
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA



TRABAJO DE FIN DE GRADO

**Variación morfológica en la arquitectura
radicular en una colección de especies
silvestres, variedades comerciales y
mutantes de tomate**

Francisco Javier Gran Gómez

Directores: José Manuel Pérez Pérez

Aurora Alaguero Cordovilla

Departamento de Biología Aplicada

Área de Genética

Curso 2016-17



Instituto de Bioingeniería

Universidad Miguel Hernández

JOSÉ MANUEL PÉREZ-PÉREZ, Profesor Titular de Universidad en el área de conocimiento de Genética de la Universidad Miguel Hernández de Elche, y

AURORA ALAGUERO CORDOVILLA, Titulada Superior del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

HACEMOS CONSTAR

que el presente trabajo ha sido realizado bajo nuestra dirección y recoge fielmente la labor realizada por el alumno Francisco Javier Gran Gómez. Las investigaciones reflejadas en esta memoria se han desarrollado íntegramente en la Unidad de Genética del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche.



José Manuel Pérez-Pérez



Aurora Alaguero Cordovilla

Elche, 6 de septiembre de 2017

RESUMEN

Con este Trabajo de Fin de Grado pretendemos contribuir a la disección genética del proceso de formación y desarrollo del sistema radicular en una planta de interés agronómico, como el tomate cultivado. Hemos caracterizado la morfología de la raíz principal en plántulas jóvenes que han crecido en condiciones de cultivo *in vitro*, así como de las raíces laterales y las adventicias en respuesta a herida. Se han utilizado semillas correspondientes a 11 especies silvestres de tomate, 4 variedades comerciales y 5 mutantes. Nuestros resultados nos han permitido seleccionar los genotipos de tomate que presentan características diferenciales de su sistema radicular con fin de utilizarse, en un futuro, para aumentar el rendimiento en la producción de tomates a nivel agrícola e industrial.

PALABRAS CLAVE: raíces adventicias, arquitectura radicular, variación natural, caracteres cuantitativos, *Solanum lycopersicum*

ABSTRACT

The aim of this work is to contribute to the genetic dissection of the processes involving root system formation and development in tomato, a highly valued agronomic crop. We have morphologically characterized some traits regarding primary root development, as well as lateral and adventitious root formation after wounding; using a previously-established *in vitro* culture system. Seeds of 11 wild tomato species, four commercial varieties and five mutants have been used in this work. Our results allowed us to select the genotypes with differential characteristics of their root system with the purpose of increasing tomato production at an agricultural and industrial scale.

KEY WORDS: adventitious roots, root architecture, natural variation, quantitative traits, *Solanum lycopersicum*.

ÍNDICE GENERAL

Página

1.. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 CARACTERÍSTICAS DEL TOMATE.....	1
1.2 TAXONOMÍA DEL TOMATE.....	1
1.3 EL TOMATE COMO MODELO EXPERIMENTAL.....	3
1.4 CARACTERÍSTICAS DEL SISTEMA RADICULAR.....	4
1.4.1 RAÍZ PRINCIPAL.....	5
1.4.2 RAÍCES LATERALES.....	6
1.4.3 RAÍCES ADVENTICIAS.....	6
2.. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	8
3.. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
3.1 MATERIAL VEGETAL.....	10
3.2 CULTIVO DE TOMATE.....	11
3.3 ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE LAS RAÍCES POR EL MÉTODO DE TINCIÓN mPS-PI.....	13
3.4 OBTENCIÓN DE LAS IMÁGENES.....	14
3.5 TRATAMIENTO DE IMÁGENES.....	15
3.6 PRUEBAS ESTADÍSTICAS.....	15
4.. RESULTADOS.....	16
4.1 SELECCIÓN DE LAS LÍNEAS A ESTUDIO.....	16
4.2 GERMINACIÓN.....	16
4.3 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LA ARQUITECTURA RADICULAR.....	18
4.3.1 RAÍZ PRINCIPAL.....	18
4.3.2 RAÍCES LATERALES.....	20
4.3.3 RAÍCES ADVENTICIAS.....	27
5.. DISCUSIÓN.....	33
6.. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA.....	35
7.. BIBLIOGRAFÍA.....	37
8.. ANEXO.....	41

ÍNDICE DE TABLAS

Página

Tabla 1	Líneas de tomate estudiadas en este trabajo.....	10
Tabla 2	Valor de P en los parámetros de la raíz principal en <i>S. lycopersicum</i> var. Craigella.....	18
Tabla 3	Valor de P en los parámetros de las raíces laterales en <i>S. lycopersicum</i> var. Craigella.....	21
Tabla 4	Valor de P en los parámetros de las raíces adventicias en <i>S. lycopersicum</i> var. Craigella.....	28



ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1	Taxonomía del fruto del tomate.....	2
Figura 2	Taxonomía del tomate.....	3
Figura 3	Sistema radicular en tomate.....	5
Figura 4	Localización de las especies de tomate utilizadas en este trabajo.....	11
Figura 5	Esquema del protocolo seguido para la realización del fenotipado de las líneas estudiadas.....	13
Figura 6	Algunas líneas estudiadas en este trabajo.....	16
Figura 7	Porcentaje de germinación de las líneas estudiadas.....	17
Figura 8	Longitud relativa de la raíz principal en las líneas estudiadas.....	19
Figura 9	Ángulo de la raíz principal con respecto a la vertical en las líneas estudiadas.....	20
Figura 10	Número relativo de raíces laterales en las líneas estudiadas.....	22
Figura 11	Número relativo de densidad de raíces laterales en todas las líneas estudiadas.....	23
Figura 12	Longitud promedio de las raíces laterales en las líneas estudiadas.....	24
Figura 13	Valor absoluto de ángulo de crecimiento de las raíces laterales en las líneas estudiadas.....	25
Figura 14	Dirección de crecimiento de las raíces laterales en las líneas estudiadas.....	26
Figura 15	Microscopía confocal del ápice de raíces laterales en las variedades comerciales así como en los genotipos mutantes analizados.....	27
Figura 16	Número de raíces adventicias en las líneas estudiadas.....	28
Figura 17	Densidad de raíces adventicias en las líneas estudiadas.....	29
Figura 18	Longitud de raíces adventicias en las líneas estudiadas.....	30
Figura 19	Ángulo de crecimiento de las raíces adventicias en las líneas estudiadas...	31

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Características del tomate

El tomate cultivado (*Solanum lycopersicum* L.) es una planta herbácea, autógama y perenne cuyo fruto es una baya carnosa con una elevada variabilidad de tamaños y formas y un alto valor nutricional (Ensminger *et al.*, 1995). Se ha demostrado que estos frutos son beneficiosos para la salud, ya que contienen vitaminas A y C, minerales como el potasio y carotenoides como el licopeno, un compuesto altamente antioxidante. Los extractos de tomate, ricos en carotenoides, producen efectos beneficiosos en la oxidación postprandial del LDL (lipoproteínas de baja densidad), en la insulina y en la glucosa (Deplanque *et al.*, 2016). Además, su elevada biodisponibilidad en el tejido prostático, hace que contribuya a la prevención del cáncer de próstata (Chen *et al.*, 2015). También se ha estudiado que la ingesta del fruto del tomate reduce el riesgo de padecer cáncer o una enfermedad cardiovascular (Canene-Adams *et al.*, 2005). Por estas y otras características organolépticas, el tomate cultivado es uno de los vegetales más comercializados a nivel mundial, con una gran importancia económica. Según datos de la FAO, en 2014 se produjeron 170 millones de toneladas de tomate en el mundo, siendo China el primer país productor (52 toneladas), seguido de India (18 toneladas). España es el octavo país del mundo con mayor producción de tomate (5 toneladas).

El tomate, pertenece a la familia de las solanáceas, grupo de gran importancia en cultivos hortícolas donde podemos encontrar más de 3.000 especies. A esta familia pertenecen, entre otras, especies alimenticias tan importantes como la berenjena (*Solanum melongena* L.), el pimiento (*Capsicum annuum* L.) y la patata (*Solanum tuberosum* L.). Dentro del género *Solanum* se incluyen especies medicinales como la belladona (*Atropa belladonna*) o plantas ornamentales como la *petunia* (*Petunia × hybrida*) (Weese y Lynn, 2007). Las especies del género *Solanum* pueden encontrarse tanto en regiones templadas como tropicales, viviendo en hábitats muy diferentes como son desiertos o bosques tropicales y con grandes variaciones de altitud (Warnock, 1991).

1.2. Taxonomía del tomate

La taxonomía empleada hoy en día para el tomate cultivado es la siguiente: Reino: Plantae; Subreino: Traqueobionta; Superdivisión: Spermatophyta; Clase: Magnoliopsida;

Subclase: Asteridae; Orden: Solanales; Suborden: Solanineae; Familia: Solanaceae; Género: *Solanum*; Especie: *lycopersicum* (Foolad, 2007).

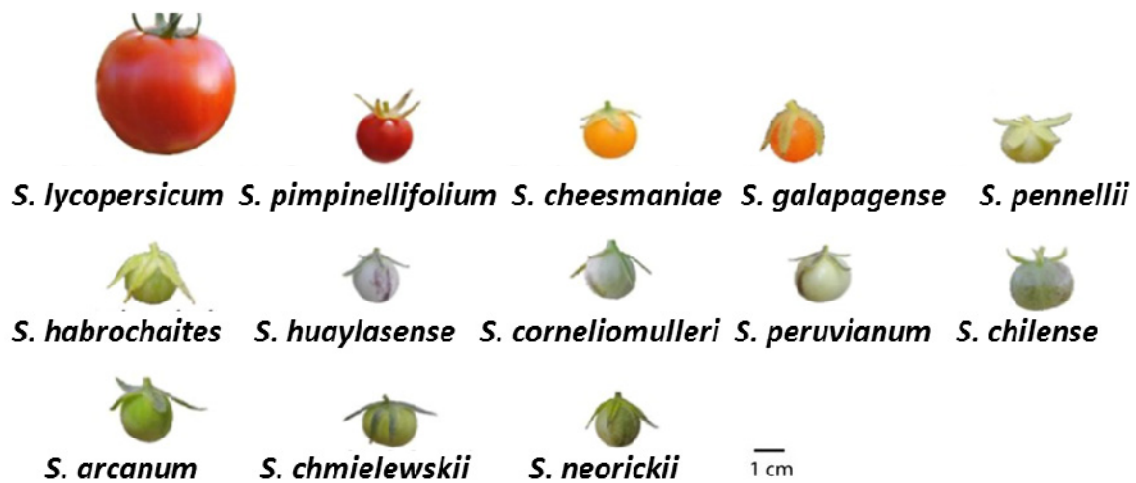


Figura 1. Taxonomía del fruto del tomate. Diferencias morfológicas en los frutos de los tomates de la especie cultivada (*S. lycopersicum*) y las variedades silvestres relacionadas. Tomado de Li y Chetelat (2015), con modificaciones.

El tomate fue introducido en Europa en el siglo XVI, siendo descrito como *Solanum pomiferum* (Bergougnoux, 2013). Anguillara (1561) fue el primero que denominó al tomate como *lycopersicon*. El carácter multilocular del fruto hizo que Tournefort (1694) considerara que los tomates cultivados debían pertenecer a un género distinto llamado *Lycopersicon*, diferenciándolo así del género *Solanum*. Linneo (1753) fue el primero en clasificar al tomate como *Solanum lycopersicum*, pero Miller al año siguiente lo renombró como *Lycopersicon esculentum*, para que de esta forma fuera aceptado como planta comestible, debido a que con esta nueva clasificación ya no se relacionaba con la belladonna y la mandrágora. Tras muchos años de debate, el tomate cultivado se introdujo dentro del género *Solanum* como *Solanum lycopersicum*, confirmando la clasificación de Linneo (Foolad, 2007; Peralta y Spooner, 2006).

En 1940, Miller fue el primero en hacer una clasificación del tomate (Figura 2). Identificó seis especies de tomate separadas en dos secciones: subgénero *Eulycopersicon* y subgénero *Eriopersicon*. Rick (1979) llevó a cabo una clasificación en base a la capacidad de las especies silvestres para cruzarse con el tomate cultivado, en ella distinguió nueve especies de tomate que se dividían en dos según su capacidad de cruce: el grupo *Esculentum* y el grupo *Peruvianum*, siendo las especies pertenecientes a *Esculentum* las que podían hibridar con el tomate cultivado. Más tarde Child (1990) clasificó a los tomates dentro del subgénero

Potatoe, sección *Lycopersicum*, y los dividió en tres series debido a la caracterización molecular del ADN nuclear y cloroplástico (Palmer y Zamir, 1982; Miller y Tanksley 1990: Spooner *et al.*, 1993).

En la actualidad se consideran 13 especies de tomate, incluyendo el tomate cultivado (Figura 1) y las entradas (*accessions*) silvestres que se dividen en cuatro grupos: (1) el grupo *Lycopersicon* que comprende las especies *S. lycopersicum*, *S. pimpinellifolium*, *S. cheesmaniae* y *S. galapagense*, (2) el grupo *Neolycopersicon*, en el que se encuentra *S. pennellii*, (3) el grupo *Eriopersicon*, donde se agrupan las especies *S. peruvianum*, *S. corneliomulleri*, *S. huaylasense*, *S. habrachaites* y *S. chilense* y finalmente (4) el grupo *Arcanum*, donde se encuentran las especies *S. arcanum*, *S. chmielewskii* y *S. neorickii* (Peralta *et al.*, 2008). (Figura 2).

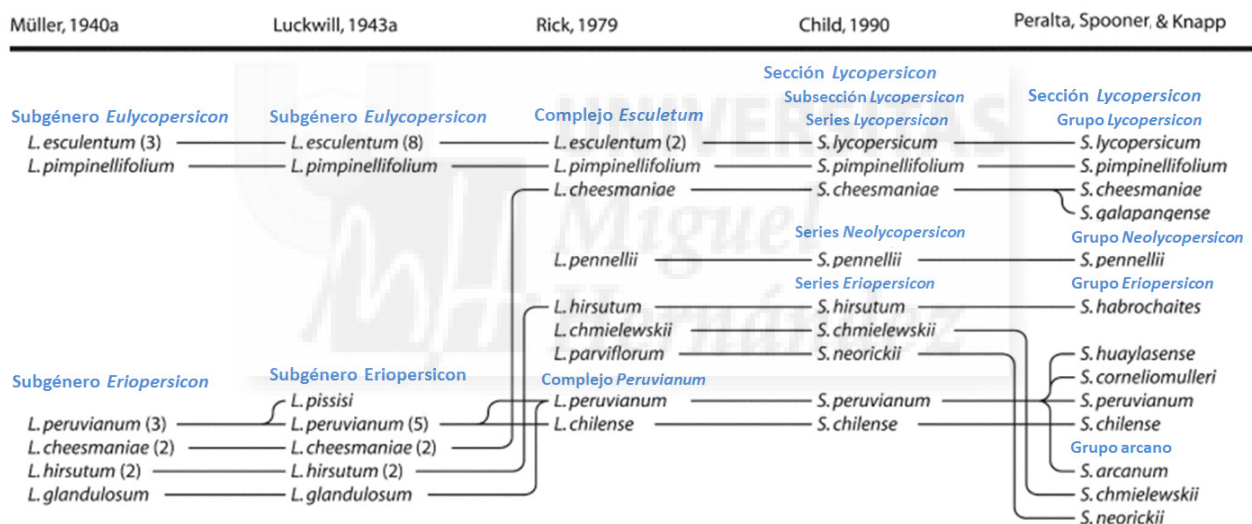


Figura 2: Taxonomía del tomate. *S. lycopersicum* y sus variaciones a lo largo de los años. Especies silvestres relacionadas. Tomado de Peralta *et al.*, (2008), con modificaciones.

1.3. El tomate como modelo experimental

La planta de tomate presenta características que podrían hacer de ella un modelo biológico experimental adecuado para el estudio de la biología vegetal en las solanáceas. Entre estas características cabe destacar que se trata de una especie autógama diploide, con un genoma pequeño (950 Mb en 12 cromosomas) que se encuentra completamente secuenciado (Tomato Genome Consortium, 2012) y que dispone de un mapa genético con una gran cantidad de marcadores asociados a características importantes (<https://solgenomics.net/>).

Para estudiar los rasgos importantes en tomate, se obtuvieron colecciones de mutantes que son dominio público (Emmanuel y Levy, 2002) y gracias a la intervención de más de 300 investigadores se consiguió completar la secuenciación de su genoma en 2012 (Tomato Genome Consortium, 2012). El tomate es un modelo experimental muy interesante cuando se quieren estudiar rasgos de las plantas como son; la formación de frutos carnosos (Vrebalov *et al.*, 2009), el desarrollo de las hojas compuestas (Shani *et al.*, 2010), la interacción con patógenos de relevancia económica (Uehara *et al.*, 2010), y la interacción de las raíces con los microorganismos del suelo para la formación de micorrizas (Song *et al.*, 2015), entre otras.

Las especies silvestres, normalmente suelen estar restringidas a climas y suelos particulares por lo que no crecen en todos los ambientes. La adaptación de estas especies a los diversos climas puede ser una de las principales causas de la diversidad genética en el tomate. Esta variación suele expresarse con cambios fisiológicos, morfológicos y rasgos sexuales (Peralta *et al.*, 2005). En cambio, la variabilidad genética del tomate cultivado es muy limitada, debido principalmente a la selección natural durante la domesticación (Ladizinsky, 1985). Solo un 5% de la variabilidad total del género *Solanum* está presente en *S. lycopersicum* (Miller y Tanksley 1990). Por tanto, se ha tratado de aumentar la diversidad genética utilizando para ello las especies silvestres emparentadas. Primero debemos identificar variabilidad en el carácter que deseamos modificar y después tratar de introducir esa variabilidad en nuestra variedad de interés (Francia *et al.*, 2005). De esta forma se ha intentado aumentar el rendimiento en tomate (Bernacchi *et al.*, 1998; Gur y Zamir, 2004).

Además de las mutaciones inducidas, la variación genética natural es amplia en las especies silvestres de *Solanum* la mayoría de las cuales son interfértiles y susceptibles de cruzarse con el tomate cultivado (Stevens *et al.*, 1986). Estas especies son una fuente valiosa de loci de rasgos cuantitativos o QTL, y de la variación alélica de los principales genes (Bai *et al.*, 2007). El hallazgo de nuevos fenotipos e identificación de nuevos alelos procedentes de especies silvestres se podría facilitar mediante el uso de líneas de introgresión (Eshed *et al.*, 1994).

1.4. Características del sistema radicular

Las raíces son órganos encargados de fijar la planta al sustrato terrestre, absorber agua y sales minerales de forma selectiva y acumular sustancias de reserva en sus células. Además,

pueden actuar como barrera selectiva frente a diferentes patógenos (Naseer *et al.*, 2012). Estos órganos están formados por tres capas principales: epidermis, córtex y endodermis, junto con los tejidos vasculares y el periciclo (Figura 3A). Además de la raíz principal, las plantas pueden presentar raíces secundarias que se desarrollan a partir de bifurcaciones de la raíz principal (raíces laterales de primer orden) o a partir de otras raíces laterales (raíces laterales de segundo, tercer orden, etc.) En el tomate el sistema radicular es axonomorfo, a partir de la raíz principal se forman las raíces laterales (Figura 3B). Además, en algunas plantas, entre las que se encuentra el tomate, puede observarse otro tipo de raíces, las raíces adventicias, que tienen un origen postembrionario y se forman a partir de estructuras de la parte aérea de la planta, como pueden ser los hipocótilos, las hojas o los tallos (Figura 3C). Esta formación de raíces adventicias puede darse de forma natural o en respuesta a diferentes tipos de estrés (Casson y Lindsey, 2003).

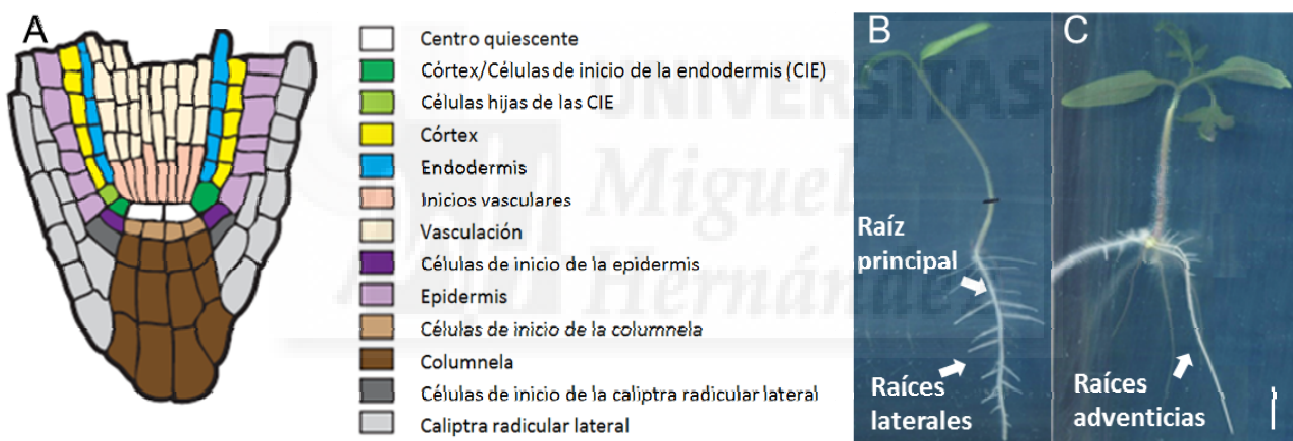


Figura 3. Sistema radicular en tomate. (A) Esquema detallado de las capas que componen el ápice de una raíz. Imagen sacada de Petricka *et al.* (2009) con modificaciones. (B) Sistema radicular en *S. lycopersicum* y (C) raíces adventicias tras una herida. La barra de escala indica 10 mm.

1.4.1. Raíz principal

La radícula es la raíz inicial de una planta que se desarrolla durante la embriogénesis y está presente en el embrión dentro de la semilla. La raíz principal deriva de la elongación de la radícula durante la germinación de las plantas vasculares. En gimnospermas y dicotiledóneas, incluyendo plantas como *Arabidopsis thaliana*, el tomate y plantas perennes leñosas como el álamo (*Populus spp.*), la raíz principal crece para convertirse en una raíz central gruesa que puede desarrollar raíces laterales (Esau, 1977).

1.4.2. Raíces laterales

Tienen un origen postembrionario y surgen de células del periciclo de las raíces ya existentes, como puede ser la raíz principal. Dependiendo de la especie, pueden derivar de células del periciclo adyacentes a las células polares del xilema, como por ejemplo pasa en *Arabidopsis thaliana*, o de células polares del floema como en maíz (*Zea mays* L.) (Casero *et al.*, 1995). Este proceso se ha definido con claridad en *Arabidopsis* donde la formación de la raíz lateral comienza con la primera división celular en las células del periciclo y se han identificado siete etapas en la adquisición de la identidad celular y la organización de tejidos hasta que se observa el primordio de raíz lateral emergente (Malamy *et al.*, 1997).

1.4.3. Raíces adventicias

La formación de raíces adventicias consiste en la generación de órganos radiculares *de novo* a partir de estructuras maduras (Bellini *et al.*, 2014). Estas raíces crecen a partir de órganos que no forman parte del sistema radicular, y esta característica ha sido ampliamente utilizada en la propagación vegetativa por esquejes. La formación de raíces adventicias a través de esquejes de tallo es un método de propagación común (De-Klerk *et al.*, 1999), que permite la propagación clonal de variedades élite y de especies que generan malas semillas o con baja germinación.

A pesar del amplio uso de las raíces adventicias en el sector agronómico, la base molecular de este proceso todavía es poco conocida, aunque se ha asociado su formación al tejido vascular (Bellini *et al.*, 2014). El origen de estas raíces sigue siendo todavía hoy incierto, ya que se han observado diferencias dependiendo de la especie y del tejido u órgano a partir del cual se desarrollan. En *Arabidopsis* se generan a partir de las células del periciclo adyacentes al xilema, de manera parecida a las raíces laterales (Sukumar *et al.*, 2013).

Las raíces adventicias se pueden desarrollar de manera natural o en respuesta a algún tipo de estrés como ya se ha comentado anteriormente. Las heridas y las inundaciones inducen la formación de raíces adventicias en muchas especies como una estrategia para adaptarse a estas condiciones de estrés (Mergemann y Sauter, 2000).

La variación genética natural que controla la formación de órganos adventicios *in vitro* podría provenir de genes reclutados durante la evolución para mejorar la asignación de recursos a través de la formación de órganos supernumerarios (Ochoa *et al.*, 2006) o para

hacer frente a estreses, reemplazando los brotes o raíces después de los episodios de incendio (Kauffman *et al.*, 1991), herbivoría (van der Meijden *et al.*, 1988), o inundación (Mano *et al.*, 2005).



2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

En el laboratorio del Prof. José Manuel Pérez Pérez y en el marco del proyecto “*Genómica comparada de la formación de raíces adventicias en tomate y clavel (BIO2015-64255-R)*”, se están llevando a cabo distintas aproximaciones experimentales para entender las bases genéticas de la formación de raíces adventicias en las plantas (<http://arolab.edu.umh.es/>). La mayoría de los estudios de mejora genética realizados hasta la fecha en tomate y otras solanáceas han centrado su atención en la parte vegetativa de la planta y, especialmente, en el fruto, dejando de lado el sistema radicular (Gebhardt, 2016). Contribuir a la disección genética del proceso de formación y desarrollo del sistema radicular en una especie vegetal de interés agronómico, como el tomate, es clave para incrementar la eficiencia en la captación de agua y nutrientes y, por ende, aumentar la productividad vegetal (Rogers y Benfey, 2015).

Este Trabajo de Fin de Grado se centra en el estudio de algunos parámetros relevantes de la arquitectura radicular en una selección de especies silvestres de tomate emparentadas con el tomate cultivado, *S. lycopersicum*, así como con algunas variedades comerciales de tomate y mutantes afectados en el desarrollo del sistema radicular. Se han seguido las pautas experimentales definidas en un trabajo previo, en el que se estudió la formación de raíces adventicias mediante la escisión de la raíz principal (Alaguero, 2016). De los 910 mutantes en genes individuales que se han descrito en la colección de líneas del Tomato Genetics Resource Center (TGRC) de la Universidad de California, únicamente 13 se dice que presentan algún tipo de alteración en el sistema radicular. Hemos seleccionado 6 de ellos para el estudio detallado de la arquitectura radicular en nuestras condiciones experimentales.

Los objetivos específicos de este Trabajo de Fin de Grado son:

- Diseñar y evaluar un protocolo para el estudio de la raíz principal, las raíces laterales y las adventicias en plántulas de tomate cultivadas *in vitro*.
- Caracterizar la variación fenotípica del sistema radicular, raíz primaria y raíces laterales, durante el desarrollo temprano en una selección de especies silvestres, variedades comerciales y mutantes de tomate.

- Caracterizar la variación fenotípica existente en la morfología del sistema radicular adventicio en respuesta a herida en una selección de especies silvestres, variedades comerciales y mutantes de tomate.
- Estudiar la estructura tisular del meristemo apical en alguna de las líneas estudiadas.



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material vegetal

En el presente trabajo se va a realizar un estudio fenotípico del sistema radicular de especies pertenecientes a los 4 grupos en los que se clasifican las especies de tomate y que se han descrito en el apartado de introducción. Las especies con las que se ha realizado este trabajo, su variedad, la serie en la que se clasificaron en el laboratorio y el nombre de entrada en el TGRC (Tomato Genetic Resource Center) se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Líneas de tomate estudiadas en este trabajo

Grupo	Especie/variedad o mutación	Código de entrada en el TGRC
Lycopersicon	<i>S. lycopersicum</i> /Moneymaker ^a	LA2706
Lycopersicon	<i>S. lycopersicum</i> /Craigella ^a	LA3247
Lycopersicon	<i>S. lycopersicum</i> /Perú ^a	LA1324
Lycopersicon	<i>S. lycopersicum</i> /Ecuador ^a	LA1479
Lycopersicon	<i>S. lycopersicum</i> /umbrosa ^c	LA0630
Lycopersicon	<i>S. lycopersicum</i> /rosette ^c	LA0270
Lycopersicon	<i>S. lycopersicum</i> /ridget ^c	LA1794
Lycopersicon	<i>S. lycopersicum</i> /aerial root ^c	LA3205
Lycopersicon	<i>S. lycopersicum</i> /dwarf root ^c	LA3207
Lycopersicon	<i>S. galapagense</i> ^d	LA1044
Lycopersicon	<i>S. pimpinellifolium</i> ^d	LA1578
Lycopersicon	<i>S. cheesmaniae</i> ^b	LA1037
Neolycopersicon	<i>S. pennellii</i> ^d	LA0716
Eriopersicon	<i>S. huaylasense</i> ^d	LA1983
Eriopersicon	<i>S. corneliomulleri</i> ^b	LA1274
Eriopersicon	<i>S. chilense</i> ^b	LA1932
Eriopersicon	<i>S. peruvianum</i> ^b	LA1336
Arcanum	<i>S. arcanum</i> ^d	LA2157
Arcanum	<i>S. chmielewskii</i> ^d	LA2663

^avariedades comerciales, ^bespecies silvestres adaptadas a ambientes extremos, ^cespecies generadas por mutación, ^despecies silvestres.

En este trabajo se ha realizado un estudio fenotípico del sistema radicular de distintas especies de tomate pertenecientes a los cuatro grupos descritos en el trabajo de Peralta en 2008; *Lycopersicon*, *Neolycopersicon*, *Eriopersicon* y *Arcanum*. Además se han incluido 5 líneas que han sido generadas por mutación en el fondo genético de *S. lycopersicum*. Las líneas se dividieron en 4 series para su mejor estudio en el laboratorio (Tabla 1). En todas las series se puso como control la variedad Craigella de *S. lycopersicum*. Las líneas empleadas fueron proporcionadas por el TGRC. En la Figura 4 se puede observar el lugar de procedencia de las líneas de tomate de las que el TGRC tiene información del lugar de procedencia en su página web y que se han utilizado en este trabajo.

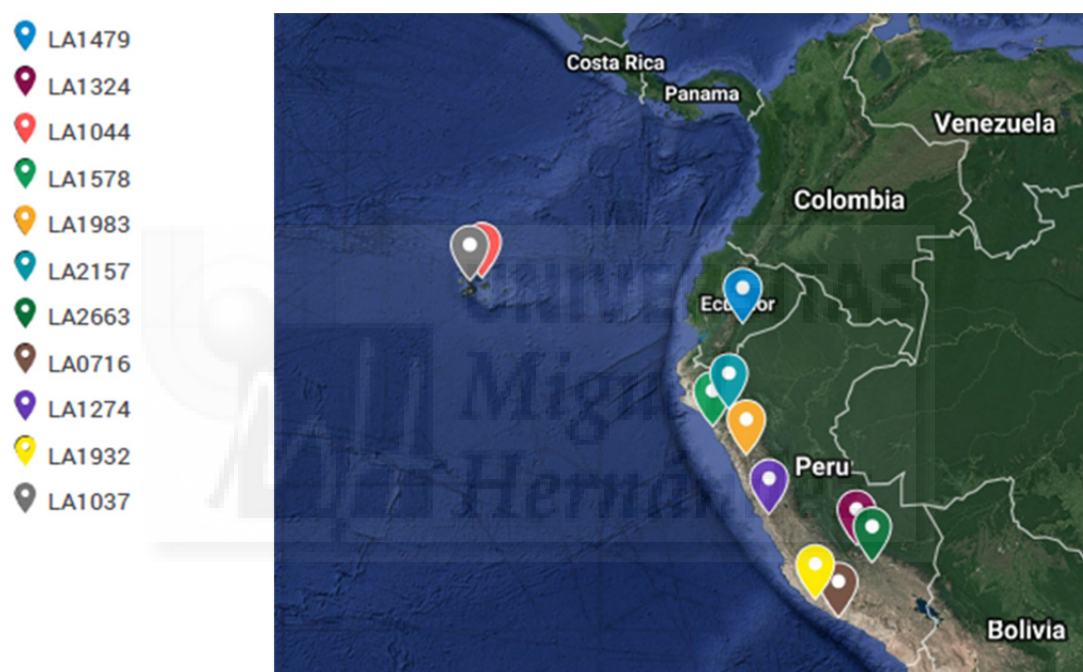


Figura 4. Localización de las especies de tomate utilizadas en el trabajo. Únicamente se representan las variedades que contienen información sobre su localización en el TGRC.

3.2. Cultivo de tomate

Las semillas empleadas durante el trabajo (20 semillas de cada variedad) se esterilizaron mediante inmersión en una solución de lejía comercial (37 gramos de cloro activo por litro) al 50% con agua destilada durante 10 min con agitación manual, utilizando para ello tubos *Eppendorf* de 1,5 mL. A continuación, se retiró la solución de lejía y se llevaron a cabo 4 lavados con 1 mL de agua destilada estéril (los dos primeros de 5 min y los dos últimos de 10 min). A continuación se depositaron las semillas en cajas de Petri estériles de 120x120 mm con papel de filtro autoclavado humedecido a modo de cámara húmeda, se sellaron las

placas con Parafilm y se introdujeron en una estufa (Selecta) a 28°C durante 48 h para favorecer la germinación. Posteriormente, se contabilizaron las semillas germinadas de cada variedad y aquellas que habían germinado se transfirieron a cajas de Petri de 240x240 mm que contenían 150 mL de medio de cultivo MS, autoclavado previamente (121°C durante 20 min): 2,15 g/L de sales de Murashige y Skoog (Duchefa), 20 g/L de sacarosa, 2 ml/L de solución de vitaminas Gamborg 500x (Duchefa), 0,5 g/L tampón MES (ácido 2-[N-morfolino]etano sulfónico) (Duchefa). Se ajustó el pH a 5,8 empleando para ello una disolución de KOH a 1 M y se añadieron 2,5 g/L de Gelrite (Duchefa), gelificante que permite el estudio del sistema radicular ya que es totalmente transparente. El medio de cultivo se introdujo en las cajas de Petri en condiciones de esterilidad empleando para ello una cabina de flujo laminar horizontal (Telstar AH100). Se colocaron 12 semillas por caja (2 filas de 6 semillas) dispuestas de forma equidistante. A continuación, las cajas se incubaron en condiciones de fotoperiodo de día largo (16 h de luz y 8 h de oscuridad) a 24/20°C (día/noche) en una cámara de cultivo BioClim. Las cajas se cambiaron de lugar diariamente dentro de la cámara de cultivo para homogeneizar las condiciones ambientales recibidas por las plantas.

A las 72 horas de la germinación, se cortaron los ápices (5 mm) de las raíces para promover la formación de raíces laterales, de manera similar a cómo se había descrito previamente en *Arabidopsis thaliana* (Van Norman *et al.*, 2014), realizando un corte en la base del ápice y empleando un bisturí estéril en la cabina de flujo laminar horizontal. A los 6 días después de la germinación (72h después del corte de la raíz principal) se indujo la formación de raíces adventicias en el hipocótilo cortando la raíz principal, nuevamente en la cabina de flujo laminar. Para ello, se cortó el tercio inferior del hipocótilo de cada planta para evitar la presencia de primordios radiculares adventicios que pudieran estar ya formados en el hipocótilo de las plantas. Los explantos de hipocótilo se transfirieron a nuevas cajas de Petri de 240x240 mm que contenían 150 mL de medio MS, autoclavado previamente. A los 10 días después del corte de la raíz principal (16 días después de la germinación) se procedió al recuento de las raíces adventicias.

Tras finalizar los experimentos, 2 plantas de cada genotipo se transfirieron a macetas que contenían una mezcla de turba (J&P Viverismo) y perlita (Proquilab) (relación 1:1) y se depositaron en el invernadero en condiciones de riego controladas (4 min de riego cada 6 h)

con el fin de obtener semillas, donde estuvieron creciendo desde el mes de abril hasta agosto.

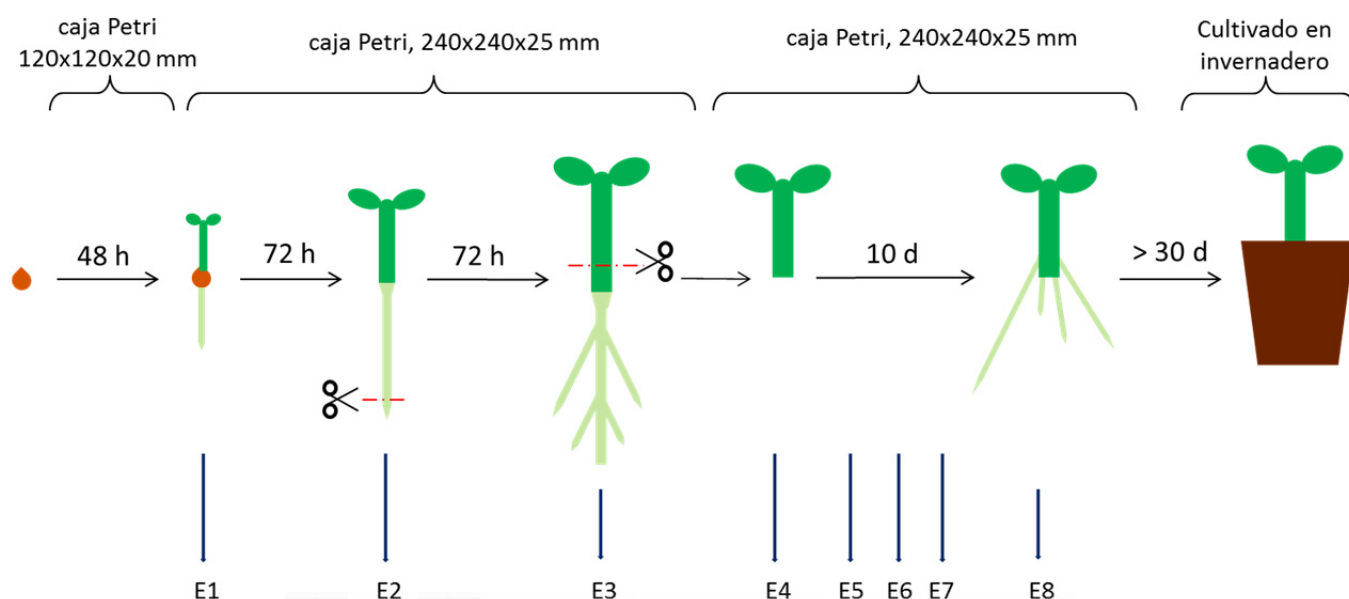


Figura 5. Esquema del protocolo seguido para la realización del fenotipado de las líneas estudiadas. Esquema del procedimiento de fenotipado seguido en este trabajo, desde la siembra de semillas hasta el desarrollo de las plantas en el invernadero. Las líneas inclinadas en negro representan cortes efectuados. E1-E8 simbolizan el momento de la toma de imágenes de las distintas placas mediante su escaneado.

3.3. Análisis morfológico de las raíces por el método de tinción mPS-PI (pseudo Schiff con yoduro de propidio)

Para el estudio de la estructura celular de las raíces laterales se empleó un protocolo de tinción de raíces con yoduro de propidio para su posterior visualización con microscopía confocal, la técnica de tinción mPS-PI (pseudo Schiff-yoduro de propidio modificada), descrita en el trabajo de Truernit *et al.* (2008). Para ello se recogió el sistema radicular que se había cortado en el apartado anterior de cuatro plantas de todas las especies y se transfirió, en el momento del corte, a un tubo eppendorf de 1,5 mL que contenía 1 mL de solución fijadora (50 % metanol y 10% ácido acético), donde permanecieron 12 h a 4°C. Empleando esta solución fijadora las células mantenían su estructura intacta siendo así fácilmente visibles en el microscopio. A continuación, se realizó un lavado con agua destilada y se incubaron con ácido periódico al 1% durante 40 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se llevó a cabo un lavado con agua destilada y se trataron con el reactivo de

Schiff (100 mM de metabisulfito de sodio en 0,54% de HCl) al que se le añadió 0,1 g/mL de yoduro de propidio. Esta técnica nos permite preparar la muestra para microscopía confocal ya que permite la tinción de componentes celulares que contienen hidratos de carbono como por ejemplo algunas membranas celulares. El yoduro de propidio nos permite visualizar las membranas celulares de un rojo intenso. Las muestras se incubaron con el reactivo de Schiff durante 2 h. Posteriormente las muestras se aclararon con hidrato de cloral (80 g de hidrato de cloral en 30 mL de agua destilada) para eliminar el exceso de tinción, y se mantuvieron en esta solución durante toda la noche. Al día siguiente se eliminó el exceso de hidrato de cloral y se montaron empleando el reactivo de Hoyer (30 g de goma arábica, 20 g de hidrato de cloral, 20 g de glicerol y 50 mL de agua destilada) sobre un portaobjetos, añadiendo un par de gotas del reactivo. A continuación, se tapó la muestra con un cubreobjetos y se selló empleando laca de uñas. Una vez seco el sellador las muestras se analizaron con un microscopio confocal Leica TCS-SPE para obtener imágenes de la capa de células central de los ápices de las raíces laterales. La longitud de onda de excitación para las muestras teñidas por el método PS-PI fue de 488 nm, la longitud de onda de emisión se recogió entre 485 y 491nm.

3.4. Obtención de las imágenes

Para la obtención de las imágenes que se analizaron durante el trabajo se utilizó un escáner Epson V330. Las imágenes se guardaron en el ordenador con una resolución de 800ppp (píxeles por pulgada) para su posterior procesado. Durante el cultivo de tomate se fueron realizando escáneres periódicos a las cajas de Petri 120x120 mm. Se realizaron escáneres antes de cortar el ápice para poder obtener imágenes de la raíz principal sin la presencia de raíces laterales a las 72h de colocar las plantas en las placas. A continuación, se obtuvieron nuevos escáneres tras cortar el ápice, para obtener imágenes de las raíces laterales a los 6 días después de colocar las plantas en las placas, y tras eliminar la raíz principal, con el objetivo de analizar las raíces adventicias generadas en la base del hipocótilo a los 10 días tras el corte de la raíz principal (Figura 5). Además, también se obtuvieron imágenes, empleando el mismo método, de las cajas de Petri que contenían explantos en medio MS y con la auxina vegetal ácido indol-acético y la citoquinina 6-benzilaminopurina.

3.5. Tratamiento de imágenes

El tratamiento de imágenes se ha llevado a cabo empleando los programas ImageJ (Fiji, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) y EZ Rhizo (Armengaud *et al.*, 2009). En primer lugar, hemos utilizado ImageJ para realizar un pre-tratamiento de la imagen que es necesario para poder posteriormente utilizar el programa EZ Rhizo. En primer lugar se separaron los canales de color con el objetivo de quedarnos con la imagen en blanco y negro con más contraste posible, para lo cual se utilizó el canal rojo. A continuación se realizó un ajuste del contraste para que el EZ Rhizo pueda detectar las raíces de forma automática sin perder información. Esta imagen es la que después se introduce en el EZ Rhizo para el análisis detallado del sistema radicular. Con el EZ Rhizo en primer lugar se transformó la imagen a binaria, obteniendo una imagen compuesta por píxeles. A continuación, se procedió al editado de la imagen de forma manual para la corrección de posibles errores al transformar la imagen. Posteriormente, se transforma el grosor de la raíz a una imagen que consta de un solo píxel. Al emplear el programa EZ Rhizo, se pueden obtener de forma automática los valores de la longitud, el ángulo, la posición y el vector de cada raíz, así como el número de raíces laterales y la distancia entre ellas. Este procedimiento se ha realizado de forma individual para cada planta.

3.6. Pruebas estadísticas

El análisis estadístico de los datos obtenidos en el trabajo se ha realizado con el programa Statgraphics Centurion (Statpoint Technologies Inc., USA). Para llevar a cabo el análisis, primero se describieron los valores atípicos y a continuación se realizó un análisis de varianza (ANOVA) simple para comparar entre distintos genotipos. En todos los ensayos se utilizó un valor de significación del 5%. También se han utilizado histogramas y se ha llevado a cabo un ajuste de datos no censurados, para ajustar nuestros valores a una distribución normal. Los valores se agruparon según la serie y se normalizaron respecto al genotipo utilizado como control (Craigella).

4. RESULTADOS

4.1. Selección de las líneas a estudio

Tanto las diferentes especies silvestres de tomate como las variedades comerciales que se han utilizado en este trabajo se obtuvieron del TGRC (Tabla 1, apartado de materiales y métodos). Se han seleccionado entradas para 11 de las 13 especies que actualmente se incluyen en el clado filogenético del tomate cultivado (Figura 6A). Se han seleccionado además cinco líneas mutantes de *S. lycopersicum* que tendrían alterado algún aspecto de la formación de las raíces, según se indicaba en la colección de mutantes del TGRC (Figura 6B) y cuatro variedades comerciales de tomate (véase el apartado correspondiente de materiales y métodos).

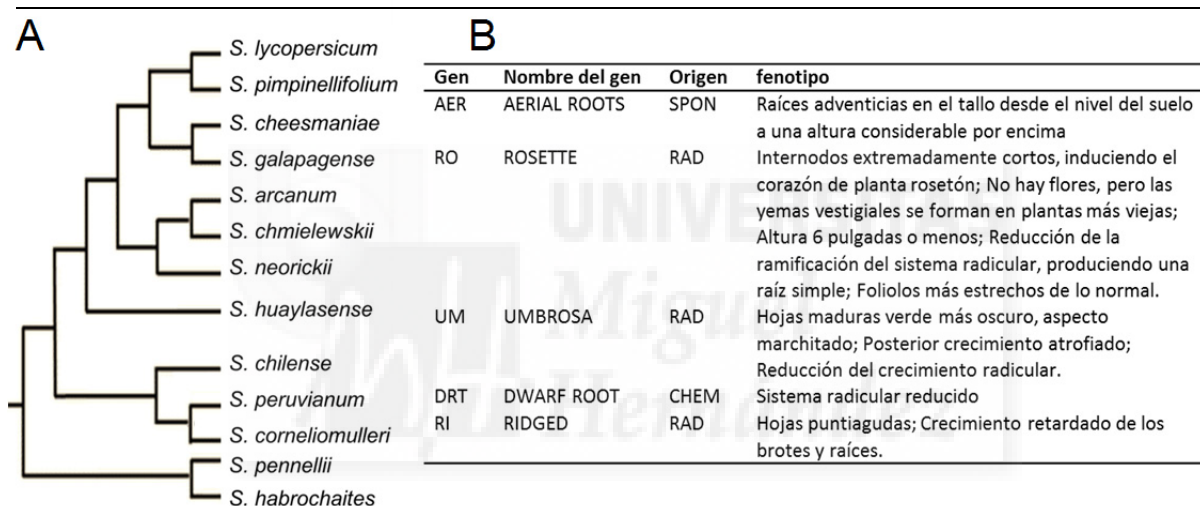


Figura 6. Algunas líneas estudiadas en este trabajo. (A) Árbol filogenético de algunas de las especies del género *Solanum* en el clado del tomate. Tomado de Bendinger *et al.* (2010), con ligeras modificaciones. (B) Tabla que incluye algunas características de los mutantes estudiados en este trabajo. SPON: mutantes espontáneos; RAD: mutantes obtenidos por rayos X; CHEM: mutantes obtenidos por mutagénesis química.

4.2. Germinación

Para determinar si existían diferencias en el porcentaje de germinación entre las diferentes líneas analizadas, se evaluó el porcentaje de germinación en los tres casos. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 7. El porcentaje de germinación de *S. lycopersicum* var. Craigella fue del 62%, la mayoría de las especies silvestres de tomate presentaron valores de germinación similares a los de *S. lycopersicum* var. Craigella, a

excepción de *S. galapagense*, con un 25% de germinación, y *S. pimpinellifolium*, en la que germinaron un 95% de las semillas (Figura 7A).

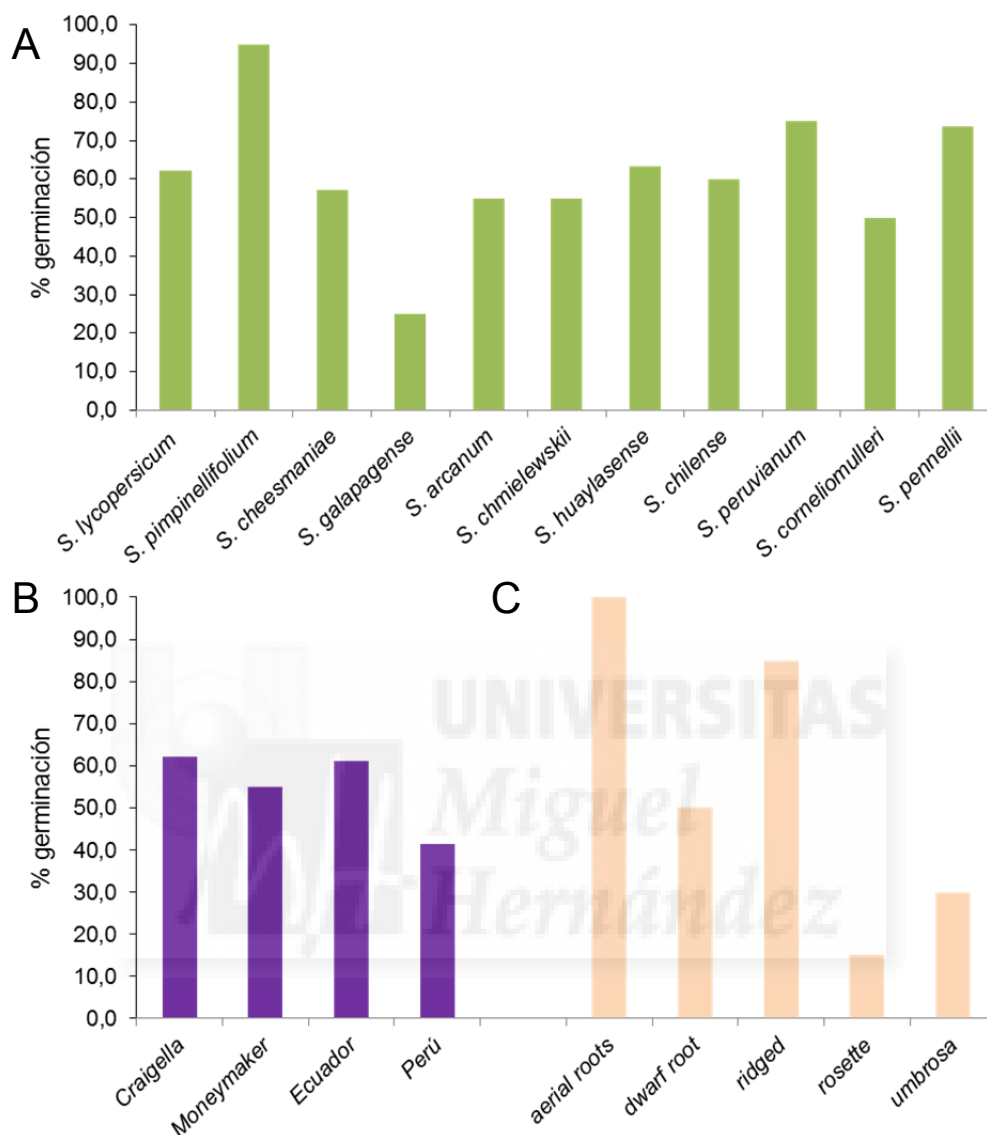


Figura 7. Porcentaje de germinación de las líneas estudiadas. (A) Especies silvestres de tomate y *S. lycopersicum* var. Craigella, como referencia. (B) Variedades comerciales de tomate utilizadas en este trabajo. (C) Mutantes de raíz analizados.

La germinación en las variedades comerciales de tomate osciló entre un 40 y un 60% (Figura 7B). En el caso de los mutantes de tomate analizados, se observó cierta variación en los porcentajes de germinación: mientras que en el mutante *aerial roots* el porcentaje de germinación fue del 100%, *rosette*, y *umbrosa* presentaron valores de germinación mucho más bajos (Figura 7C).

4.3. Caracterización morfológica de la arquitectura radicular

4.3.1. Raíz principal

El estudio de la raíz principal se llevó a cabo a las 72 horas de la germinación de las semillas (5 días después de la siembra). A partir de las imágenes obtenidas se analizaron los siguientes parámetros: (1) *longitud* de la raíz principal y, (2) *ángulo* de la raíz principal respecto a la vertical. En el apartado de materiales y métodos se describe la forma en que se cuantificaron estos parámetros.

Ya que se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la longitud de la raíz principal de los parentales en función de la siembra (Tabla 2), se procedió a corregir los resultados de cada serie respecto a la variedad Craigella de *S. lycopersicum*, para poder comparar los resultados obtenidos en las distintas siembras.

Tabla 2. Valor de P en los parámetros de la raíz principal en *S. lycopersicum* var. Craigella

Parámetro estudiado	Factor: siembra ^a
Longitud	<0,001
Ángulo	0,079

^a Se indican en negrita y cursiva los valores de $P < 0,01$.

El valor promedio de la *longitud* de la raíz principal en las plántulas de *S. lycopersicum* var. Craigella a los 5 días tras la siembra fue de $38,6 \pm 9,8$ mm (Figura 8). En las especies silvestres estudiadas, se observaron diferencias estadísticamente significativas con *S. lycopersicum* en *S. cheesmaniae*, *S. arcanum* y *S. chmielewskii*, que mostraron una raíz principal más corta (Figura 8A). En cambio, *S. pimpinellifolium* y *S. pennellii* mostraron una mayor longitud de la raíz principal que en *S. lycopersicum* var. Craigella (Figura 8A). Las variedades comerciales también mostraron diferencias estadísticamente significativas con Craigella, con valores significativamente elevados de longitud de raíz principal en MoneyMaker ($53,1 \pm 0,4$ mm). Por otro lado, las variedades de Ecuador y Perú mostraron una longitud de raíz principal inferior a la de Craigella (Figura 8C). Los mutantes *aerial roots* y *ridged* mostraron valores mayores de longitud de raíz principal que Craigella mientras que el mutante *dwarf root* mostró una menor longitud de la raíz principal (Figura 8D).

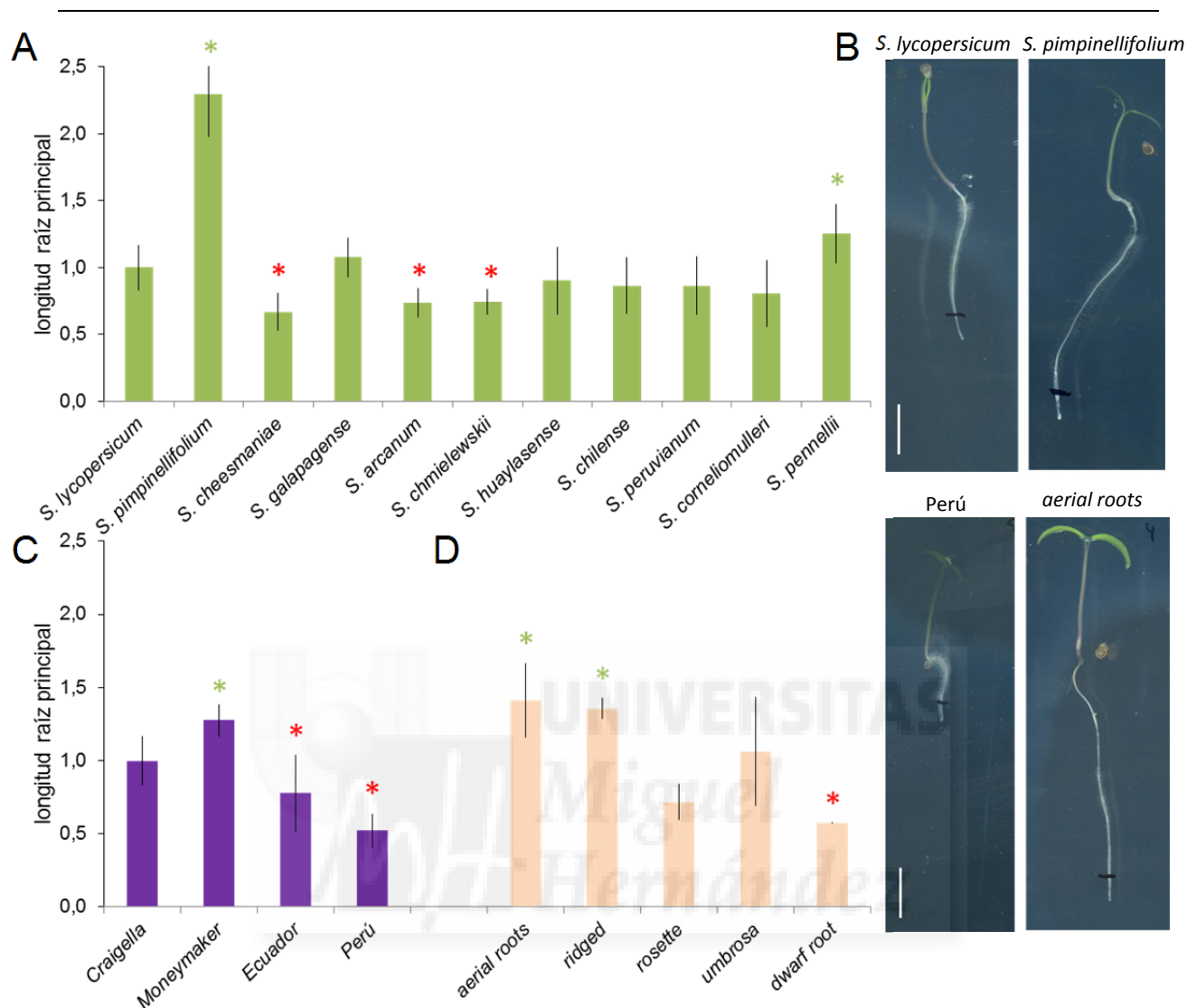


Figura 8. Longitud relativa de la raíz principal en las líneas estudiadas. (A) Especies silvestres de tomate y *S. lycopersicum* var. Craigella, como referencia. (B) Imágenes representativas de plántulas de tomate a los 5 días de la germinación. Las barras de escala indican 10 mm. (C) Variedades comerciales de tomate utilizadas en este trabajo. (D) Mutantes de raíz analizados. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con *S. lycopersicum* var. Craigella, en verde los que presentaron valores mayores que el genotipo de referencia y en rojo los que presentaron valores menores.

El ángulo de la raíz principal respecto a la vertical (Figura 9) fue de $14,0 \pm 7,0^\circ$ en *S. lycopersicum* var. Craigella. Solo *S. cheesmaniae*, con un valor de $4,1 \pm 3,3^\circ$, y *S. huaylasense* con un valor de $28,7 \pm 10,1^\circ$, presentaron diferencias estadísticamente significativas con la especie tomada como control (Figura 9A). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las variedades comerciales (Figura 9C) con respecto al ángulo de la raíz principal. Dos mutantes, *aerial roots* y *ridged*, mostraron un ángulo de crecimiento de la raíz

principal menor de 10° y *rosette* mostró un valor del ángulo de la raíz principal de $29,0 \pm 12,2^\circ$ (Figura 9D), los tres mostraron diferencias estadísticamente significativas con *S. lycopersicum* var. *Craigella*.

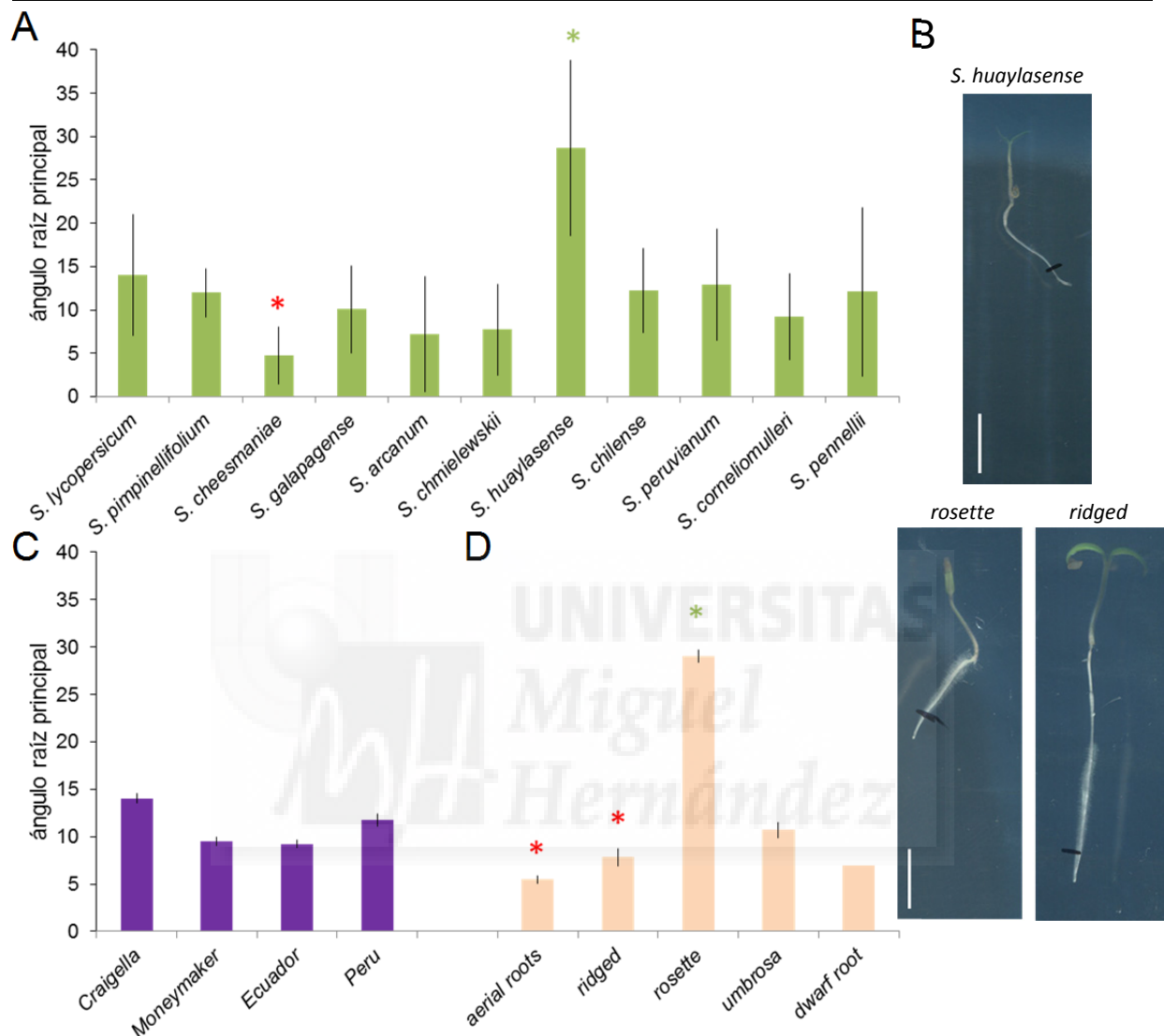


Figura 9. Ángulo de la raíz principal con respecto a la vertical en las líneas estudiadas. (A) Especies silvestres de tomate y *S. lycopersicum* var. *Craigella*, como referencia. (B) Imágenes representativas de plántulas de tomate a los 5 días de la germinación. Las barras de escala indican 10 mm. (C) Variedades comerciales de tomate utilizadas en este trabajo. (D) Mutantes de raíz analizados. Se siguen las pautas definidas en la Figura 8.

4.3.2. Raíces laterales

El sistema radicular secundario se estudió a las 72 horas del corte del ápice de la raíz principal, 8 días tras la siembra de las líneas. Los parámetros que se analizaron en las raíces laterales fueron los siguientes: (1) *número* de raíces laterales; (2) *densidad*, definida como la distancia entre dos raíces laterales consecutivas; (3) *longitud* de la raíz lateral; (4) *ángulo* de

la raíz lateral respecto a la raíz principal; y (5) *dirección* de crecimiento de la raíz lateral, considerando el valor 1 si crece hacia la izquierda de la imagen y el valor 0 si crece hacia la derecha.

Al haber encontrado diferencias estadísticamente significativas en algunos de los parámetros cuantificados en el sistema radicular secundario de nuestro genotipo de referencia, *S. lycopersicum* var. Craigella, en función de la siembra (Tabla 3), se procedió a corregir los resultados de cada serie respecto a esta línea, lo que nos ha permitido comparar los resultados de las diferentes siembras entre sí.

Tabla 3. Valor de P en los parámetros de las raíces laterales en *S. lycopersicum* var. Craigella

Parámetro estudiado	Factor: siembra ^a
Número	<0,001
Densidad	<0,001
Longitud	0,063
Ángulo	<0,001
Dirección	0,488

^a Se indican en negrita y cursiva los valores de $P < 0,01$.

El *número* relativo de raíces laterales en el parental de referencia *S. lycopersicum* var. Craigella fue de $11,0 \pm 6,5$ raíces (Figura 10). Existen diferencias estadísticamente significativas en el número de raíces laterales entre las variedades silvestres analizadas, siendo *S. pimpinellifolium* la especie que más raíces laterales mostró con un promedio de casi tres veces más raíces laterales que *S. lycopersicum* var. Craigella. *S. arcanum*, *S. chmielewskii* y *S. pennellii* también mostraron un número de raíces laterales mayor que el control (Figura 10A). Por otro lado, *S. cheesmanae*, *S. chilense*, *S. peruvianum* y *S. corneliomulleri* mostraron un número relativo de raíces laterales menor que *S. lycopersicum* var. Craigella (Figura 10A). En el caso de las variedades comerciales, MoneyMaker y la de Ecuador mostraron un número de raíces laterales mayor que Craigella, siendo estas diferencias estadísticamente significativas (Figura 10C). Los genotipos mutantes mostraron en general un número menor de raíces laterales que *S. lycopersicum* var. Craigella, aunque solamente en *rosette* y *dwarf root* diferencias fueron estadísticamente significativas (Figura 10D).

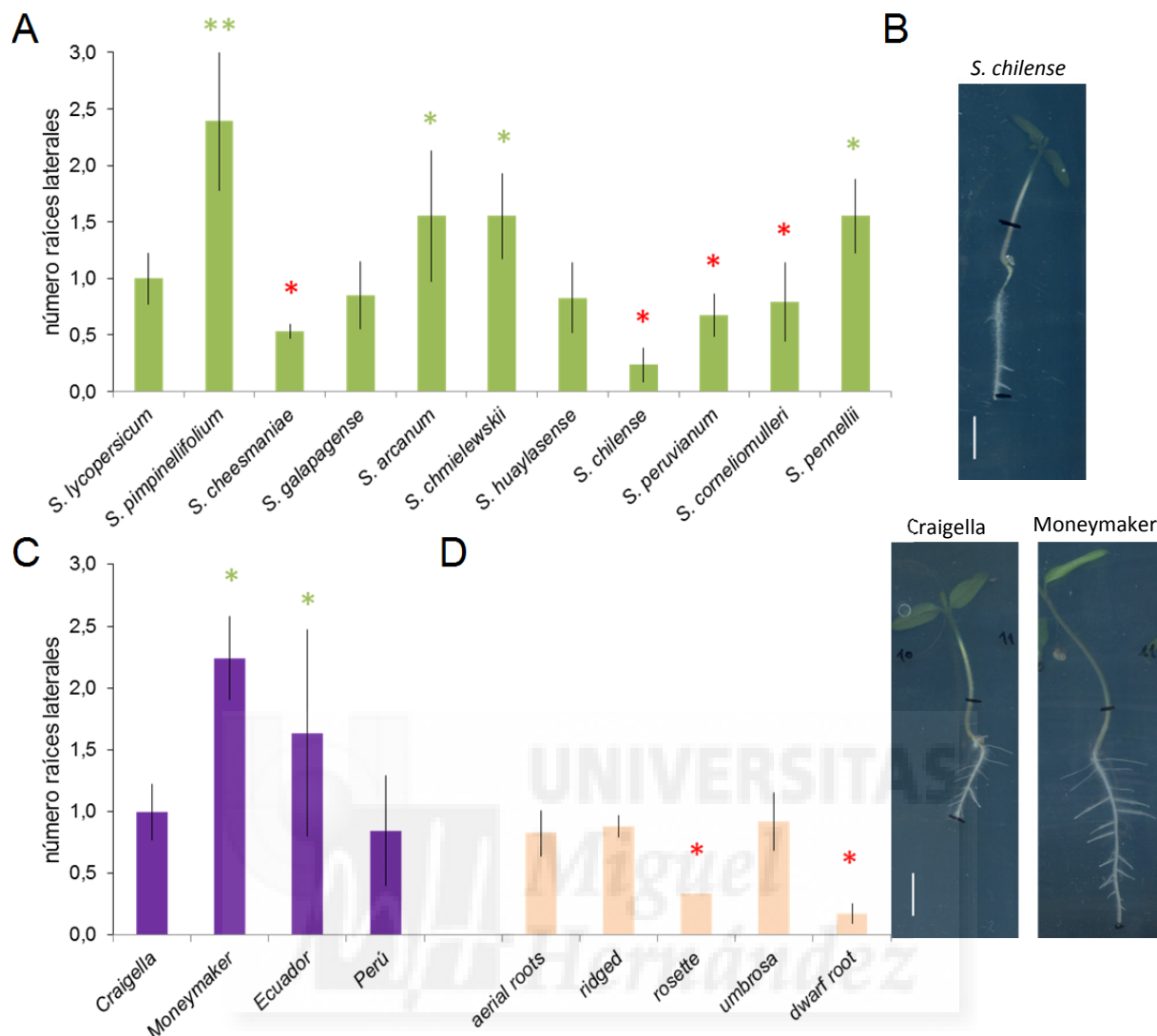


Figura 10. Número relativo de raíces laterales en las líneas estudiadas. (A) Especies silvestres de tomate y *S. lycopersicum* var. Craigella, como referencia. (B) Imágenes representativas de plántulas de tomate a los 8 días de la germinación. Las barras de escala indican 10 mm. (C) Variedades comerciales de tomate utilizadas en este trabajo. (D) Mutantes de raíz analizados. Se siguen las pautas definidas en la Figura 8.

Respecto a la *densidad* del sistema radicular secundario (Figura 11), se ha observado que el valor promedio de distancia entre dos raíces laterales consecutivas en *S. lycopersicum* var. Craigella fue de $16,6 \pm 1,1$ mm. *S. pimpinellifolium*, *S. chilense* y *S. pennellii* presentaron una mayor densidad radicular, por lo que las raíces laterales se encontraban más juntas que en el caso de *S. lycopersicum* var. Craigella, mientras que *S. arcanum* y *S. chmielewskii* presentaron una menor densidad de raíces laterales (Figura 11A). El resto de variedades comerciales estudiadas presentaron una densidad de raíces laterales menor que Craigella (Figura 11B), mientras que en el caso de los genotipos mutantes no se encontraron

diferencias estadísticamente significativas en la densidad de raíces laterales con respecto al genotipo de referencia (Figura 11C).

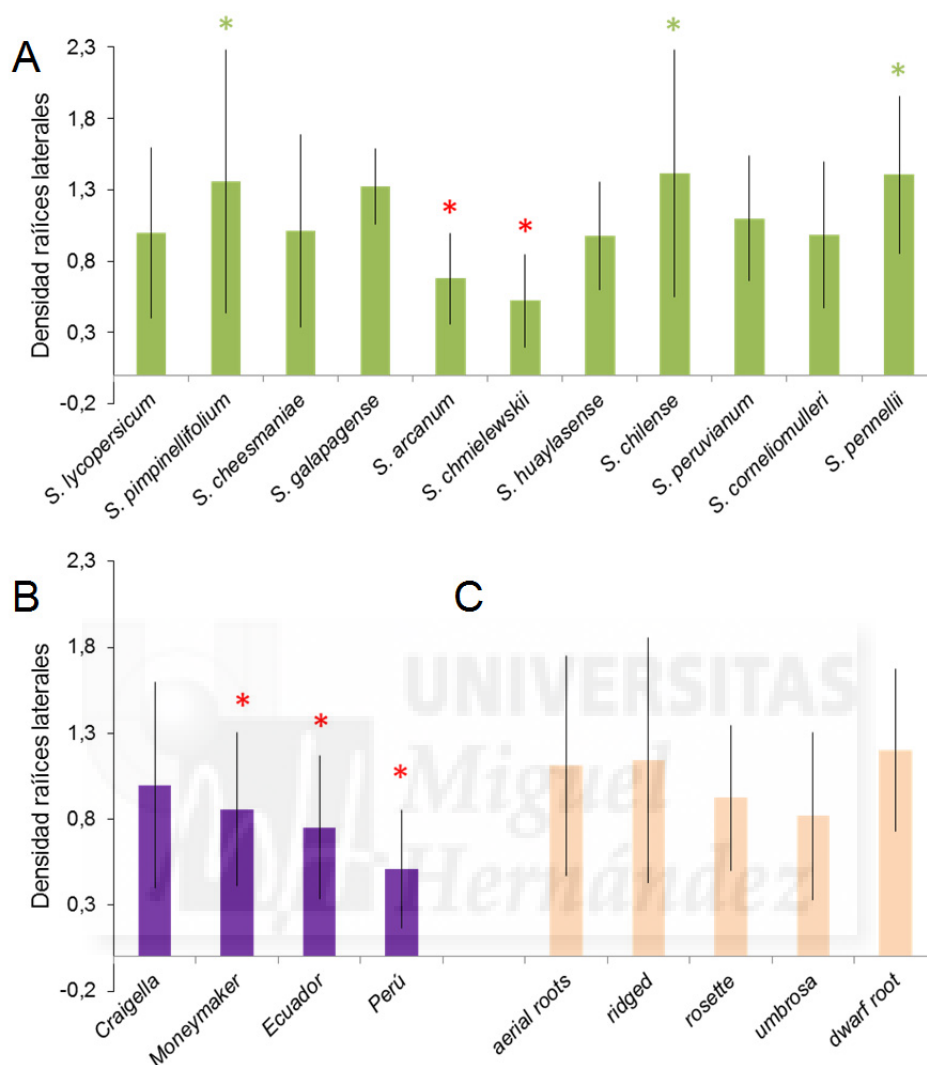


Figura 11. Número relativo de densidad de raíces laterales en las líneas estudiadas. (A) Especies silvestres de tomate y *S. lycopersicum* var. Craigella, como referencia. (B) Variedades comerciales de tomate utilizadas en este trabajo. (C) Mutantes de raíz analizados. Se siguen las pautas definidas en la Figura 8.

Por estudios realizados en otras especies, se sabe que la *longitud* de las raíces laterales depende del estadio de desarrollo de éstas, ya que las raíces laterales viejas son más largas que las raíces laterales más jóvenes. A pesar de estas diferencias locales entre las longitudes de las raíces laterales dentro de cada plántula, hemos determinado que existen diferencias estadísticamente significativas entre algunas de las especies analizadas (Figura 12). *S. lycopersicum* var. Craigella presentó un valor promedio de longitud de raíces laterales de $4,3 \pm 2,2$ mm. Las especies *S. pimpinellifolium* y *S. peruvianum* presentaron un valor promedio

de la longitud de raíces laterales superior al de *S. lycopersicum* var. Craigella, $5,3 \pm 3,7$ mm y $5,9 \pm 2,9$ mm respectivamente. Mientras que las especies *S. arcanum*, *S. chmielewskii*, *S. huayalense* y *S. chilense* presentaron valores de longitud promedio de raíces laterales más bajos, siendo *S. chmielewskii* la especie con un valor de longitud promedio de raíces laterales más bajo con $1,6 \pm 0,7$ mm de longitud (Figura 12A). Todas las variedades comerciales estudiadas en este trabajo presentaron una longitud promedio de raíces laterales estadísticamente mayor que Craigella, siendo la variedad de Perú la que mayor longitud de raíces laterales presentó, $5,7 \pm 3,6$ mm (Figura 12B). Los genotipos mutantes *ridged* y *dwarf root* presentaron diferencias estadísticamente significativas y se observó una longitud promedio de raíces laterales menor que en Craigella (Figura 12C).

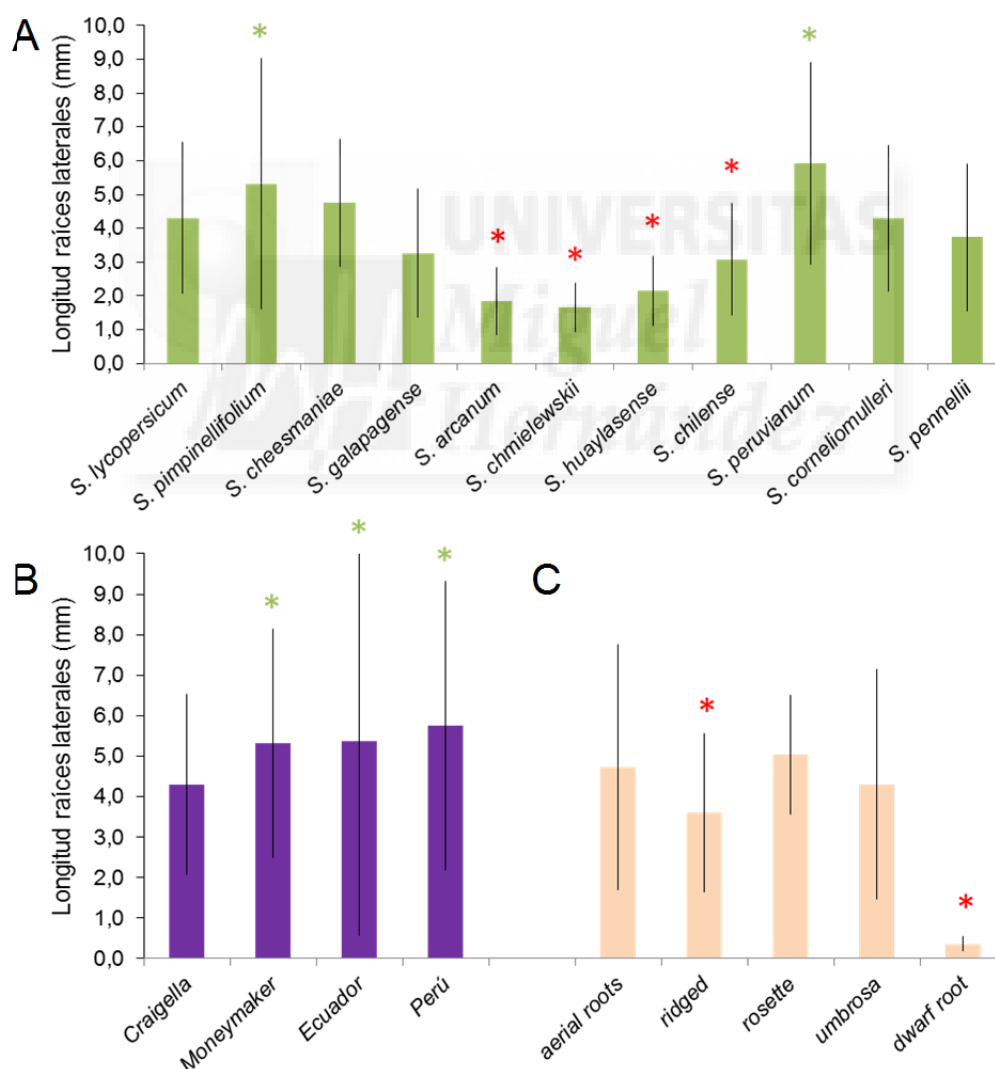


Figura 12. Longitud promedio de las raíces laterales en las líneas estudiadas. (A) Especies silvestres de tomate y *S. lycopersicum* var. Craigella, como referencia. (B) Variedades comerciales de tomate utilizadas en este trabajo. (C) Mutantes de raíz analizados. Se siguen las pautas definidas en la Figura 8.

El *ángulo* de crecimiento de las raíces laterales en la especie *S. lycopersicum* var. Craigella fue de $52,1 \pm 13,2^\circ$ (Figura 13). Solo una de las variedades silvestres de tomate, *S. chmielewskii*, presenta un valor promedio de ángulo de raíces laterales estadísticamente significativo superior, mientras que *S. galapagense*, *S. huaylasense* y *S. pennellii* presentaron ángulos menores que *S. lycopersicum* var. Craigella (Figura 13A). Las variedades comerciales mostraron diferencias estadísticamente significativas con la variedad control, Craigella, presentando todas ellas ángulos de crecimiento de las raíces laterales mayores (Figura 13B). En el caso de los genotipos mutantes, únicamente *aerial roots* presentó un valor de ángulo de raíces laterales menor que resultó además estadísticamente significativo (Figura 13C).

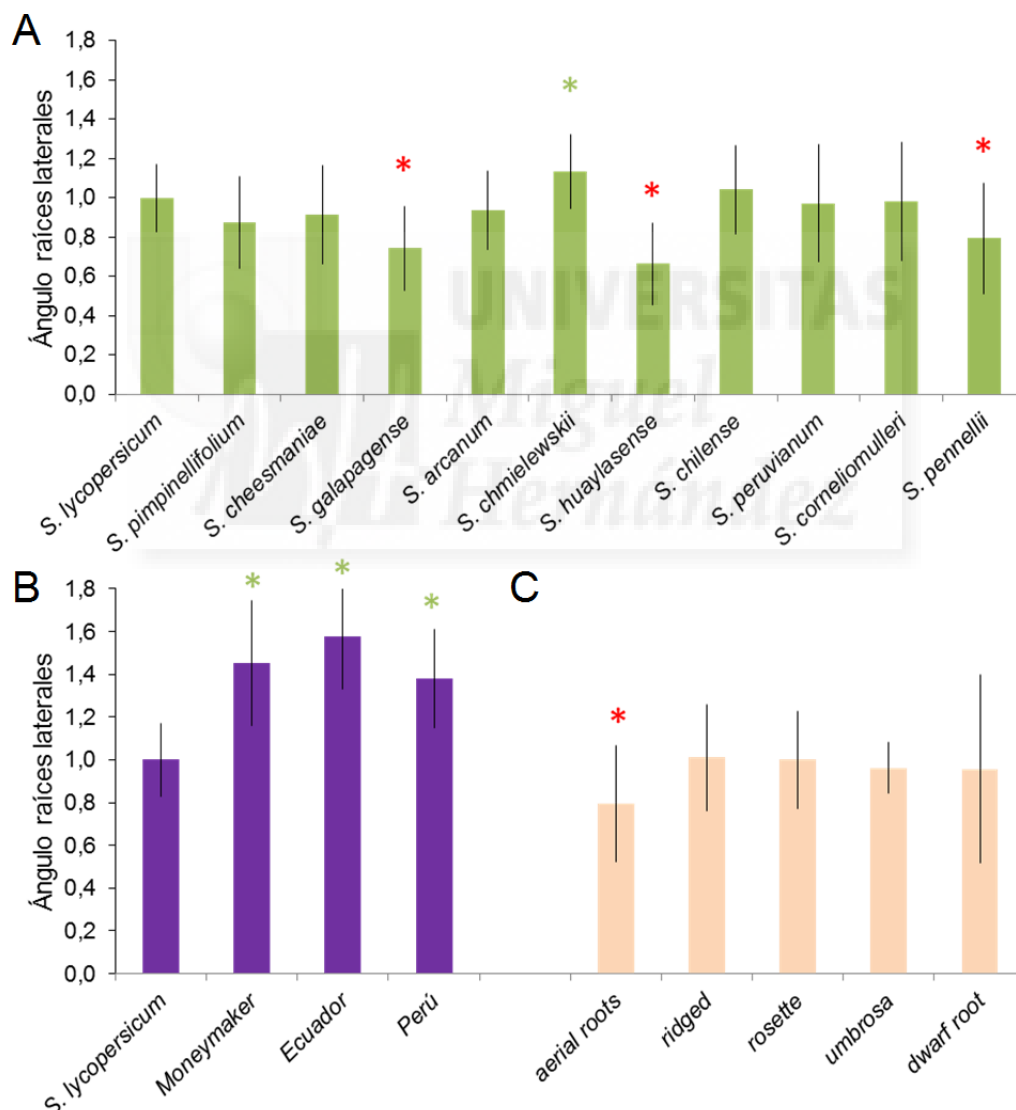


Figura 13. Valor absoluto de ángulo de crecimiento de las raíces laterales en las líneas estudiadas. (A) Especies silvestres de tomate y *S. lycopersicum* var. Craigella, como referencia. (B) Variedades comerciales de tomate utilizadas en este trabajo. (C) Mutantes de raíz analizados. Se siguen las pautas definidas en la Figura 8.

Por último se estudió la *dirección* de crecimiento de las raíces laterales (Figura 14) y se observó que no había diferencias significativas en este parámetro en ninguno de los casos estudiados.

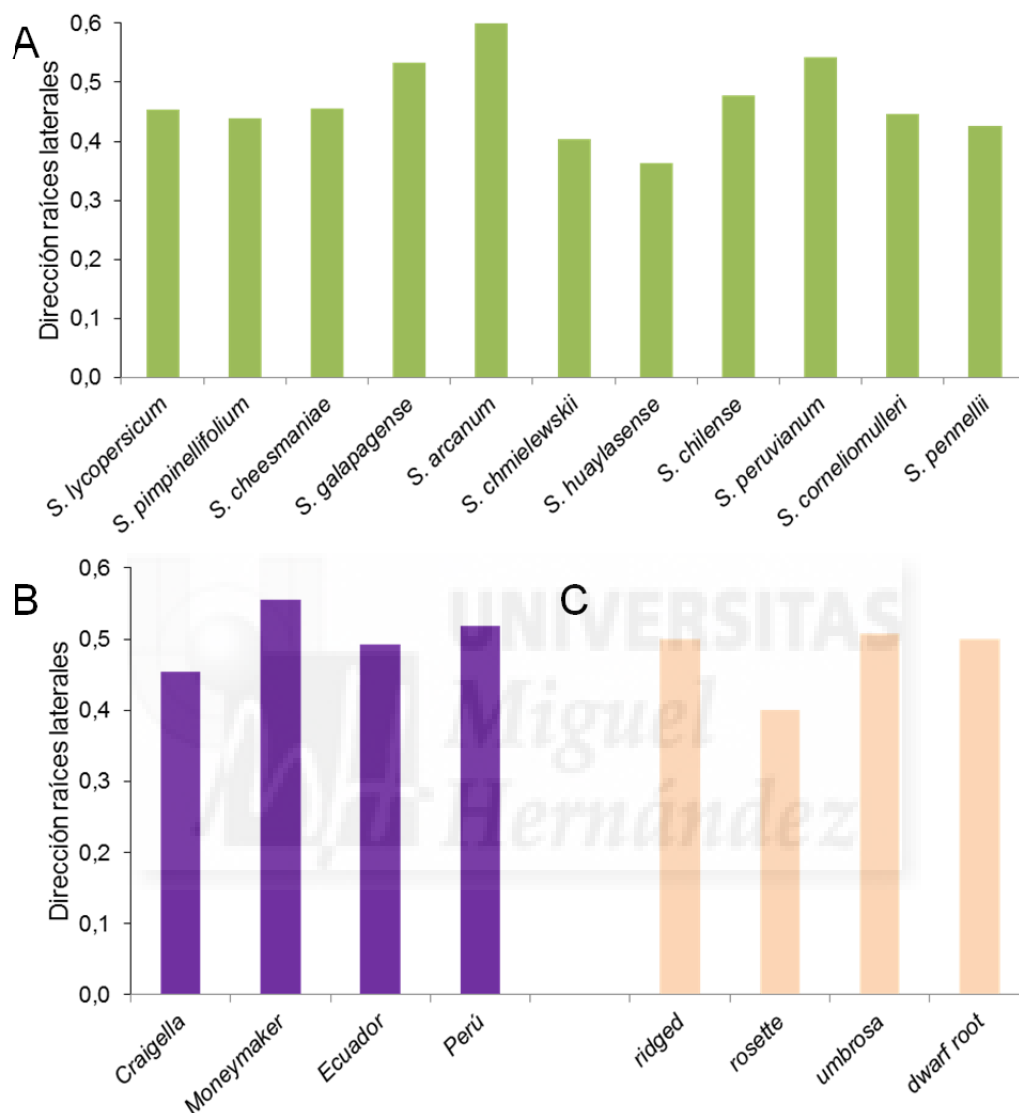


Figura 14. Dirección de crecimiento de las raíces laterales en las líneas estudiadas. (A) Especies silvestres de tomate y *S. lycopersicum* var. Craigella, como referencia. (B) Variedades comerciales de tomate utilizadas en este trabajo. (C) Mutantes de raíz analizados. Se siguen las pautas definidas en la Figura 8.

Para comprobar si las diferencias observadas en las raíces laterales podrían tener su origen en la morfología celular, se fijaron, se tiñeron y se visualizaron las raíces laterales mediante microscopía confocal (véase el apartado de materiales y métodos). En la Figura 15A-D se muestran imágenes representativas del meristemo apical de las raíces laterales en las cuatro variedades comerciales de tomate estudiadas. No se han observado diferencias

notables en la estructura tisular del meristemo entre variedades. Por otro lado, en la Figura 15E-H se muestran imágenes de algunos de los mutantes estudiados. En todos los casos la estructura tisular del meristemo fue aparentemente normal.

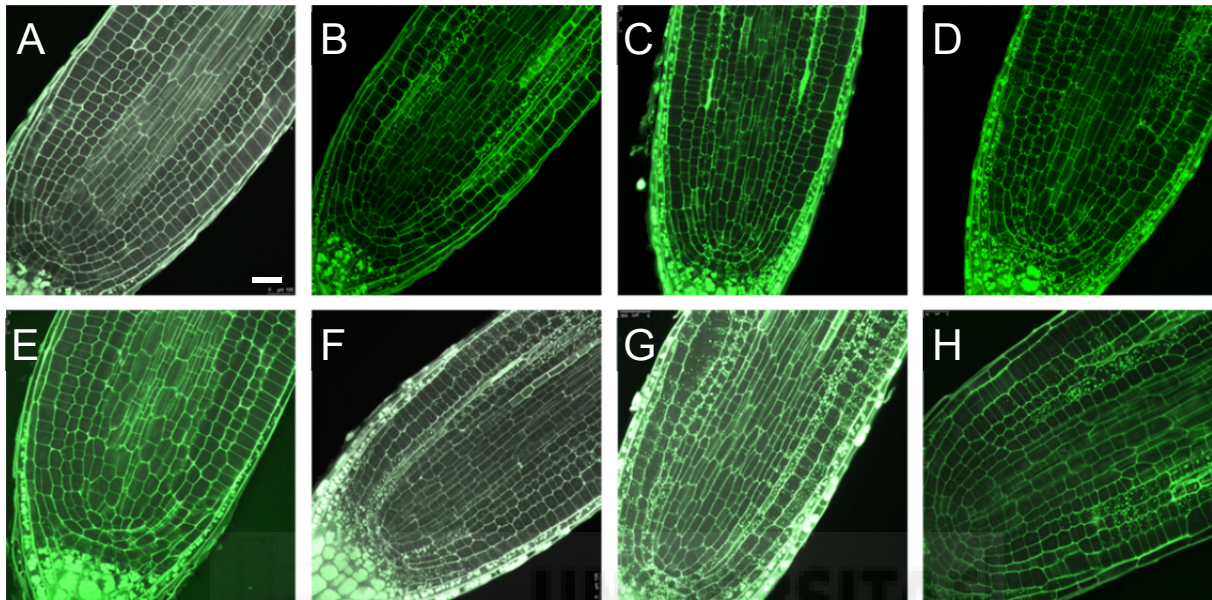


Figura 15. Microscopía confocal del ápice de raíces laterales en las variedades comerciales (A-D) así como en los genotipos mutantes (E-H) analizados. Se muestran imágenes representativas de las variedades (A) Craigella, (B) Moneymaker, (C) Ecuador y (D) Perú de *S. lycopersicum*, así como de los mutantes (E) *rosette*, (F) *ridged*, (G) *aerial roots* y (H) *umbrosa*. La barra de escala indica 100 μm .

4.3.3. Raíces adventicias

El estudio del sistema radicular adventicio se llevó a cabo a los 10 días tras la escisión del sistema radicular completo, así como del tercio inferior del hipocótilo de cada planta con el fin de asegurar la ausencia de primordios radiculares preformados en el mismo (véase el apartado correspondiente de materiales y métodos). El análisis del sistema radicular adventicio incluía los siguientes parámetros: (1) *número* de raíces adventicias; (2) *densidad*, definida como la distancia entre dos raíces adventicias consecutivas; (3) *longitud* de las raíces adventicias; y (4) *ángulo* de las raíces adventicias respecto a la vertical. En este caso, no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los parámetros cuantificados en el sistema radicular adventicio en la variedad comercial de referencia (Craigella) en función de la siembra (Tabla 4), por lo que no fue necesario corregir los resultados de cada serie.

Tabla 4. Valor de P en los parámetros de las raíces adventicias en *S. lycopersicum* var. Craigella

Parámetro estudiado	Factor: siembra ^a
Número	0,706
Densidad	0,066
Longitud	0,705
Ángulo	0,556
Dirección	0,844

^a Se indican en **negrita y cursiva** los valores de $P < 0,01$.

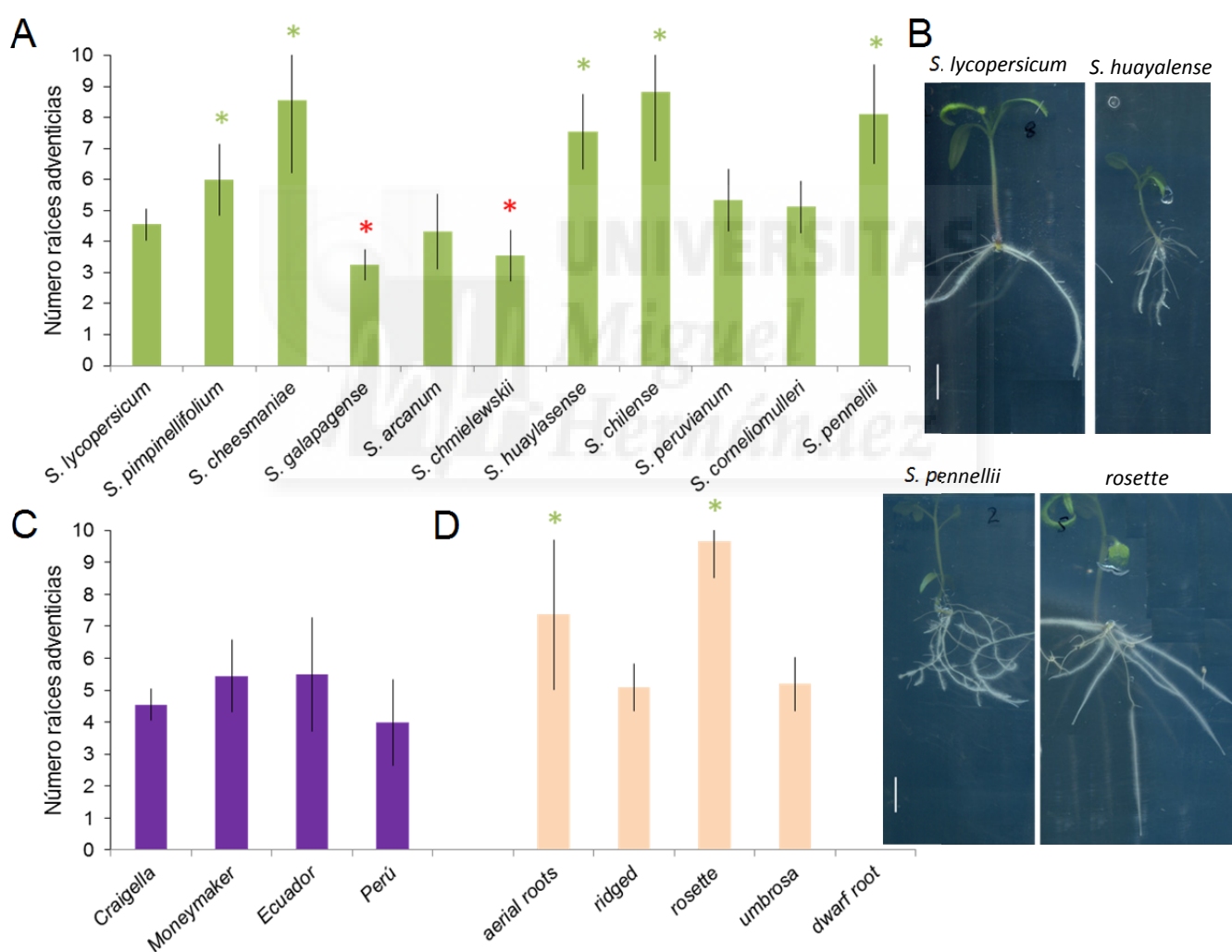


Figura 16. Número de raíces adventicias en las líneas estudiadas. (A) Especies silvestres de tomate y *S. lycopersicum* var. Craigella, como referencia. (B) Imágenes representativas de plántulas de tomate a los 8 días de la germinación. Las barras de escala indican 10 mm. (C) Variedades comerciales de tomate utilizadas en este trabajo. (D) Mutantes de raíz analizados. Se siguen las pautas definidas en la Figura 8.

El número de raíces adventicias (Figura 16) de *S. lycopersicum* var. Craigella fue de $4,8 \pm 1,1$ raíces, la mayoría de especies silvestres mostró un número de raíces adventicias mayor, *S. cheesmaniae* fue la especie que presentó los valores más altos, $9,7 \pm 4,8$ raíces (Figura 16A). *S. galapagense* y *S. chmielewskii* mostraron un número significativamente menor de raíces adventicias que la variedad Craigella de referencia. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las variedades comerciales (Figura 16C). *aerial roots* y *rosette* mostraron un número mayor de raíces adventicias que *S. lycopersicum* var. Craigella (Figura 16D).

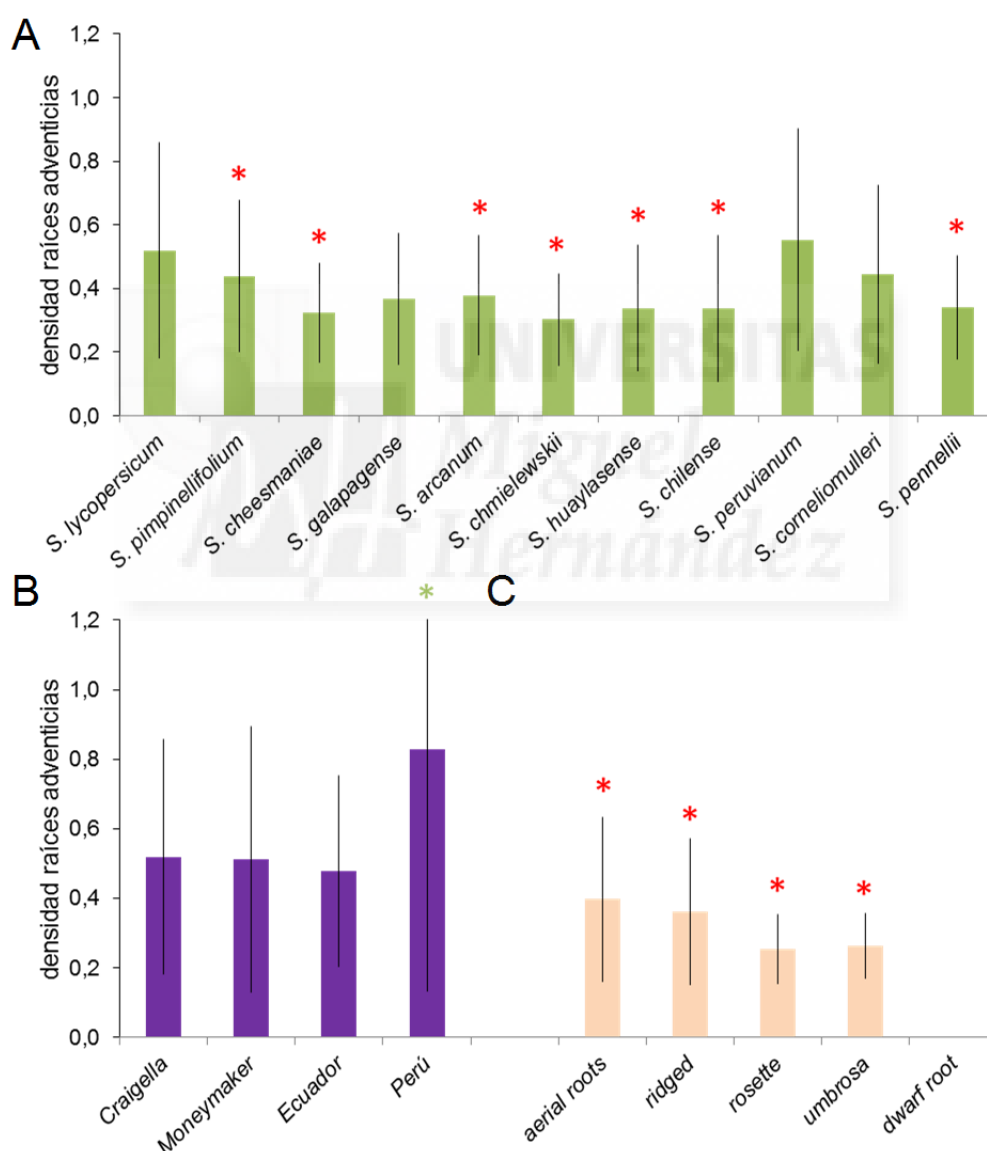


Figura 17. Densidad de raíces adventicias en las líneas estudiadas. (A) Especies silvestres de tomate y *S. lycopersicum* var. Craigella, como referencia. (B) Variedades comerciales de tomate utilizadas en este trabajo. (C) Mutantes de raíz analizados. Se siguen las pautas definidas en la Figura 8.

Respecto a la *densidad* del sistema radicular adventicio (Figura 17), hemos determinado que el valor promedio de distancia entre dos raíces adventicias consecutivas fue de $0,5 \pm 0,3$ mm en *S. lycopersicum*. Se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en la mayoría de las especies silvestres analizadas (Figura 17A), presentando todas ellas una densidad menor de raíces adventicias. Únicamente la variedad de Perú mostro diferencias estadísticamente significativas en la densidad del sistema radicular adventicio, presentando un valor de $0,8 \pm 0,6$ mm de distancia entre dos raíces adventicias consecutivas (Figura 17B). Todos los genotipos mutantes presentaron un valor de densidad de raíces adventicias menor, siendo estos estadísticamente significativos (Figura 17C).

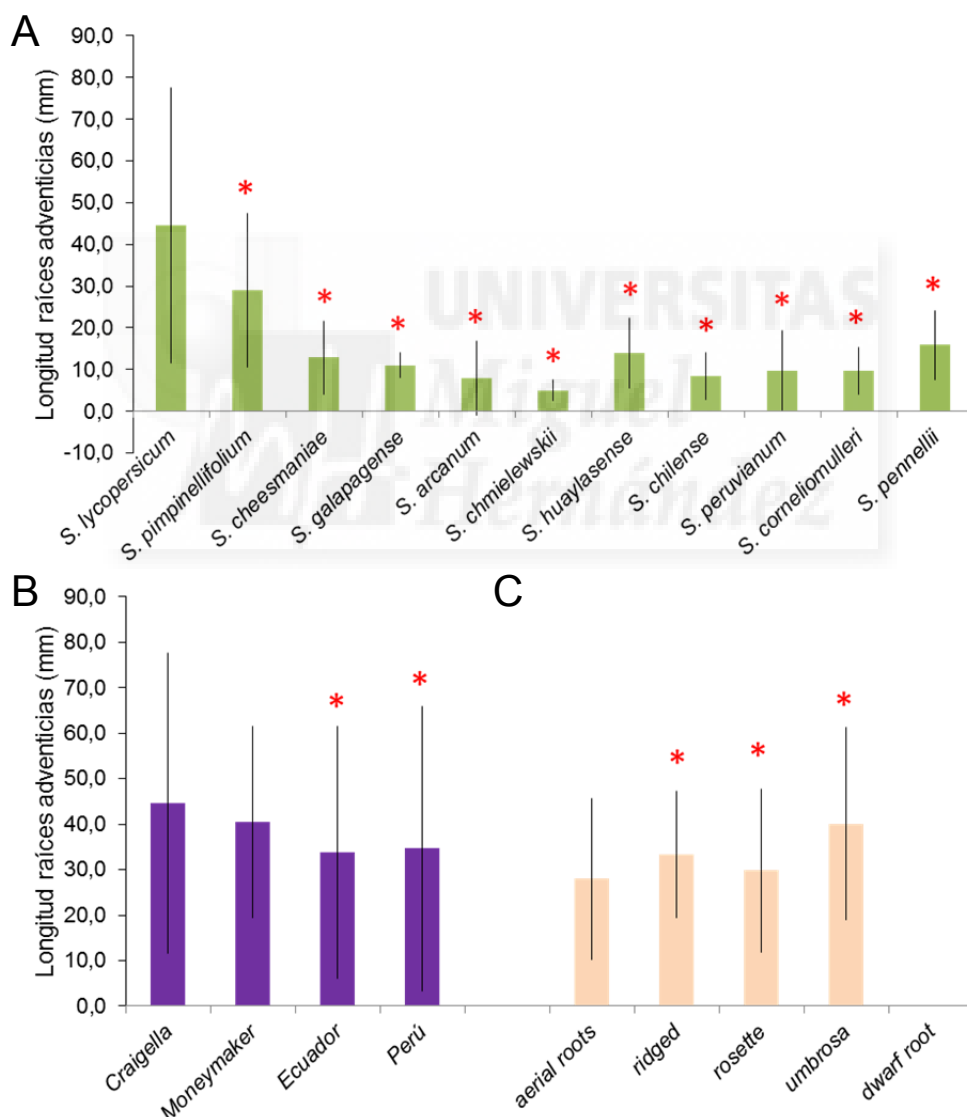


Figura 18. Longitud de raíces adventicias en las líneas estudiadas. (A) Especies silvestres de tomate y *S. lycopersicum* var. Craigella, como referencia. (B) Variedades comerciales de tomate utilizadas en este trabajo. (C) Mutantes de raíz analizados. Se siguen las pautas definidas en la Figura 8.

La *longitud* de las raíces adventicias se representa en la Figura 18. La longitud promedio de las raíces adventicias de las plantas *S. lycopersicum* var. Craigella fue de $44,5 \pm 31,9$ mm. Todas las especies silvestres estudiadas mostraron valores más bajos de longitud que *S. lycopersicum* (Figura 18A). En el caso de las variedades comerciales se observó que las variedades de Ecuador y Perú mostraron un valor promedio de longitud de raíces adventicias menor que Craigella (Figura 18B). Los genotipos mutantes *aerial roots*, *ridged* y *rosette* también mostraron diferencias estadísticamente significativas, observándose en los tres casos raíces adventicias más cortas que las del genotipo de referencia (Figura 18C).

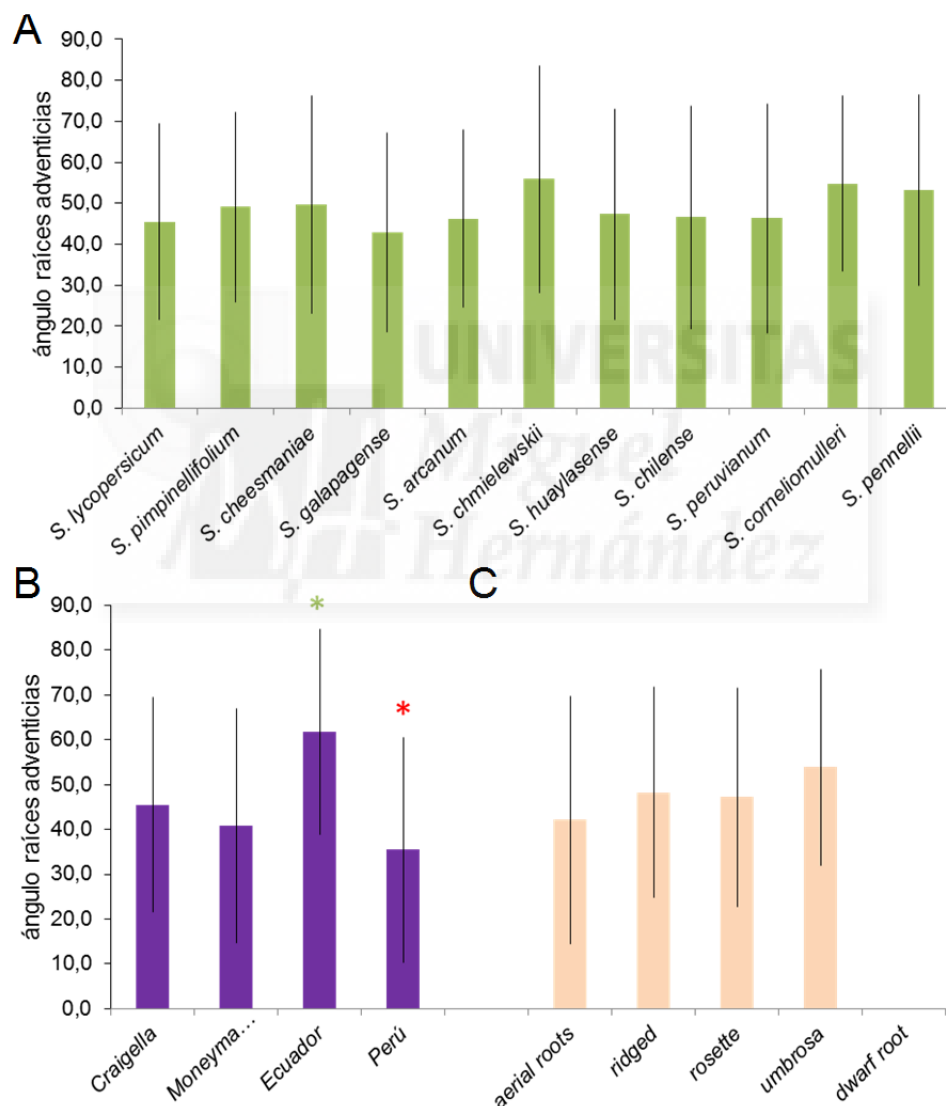


Figura 19. Ángulo de crecimiento de las raíces adventicias en las líneas estudiadas. (A) Especies silvestres de tomate y *S. lycopersicum* var. Craigella, como referencia. (B) Variedades comerciales de tomate utilizadas en este trabajo. (C) Mutantes de raíz analizados. Se siguen las pautas definidas en la Figura 8.

El *ángulo* de crecimiento de las raíces adventicias en *S. lycopersicum* var. Craigella fue de $45,5 \pm 23,8^\circ$ (Figura 19). No se han observado diferencias estadísticamente significativas entre las especies silvestres, mostrando todas ellas un ángulo de raíces adventicias con respecto a la vertical de entre 40 y 60° (Figura 19A). Entre las variedades comerciales solo la de Ecuador mostró un ángulo de raíces adventicias mayor que Craigella, mientras que la de Perú mostró un ángulo menor (Figura 19B). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre Craigella y los genotipos mutantes estudiados (Figura 19C).



5. DISCUSIÓN

En este Trabajo de Fin de Grado se pretende aportar información sobre los procesos genéticos relacionados con la formación y el desarrollo del sistema radicular en tomate utilizando para ello una colección de 11 especies silvestres de tomate, 4 variedades comerciales y 5 mutantes de tomate obtenidos de la colección de mutantes morfológicos del TGRC. Se han llevado a cabo dos ensayos diferentes. En el primero de ellos se ha realizado un análisis fenotípico de la morfología de la raíz principal, las raíces laterales y las raíces adventicias en la colección de líneas estudiadas. A continuación se visualizó mediante microscopia confocal la estructura celular del meristemo en las raíces laterales de algunas de las líneas que mostraron valores extremos en los parámetros estudiados del sistema radicular.

A pesar de la limitada variabilidad genética existente entre las variedades de tomate (100 Tomato Genome Sequencing Consortium, 2014; Blanca *et al.*, 2015; Sahu y Chattopadhyay 2017), hemos observado una variación significativa para algunos parámetros determinantes del sistema radicular, tales como la longitud de la raíz principal y las laterales, el número de raíces laterales y su ángulo de crecimiento. Por otro lado, apenas se observaron diferencias entre las variedades en lo que respecta a los parámetros definitorios del sistema radicular adventicio, a excepción de la variedad de Perú, que procede de una zona de altitud media (1.200 m) en la región de Quillabamba y que se caracteriza por su fruto de pequeño tamaño. La variedad Moneymaker, que tuvo su apogeo de popularidad en los años 60 y 70 por su uniformidad y sabor excepcional, presentó un número significativamente mayor de raíces laterales, lo que la convierte en una buena variedad para utilizarla como genotipo de referencia en las búsquedas de mutantes afectados en la arquitectura radicular. De hecho, existe una colección española de líneas de ADN-T que se han generado en este fondo genético y que se han puesto a disposición de la comunidad científica recientemente (Pérez-Martin *et al.*, 2017), por lo que se prevé iniciar el análisis de algunos de los mutantes de esta colección en trabajos futuros del laboratorio del Prof. José Manuel Pérez Pérez.

En nuestras condiciones experimentales, el mutante *aerial roots* presentó un mayor número de raíces adventicias que las variedades comerciales de tomate, lo que está en consonancia con los resultados obtenidos recientemente por otros autores (Mignolli *et al.*, 2017). En este trabajo se determinó que en el mutante *aerial roots* el transporte polar de auxinas desde las hojas hasta la base del tallo está afectado, debido a que la expresión de algunos transportadores de auxinas de la familia *PIN-FORMED* (*SIPIN1*, *SIPIN4*, *SILAX5*) es mucho mayor en la región apical del tallo, lo que condiciona la acumulación de auxina en la región basal de los tallos y, en consecuencia, la inducción de la formación de raíces adventicias. Los mutantes *aerial roots* y *ridged* presentaron una mayor longitud

de la raíz principal que las variedades comerciales analizadas, que puede deberse a un mayor tamaño del meristemo radicular, a una mayor expansión celular o a una combinación de ambos factores. Dado que no se observaron diferencias notables en la estructura tisular del meristemo entre estos genotipos y las variedades comerciales analizadas, serán necesarios estudios adicionales para poder establecer la causa de las diferencias observadas. Otro de los mutantes que presentó un mayor número de raíces adventicias fue el mutante *rosette*, aunque en este caso, la mutación también parece afectar al número de raíces laterales en la misma dirección. El mutante *rosette* se identificó tras la mutagénesis con rayos X de semillas de tomate (Butler, 1954) y apenas se ha investigado desde entonces. En estudios posteriores en el laboratorio del Prof. José Manuel Pérez Pérez se seguirá investigando sobre la implicación de los genes *AERIAL ROOTS* y *ROSETTE* en la formación de raíces adventicias.

Como era esperable según resultados de los estudios genómicos presentados previamente, el espectro de variación de los parámetros de la arquitectura radicular observados en las especies silvestres analizadas fue amplio. Cabe destacar de entre las estudiadas a *S. pimpinellifolium*, ya que presentó una mayor longitud de la raíz primaria y las laterales y un mayor número (y densidad) de raíces laterales y adventicias. Recientemente se ha desarrollado una nueva colección de 54 líneas de introgresión de *S. pimpinellifolium* en el fondo genético *S. lycopersicum* var MoneyMaker (Barrantes *et al.*, 2016), lo que nos permitirá iniciar la disección genética de la arquitectura radicular y, eventualmente, la identificación de los alelos responsables de las diferencias existentes entre estas dos especies. Es destacable además que muchas de las especies silvestres presentaron un número de raíces adventicias muy superior al de las variedades comerciales, lo que sugiere que la presencia de raíces adventicias podría ser un rasgo ancestral y que no ha sido deliberadamente seleccionado durante la domesticación actual del tomate. A la vista de resultados recientes (Sauvage *et al.*, 2017), sería interesante estudiar si alguno de los genes diferencialmente expresados en las variedades comerciales respecto a las especies silvestres estaría relacionado con la formación de raíces adventicias. Nos parece curioso comentar el caso de *S. chilense*, que está adaptado a zonas desérticas (Maldonado *et al.*, 2003) y que presenta, en condiciones naturales, un sistema radicular bien desarrollado con una raíz principal más larga y con un mayor número de raíces laterales que el tomate cultivado (O'Connell *et al.*, 2007). En nuestras condiciones de cultivo *in vitro* en un medio rico en nutrientes, sin embargo, tanto la longitud de la raíz principal como el número de raíces laterales fueron significativamente menores que en las variedades comerciales e inferior al de nuestro silvestre. Para poder obtener valores más próximos a la realidad, deberíamos de llevar a cabo nuestra caracterización fenotípica del sistema radicular en condiciones de déficit de nutrientes o en macetas en el invernadero.

6. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

- Se ha establecido un protocolo estandarizado para el análisis morfológico de la arquitectura radicular en tomate y se ha evaluado éste en una colección de 11 especies silvestres de tomate, 4 variedades comerciales y 5 mutantes.
- Se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en muchos de los parámetros de la arquitectura radicular analizados entre *S. lycopersicum* y las especies silvestres de tomate. Podemos destacar a *S. pimpinelifolium*, ya que ha sido el silvestre que ha presentado una mayor longitud de la raíz principal y un mayor número de raíces laterales.
- Se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en el número y la longitud de las raíces adventicias en respuesta a herida entre los genotipos analizados. Es interesante destacar que las variedades comerciales presentaron un sistema radicular adventicio más desarrollado que las especies silvestres de tomate.
- No se han observado diferencias apreciables en la estructura tisular del meristemo apical radicular en las líneas que presentaron valores extremos entre sí y con a sus parentales.
- Nuestros resultados indican que las especies silvestres de tomate presentan una enorme variabilidad en los rasgos estudiados, por lo que constituyen un buen punto de partida para llevar a cabo estudios genéticos para entender el desarrollo del sistema radicular en el género *Solanum*.

El análisis detallado de las diferencias observadas en algunos parámetros del sistema radicular en las variedades comerciales de tomate, especies silvestres y mutantes estudiados, nos ha permitido evaluar la variabilidad genética existente en algunos de los rasgos fenotípicos complejos que caracterizan al sistema radicular de solanáceas, tales como la densidad de raíces laterales y adventicias, su ángulo de crecimiento y la longitud de las mismas. En estudios futuros, se podría utilizar las variedades que presentaron un sistema radicular más desarrollado con respecto a la variedad comercial de referencia como parentales para obtener líneas de introgresión permitiesen llevar a cabo la localización precisa de *loci* de caracteres cuantitativos o QTL. Alternativamente, estas especies silvestres, podrían utilizarse como patrones para la realización de injertos con variedades comerciales, de manera similar a cómo se hace en otras especies hortícolas como sandía, en el que las variedades más productivas se injertan en pies híbridos de calabaza, que aportan un mejor sistema radicular (Kyriacou et al., 2017).

Cabe destacar que la formación de raíces adventicias es un parámetro de enorme interés para el cultivo de plantas de tomate en el invernadero, en el que las condiciones del suelo determinan que los nutrientes se localizan en las capas más superficiales del mismo por lo que disponer de un sistema radicular adventicio más desarrollado asegura una mejor eficacia en la captación de nutrientes y de agua.



7. BIBLIOGRAFÍA

- 100 Tomato Genome Sequencing Consortium, Aflitos, S., Schijlens E., de Jong, H., de Ridder, D., Smit, S., Finkers, R., Wang, J., Zhang, G., Li, N., Mao, L., Bakker, F., Dirks, R., Breit, T., Gravendeel, B., Huits, H., Struss, D., Swanson-Wagner, R., van Leeuwen, H., van Ham, R.C., Fito, L., Guignier, L., Sevilla, M., Ellul, P. et al.,** (2014). Exploring genetic variation in the tomato (*Solanum section Lycopersicon*) clade by whole-genome sequencing. *Plant J*, **80**(1),136-48
- Alaguero, A.** (2016). Estudio funcional de la señalización hormonal en la formación de raíces adventicias en tomate. Trabajo de fin de Grado, Universidad Miguel Hernández.
- Armengaud, P.** (2009). EZ-Rhizo software. *Plant Signal Behav* **4** (2), 139-141.
- Bai, Y., Lindhout, P.** (2007). Domestication and breeding of tomatoes: what have we gained and what can we gain in the future? *Ann Bot* **100**,1085–1094.
- Barrantes, W., López-Casado, G., García-Martínez, S., Alonso, A., Rubio, F., Ruiz, J.J., Fernández-Muñoz, R., Granell, A., Monforte, A.J.** (2016). Exploring New Alleles Involved in Tomato Fruit Quality in an Introgression Line Library of *Solanum pimpinellifolium*. *Front Plant Sci.* **17**, 7:1172.
- Bedinger P. A., Chetelat R. T., McClure B., Moyle L. C., Rose J. K., Stephen, M.S., van der Knaap, E., Baek, Y.S., Lopez-casado, G., Covey, P.A., Kumar, A., Li, W., Nunez, R., Cruz-García, F., Royer, S.** (2011). Interspecific reproductive barriers in the tomato clade: opportunities to decipher mechanisms of reproductive isolation. *Sex. Plant Reprod.* **24**(3), 171–187.
- Bellini, C., Pacurar, D.I., Perrone, I.** (2014). Adventitious roots and lateral roots: similarities and differences. *Annu Rev Plant Biol*, **65**, 639-666.
- Bergougnoux, V.** (2013). The history of tomato: from domestication to biopharming. *Biotechnology advances* **32**(1), 170–189.
- Bernacchi, D., Beck-Bunn, T., Emmatty, D., Eshed, Y., Inai, S., Lopez, J., Petiard, V., Sayama, H., Uhlig J., Zamir, D., Tanksley, S.D.** (1998). Advanced backcross QTL analysis of tomato. II 140 Evaluation of near-isogenic lines carrying single-donor introgressions for desirable wild QTL-alleles derived from *Lycopersicon hirsutum* and *Lycopersicon pimpinellifolium*. *Theor Appl Genet* **97**, 170-180.
- Blanca, J., Montero-Pau, J., Sauvage, C., Bauchet, G., Illa, E., Díez, M.J., Francis, D., Causse, M., van der Knaap, E., Cañizares, J.** (2015). Genomic variation in tomato, from wild ancestors to contemporary accessions. *BMC Genomics.* **16**:257.
- Butler, L.** (1954). Two new mutants in the tomato: Propeller and Rosette **45**, 25–27.
- Canene-Adams K., Campbell J., Zaripheh S., Jeffery E., Erdman J. J.** (2005). The tomato as a functional food. *J. Nutr.* **135**, 1226–1230.
- Casero, P.J., Casimiro, I., and Lloret, P.G.** (1995). Lateral root initiation by means of asymmetrical transversal divisions of the pericycle cells in four different species of plants: *Raphanus sativus*, *Helianthus annuus*, *Zea mays* and *Daucus carota*. *Protoplasma* **188**, 49–58.
- Casson, S.A., Lindsey, K.** (2003). Genes and signalling in root development. *New Phytol.* 15811–38.

- Chen, P., Zhang, W., Wang, X., Zhao, K., Negi, D.S., Zhuo, L., Qi, M., Wang, X., Zhang, X.** (2015). Lycopene and Risk of Prostate Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Medicine Baltimore*, **94**(33).
- De Klerk, G.J., van der Krieken, W., De Jong, J.C.** (1999). The formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. *In Vitro Cell Devel Biol*, **35**(3), 189–199.
- Deplanque, X., Muscente-Paque, D., Chappuis, E.** (2016). Proprietary tomato extract improves metabolic response to high-fat meal in healthy normal weight subjects. *Food and Nutrition research*, **60**:1, 32537.
- Emmanuel, E., Levy, A.A.** (2002). Tomato mutants as tools for functional genomics. *Curr Opin Plant Biol*, **5**(2), 112-117.
- Ensminger, A.H., Ensminger, M.E., Konlande J.E., Robson, J.R.K.** (1995). *The Concise Encyclopedia of Foods and Nutrition*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Esau, K.** (1977). *Anatomy of Seed Plants*. (New York: John Wiley and Sons).
- Eshed, Y., Zamir, D.** (1994). Introgressions from *Lycopersicon pennellii* can improve the soluble solids yield of tomato hybrids. *Theoretical and Applied Genetics*, **88**, 891–897.
- Foolad, M.R.** (2007). Genome mapping and molecular breeding of tomato. *International Journal of Plant Genomics*. 2007:64358.
- Francia, E., Tacconi, G., Crosatti C., Barabaschi, D., Bulgarelli, D., Dall'Aglio, E., Vale, G.** (2005). Marker assisted selection in crop plants. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **82**, 317-342.
- Gebhardt, C.** (2016). The historical role of species from the Solanaceae plant family in genetic research. *Theor Appl Genet*. **129**(12), 2281-2294.
- Gur, A., Zamir, D.** (2004). Unused natural variation can lift yield barriers in plant breeding. *PLoS Biol* **2**(10):e245.
- Kauffman, J. B.** (1991). Survival by sprouting following fire in tropical forests of the Eastern Amazon. *Biotropica*, **23**, 219-224.
- Ladizinsky, G.** (1985). Founder effect in crop-plant evolution. *Econ Bot* **33**, 191-199.
- Li, W., Chetelat, R.T.** (2015). Unilateral incompatibility gene *ui1.1* encodes an S-locus F-box protein expressed in pollen of Solanum species. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **112**(14), 4417–22.
- Malamy, J.E., Benfey, P.N.** (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **124**, 33–44.
- Maldonado, C., Squeo, F.A., Ibacache, E.** (2003). Phenotypic response of *Lycopersicon chilense* to water deficit. *Rev. Chil. Hist. Nat.* **76**, 129–137.
- Mano Y, Muraki M, Fujimori M, Takamizo T, Kindiger B.** (2005). AFLP-SSR maps of maize×teosinte and maize×maize: comparison of map length and segregation distortion. *Plant Breeding*. **124**, 432–439.
- Mergemann, H., Sauter, M.** (2000). Ethylene induces epidermal cell death at the site of adventitious root emergence in rice. *Plant Physiol*, **124**(2), 609-614.

- Mignolli, F., Mariotti, L., Picciarelli, P., Vidoz, M.L.** (2017). Differential auxin transport and accumulation in the stem base lead to profuse adventitious root primordia formation in the aerial roots (aer) mutant of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *J Plant Physiol*, **213**, 55-65.
- Miller J.C., Tanksley S.D.** (1990). RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. *Theor Appl Genet* **80**, 437-448.
- Naseer S., Lee Y., Lapierre C., Franke R., Nawrath C., Geldner N.** (2012). Casparian strip diffusion barrier in *Arabidopsis* is made of a lignin polymer without suberin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 10910101–10106.
- Ochoa, I.E., Blair, M.W., Lynch, J.P.** (2006). QTL analysis of adventitious root formation in common bean under contrasting phosphorus availability. *Journal of Crop Science* **46**, 1609–2.
- O’Connell, M.A., Medina, A.L., Sanchez, P.P., Trevino, M.B.** (2007). Molecular genetics of drought resistance response in tomato and related species. In: Razdan, M.K., Mattoo, A.K. (Eds.), *Genetic Improvement of Solanaceous Crops*, 2. Tomato, Science Publishers, Enfield, USA **2**, 261–283.
- Palmer, J.D., Zamir, D.** (1982). Chloroplast DNA evolution and phylogenetic relationships in *Lycopersicon*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 5006-5010.
- Peralta, I.E., Spooner, D.M.** (2005). Morphological characterization and relationships of wild tomatoes. *Monogr Syst Bot* **104**, 227–57.
- Peralta, I.E., Knapp, S., Spooner, D.M.** (2006). Nomenclature for wild and cultivated tomatoes. *Tomato Genetics Cooperative Report*. **56**, 6–12.
- Peralta, I.E., Spooner, D.M., Knapp, S.** (2008). *Taxonomy of Wild Tomatoes and their Relatives (Solanum sect. Lycopersicoides, sect. Juglandifolia, sect. Lycopersicon; Solanaceae) Systematic Botany Monographs* 84.
- Pérez-Martín, F., Yuste-Lisbona, F.J., Pineda, B., Angarita-Díaz, M.P., García-Sogo, B., Antón, T., Sánchez, S., Giménez, E., Atarés, A., Fernández-Lozano, A., Ortíz-Atienza, A., García-Alcázar, M., Castañeda, L., Fonseca, R., Capel, C., Goergen, G., Sánchez, J., Quispe, J.L., Capel, J., Angosto, T., Moreno, V., Lozano, R.** (2017) A collection of enhancer trap insertional mutants for functional genomics in tomato. *Plant Biotechnol J*. Mar 19.
- Petricka, J.J., Van Norman, J.M., Benfey, P.N.** (2009). Symmetry breaking in plants: molecular mechanisms regulating asymmetric cell divisions in *Arabidopsis*. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**:a000497.
- Rogers, E.D., Benfey, P.N.** (2015). Regulation of plant root system architecture: implications for crop advancement. *Curr Opin Biotechnol* **32**, 93–98.
- Sahu, K.K., Chattopadhyay, D.** (2017). Genome-wide sequence variations between wild and cultivated tomato species revisited by whole genome sequence mapping. *BMC Genomics*, **18**(1), 430.
- Sauvage, C., Rau, A., Aichholz, C., Chadoeuf, J., Sarah, G., Ruiz, M., Santoni, S., Causse, M., David, J., Glémin, S.** (2017). Domestication rewired gene expression and nucleotide diversity patterns in tomato. *Plant J*. **91**(4), 631-645.
- Shani, E., Ben-Gera, H., Shleizer-Burko, S., Burko, Y., Weiss, D., Ori, N.** (2010). Cytokinin regulates compound leaf development in tomato. *Plant Cell*, **22**(10), 3206–3217.

- Song, Y., Chen, D., Lu, K., Sun, Z.** (2015). Enhanced tomato disease resistance primed by arbuscular mycorrhizal fungus. *Front Plant Science* **6**:786.
- Spooner D.M., Anderson, G.J., Jansen, R.K.** (1993). Chloroplast DNA evidence for the interrelationships of tomatoes, potatoes, and pepinos (*Solanaceae*). *Am. J. Bot.* **80**, 676–688.
- Stevens, M.A., Rick, C.M.** (1986). Genetic and breeding. In Atherton JG and Rudich J (ed.) *The tomato crop: a scientific basis for improvement*. Chapman and Hall, London, 35-109.
- Sukumar P., Maloney, G.S., Muday, G.K.** (2013). Localized induction of the ATP-binding cassette B19 auxin transporter enhances adventitious root formation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **162**, 1392–405.
- Tomato Genome Consortium.** (2012). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, **485**(7400), 635-641.
- Truernit, E., Bauby, H., Dubreucq, B., Grandjean, O., Runions, J., Barthélémy, J., Palauqui, J.C.** (2008). High-resolution whole-mount imaging of three-dimensional tissue organization and gene expression enables the study of Phloem development and structure in *Arabidopsis*. *Plant Cell Jun*; **20**(6), 1494-503.
- Uehara, T., Sugiyama. S., Matsuuna, H., Arie, T., Masuta, C.** (2010). Resistant and Susceptible Responses in Tomato to Cyst Nematode are Differentially Regulated by Salicylic Acid. *Plant Cell Physiol* **51**(9), 1524-1536.
- Van der Meijden, E., Wijn, M., Verkaar. H.J.** (1988). Defence and regrowth, alternative plant strategies in the struggle against herbivores. *Oikos* **51**, 355-363
- Van Norman, J.M., Zhang, J., Cazzonelli, C.I., Pogson, B.J., Harrison, P.J., Bugg, T.D., Chan, K.X., Thompson, A.J., Benfey, P.N.** (2014). Periodic root branching in *Arabidopsis* requires synthesis of an uncharacterized carotenoid derivative. *PNAS* **111**:E1300–9.
- Vrebalov, J., Pan, I.L., Arroyo, A.J., McQuinn, R., Chung, M., Poole, M., Rose, J.** (2009). Fleshy fruit expansion and ripening are regulated by the Tomato *SHATTERPROOF* gene *TAGL1*. *Plant Cell*, **21**(10), 3041-3062.
- Warnock, S.J.** (1991). Natural Habitats of *Lycopersicon* species. *HortScience*, **26**(5).
- Weese, T.L., Lynn B.** (2007). A three-gene phylogeny of the genus *Solanum* (*Solanaceae*). *Systematic Botanic* **32**, 445-463.

8. ANEXO

Morphological characterization and assessment of variability in adventitious root formation in diverse tomato genotypes

Alaguero, A.¹, Azorín., A.¹, Gran, F.J.¹, Peres, L.E.², and Pérez-Pérez, J.M.¹

¹Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández de Elche, Avda. de la Universidad s/n, 03202 Elche, Spain

²Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo, 13418-900 Piracicaba, Brasil

Adventitious roots (ARs) are ectopic roots that arise either naturally or in response to stress from various plant tissues, such as stems and leaves; they may also be induced by mechanical damage or following *in vitro* tissue culture regeneration.

Tomato is an attractive model to study the genetic basis of adventitious organ formation. To explore the phenotypic space of this trait in tomato, we characterized AR formation in excised hypocotyls in a genotypically diverse set of 10 wild tomato species, 7 commercial cultivars, and 20 tomato mutants affected in known genes involved in light or hormonal signaling. A combination of semi-automated image capture and quantitative histology methods allowed us to define the cellular dynamics during the early stages of AR initiation. By studying a collection of *Solanum pennellii* introgression lines (1), we identified several genomic regions that might include genes involved in AR development.

Mendelization of the causal genes will allow us to understand the genetic basis of AR variability within the tomato clade.

(1) Arikita *et al.* (2013) *Plant Sci* 199-200: 121

Work funded by MINECO/FEDER (AGL2012-33610 and BIO2015-64255-R)

Morphological characterization and assessment of variability in adventitious root formation in diverse tomato genotypes

Aurora Alaguero¹, Alfonso Azorin¹, Francisco Javier Gran¹, Lazaro E. P. Peres², José Manuel Pérez-Pérez¹



¹ Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Avda. de la Universidad s/n, 03202 Elche, Spain

² Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ), Universidade de São Paulo (Piracicaba) Brasil

aalaguero@umh.es



Introduction

Adventitious roots (ARs) are ectopic roots that arise either naturally or in response to stress from various plant tissues, such as stems and leaves; they may also be induced by mechanical damage or following *in vitro* tissue culture regeneration¹.

Results

To explore the phenotypic space of AR morphology in tomato, we characterized AR formation in excised hypocotyls in a genotypically diverse set of wild tomato species, commercial cultivars, and previously-described tomato mutants affected in known genes involved in light or hormonal signaling. A combination of semi-automated image capture and quantitative histology methods allowed us to define the cellular dynamics during the early stages of AR initiation. By studying a collection of *Solanum pennellii* introgression lines², we identified several genomic regions that might include genes involved in AR development.

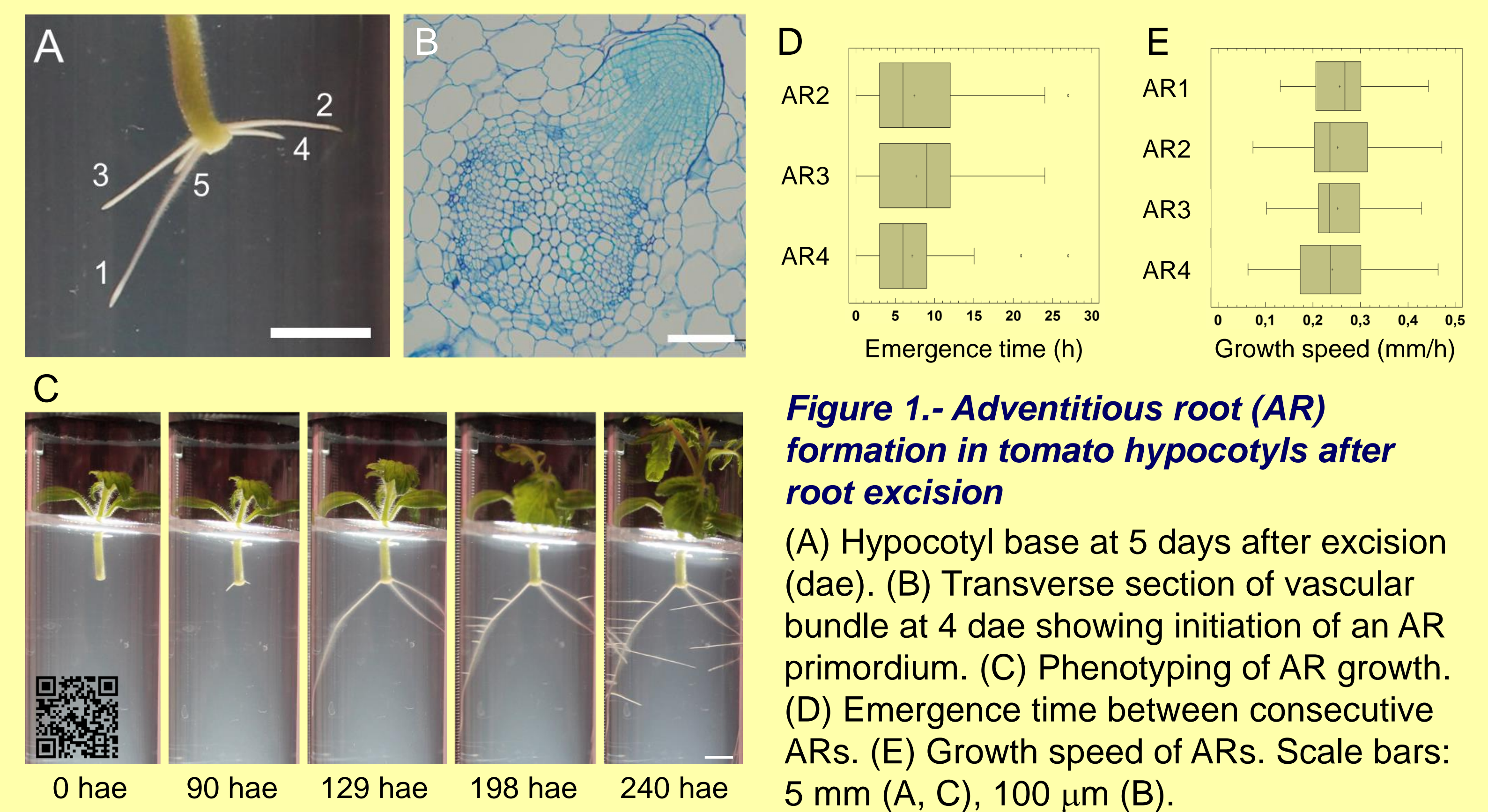


Figure 1.- Adventitious root (AR) formation in tomato hypocotyls after root excision

(A) Hypocotyl base at 5 days after excision (dae). (B) Transverse section of vascular bundle at 4 dae showing initiation of an AR primordium. (C) Phenotyping of AR growth. (D) Emergence time between consecutive ARs. (E) Growth speed of ARs. Scale bars: 5 mm (A, C), 100 μ m (B).

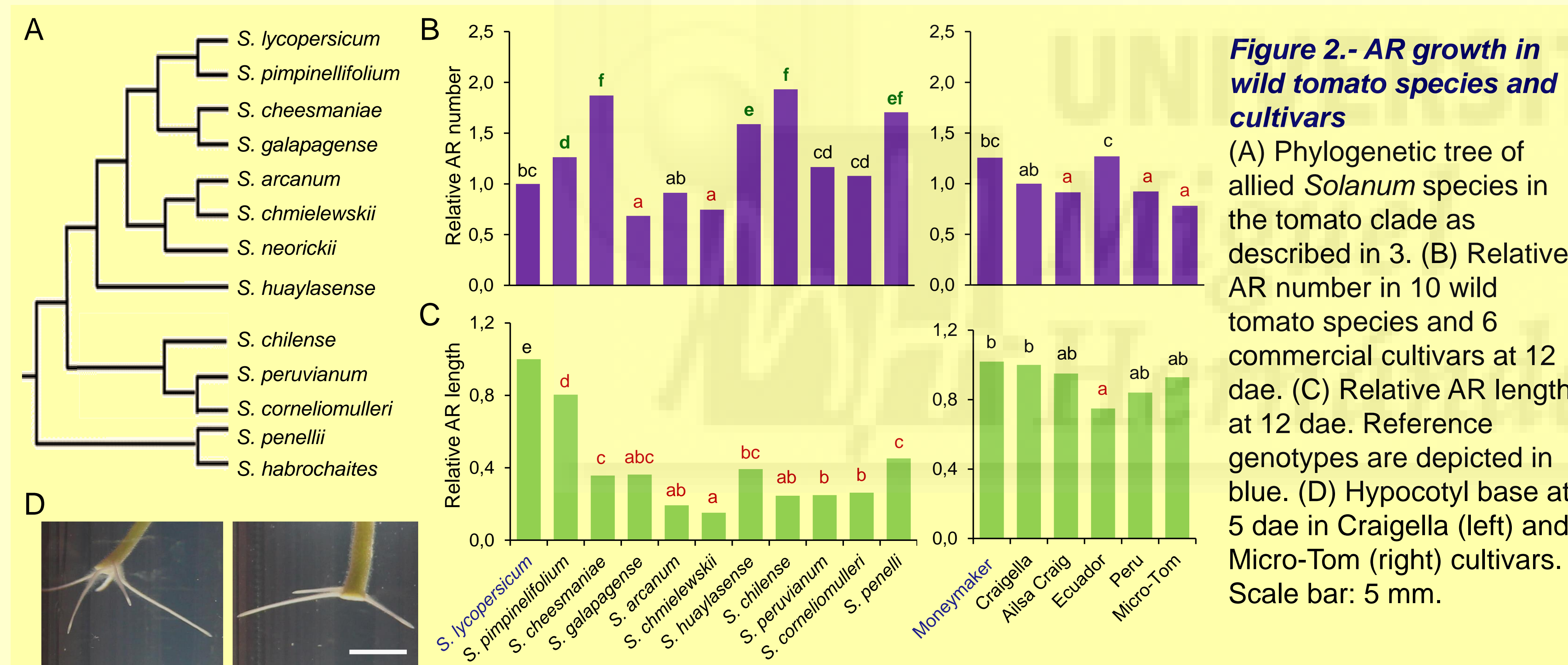


Figure 2.- AR growth in wild tomato species and cultivars

(A) Phylogenetic tree of allied *Solanum* species in the tomato clade as described in 3. (B) Relative AR number in 10 wild tomato species and 6 commercial cultivars at 12 dae. (C) Relative AR length at 12 dae. Reference genotypes are depicted in blue. (D) Hypocotyl base at 5 dae in Craigella (left) and Micro-Tom (right) cultivars. Scale bar: 5 mm.

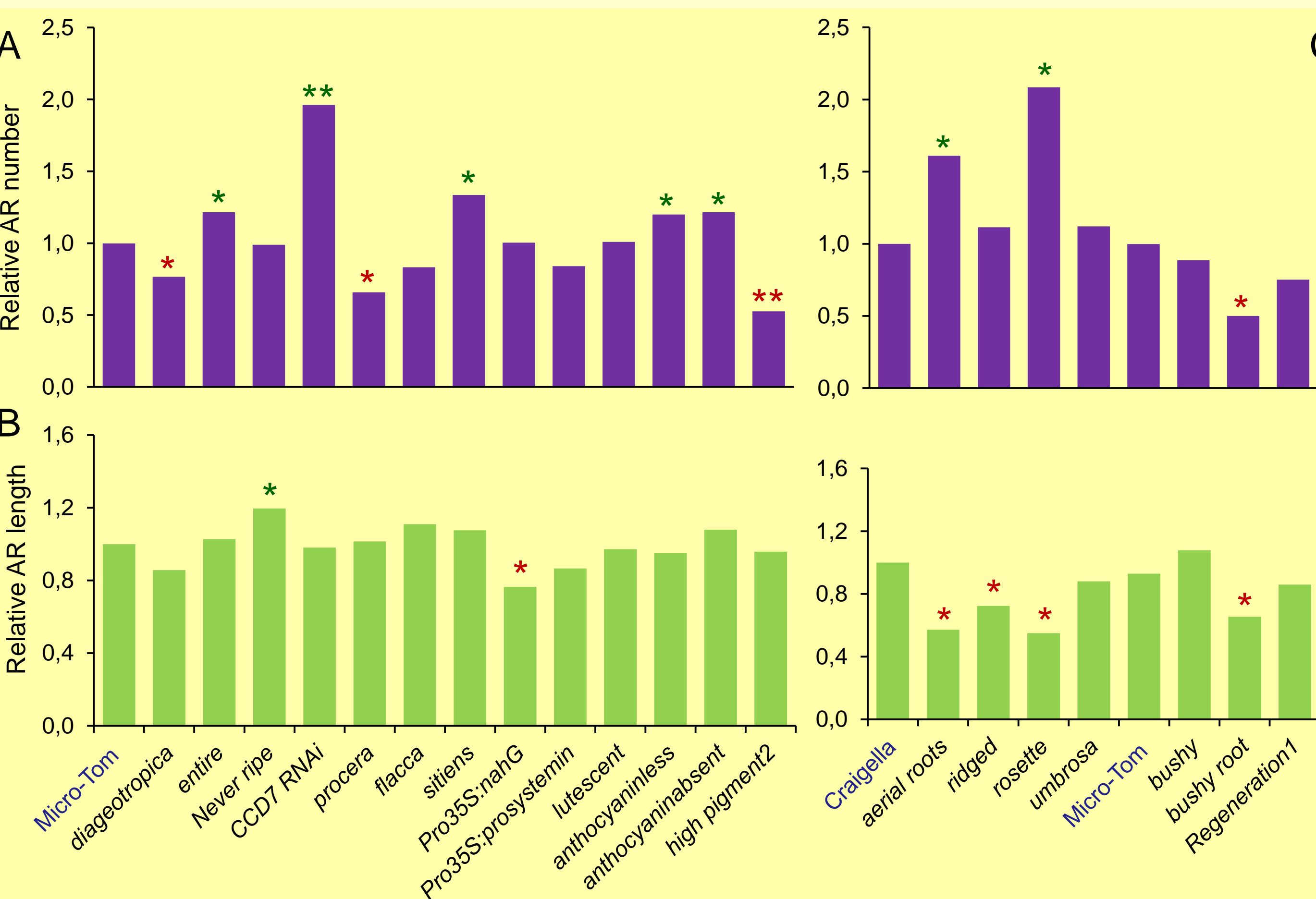
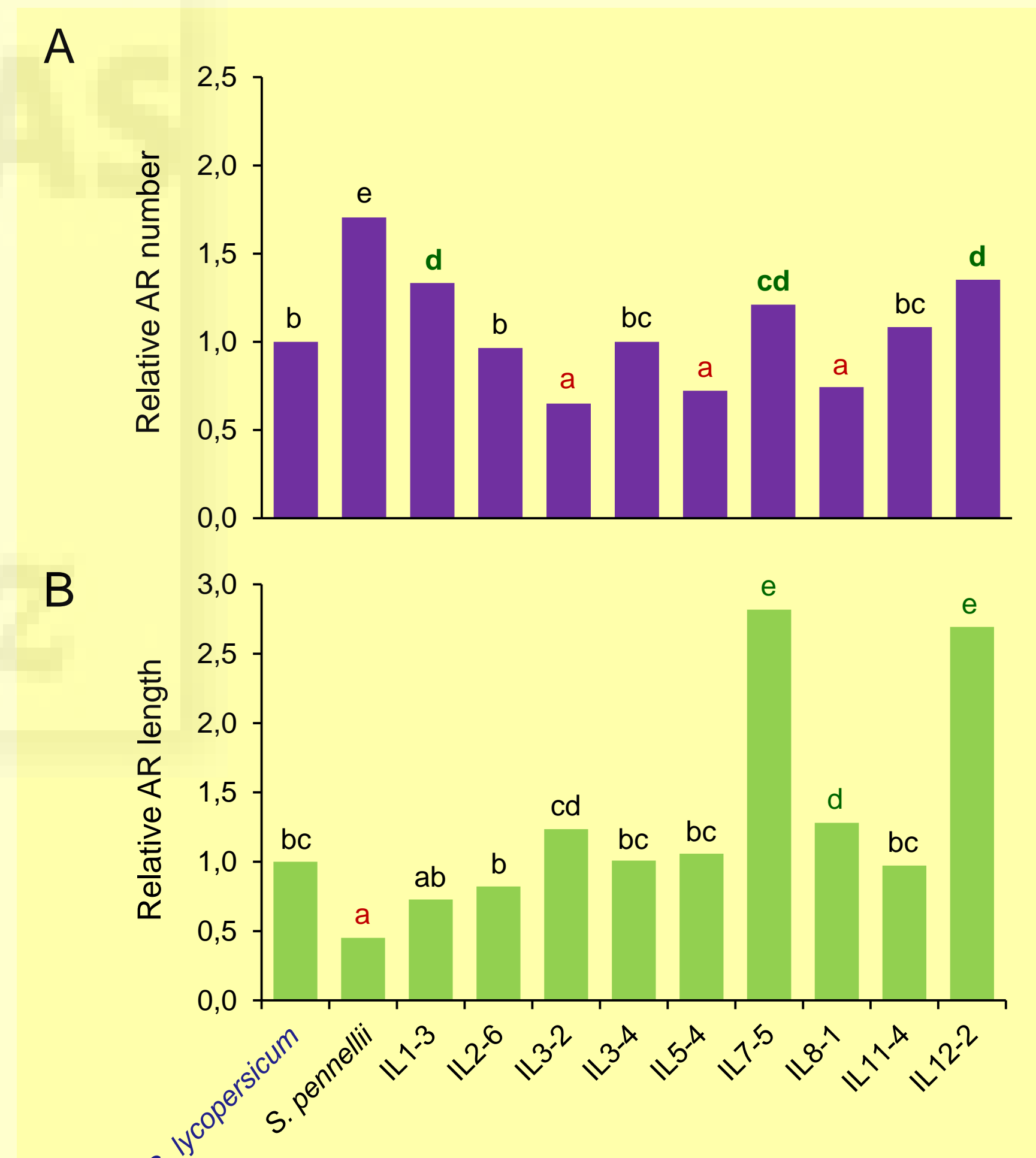


Figure 3.- AR growth in a selection of tomato mutants affected in known pathways

(A) AR number and (B) AR length in 20 previously-described tomato mutants at 12 dae. (C) AR phenotype at 8 dae in some tomato mutants. Scale bar: 5 mm.

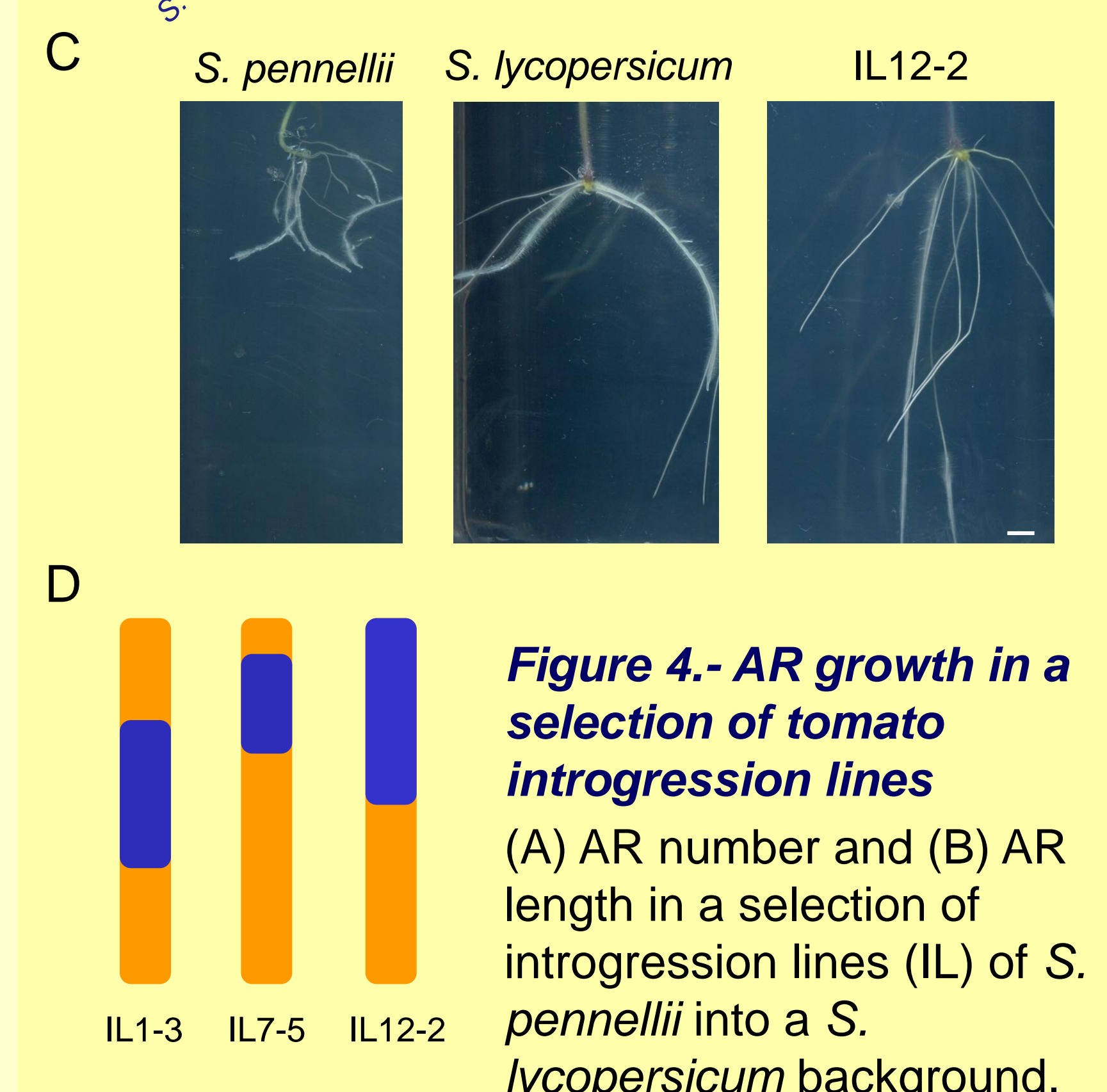


Figure 4.- AR growth in a selection of tomato introgression lines

(A) AR number and (B) AR length in a selection of introgression lines (IL) of *S. pennellii* into a *S. lycopersicum* background.

(C) AR phenotype at 10 dae in IL12-2 and its parental genotypes. Scale bar: 5 mm. (D) IIs selected for further studies; blue, *S. pennellii*; orange, *S. lycopersicum*.

Conclusion

We have initiated the genetic dissection of AR formation in tomato. Mendelization of the causal genes will allow us to understand the genetic basis of the observed variability in AR traits within the tomato clade.

References

- Bellini *et al.* (2014). *Annu Rev Plant Biol* **65**: 639
- Arikita *et al.* (2013). *Plant Sci* **199-200**: 121
- Bedinger *et al.* (2010). *Sex Plant Reprod* **24**: 171



Acknowledgements

Work in the laboratory of J.M.P.-P. (AGL2012-33610 and BIO2015-64255-R) is financed by the Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) and by FEDER funds of the EC - "A way to build Europe"



AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo Fin de Máster ha sido posible gracias a la financiación por el Ministerio de Economía y Competitividad en el proyecto *“Genómica comparada de la formación de raíces adventicias en tomate y clavel (BIO2015-64255-R)”*.

A José Manuel Pérez por haberme dado la oportunidad de iniciar mi carrera investigadora en su laboratorio, por hacerme aprender cada día y haberme orientado de la mejor manera posible.

A Aurora Alaguero por enseñarme todo lo necesario para desenvolverme en el laboratorio. Gracias por haberme ayudado en todo momento (tuvieras tiempo para ayudarme o no) y por hacer que el trabajo y la estancia en el laboratorio haya sido lo más amena posible.

A mis compañeros del laboratorio Sergio, María salud, Paula, Diana y Clara por hacerme sentir como uno más desde el primer día. Gracias por haberme prestado vuestra ayuda en los momentos que la he necesitado.

A mi compañera del laboratorio Ana-Belen por haberme ayudado durante los primeros meses a dar mis primeros pasos en el laboratorio

A mi familia, amigos por haberme apoyado en todo momento y a mi novia Fátima por estar siempre a mi lado y haberme ayudado siempre que lo he necesitado.