se pudo observar que las muestras presentan un patrón de maduración alterado. Lo que les ocurre es que desde que el fruto aparece la parte superior del tomate no posee la misma coloración que el resto del tomate, siendo esta zona de un color verde más intenso. Una vez el fruto comienza a madurar la parte superior madura de manera más tardía y no homogéneamente como podemos observar en la figura 9.

Se observó también que no todos los frutos tienen esta zona con un verde tan intenso, debido a esto se hizo un análisis colorimétrico.



Fig.9 en la parte izquierda de la imagen se puede observar los frutos de 3 de las plantas (planta 11,12 y 13 en ese orden objeto de estudio en diferentes estadios de la maduración. La imagen de arriba corresponde con la maduración de un tomate moneymaker.

3.1.1. Análisis colorimétrico.

Los datos obtenidos tras analizar un fruto de cada una de las 8 plantas son los siguientes:

| | L* | L* | L* | A* | A* | A* | B* | B* | B* |
|-----|--------|---------|----------------------|--------|---------|----------------------|--------|---------|----------------------|
| | CORONA | ECUADOR | ZONA INFERIO R | CORONA | ECUADOR | ZONA INFERIO R | CORONA | ECUADOR | ZONA INFERIO R |
| I11 | 47.65 | 52.88 | 56.22 | -14.73 | -15.64 | -16.32 | 25.06 | 30.16 | 33.83 |
| I12 | 45.56 | 57.23 | 61.25 | -14.31 | -14.88 | -14.99 | 22.91 | 29.47 | 32.18 |
| I13 | 47.76 | 58.79 | 64.15 | -14.92 | -14.75 | -14.80 | 24.29 | 29.55 | 32.06 |
| I14 | 47.73 | 59.55 | 63.58 | -15.00 | -14.45 | -14.16 | 24.01 | 29.68 | 31.22 |
| I15 | 48.25 | 59.84 | 64.57 | -13.75 | -13.65 | -13.90 | 27.06 | 30.43 | 31.33 |
| I16 | 46.15 | 59.40 | 63.09 | -14.66 | -14.11 | -13.07 | 24.11 | 29.58 | 29.06 |
| I17 | 45.74 | 46.99 | 45.89 | -5.59 | 7.88 | 17.29 | 28.92 | 28.91 | 30.07 |
| I18 | 47.11 | 60.40 | 67.12 | -14.69 | -15.14 | -14.35 | 24.72 | 32.89 | 34.12 |

Tabla 1. Cuadro de datos de la colorimetría.

| | |
|-------------|-------|
| $\Delta E1$ | 3.03 |
| $\Delta E2$ | 2.66 |
| $\Delta E3$ | 0.29 |
| $\Delta E4$ | 3.33 |
| $\Delta E5$ | 3.73 |
| $\Delta E6$ | 10.27 |
| $\Delta E7$ | 10.11 |
| $\Delta E8$ | 2.68 |

Tabla 2. Tabla en la que se observan las diferencias entre las plantas con la fórmula:

$$\Delta E = \sqrt{(l_1 - l_2)^2 + (a_1 - a_2)^2 + (b_1 - b_2)^2}$$

En estos datos se puede observar que hay diferencias entre los diferentes individuos.

3.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR:

Una vez observado cómo se comportan las plantas en dos ambientes diferentes, las plantas que se ha caracterizado como mutantes se les realiza un Southern Blot para observar el número de inserciones que poseen.

Tras realizar el Southern de un pool de las 18 muestras se puede ver que da positivo para el fragmento NPTII del T-DNA. Con esto lo que sabemos que este mutante al menos tiene una inserción, pero esto no es concluyente ya que pueden sufrir el vector binario reorganizaciones e incluso haber perdido parte del fragmento de T-DNA.



Fig.10. Southern Blot del pool de las 18 muestras , en la imagen podemos observar que hay una sola inserción que tiene el marcador NPTII.

Para saber con más seguridad si en las muestras esta el marcador NPTII, se les hace a las 8 muestras que han crecido en el invernadero de investigación de la FundaciónUAL-ANECOOP una PCR para el marcador NPTII y además se pone también una zona de la inserción que es el extremo 5'MAS, mostrándose los resultados en la siguiente figura.

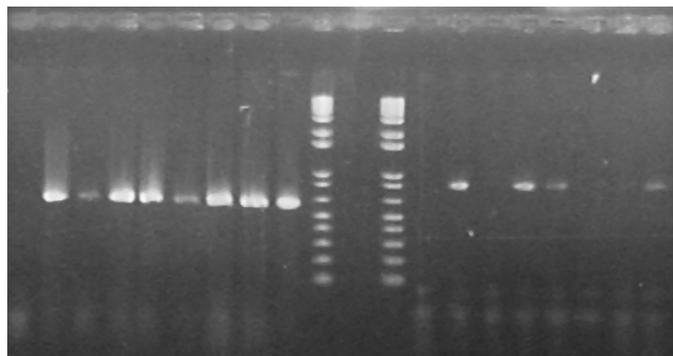


Fig.11 PCR fragmento NPTII y 5'MAS respectivamente.

En esta figura podemos observar que algunas de las plantas poseen ambos fragmentos, otras el fragmento 5'MAS y solo una de las plantas no posee ninguno de los dos marcadores. Esto nos lleva a pensar que estos mutantes de inserción poseen más de una inserción.

Para averiguar en qué zona del genoma se encuentran estas inserciones se realizan los Anchor PCR, se comienzan por hacerlos por el RB del T-DNA

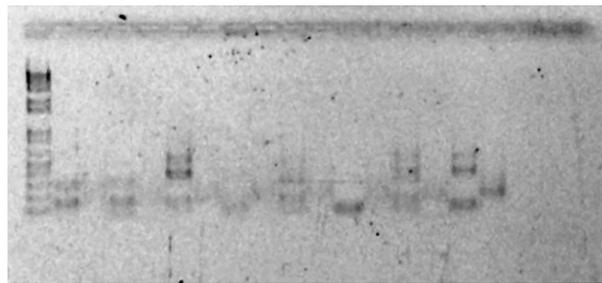


Fig.12 Anchor PCR por RB de una de las muestras.

En esta figura se pueden observar que no existe ningún fragmento que pueda ser clonado, debido a esto se realizan Anchor por el LB. En este caso se realiza a tres de los individuos. Se realiza a la muestra 11 la cual es la única que no posee ninguno de los fragmentos (NPTII y 5'MAS), la muestra 12 que posee ambos y la 13 que solo posee el fragmento 5'MAS, todo esto podemos verlo en la figura 13 y 14.

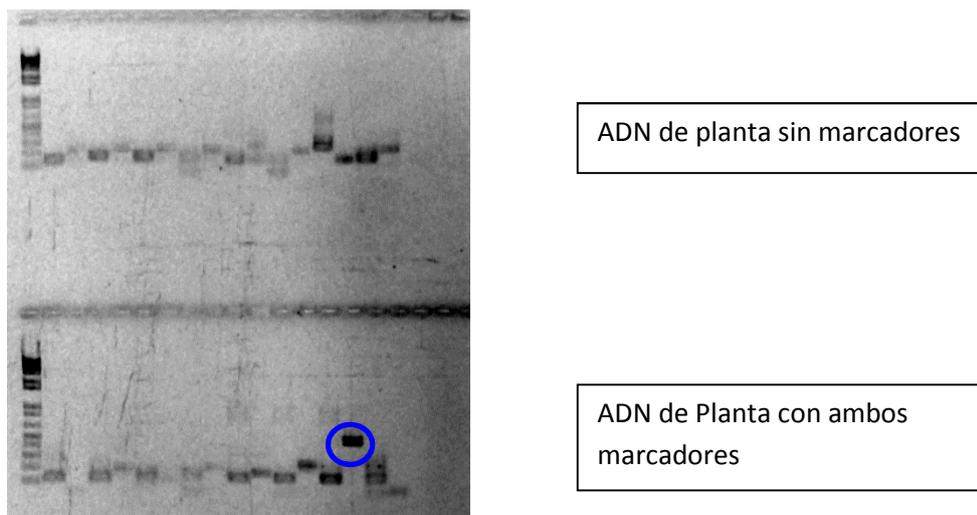


Fig. 13 Anchor PCR LB de las muestras 11 y 12 respectivamente.

Una vez secuenciada y buscada en la base de datos lo que sabemos de esta secuencia es que el T-DNA estaba insertado en la posición 29575140 del cromosoma 3 de tomate., pero no se encuentra en un gen aun caracterizado.

A partir de la secuencia se diseñan los siguientes cebadores y con ellos poder saber cuáles de mis plantas tienen el alelo mutante o el alelo WT.

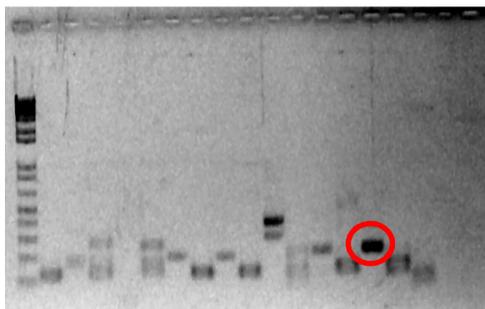
IF95MUTF TAACGCTGCGGACATCTACA

IF95MUTR : CTTGCTTGCAGCCCTCTAAT

Cebadores wt

IF95WTF: CCGCGTTTTGACTTGAATTT

IF95WTR: TGTATGAACCCCTCCGAGTC



ADN de Planta con 5'MAS

Fig.14 Anchor PCR LB, de la muestra 13.

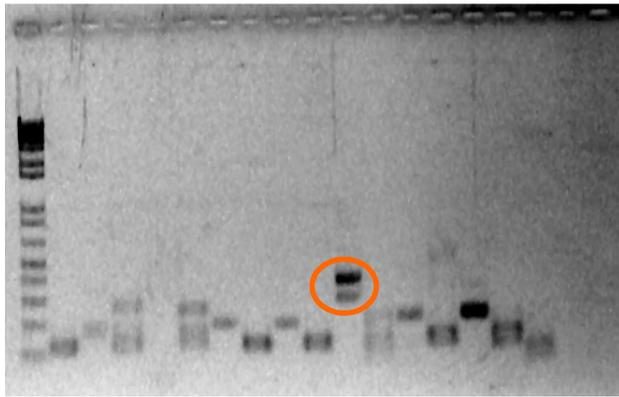
En el caso del fragmento que tenemos subrayado en rojo, no obtenemos datos en las bases por lo que cabe pensar que en este caso no solo se ha insertado el T-DNA sino que se ha podido insertar parte del plásmido pD991, por lo que se construyen cebadores para poder salir por otro de los extremos hasta el DNA de tomate.

LITA G →1°

LITAIF1: **CCATCATACTCATTGCTGATCC** →2°

LITAIF2: **GCCATTTACAATTGAATATATCCTG** →3°

Probamos a secuenciar otro de los productos de PCR del mismo anchor que se muestra en la figura 14.



Los productos de las reacciones Anchor PCR marcadas con círculo de color naranja se clonaron y secuenciaron. La secuencia de uno de los clones obtenidos fue la siguiente:

El análisis de esta secuencia indica que se ha clonado un nuevo inserto en el que el T-DNA estaría inserto en la posición 21722147 del cromosoma 1.

El análisis de esta secuencia indica que el T-DNA se ha insertado en una región de secuencia repetida del genoma de tomate del que no se ha encontrado una secuencia 100% idéntica, lo que impide conocer el lugar exacto en el que se ha insertado el T-DNA.

Se realizan cebadores para las inserciones encontradas para llegar a saber cuál de estas inserciones es la que se encuentra causando el fenotipo mutante.

Esto nos indica que en el mutante se ha producido más de una inserción y que estas están en posiciones diferentes del DNA de tomate.

Se muestra en la siguiente figura el alineamiento de las cuatro inserciones que se han encontrado, observándose las secuencias que se repiten en todas las inserciones.

```

inserto1      ATAATAACGCTGCGGACATCTACATTTTTGAATTGAAAAAAGTTGGTAATTACTCTTTC  60
inserto2      ATAATAACGCTGCGGACATCTACATTTTTGAATTGAAAAAATTTGGTAATTACTCTTTC  60
inserto3      ATAAAAACGCTGCGGACATCTACATTTTTGAATTGAAAAAATTTGGTAATTACTCTTTC  60
inserto4      ATAATAACGCTGCGGACATCTACATTTTTGAATTGAAAAAATTTGGTAATTACTCTTTC  60
              ****  *****

inserto1      TTTTCTCCATATTGACCATCATACTCATTGCTGATCC  TGGTATACAGCTTCCTCAACAC  120
inserto2      TTTTCTCCATATTGACCATCATACTCATTGCTGATCC  ATGTAGATCTGACTCAAAGACC  120
inserto3      TTTTCTCCATATTGACCATCATACTCATTGCTGATCC  TACTCAGATTTCCACCTAGCAC  120
inserto4      TTTTCTCCATATTGACCATCATACTCATTGCTGATCC  TTGATGGCATGCATTCCTGGAC  120
              *****
    
```

Fig. 15 Alineamiento de las cuatro inserciones.

De este alineamiento se deduce que el Left border que usa el pD991 en el genoma de tomate no es el mismo que otros vectores binarios utilizan y que se ha considerado la secuencia consenso, pues en las bases de datos dicen que el leftborder es la secuencia que está subrayada en el alineamiento entre la secuencia del inserto 2 y la secuencia del vector binario pLH7500 depositadas en las bases de datos de secuencias (AY234331) que se muestra en la figura 16.

```

Inserto2 1      ATAATAACGCTGCGGACATCTACATTTTTGAATTGaaaaaaaaATTGGTAATTACTCTTTC 60
|
pLH7500  8748   ATAATAACGCTGCGGACATCTACATTTTTGAATTGAAAAAAAAATTGGTAATTACTCTTTC 8689
|
Inserto2 61      TTTTCTCCATATTGACCATCATACTCATTGCTGATCCATGTAGATTTCCCGGACATGAA 120
|
pLH7500  8688   TTTTCTCCATATTGACCATCATACTCATTGCTGATCCATGTAGATTTCCCGGACATGAA 8629
|
Inserto2 121     GCCATTTACAATTGAATATATCCTGCCGCCGCTGCCGCTTTGCACCCGGTGGAG 174
|
pLH7500  8628   GCCATTTACAATTGAATATATCCTGCCGCCGCTGCCGCTTTGCACCCGGTGGAG 8575

```

Fig. 16. Comparación de los vectores de clonación con el inserto 2.

3.3. CORRELACIÓN GENEOTIPO FENOTIPO:

Debido al número de inserciones, a que estas se encuentran en diferentes cromosomas y que alguna de ellas se encuentran en zonas repetidas del genoma, no es posible la caracterización siendo necesario una siguiente generación con la que se podrá observar la segregación de este carácter. Esta nueva generación de plantas ya se está cultivando para ello. Además decir que ha sido complicado debido al bajo número de plantas que nacieron en la TG2, esto puede deberse a alguna de las inserciones que se ha conseguido identificar.

4. BIBLIOGRAFÍA:

- **Citovsky V. et al. (2004).** Agrobacterium T-DNA integration: molecules and models. Trends in Genetics.
- **José Luque.** Libro de biología molecular e ingeniería genética.
- **Wiley & Sons, (2004).** Analysis of Genes and Genomes, R. Reece
- **Gloria Maria López Casado.** Tesis doctoral Universidad de Málaga. “Biomecánica de la epidermis y la cutícula del fruto de tomate (*Solanum Lycopersicum L.*) y su relación con el agrietado.
- **Stanton B. Gelvin, a, and Sang-Ic Kima (2007).** Effect of chromatin upon Agrobacterium T-DNA integration and transgene expression. aDepartment of Biological Sciences, Purdue University, West Lafayette, IN 47907-1392, USA.
- **D. Nicholl (Cambridge, 2008).** An Introduction to Genetic Engineering 3rd Ed.
- **Lee L-Y. and Gelvin S.B. (2008).** T-DNA binary vectors and systems. Plant Physiology.
- **J. Berg, J. Tymoczko, L. Stryer (Freeman, 2006).** Biochemistry 6th Ed.
- **R. Schleif (Johns Hopkins, 1993).** Genetics and Molecular Biology.
- **T. A. Brown (Garland Science, 2002).** Genomes 2nd Ed. - T. A. Brown.
- **R. Reece (Wiley & Sons, 2004).** Analysis of Genes and Genomes.
- **D. Hartl, E. Jones (Jones and Bartlett, 1998).** Genetics, Principles and Analysis 4th Ed.
- **A. Griffiths (McGraw-Hill, 2002).** Genética 7a Ed.
- **Emmanuel E. and Levy A. (2002).** Tomato mutants as tools for functional genomics. Current Opinion in Plant Biology, Vol. 5, 112-117.

