

TRABAJO FIN DE GRADO

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

---

Estudio de la variabilidad natural para  
identificar nuevos reguladores de la  
regeneración en tomate

---

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA APLICADA

ÁREA DE GENÉTICA

CURSO 2023-2024

**Ander Sáez Gilabert**

Tutores académicos: Adrián Luque Torres y José Manuel Pérez Pérez

## RESUMEN

---

En estudios anteriores, se han identificado en el laboratorio del Prof. José Manuel Pérez Pérez varios polimorfismos que presentaban una asociación significativa con la formación de callos ectópicos en las líneas de la colección Varitome-COMAV cuando se cultivan in vitro. En este trabajo se ha evaluado la eventual cosegregación entre uno de estos polimorfismos y la formación de callo ectópico en cuatro familias F<sub>2</sub> obtenidas tras el cruzamiento de dos líneas de *Solanum lycopersicum* y otras dos de *S. pimpinellifolium* que formaban callos ectópicos con otras líneas que no los formaban. Para determinar la presencia de este polimorfismo, se ha llevado a cabo un análisis de CAPS tras la amplificación por PCR de la región del ADN genómico que contiene dicho polimorfismo. Además, se ha determinado el fenotipo de crecimiento temprano y la formación de raíces adventicias en respuesta a herida en plántulas mutantes *more adventitious roots (mar)*, aisladas previamente por una mayor producción de raíces adventicias en el tallo en condiciones de invernadero.

**PALABRAS CLAVE:** *Solanum lycopersicum*, *Solanum pimpinellifolium*, formación de callo, raíces adventicias, Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS).



## ABSTRACT

---

In previous studies, in the laboratory of Prof. José Manuel Pérez-Pérez, several polymorphisms were identified that showed a significant association with the formation of ectopic callus in the lines of the Varitome-COMAV collection when cultured in vitro. In this work, the subsequent cosegregation between one of these polymorphisms and the formation of ectopic callus was evaluated in four F<sub>2</sub> families obtained after crossing two *Solanum lycopersicum* and two *S. pimpinellifolium* lines that formed ectopic callus with other lines that did not. To determine the presence of this polymorphism, a CAPS analysis was performed after PCR amplification of the region of genomic DNA containing this polymorphism. Furthermore, the early growth phenotype and the formation of adventitious roots in response to wounding were determined in *more adventitious roots (mar)* mutant seedlings, previously isolated by a greater production of adventitious roots in the stem under greenhouse conditions.

**KEY WORDS:** *Solanum lycopersicum*, *Solanum pimpinellifolium*, callus formation, adventitious roots, Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS).

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

---

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>5</b>
1.1. Evolución del tomate .....	5
1.2. El tomate como modelo de experimentación vegetal .....	6
1.2.1. <i>Solanum lycopersicum</i> .....	6
1.2.2. <i>Solanum pimpinellifolium</i> .....	7
1.3. Sistema radicular del tomate.....	8
1.3.1. Raíz principal .....	8
1.3.2. Raíces laterales .....	8
1.3.3. Raíces adventicias.....	8
1.4. Formación de callos vegetales.....	9
1.5. Mutantes <i>mar</i> .....	10
1.6. Líneas varitome .....	10
<b>2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS</b> .....	<b>12</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>13</b>
3.1. Material vegetal.....	13
3.2. Selección de las líneas de estudio de la colección Varitome-COMAV .....	14
3.3. Cultivo in vitro .....	15
3.3.1. Esterilización y germinación de las semillas .....	15
3.3.2. Fenotipado de las familias F <sub>2</sub> .....	15
3.3.3. Fenotipado de las líneas <i>mar</i> .....	16
3.3.4. Cruces entre mutantes <i>mar</i> .....	18
3.3.5. Obtención de imágenes.....	19
3.3.6. Análisis del fenotipo radicular .....	19
3.4. Genotipado de líneas Varitome-COMAV .....	20
3.4.1. Extracción de ADN genómico .....	20
3.4.2. Amplificación de ADN mediante PCR .....	20
3.4.3. Digestión del fragmento de ADN amplificado .....	22
3.4.4. Electroforesis en gel de agarosa .....	22
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>23</b>
4.1. Formación de callo en las líneas Varitome-COMAV .....	23
4.1.1. Detección de la inserción en las líneas Varitome-COMAV .....	23
4.1.2. Fenotipado de la F <sub>2</sub> de los cruces de Varitome-COMAV.....	24
4.1.3. Genotipado de la inserción “TAGTTGGAGGCAC” mediante análisis CAPS.....	26
4.2. Mutantes <i>mar</i> .....	29
4.2.1. Fenotipado radicular de los mutantes <i>mar</i> .....	29
4.2.2. Cruzamiento entre los mutantes <i>mar</i> .....	32
<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	<b>33</b>
<b>6. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA</b> .....	<b>35</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>36</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Árbol filogenético del género <i>Solanum</i> .....	5
<b>Figura 2.</b> Morfología de <i>S. pimpinellifolium</i> y <i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> .....	7
<b>Figura 3.</b> Regulación hormonal y procesos implicados en la formación de raíces adventicias inducidas por el corte del sistema radicular .....	9
<b>Figura 4.</b> Mapa de ubicaciones de los accesos seleccionados .....	14
<b>Figura 5.</b> Proceso de esterilización de semillas y fenotipado. ....	17
<b>Figura 6.</b> Cruces de flores de líneas <i>mar</i> .....	18
<b>Figura 7.</b> Digestión enzimática con MnlI .....	21
<b>Figura 8.</b> Formación de callo ectópico en las líneas Varitome-COMAV .....	25
<b>Figura 9.</b> Análisis CAPS de los parentales.....	27
<b>Figura 10.</b> Análisis CAPS de los cruzamientos .....	28
<b>Figura 11.</b> Sistema radicular temprano de los mutantes <i>mar</i> . ....	30
<b>Figura 12.</b> Formación de raíces adventicias en los mutantes <i>mar</i> .....	31

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Familias F <sub>2</sub> utilizadas en este trabajo.....	13
<b>Tabla 2.</b> Líneas <i>mar</i> utilizadas en este trabajo.....	13
<b>Tabla 3.</b> Características de las líneas Varitome-COMAV estudiadas en este trabajo.....	23
<b>Tabla 4.</b> Estudio del modo de herencia de la formación de callo ectópico en la progenie F <sub>2</sub> .....	24
<b>Tabla 5.</b> Cruces realizados entre los mutantes <i>mar</i> y su porcentaje de éxito (entre paréntesis).....	32

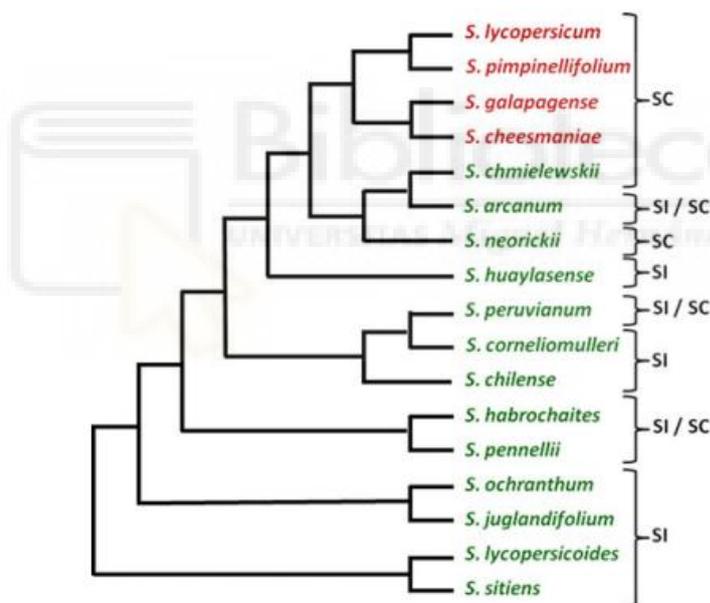
## LISTADO DE ABREVIATURAS UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO

ADNg, ADN genómico	DTE, Días Tras la Escisión del ápice de la raíz principal	<i>mar</i> , more adventitious roots	RA, Raíces Adventicias
ANOVA, análisis de la varianza	DTC, Días Tras el Corte del sistema radicular completo.	MS, <i>Murashige &amp; Skoog</i>	SLC, <i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>
ARF, Factor de Respuesta a Auxinas	F <sub>2</sub> , segunda generación	pb, par de bases	SLL, <i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>lycopersicum</i>
CAPS, Cleaved Amplification Polymorphism Sequence	GWAS, Genome Wide Association Study	PCR, reacción en cadena de la polimerasa	SNP, Single Nucleotide Polymorphism
DTS, Días Tras la Siembra	Kb, kilobase	QTL, loci de rasgos cuantitativos	SP, <i>Solanum pimpinellifolium</i>

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Evolución del tomate

El tomate que se cultiva en la actualidad (*Solanum lycopersicum*) es un miembro de la familia *Solanaceae* (Nuez *et al.*, 2008) (Figura 1). Sus orígenes silvestres apuntan al oeste de Sudamérica, incluyendo las Islas de las Galápagos, y el ancestro silvestre más cercano es *Solanum pimpinellifolium* (SP), que originariamente, proviene de las regiones costeras de Perú y Ecuador (Peralta y Spooner, 2005) (Figura 1). *Solanum lycopersicum* se divide en dos variedades botánicas: *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* (SLC) y *Solanum lycopersicum* var. *lycopersicum* (SLL). SLC es nativa de los Andes de Ecuador y Perú, y también se encuentra en áreas subtropicales. Puede crecer como especie silvestre, en jardines, junto a carreteras, y como cultivo, prosperando en los ambientes húmedos de Ecuador y Perú (Blanca *et al.*, 2015). Mientras que SP, generalmente se encuentra más en las costas secas de Perú y la costa más húmeda de Ecuador (Blanca *et al.*, 2015).



**Figura 1.** Árbol filogenético del género *Solanum*. Las especies en rojo producen frutos rojos o naranjas mientras que las especies en verde producen frutos verdes o morados. SC significa que son autocompatibles mientras que SI significa autoincompatibilidad. Figura tomada de Bedinger *et al.* (2010).

La domesticación del tomate sigue siendo incierta, especialmente en cuanto al papel de SLC en este proceso. La hipótesis que más sentido cobra es que SLC sea un intermedio evolutivo entre SP y SLL, ya que no hay barreras reproductivas entre SP y SLC, y este proceso habría ocurrido en Mesoamérica, en Ecuador, o en Perú (Blanca *et al.*, 2012). Pero alternativamente, podría ser también que SLC sea el resultado de la hibridación entre SP y SLL (Ranc *et al.*, 2008). Volviendo a la primera hipótesis, se ha propuesto un proceso de domesticación en dos etapas para el tomate. La primera

etapa consistió en la selección de SP o SLC primitivo por los agricultores en Ecuador y Perú. La segunda etapa ocurrió en Mesoamérica, donde SLC fue seleccionado hasta convertirse en SLL, que es la forma cultivada del tomate. Datos genéticos confirmaron que las variedades europeas de SLL se originaron en Mesoamérica y constituyen la base genética de las variedades antiguas de SLL (Blanca *et al.*, 2012).

Se cree que hubo un posible cuello de botella genético ocurrido durante la migración de SLL desde Mesoamérica a Europa, lo que redujo mucho la variedad genética en tomates cultivados (Tanksley y McCouch, 1997). En los últimos 100 años, se ha tratado de mejorar SLL para resistir a enfermedades, adaptarse a diversas áreas de producción, rendimiento y uniformidad, todo ello introduciendo muchas introgresiones de SP y otros parientes del tomate, para de esta manera ampliar de nuevo la diversidad genética de SLL (Sim *et al.*, 2011). Estos programas de mejora también seleccionaron rasgos específicos para los mercados de tomate fresco y procesado. Los rasgos seleccionados durante la domesticación del tomate fueron principalmente el peso del fruto y, en menor medida, su forma. Varios genes que afectan estos rasgos han sido identificados (Blanca *et al.*, 2015).

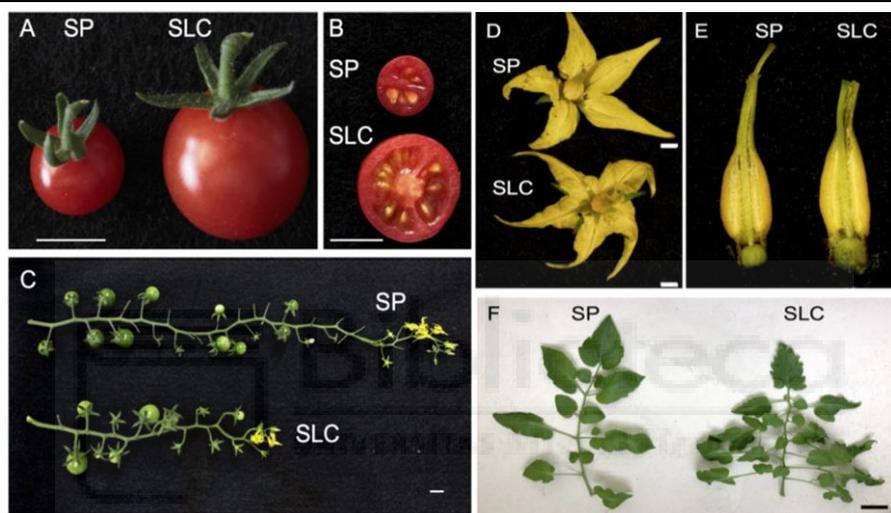
## **1.2. El tomate como modelo de experimentación vegetal**

### **1.2.1. *Solanum lycopersicum***

El tomate cultivado (SLL), se ha consolidado como un modelo de referencia en la investigación vegetal debido a su importancia económica, su variabilidad genética y la facilidad para su manipulación experimental (Larriba *et al.*, 2024). Además, la secuenciación completa de su genoma ha proporcionado una base sólida para estudios genéticos, moleculares, y biotecnológicos, permitiendo avances significativos en diversas áreas de la biología vegetal (The Tomato Genome Consortium, 2012).

La popularidad del tomate entre los científicos ha aumentado con el tiempo, convirtiéndose en un organismo modelo para programas de investigación. Esto se debe a varias razones: la capacidad de cultivar tomate en diferentes condiciones, lo que permite entender su adaptabilidad a diversos estreses abióticos (frío, sequía, etc.). Su ciclo de vida es relativamente corto. Posee insensibilidad al fotoperiodo, es decir, es capaz de florecer y producir semillas en cualquier condición de duración del día. Tiene una alta capacidad de autofecundación y no presenta depresión por consanguinidad. Otro aspecto a destacar es la facilidad para la polinización e hibridación controladas. Sumado a todo ello, se encuentra la simplicidad de su genética, con un genoma relativamente pequeño (estimado en aproximadamente 900 Mb para el cultivar "Heinz 1706", utilizado en la secuenciación del genoma del tomate) (The Tomato Genome Consortium, 2012). Por último, está su capacidad para propagarse asexualmente mediante injertos, o para regenerar plantas enteras a partir de diferentes partes de la planta (Bergougnoux, 2014).

En la actualidad, existen otras plantas que se utilizan como modelos de experimentación, como *Arabidopsis thaliana*, el maíz o el arroz. Sin embargo, el tomate se distingue del resto por dos aspectos principalmente: en primer lugar, es filogenéticamente distinto a estas plantas y, en segundo lugar, posee características morfológicas específicas. Por ejemplo, el tomate tiene un hábito de crecimiento indeterminado debido a cambios reiterativos de fases vegetativas a reproductivas (Lozano *et al.*, 2009). Existe una gran cantidad de mutantes, tanto espontáneos como inducidos por métodos químicos o por radiación, lo que proporciona una valiosa fuente de recursos para los investigadores, permitiéndoles aislar y comprender la función de los genes que regulan el desarrollo y crecimiento del tomate (Chetelat y Rick, 2005).



**Figura 2.** Morfología de *S. pimpinellifolium* y *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*. (A) Morfología de fruto, (B) sección transversal de fruto, (C) inflorescencia, (D) flor, (E) pistilo y estambres, y (F) hojas maduras de SP y SLC. Las líneas de escala miden 1 cm (A, B, C); 200  $\mu$ m (D, E), 5 cm (F). Imagen tomada de Takei *et al.*, 2021 con algunas modificaciones.

### 1.2.2. *Solanum pimpinellifolium*

*S. pimpinellifolium*, que tiene frutos pequeños, redondos y rojos, es el antecesor silvestre del tomate cultivado (Zuriaga *et al.*, 2008) (Figura 2). Fue domesticado en Sudamérica, dando lugar a SLC, que posteriormente fue mejorado en Mesoamérica para producir el tomate de fruto grande SLL (Blanca *et al.*, 2012) (Figura 2). La capacidad de SP para hibridar de forma natural con SLL y la identificación de numerosos loci de rasgos cuantitativos (QTL) ha permitido la incorporación de alelos de SP en los distintos cultivares de tomate, mejorando la resistencia a enfermedades, la tolerancia a estreses abióticos y otras características de calidad del fruto (Xin Wang *et al.*, 2020).

SP se encuentra en las regiones costeras secas de Perú, Ecuador y el norte de Chile, donde las plantas están expuestas a condiciones ambientales adversas como aguas subterráneas con altos

niveles de salinidad (Razali *et al.* 2018). Esta exposición prolongada ha dotado a SP de una robustez fenotípica que se ha perdido en el tomate cultivado durante la domesticación. Por ello, SP es una fuente valiosa de genes que pueden mejorar la tolerancia al estrés en el tomate cultivado. Por ejemplo, la resistencia a la enfermedad bacteriana causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* se logró mediante la introgresión del gen de resistencia *Pto* de SP en SLL (Bai y Lindhout, 2007).

### **1.3. Sistema radicular del tomate**

#### **1.3.1. Raíz principal**

El sistema radicular es determinante para el crecimiento de las plantas debido a sus funciones fundamentales: la absorción selectiva de agua y nutrientes, proporcionar soporte mecánico y actuar como órgano de almacenamiento, servir como barrera selectiva contra patógenos, y en la modulación de algunas respuestas al estrés (Alaguero-Cordovilla *et al.*, 2018). Como en la mayoría de las especies de plantas angiospermas, la raíz principal se forma durante la embriogénesis, que posteriormente emerge cuando se produce la germinación y crece de forma pivotante y gravitatoria engrosándose hasta componerse como tal (Bellini *et al.*, 2014). Pero esto no sería posible sin la primera división asimétrica del tejido meristemático formado en la embriogénesis, que da lugar al centro quiescente, que dispone a su alrededor de numerosas células madre que formarán diferentes tipos de tejidos que conformarán la raíz principal (Dolan *et al.*, 1993).

#### **1.3.2. Raíces laterales**

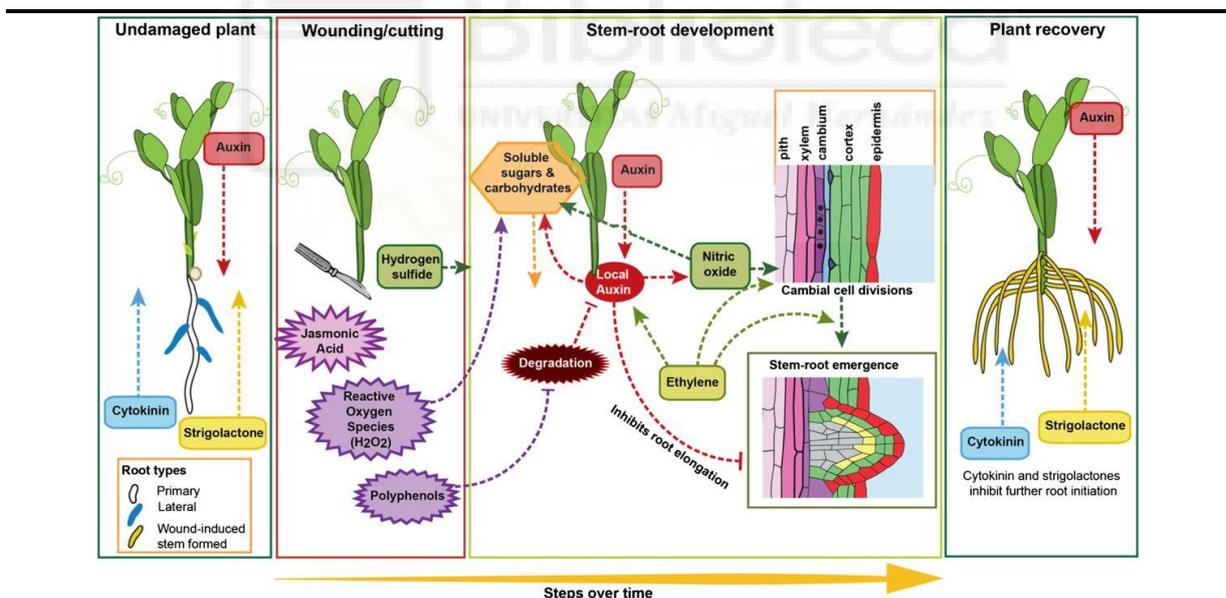
Las raíces laterales, que tienen un desarrollo postembrionario, surgen a partir de la raíz principal y su desarrollo depende principalmente de los máximos de respuesta a auxinas (Du y Scheres, 2018). Cuando se alcanzan estos picos de auxinas, se comienzan a desarrollar las raíces laterales, que generalmente surgen de las células del periciclo adyacentes al xilema (Motte *et al.*, 2019). Las raíces laterales tienen la función de mejorar la exploración horizontal del suelo y con esto, contribuir en gran medida a la capacidad de superar a las plantas vecinas cuando explotan el mismo nicho de suelo (Kevei *et al.*, 2024).

#### **1.3.3. Raíces adventicias**

Existen raíces que surgen de forma postembrionaria que no se desarrollan a partir de tejidos radiculares. Estas raíces, se denominan raíces adventicias y se forman a partir de otros tipos celulares de tejidos maduros (Verstraeten *et al.*, 2014). La aparición de este tipo de raíces no es lo común, suelen desarrollarse cuando se encuentran ante condiciones ambientales de estrés, cuando se produce un daño mecánico o se realiza el cultivo de tejido vegetal *in vitro* (Gonin *et al.*, 2019) (Figura 3). Pero ante esta circunstancia, se presentan muchas especies que desarrollan de forma habitual raíces adventicias para complementar el funcionamiento del sistema radicular (Bellini *et al.*, 2014). La responsabilidad de

la formación o no de las raíces adventicias originarias de cualquier tejido, es la acción de las fitohormonas coordinadas con los estímulos externos. Como en muchos procesos de organogénesis vegetal, se incluye la acumulación de la auxina ácido indol-3-acético para la iniciación del proceso de formación (Lakehal y Bellini, 2019) (Figura 3). Por otro lado, el etileno es una fitohormona relacionada con el estrés que se induce rápidamente en respuesta a varios estímulos ambientales, y su biosíntesis está controlada por las auxinas y viceversa. En el caso de las raíces adventicias, auxinas y etileno actúan de forma sinérgica, por ende, el etileno promueve su formación (Negi et al., 2010) (Figura 3). Contrariamente, una elevada concentración de citoquininas inhibe la formación de raíces adventicias (Kareem et al., 2016) (Figura 3).

Este proceso se divide en tres etapas principales. En primer lugar, cuando se produce la inducción por las diferentes condiciones, se da la especificación y reprogramación celular. En segundo lugar, las células fundadoras de las raíces adventicias que han sido inducidas, que suelen encontrarse próximas a tejidos vasculares, comienzan a dividirse formando de este modo los primordios. Por último, el primordio crece y se establecen las conexiones con el sistema vascular (Alguero-Cordovilla et al., 2021).



**Figura 3.** Regulación hormonal y procesos implicados en la formación de raíces adventicias inducidas por el corte del sistema radicular. Figura tomada de Steffens *et al.* (2016).

#### 1.4. Formación de callos vegetales

Un callo es una masa desorganizada de células que se forma como respuesta a heridas en la planta o en explantos durante el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. La formación de estos callos supone la dediferenciación de algunos de los tejidos del explanto, seguida de divisiones celulares

desordenadas (Ikeuchi *et al.*, 2013). Las fitohormonas responsables de la formación de callos son las auxinas y las citoquininas. Cuando estas hormonas se encuentran a los mismos niveles, se induce este tipo de tejido (Melnyk, 2023). Una vez el callo ha proliferado, los tejidos del callo expresan marcadores de identidad de raíces laterales. Aunque dependiendo de la especie, pueden desarrollarse tallos u otros órganos, dependiendo también de las condiciones ambientales (Segretín, 2006). En el ámbito de la biotecnología vegetal, la formación de callos es utilizada en técnicas de cultivo de tejidos, permitiendo la clonación y propagación de plantas, así como la ingeniería genética, ya que, en muchos casos, es posible la generación de una planta funcional a partir de explantos de callos (Mroginski y Roca, 1991).

### **1.5. Mutantes *mar***

Los mutantes *more adventitious root (mar)* que he estudiado en este TFG presentan un mayor número de raíces adventicias que la estirpe silvestre de procedencia, la variedad comercial M82. Estas líneas mutantes se han obtenido por medio de metanosulfonato de etilo (EMS) y bombardeo de neutrones (FN) en la Universidad Hebrea de Jerusalén, y han sido cedidas por el Dr. Idan Efroni. Este proyecto tenía como finalidad identificar los determinantes genéticos en el proceso de formación de raíces adventicias en tomate mediante el uso de mutantes. Identificaron 16 familias de las 2.100 generadas que presentaron un fenotipo distinto de la estirpe silvestre para la formación de raíces adventicias en el tallo en condiciones de invernadero. Estas 16 familias fueron sometidas a un análisis de complementación identificando así 14 loci distintos. Un tipo de mutantes interesantes producía un mayor número de raíces adventicias y el otro producía un menor número. Cuatro de estos mutantes *mar* se han utilizado en este trabajo.

### **1.6. Líneas Varitome**

La mejora de los cultivos de tomate en el futuro se basa en aprovechar la diversidad genética presente en sus ancestros. El tomate cultivado SLL evolucionó de poblaciones semidomesticadas y silvestres de SLC, y éstas a su vez de SP. Esto puede permitir la identificación de genes que controlan la calidad del fruto y alelos beneficiosos que pueden haber sido ignorados durante la domesticación. Con esta información, se busca obtener una comprensión avanzada de las vías moleculares y bioquímicas que impactan las características del tomate. (Fernández-Pozo *et al.*, 2015).

La relevancia de estos estudios también radica en su futura aplicabilidad en los programas de mejora. Al contar con una población extensa y diversa, además de cientos de miles de marcadores distribuidos a lo largo del genoma, es posible identificar las variantes alélicas responsables del fenotipo de interés (Huang & Han 2014). Tras la identificación de las variantes genéticas asociadas al rasgo, se desarrollan poblaciones de mapeo específicas para validar los posibles genes o QTL candidatos. Una

vez validados, los individuos portadores de estas variantes pueden ser utilizados en el desarrollo de variedades comerciales que incluyan el rasgo deseado. Además, se puede aprovechar la diversidad presente en las colecciones de germoplasma y buscar nuevas variantes alélicas en ellas (Mata-Nicolás *et al.*, 2020).

Para ello, se desarrolló el proyecto Varitome. Este proyecto consta de una gran colección de variedades que representan la diversidad en el centro de origen y domesticación del tomate. Ya han sido caracterizadas morfológicamente la variabilidad de los caracteres vegetativos, del fruto y de la flor en una colección de 164 entradas de tomate del proyecto Varitome, para el cual también ya está disponible el genoma completo. La formación de callo ocurría en el tomate silvestre (SP) y se fue perdiendo durante la domesticación del propio. A parte, en algunas líneas geográficamente próximas, la formación de callos ectópicos parece estar negativamente correlacionada con la aparición de raíces adventicias. (Justamante *et al.*, 2022). Los diferentes SNP identificados han sido anotados y se ha realizado un análisis de asociación a genoma completo o GWAS para detectar regiones candidatas. Además, se ha desarrollado una colección de familias segregantes mediante el cruce de todas las accesiones con una accesión representativa de cada especie, lo que podría acelerar la validación de genes y SNP candidatos (Mata-Nicolás *et al.*, 2020).



## 2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

En el laboratorio del profesor José Manuel Pérez Pérez se están realizando diferentes aproximaciones experimentales para poder entender las bases genéticas de la regeneración en plantas, utilizando el tomate (Alaguero-Cordovilla et al. 2021; Larriba et al. 2021a, 2021b, 2022; Modrego et al. 2023) y *Arabidopsis thaliana* (Bustillo-Avendaño et al. 2018; Ibáñez et al., 2020), como sistemas modelo.

En un trabajo previo, se estudió el crecimiento temprano y la capacidad de formación de raíces adventicias en respuesta a herida en 164 genotipos de la colección Varitome-COMAV (Mata-Nicolás et al., 2020). Mediante un análisis de asociación a genoma completo o GWA, se identificaron tres regiones candidatas con varios polimorfismos que presentaron una elevada correlación con la capacidad de producir callos de forma ectópica en cultivo *in vitro* (Justamante et al., sin publicar). Una de estas regiones candidatas se localiza en el cromosoma 5, en una región de 29,5 Kb que contiene los genes *SIATHB1* y *SIARF24*, este último relacionado con la vía de señalización activada por las auxinas.

A través de nuestra colaboración con el grupo del Dr. Idan Efroni, de la Universidad Hebrea de Jerusalén (Israel), hemos recibido semillas de los mutantes *more adventitious roots* (*mar*), identificados en una búsqueda de mutantes generados por medio de metanosulfonato de etilo (EMS) y bombardeo de neutrones (FN) en el fondo genético M82 que presentaban una mayor formación de raíces adventicias en el tallo en condiciones de invernadero.

Se han definido como objetivos en este Trabajo de Fin de Grado:

- Determinar si el polimorfismo presente en la región 5'-UTR del gen *SIARF24* está asociado a la formación de callos ectópicos en las líneas de Varitome-COMAV estudiadas previamente.
- Realizar el fenotipado *in vitro* de las líneas *mar* para determinar su fenotipo en la formación de raíces adventicias en respuesta a herida.
- Llevar a cabo cruzamientos con los mutantes *mar* para obtener dobles mutantes.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Material vegetal

En este trabajo se han utilizado las semillas de la segunda generación (F<sub>2</sub>) del cruzamiento de algunos genotipos de la colección Varitome-COMAV, cuyo fondo genético era SLC, que producen callos de forma natural y que contienen la inserción “TAGTTGGAGGCAC” en la posición 64811767 del cromosoma 5 de forma homocigota, con la variedad comercial “MoneyMaker” que no produce callos de forma natural y no contiene esta inserción (Tabla 1). De la misma manera, también se ha seleccionado algunas F<sub>2</sub> resultado del cruzamiento de genotipos de la colección Varitome-COMAV, cuyo fondo genético era SP, que producen callos de forma natural y que contienen la inserción “TAGTTGGAGGCAC” en homocigosis, con el genotipo BGV007109, en fondo SP pero que no produce callos de forma natural y no contiene esta inserción (Tabla 1).

**Tabla 1.** Familias F<sub>2</sub> utilizadas en este trabajo.

BGV006865 (SLC, produce callos) × MoneyMaker (SLL)
BGV006229 (SLC, produce callos) × MoneyMaker (SLL)
BGV007339 (SP, produce callos) × BGV007109 (SP, no produce callos)
BGV007366 (SP, produce callos) × BGV007109 (SP, no produce callos)

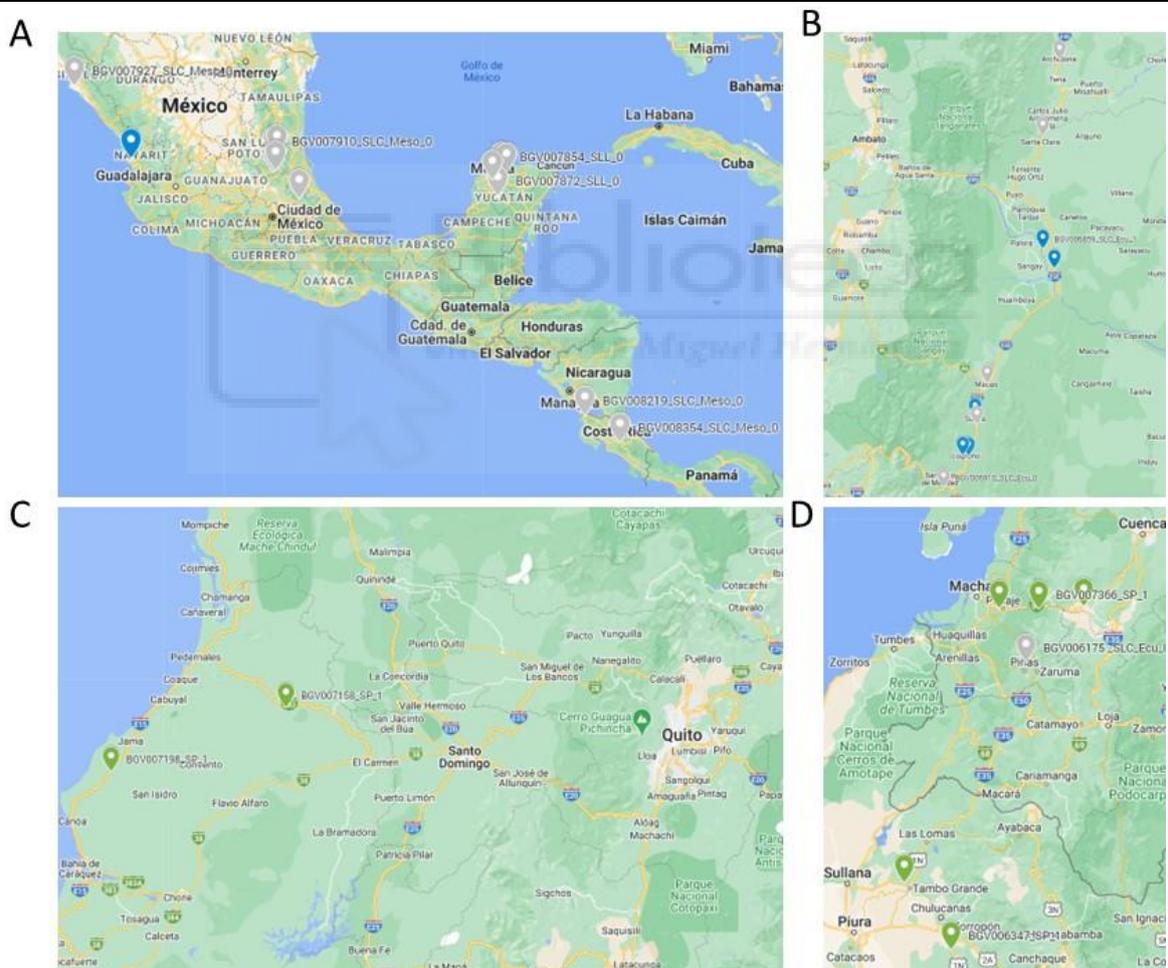
Por otro lado, se trabajó con alguno de los mutantes *mar*, cedidos por el Dr. Idan Efroni, de la Universidad Hebrea de Jerusalén (Tabla 2). Se trata de líneas genéticas de tomate obtenidas por ellos, caracterizándose por una sobreproducción anormal de raíces adventicias en condiciones de invernadero. Como control y fondo genético se utilizó la variedad comercial UC-82 disponible en el laboratorio, ya que en un estudio previo se indicó de que UC-82 y M82 (variedad de la que provienen los mutantes y se utiliza como control en el experimento realizado por Beatrice Gedion) comparten una similitud de entre el 99,33% y 99,74%, presentan un patrón de herencia de haplotipos muy parecidos y son muy consistentes con un pedigrí común y una selección compartida de progenie parcialmente endogámica (Cambiaso *et al.*, 2020).

**Tabla 2.** Líneas *mar* utilizadas en este trabajo.

Código de la línea utilizada	Alelo	Locus
n5296m1	<i>mar1-1</i>	MAR1
e2127m1	<i>mar2-1</i>	MAR2
n2734m1	<i>mar4-1</i>	MAR4
n1747m1	<i>mar5-1</i>	MAR5

### 3.2. Selección de las líneas de estudio de la colección Varitome-COMAV

Para determinar la presencia o no de la inserción en las diferentes líneas parentales de la colección de Varitome-COMAV estudiadas previamente en el laboratorio del Prof. J.M Pérez Pérez (Tabla 3), se utilizó la herramienta JBrowse de visualización de genomas (Diesh *et al.*, 2023), accesible desde la página de Sol Genomics Network (<https://solgenomics.net/>). Se localizaba la presencia de la inserción “TAGTTGGAGGCAC” en la posición 64811767 del cromosoma 5 y se determinaba si estaba en heterocigosis, homocigosis o no estaba presente, en cada uno de los genotipos seleccionados. Los genotipos que se han utilizado en este trabajo son SLC que provienen de Mesoamérica y la zona montañosa de Ecuador (Figura 4A, B). Por otro lado, los genotipos SP que se han seleccionado son originarios de la zona costera del norte de Ecuador, así como del sur de Ecuador y norte de Perú (Figura 4C, D).



**Figura 4.** Mapa de ubicaciones de los accesos seleccionados (A) Zona de Centroamérica que incluye genotipos que se encontraban en México y Costa Rica. (B) Genotipos que se encontraban en la zona del interior, al este de Ecuador. (C) Genotipos que se encontraban en la zona de la costa, al oeste de Ecuador. (D) Zona entre Ecuador y Perú, en la que se encuentran algunos genotipos al sur de Ecuador y otros al norte de Perú. En color gris, aparecen los genotipos sin callo (tanto SP como SLC), en verde aparecen SP con callo y en azul SLC con callo.

### **3.3. Cultivo in vitro**

#### **3.3.1. Esterilización y germinación de las semillas**

En primer lugar, para asegurar las condiciones de esterilidad del material de manipulación, se desinfectaron las pinzas con alcohol. Se envolvieron las semillas en paquetes pequeños de papel Miracloth (8 semillas por paquete). Estos paquetes se sellaron y a la vez se identificaron mediante clips de diferentes colores, correspondiendo cada color a un genotipo distinto.

A partir de aquí, se trabajó en cabina de flujo laminar horizontal modelo AH100 (Telstar). En un tubo Falcon de 50 mL, se preparó una disolución que contenía lejía comercial (37 g de cloro activo por litro a la salida de fábrica) al 30% además de 150 µL de una solución de Tritón X-100 al 10%. Se introdujeron los paquetes que contienen las semillas en el tubo Falcon con la disolución, y se mantuvieron durante 15 minutos en agitación. Transcurridos los 15 minutos, se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con agua destilada autoclavada, en agitación también (Figura 5A). Después de haber realizado los 3 lavados, en una placa de Petri se humedecieron con agua destilada autoclavada 2 papeles de filtro, del mismo tamaño aproximadamente que la placa, quedando adheridos a ésta. Con ayuda de pinzas estériles, se desarrollaron los paquetes y se pasaron las semillas a la Placa de Petri sobre los papeles de filtro humedecidos. Para evitar contaminación y la pérdida de humedad, se sellaron las placas con Parafilm (Bemis) y se introdujeron en una estufa (P Selecta) a 30°C en oscuridad, donde permanecerían 3 días para favorecer su germinación (Figura 5A). Pasados estos días, se transfirieron las placas a una cámara de cultivo modelo MLR-352 (Panasonic) donde permanecerían un máximo 7 días en función de su germinación (Figura 5A).

#### **3.3.2. Fenotipado de las familias F<sub>2</sub>**

Tras este tiempo (máximo 7 días), en las placas, se traspasaron las plántulas a cajas de Petri de 120×120×10 mm que contenían 75 mL de medio de cultivo Murashige & Skoog (M0221, Duchefa Biochemie) (Figura 5A). Para preparar 1 L de medio de cultivo, se agregaron 800 mL de agua destilada en un vaso de precipitados y se mantuvo en agitación constante durante todo el proceso. Luego, se añadieron 2,15 g de sales de Murashige y Skoog (M0221, Duchefa Biochemie), 10 g de sacarosa (S0809, Duchefa Biochemie), 0,5 g de MES monohidrato (M1503, Duchefa Biochemie), y 2 mL de una solución de vitaminas Gamborg (G0415, Duchefa Biochemie) a una concentración de 1×. Un paso fundamental era que todos los compuestos se disolvieran completamente en el agua destilada. Posteriormente, se ajustó el pH de la solución a 5,7 con unas gotas de KOH 1M. Luego, se completó la mezcla con agua destilada hasta alcanzar 1000 mL usando una probeta graduada y se dividía el contenido en dos botellas de 500 mL, añadiendo 3,25 g de Plant Agar (P1001, Duchefa Biochemie) a cada botella. Las botellas se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 20 minutos y una vez finalizado este paso, se

dejó enfriar el medio en un baño termostatzado hasta 50°C, antes de verterlo en las cajas de Petri a razón de 75 mL por placa, en una cabina de flujo laminar horizontal modelo AH100 (Telstar) para mantener las condiciones asépticas.

Las plántulas fueron transferidas a las cajas de Petri con ayuda de unas pinzas estériles en la cabina de flujo laminar, repartiendo 8 plántulas equidistantes por cada placa. Después se cerraron y sellaron las cajas de Petri con cinta Micropore 3MM de 12.5 mm y se guardaron en una cámara de cultivo modelo MLR-352 (Panasonic), con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad y una temperatura de 25°C, en posición vertical y con una inclinación de 120° para así favorecer el crecimiento gravitrópico de las plantas. En estas condiciones se mantuvieron las plantas durante 8 días. A continuación, se transfirieron las plántulas a cajas cuadradas SteriVent High de 245×245×120 mm con 100 mL de medio de cultivo cada una, empleando para ello unas pinzas estériles y presionando con cuidado la base del hipocótilo para hundirla en el medio de cultivo, de forma que la planta quedó en vertical, poniendo hasta 9 plantas como máximo por caja y se cierran con sus respectivas tapas a presión. Finalmente se guardaron en cámara de cultivo, con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad y una temperatura de 25°C. A los 4 días de estar en la caja (25 días tras siembra), se tomaron fotos de las plantas, y se llevó a cabo un análisis a simple vista para determinar la presencia o no de callos. Se repitió este proceso a los 11 días de estar en la caja (32 días tras siembra).

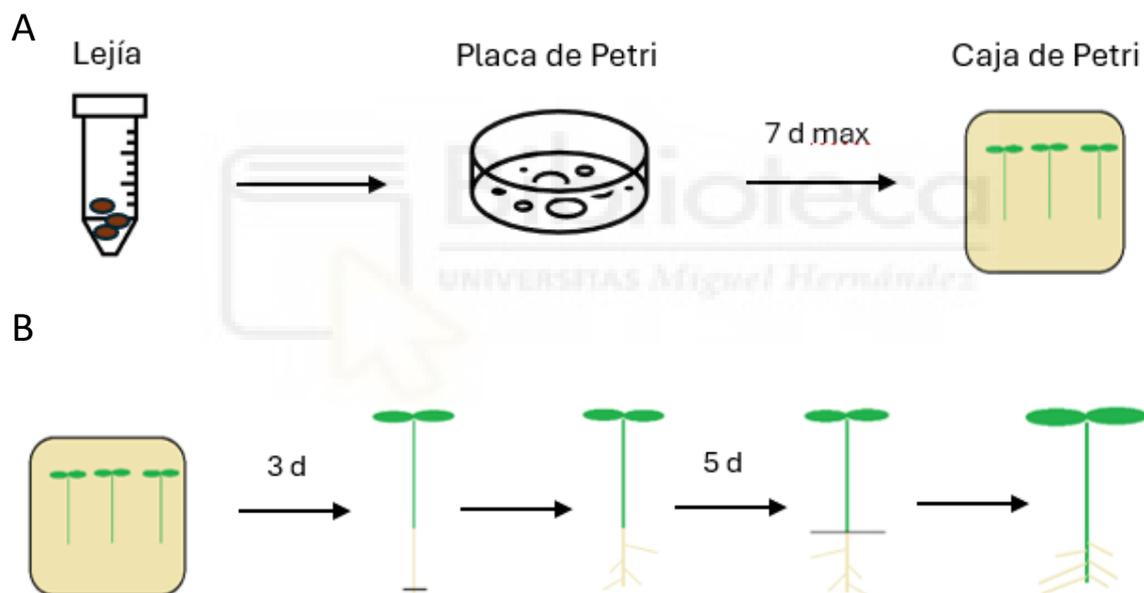
Tras 24 días en las cajas, se realizó el trasplante a macetas de 450 mL con una mezcla 1:1 de sustrato comercial (Projar) y perlita (Projar) y se añadió en cada maceta 4 g/L de fertilizante de liberación controlada Osmocote (Everris). Una vez transferidas todas las plantas al sustrato, se regaron las plantas y se dejaron en la cámara de cultivo visitable con 16/8 h de fotoperiodo y una humedad relativa de  $59,8 \pm 2,5$  %, con riego ocasional (cada 2 o 3 días) por subirrigación. A los 35 días de estar en maceta, se tomaron fotos de las plantas, y se realizó un análisis a simple vista para determinar la cantidad de raíces adventicias producidas.

### **3.3.3. Fenotipado de las líneas *mar***

Tras 7 días máximo en la placa de Petri en la cámara de cultivo, se traspasaron las plántulas a cajas de Petri de 120×120×10 mm que contenían 75 mL de medio de cultivo previamente autoclavado durante 20 min a 121°C. Las plántulas fueron transferidas a las cajas de Petri con ayuda de unas pinzas estériles en la cabina de flujo laminar (Telstar), repartiendo 6 plántulas equidistantes por cada placa. Después se cerraron y sellaron las cajas de Petri con cinta Micropore 3MM de 12,5 mm y se guardaron en una cámara de cultivo, con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad y una temperatura de 25°C, en posición vertical y con una inclinación de 120° para así favorecer el crecimiento gravitrópico de las plántulas. Y cuando pasaron 3 días en las cajas de Petri, se les escindió el ápice de la raíz principal de

cada planta con un bisturí, para provocar la formación de raíces laterales y en estas condiciones se mantuvieron las plantas durante 5 días, en los cuales se realizó un escaneo de las cajas en los días 3, 4 y 5 después de la escisión del ápice de la raíz principal (Figura 5B).

Después de los 5 días, se cortó por completo el sistema radicular de cada planta en la base del hipocótilo utilizando un bisturí, para favorecer el crecimiento de raíces adventicias en la región cercana a la herida, y se transfirieron los hipocótilos a cajas cuadradas SteriVent High de 245×245×20 mm con 100 mL de medio de cultivo cada una, empleando para ello unas pinzas estériles y presionando con cuidado la base del hipocótilo para hundirla en el medio de cultivo, de forma que la planta quedó en vertical, poniendo hasta 6 plantas como máximo por caja y se cierran con sus respectivas tapas a presión (Figura 5B) . Finalmente se guardaron en cámara de cultivo con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h oscuridad y una temperatura de 25°C.

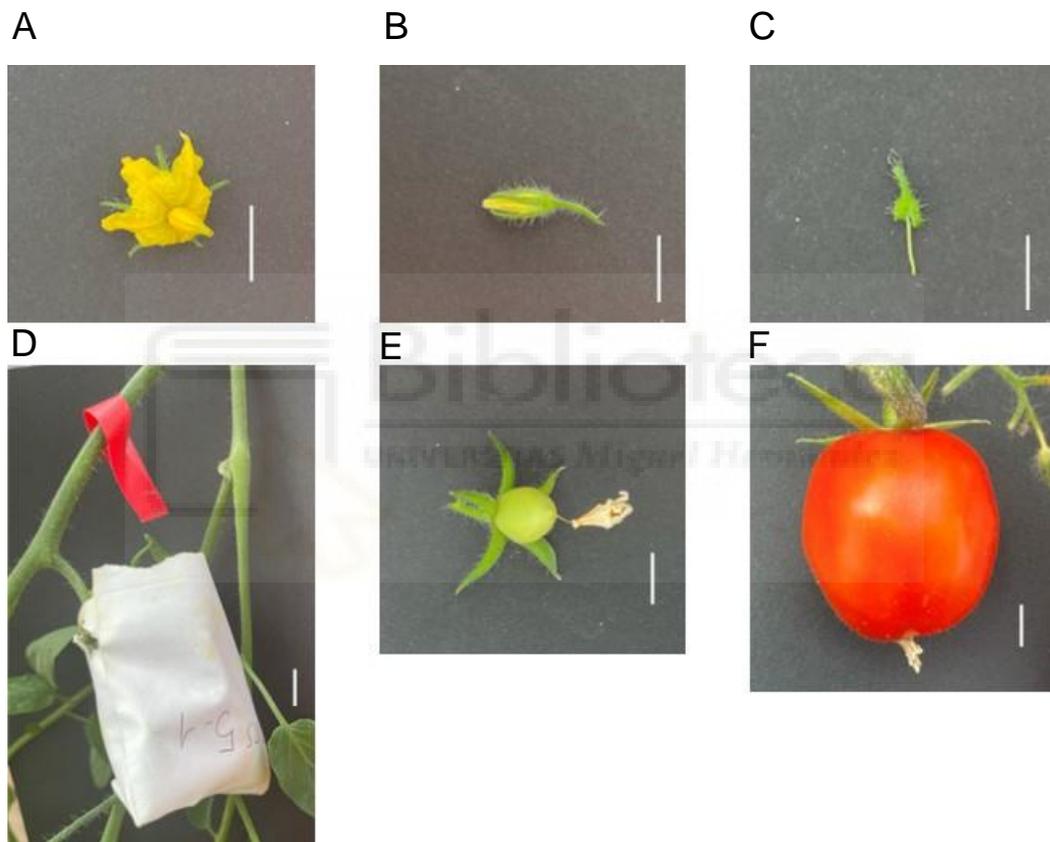


**Figura 5.** (A) Proceso de esterilización de semillas y pase a cajas de Petri tras 7 días como máximo. (B) Fenotipado de líneas *mar* en cajas de Petri, mediante corte del ápice de la raíz principal a los 3 días y corte del sistema radicular completo tras 5 días.

A los 2, 5, 6 y 7 días de haber cortado el sistema radicular completo, se realizaron escaneos. Y tras los 7 días en las cajas, se realizó el trasplante a macetas de 450 mL con el mismo contenido explicado anteriormente. Una vez transferidas todas las plantas al sustrato y puestas, se regaron las plantas y se dejaron en la cámara de cultivo visitable con 16/8 h de fotoperiodo y una humedad relativa de  $59,8 \pm 2,5$  %, con riego ocasional (cada 2 o 3 días) por subirrigación.

### 3.3.4. Cruces entre mutantes *mar*

Para realizar los cruzamientos entre los distintos genotipos *mar*, se tuvo que esperar unos meses, ya que antes no se dieron las condiciones óptimas para que las plantas se encontraran en perfecto estado para producir flores. Las flores que se utilizan como parentales masculinos deben tener los pétalos y sépalos abiertos y los estambres al descubierto con polen (Figura 6A). Se escindían las flores al completo, y sobre una placa y con la flor sujeta mediante unas pinzas, se golpeaba suavemente el borde de la placa con las pinzas, de manera que los estambres se sacudían y el polen caía a la placa.



**Figura 6.** (A) Flor abierta y madura para utilizar como parental masculino. (B) Flor cerrada capaz de ser utilizada como parental femenino. (C) Flor con el pistilo al descubierto lista para ser polinizada por haberle escindido sépalos, pétalos y estambres. (D) Flor ya polinizada con su correspondiente sobre y etiqueta identificativos. (E) Flor que ya está comenzando a crecer formando así tomate. (F) Tomate maduro a partir de un cruce. Todas las barras de escala miden 1 cm.

Para la flor que se utilizaba como parental femenino, era necesario que se encontrara con los sépalos a medio abrir y los pétalos cerrados de manera que cubrieran los estambres y el pistilo (Figura 6B). Se eliminaban los sépalos, pétalos y estambres mediante la ayuda de unas pinzas y con cuidado

de no girar la flor para no estrangularla. De esta manera, quedaba el pistilo al descubierto, listo para ser impregnado con el polen previamente extraído, tocando suavemente sobre el mismo (Figura 6C). Tras realizar este proceso, se empleaba un sobre de papel rotulado con el nombre del parental masculino para cubrir el pistilo fecundado y evitar cruzamientos indeseados o daños mecánicos (Figura 6D). Además, se ponía etiquetas con el nombre del parental masculino utilizado también sobre las ramas de las que emergía la flor fecundada del parental femenino para evitar posibles errores de identificación. Finalmente se formaba el tomate tras unos días (Figura 6E, F).

### 3.3.5. Obtención de imágenes

Las medidas del fenotipado de las líneas mutantes *mar* se documentaron mediante la obtención de imágenes de las Cajas de Petri y de las Cajas SteriVent High con un escáner Epson Perfection V330 Photo a través del cual se tomaron imágenes a color (24 bits) con una resolución de 1.200 ppp y en formato de archivo JPG. Las fotos a las plantas de la colección Varitome-COMAV se realizaron mediante una cámara de fotografía modelo Canon EOS 1100D.

### 3.3.6. Análisis del fenotipo radicular

Con la finalidad de realizar un análisis estadístico para comprobar si las diferencias observadas entre las distintas líneas genéticas eran significativas, se realizaron medidas de longitud de la raíz principal; del número y la longitud de las raíces laterales y adventicias. Para el estudio de la longitud de la raíz principal, se analizaron las fotografías obtenidas a los 7 días después de la siembra con ayuda del programa Image J (<https://imagej.net/ij/>). Una vez abierta la imagen en esta aplicación se procedió a la fijación de la escala y posteriormente, de forma manual y con ayuda de la herramienta “freehand line”, se realizaron trazas por encima de la raíz principal hasta obtener una copia idéntica de la raíz a estudio. Por último, se anotaron los datos de longitud de cada raíz principal en una tabla de Excel. Para la longitud de las raíces laterales se siguió exactamente el mismo procedimiento, pero 4 días tras la escisión del ápice de la raíz principal. Y finalmente, para la longitud de las raíces adventicias, con el mismo mecanismo, pero se realizaron las medidas 7 días después del corte del sistema radicular completo. Todas estas longitudes se pasaban a un documento de Microsoft Excel.

Los datos obtenidos en el programa Microsoft Excel, se analizaron estadísticamente utilizando el software Statgraphics Centurion XVI (<http://statvision.com/statpoint.htm>). Primero, se identificaron los valores atípicos y luego se verificó la distribución de los datos para cada parámetro, transformando aquellos que no se ajustaban a una distribución normal. Posteriormente, se llevaron a cabo análisis multifactorial para detectar diferencias entre series, placas y líneas. Por último, análisis de varianza simple (ANOVA) con un nivel de significación del 1% para comprobar si existía diferencia significativa entre las diferentes líneas genéticas.

### **3.4. Genotipado de las líneas Varitome-COMAV**

#### **3.4.1. Extracción de ADN genómico**

Una vez se realizaron los distintos fenotipados necesarios, y se seleccionó el material que era de interés, se procedió a realizar las extracciones de ADN genómico (ADNg) oportunas. Para ello, se recogieron 100 mg de tejido vegetal fresco procedente de hojas jóvenes en un tubo Eppendorf de 1,5 mL y se mantuvo en hielo. Antes de comenzar la homogeneización, fue necesario preparar el tampón de extracción, el cual contenía 100 mL/L de Tris-CL pH 8,0 (1M), 100 mL/L de EDTA pH 8,0 (0,5 M), 200 mL/L de NaCl (2,5 M), 600 mL/L de agua destilada previamente autoclavada a 121°C y 1,2 mL/L de la enzima RNAsa. Una vez preparado el tampón, se añadieron 250 µL de éste y se maceró el material vegetal, utilizando un palillo estéril, hasta obtener una mezcla prácticamente homogénea. Seguidamente se agregaron otros 250 µL del tampón de extracción y se volvió a macerar hasta conseguir la homogeneidad. Después se retiró el palillo y se agregaron 35 µL (a cada tubo) de SDS al 20%, y se incubó a 65°C en el termobloque durante 5 min. Transcurridos los 5 min, se pasaron los tubos a hielo, se les añadió 130 µL de KOAc 5M y se incubaron en hielo durante 8 min. Después, se centrifugaron a 4°C durante 15 min a 12000 g en una centrífuga refrigerada Digicen 21R (Ortoalresa). El siguiente paso fue coger 550 µL del sobrenadante resultado de la centrifugación, y pasarlo a un nuevo tubo, para obtener un resultado más puro, se volvió a centrifugar a la misma temperatura y velocidad de giro, pero durante 5 min. De nuevo, se transfirieron 530 µL a otro tubo nuevo, se le añadieron 640 µL de isopropanol, 40 µL de NaOAc 3M y se metieron los tubos al congelador a -20°C durante 1 h, para permitir la precipitación del ADN.

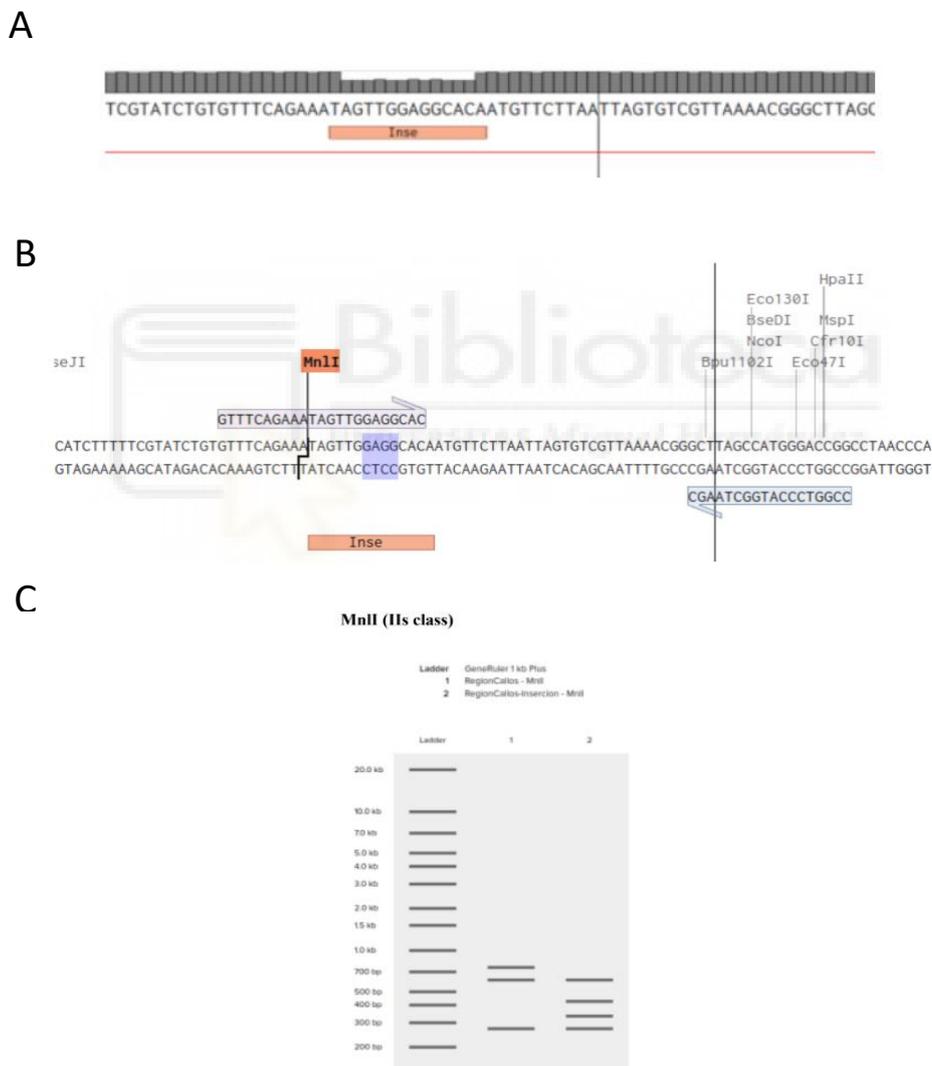
Tras la espera de 1 h, se volvieron a centrifugar los tubos a 4°C 12000 g durante 15 min. Una vez centrifugados, se eliminó el sobrenadante por decantación y se añadió 1 mL de etanol al 70%. Se volvió a realizar otra centrifugación, a 4°C 12000 g durante 5 min y se eliminó el sobrenadante resultante mediante micropipeta, para evitar arrastrar el pellet de ADN. Para terminar de eliminar los posibles restos de etanol, se incubaron los tubos a 45°C con la tapa abierta durante 8 min aproximadamente. Cuando se consiguió eliminar el etanol por completo, se resuspendió el precipitado de ADN en 50 µL de agua libre de nucleasas y se almacenó en el congelador a -20°C para su posterior utilización.

#### **3.4.2. Amplificación del ADN mediante PCR**

El fragmento de ADN que se amplificó por PCR tiene un tamaño de 1.349 y 1.362 pares de bases (pb) dependiendo de si no tienen la inserción o si la tienen, respectivamente, y se usó el Kit GoTaq DNA Polymerase (Promega). Para llevar a cabo la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR), (por tubo de PCR de 0,2 mL) se añadieron 4 µL de tampón 5x del kit; 2 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM; 1 µL del cebador forward "CallosSecF (CCCAGCCCACCCCTCTATTT)" 10 µM q; 1 µL del cebador reverse "CallosSecR

(CGAGTGTGTTTGGTGTTCAGCCT)” 10  $\mu$ M; 0,4  $\mu$ L de dNTPs 10 mM; 9,35  $\mu$ L de agua libre de nucleasas; 0,25  $\mu$ L de GoTaq 5 U/L y 2  $\mu$ L de ADN de interés previamente extraído y resuspendido.

Tras mezclar bien la mezcla, se introdujeron los tubos de PCR en un termociclador T100 (BioRad). El programa para llevar a cabo la amplificación del fragmento de interés fue: 95°C durante 2 min, un bucle que se repitió 40 veces que consistía en 95°C durante 20 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 1,5 minutos. Finalmente, después del bucle se programó una etapa de 72°C durante 5 minutos. Al acabar el termociclador, se almacenaron las muestras en el congelador a -20°C para su posterior utilización.



**Figura 7.** (A) Secuencia parcial de la región del ADN que contiene la inserción (resaltada en naranja). (B) Enzima de restricción MnlI que reconoce la diana GAGG/CTCC, que al ser de tipo II, produce el corte a 6 pb de distancia de su diana, la cual se encuentra dentro de la inserción. (C) Patrón de bandas producidas por el corte de la enzima MnlI en un gel de electroforesis, en el cual, en la calle 1 se observa el patrón que presentan las plantas sin inserción y en la calle 2, las que sí la presentan.

### 3.4.3. Digestión del fragmento de ADN amplificado

Obtenido el producto de PCR en buenas condiciones, se procedió a realizar un análisis denominado Cleaved Amplified Polymorphism Sequence (CAPS) (Figura 7A-B). Esta técnica nos permite diferenciar las plantas que contienen la inserción de las que no, ya que, si el fragmento amplificado de ~1,4 Kb PCR contiene la inserción, presentará tres dianas de restricción para la enzima MnlI, mientras que si el producto de PCR no contiene la inserción presentará solo dos dianas. De esta manera, se genera un patrón de bandas diferente en las plantas que presentan la inserción (4 fragmentos del producto de PCR tras la digestión) del de las que no la presentan (3 fragmentos del producto de PCR tras la digestión) (Figura 7C).

### 3.4.4. Electroforesis en gel de agarosa

Para visualizar el resultado de las extracciones de ADN, de las PCR y las digestiones enzimáticas, fue necesario en todas realizar posteriormente una electroforesis en gel de agarosa. Para ello, se prepararon geles de agarosa al 1%. Se añadió 1 g de Agarosa E (Pronadisa) a un matraz de 250 mL, y a continuación se agregaron 100 mL de Tampón TBE 0,5x. Se calentó la mezcla en el microondas hasta obtener una disolución transparente y se dejó atemperar por un tiempo. Mientras se atemperaba, se montaba el portageles, colocándole en los laterales dos gomas negras que impiden que se derrame el gel hasta que solidificase, y el peine en la parte superior que formaría los pocillos. Una vez atemperada la agarosa, se le añadieron 5 µL de GreenSafe View, y se agitó suavemente para su correcta distribución por toda la disolución. Se vertió el contenido del matraz al portageles y se dejó solidificar por 15 min aproximadamente. Mientras solidificaba, se añadía Tampón TBE 0,5x a la cubeta de electroforesis hasta cubrir la plataforma central sin sobrepasar la marca indicadora de volumen máximo. Una vez solidificaba, se retiraban las gomas y el peine, y se introducía el portageles en la cubeta de electroforesis. Se cargaron 7 µL de marcador de peso molecular Gene Ruler DNA ladder 1 kb [SM0313, Thermofisher] en el primer pocillo siempre y en los demás pocillos, las muestras a observar. Para las extracciones de ADN y el producto de PCR, se cargaban 8 µL de muestra y 2 µL de tampón de carga 5x. Mientras que, para el producto de la digestión, se cargaban 16 µL de muestra y 4 µL de tampón de carga 5x. Se tapaba la cubeta y se conectaba a la fuente de alimentación a 100 V. Una vez el gel corría lo necesario, se llevaba al documentador de geles (SML-01, Maestrogen), provisto de luz ultravioleta para poder visualizar el ADN.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Formación de callo en líneas Varitome-COMAV

#### 4.1.1. Detección de la inserción en las líneas Varitome-COMAV

En un trabajo previo se llevó a cabo un estudio fenotípico del crecimiento temprano en 164 genotipos de la colección de líneas Varitome-COMAV. En estos experimentos se observó que 14 de estas líneas mostraban una formación ectópica de callo en la parte aérea de las plántulas crecidas en condiciones in vitro (Tabla 3). En este trabajo se han elegido otras 21 líneas de esta misma colección que no presentaban formación ectópica de callo y que se localizaban en una localización geográfica próxima a las 14 que formaban callo de forma ectópica (Tabla 3). Mediante la herramienta JBrowse de SolGenomics se identificó que 11 de las líneas que formaban callo contenían la inserción “TAGTTGGAGGCAC” (78,57%) y de éstas, 9 la presentaban en homocigosis (81,81%) y 2 en heterocigosis (18,18%). Esta inserción “TAGTTGGAGGCAC” fue estudiada debido a que mostró una alta correlación con la formación de callo en un análisis detallado de haplotipos, obtenidos de un análisis GWAS que revelaba un valor de P significativo.

**Tabla 3.** Característica de las líneas Varitome-COMAV estudiadas en este trabajo.

Código	Zona geográfica	Localización (latitud, longitud)	Fondo genético	Produce callo de forma ectópica	Inserción “TAGTTGGAGGCAC”
BGV007927	Noroeste de México	24.725, -107.79166	SLC	No	-
BGV007934	Noroeste de México	21.80833, -105.34166	SLC	Sí	-
BGV007900	Este de México	20.16666, -98.05	SLC	No	-
BGV007910	Este de México	21.90833, -99.15833	SLC	No	-
BGV007911	Este de México	21.99166, -98.99166	SLC	No	-
BGV007918	Este de México	21.25833, -99.125	SLC	No	-
BGV007920	Este de México	21.34166, -99.04166	SLC	No	-
BGV007854	Sureste de México	21.29166, -89.25833	SLL	No	-
BGV007860	Sureste de México	21.25833, -89.04166	SLL	No	-
BGV007872	Sureste de México	20.30833, -89.425	SLL	No	-
BGV007936	Sureste de México	20.975, -89.64166	SLL	No	-
BGV008219	Costa Rica	11.075, -85.64166	SLC	No	-
BGV008354	Costa Rica	9.94186, -84.10561	SLC	No	-
BGV007109	Noroeste de Ecuador	0.98944, -79.53361	SP	No	-
BGV007158	Noroeste de Ecuador	-0.09222, -79.76055	SP	Sí	-
BGV007198	Noroeste de Ecuador	-0.30111, -80.32916	SP	Sí	En heterocigosis
BGV008041	Noroeste de Ecuador	-13, -72.53333	SP	No	-
BGV006229	Centro de Ecuador	-3.06305, -78.48638	SLC	Sí	En homocigosis
BGV006231	Centro de Ecuador	-2.48138, -78.16194	SLC	No	-
BGV006232	Centro de Ecuador	-2.61249, -78.2225	SLC	Sí	En homocigosis
BGV006753	Centro de Ecuador	-0.90342, -77.8031	SLC	No	-

BGV006825	Centro de Ecuador	-1.23777, -77.88027	SLC	No	-
BGV006859	Centro de Ecuador	-1.72388, -77.88055	SLC	Sí	-
BGV006865	Centro de Ecuador	-1.80916, -77.82916	SLC	Sí	En homocigosis
BGV006881	Centro de Ecuador	-2.30361, -78.11888	SLC	No	-
BGV006896	Centro de Ecuador	-2.45055, -78.16972	SLC	Sí	En homocigosis
BGV006899	Centro de Ecuador	-3.06305, -78.48638	SLC	No	-
BGV006904	Centro de Ecuador	-2.61527, -78.19833	SLC	Sí	En heterocigosis
BGV006910	Centro de Ecuador	-2.75166, -78.30472	SLC	No	-
BGV006175	Suroeste de Ecuador	-3.63083, -79.67972	SLC	No	-
BGV006208	Suroeste de Ecuador	-3.30805, -79.34805	SP	Sí	En homocigosis
BGV007339	Suroeste de Ecuador	-3.32277, -79.83222	SP	Sí	En homocigosis
BGV007366	Suroeste de Ecuador	-3.32833, -79.60805	SP	Sí	En homocigosis
BGV006327	Noroeste de Perú	-4.89222, -80.3752	SP	Sí	En homocigosis
BGV006347	Noroeste de Perú	-5.27833, -80.10583	SP	Sí	En homocigosis

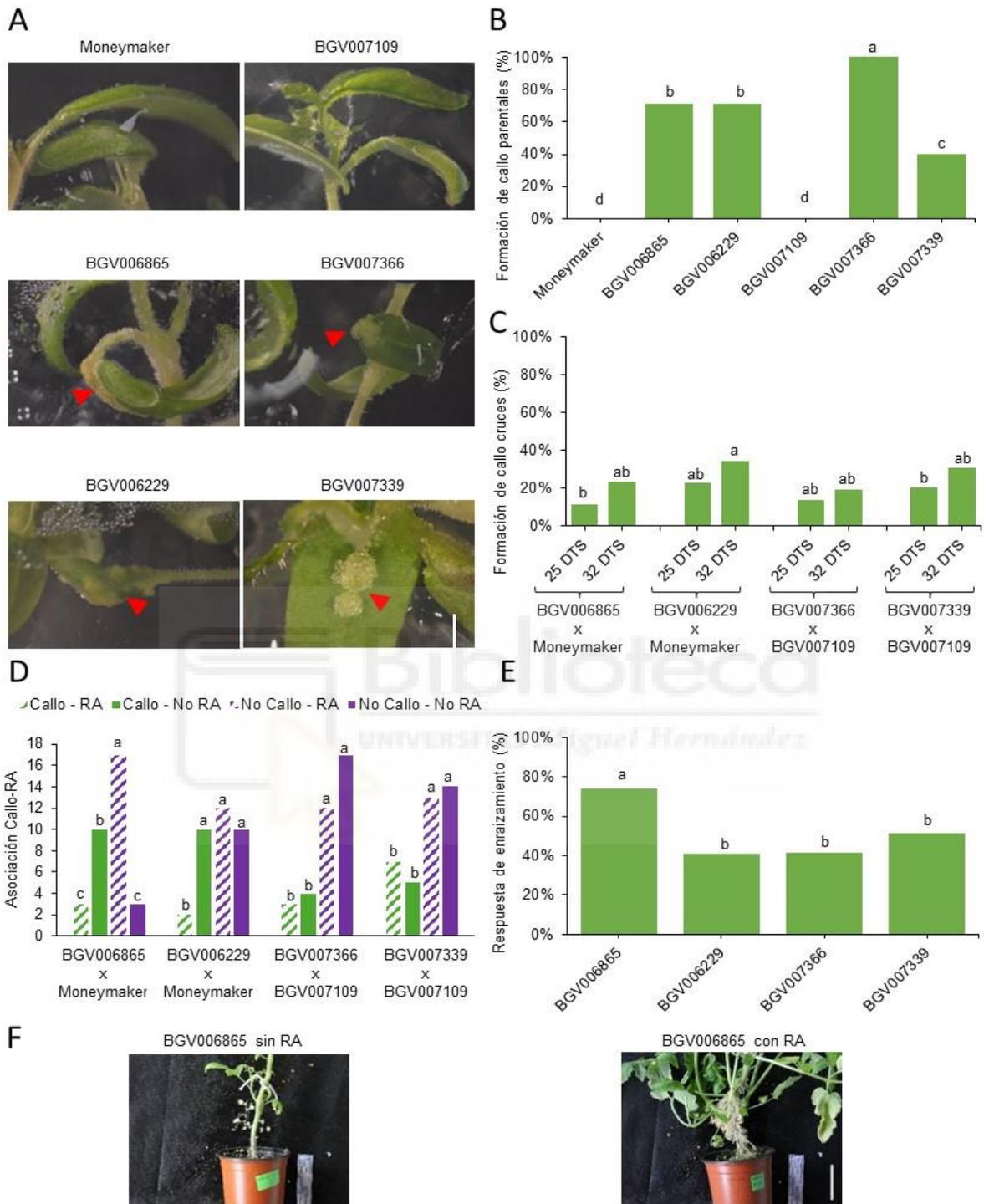
#### 4.1.2. Fenotipado de la F<sub>2</sub> de los cruces de Varitome-COMAV

Para determinar la base genética de la formación de callo ectópico en la colección de líneas Varitome-COMAV y la eventual correlación con la presencia de la inserción "TAGTTGGAGGCAC", se estudió la formación de callo ectópico en cuatro familias F<sub>2</sub>: dos de ellas derivadas del cruzamiento entre líneas SP, y otras dos derivadas del cruzamiento utilizando líneas SLC. En el fondo SP, las líneas BGV007339 y BGV007366, que presentaban formación ectópica de callo y presencia de la inserción en homocigosis, se cruzaron con la línea BGV007109, que no producía callo ectópico y no presentaba la inserción (Figura 8A). En el fondo SLC, las líneas BGV006865 y BGV006229 presentaban formación ectópica de callo y presencia de la inserción en homocigosis, y se cruzaron con la línea Moneymaker, en fondo SLL, sin formación de callo ectópico y sin la inserción (Figura 8B). Se ha determinado la presencia de callo ectópico en la región aérea de las plántulas F<sub>2</sub> a los 25 y 32 días tras la siembra (DTS) observándose, en todos los casos, que el número de plántulas que muestran callo se incrementa con la edad de la planta (Tabla 4).

**Tabla 4.** Estudio del modo de herencia de la formación de callo ectópico en la progenie F<sub>2</sub>.

Cruzamiento	25 DTS		32 DTS			
	Sin callo	Con callo	Sin callo	Con callo	Chi-cuadrado	Valor de P
BGV006885 × Moneymaker	30	4	26	8	0,039	0,842
BGV006229 × Moneymaker	27	8	23	12	1,610	0,205
BGV007339 × BGV007109	31	8	27	12	0,692	0,406
BGV007366 × BGV007109	31	5	29	7	0,593	0,442

El valor de Chi-cuadrado representa el ajuste de los datos de la población F<sub>2</sub> indicada a una segregación fenotípica ¾ sin callo y ¼ con callo. El valor de P se ha obtenido a partir del Chi-cuadrado con la aplicación web: <https://www.graphpad.com/quickcalcs/pvalue1.cfm>.



**Figura 8.** Formación de callo ectópico en las líneas Varitome-COMAV. (A) Imágenes representativas de la formación de callos ectópicos. La barra de escala mide 5 mm. (B) Gráfico de formación de callo ectópico en los parentales. (C) Gráfico de formación de callo ectópico en los cruces. (D) Gráfico de asociación del callo con las RA. (E) Gráfico de la respuesta de enraizamiento. (F) Fotografías representativas de plantas del genotipo BGV006865 sin RA y con RA. La línea de escala representa 50 mm. Las letras minúsculas A-D indican las diferencias estadísticamente significativas (valor de  $p < 0.05$ ; ANOVA) entre los distintos genotipos para el tiempo indicado.

En la generación de las parentales, se confirmó la ausencia de callo ectópico en los genotipos Moneymaker y BGV007109, y la presencia de al menos un 70% de formación de callos ectópicos en BGV006865, BGV006229 y BGV007366. El genotipo BGV007339 mostró un 40% de formación de callo ectópico (Figura 8B).

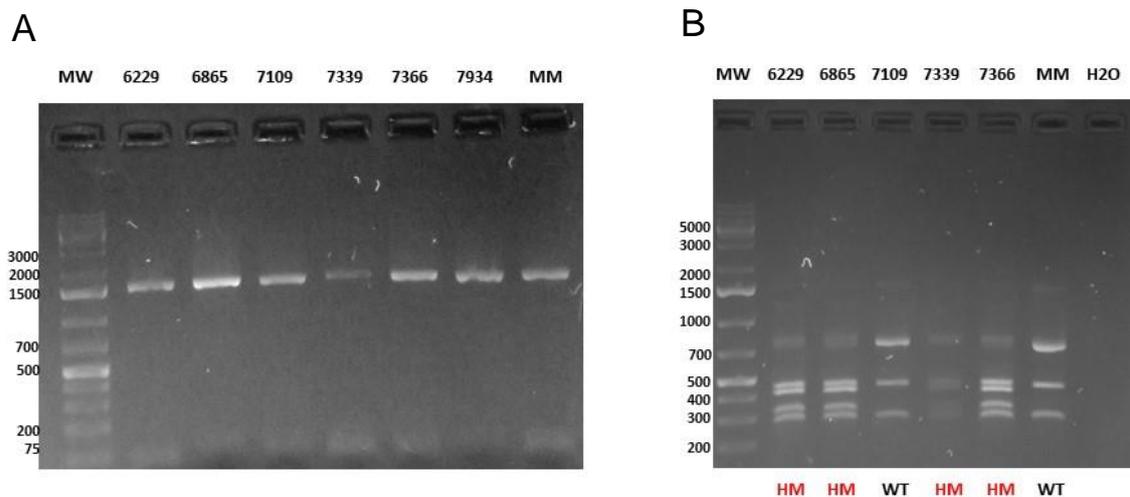
En cuanto a la generación  $F_2$  producida por los cruzamientos, a los 25 DTS los genotipos BGV006865 x Moneymaker y BGV007366 x BGV007109 mostraron un 10% de formación de callo ectópico, mientras que en BGV006229 x Moneymaker y BGV007339 x BGV007109 se observó un 20%. A los 32 DTS, el porcentaje de formación de callo ectópico en los genotipos BGV006865 x Moneymaker y BGV007366 x BGV007109 subió al 30%, mientras que en BGV006229 x Moneymaker y BGV007339 x BGV007109 la formación de callo ectópico se incrementó al 20% (Figura 8C).

También se estudió si existía asociación entre la formación de callo ectópico y la formación de raíces adventicias. Pero debido a los dispares resultados obtenidos se descarta esta posible relación en estos genotipos. En los cruces respectivos a SLC, la tendencia era que, a mayor formación de callo ectópico, menor número de raíces adventicias, mientras que en SP se invierte la tendencia, ya que había un mayor número de plantas que formaban callo y raíces adventicias, y otras que no formaban callo ectópico ni raíces adventicias (Figura 8D). A los 70 DTS, se determinó la presencia de raíces adventicias. Las plantas del cruce BGV006865 x Moneymaker presentaron el valor más alto de raíces adventicias, con un 70%, mientras que el resto presentaban un 40% (Figura 8E). Las proporciones observadas de plántulas que mostraban la formación ectópica de callo en las cuatro familias  $F_2$  fueron compatibles con el carácter monogénico de este rasgo, independientemente del fondo genético (SP o SLC), tal como evidencian los resultados mostrados en la Tabla 4.

#### **4.1.3. Genotipado de la inserción “TAGTTGGAGGCAC” mediante análisis CAPS**

La presencia de la inserción se determinó mediante un análisis CAPS utilizando ADN genómico extraído de plantas individuales. A partir de este ADN genómico se llevó a cabo una amplificación por PCR del fragmento de 1.349 pb (sin la inserción) o 1.362 pb (con la inserción), y su digestión posterior mediante la enzima MnlI (véase el apartado de Materiales y Métodos).

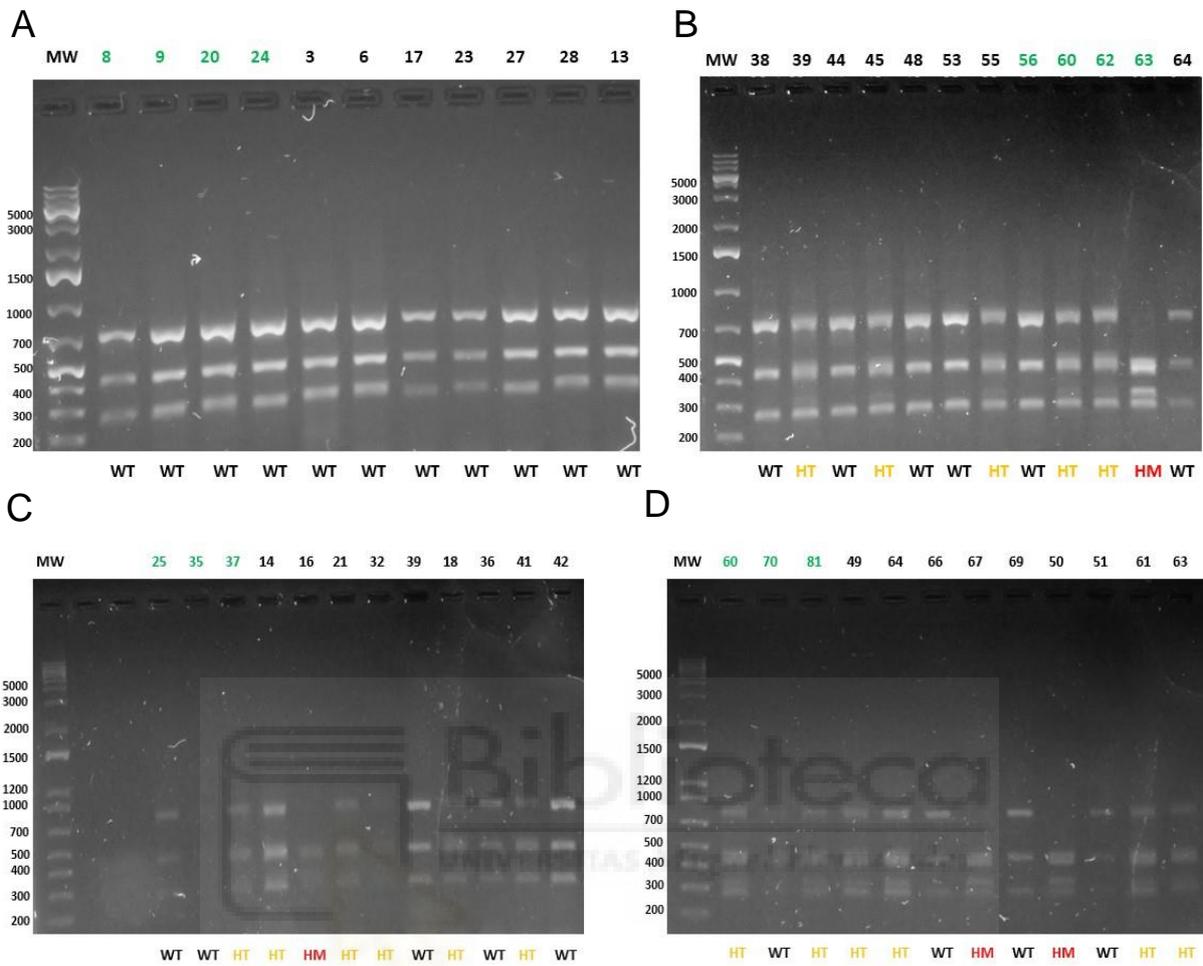
De cada familia  $F_2$ , se han elegido un mínimo de tres plántulas que formaron callo ectópico a los 25 DTS y siete plantas que no formaron callo ectópico a los 25 DTS. En un primer momento, se confirmó que los parentales BGV006865 (SLC), BGV006229 (SLC), BGV007339 (SP) y BGV007366 (SP), eran homocigotos para la inserción, mientras que MoneyMaker (SLL) y BGV007109 (SP) no la contenían (Figura 9).



**Figura 9.** (A) PCR del fragmento de ~1,4 Kb que contiene la inserción “TAGTTGGAGGCAC” en los parentales de los cruces. (B) Análisis CAPS de los parentales. MW es el marcador de peso molecular. WT para las plantas que no presentaron la inserción “TAGTTGGAGGCAC”, HT y HM para las plantas que presentaron la inserción “TAGTTGGAGGCAC” en homocigosis.

En la Figura 10 se muestran geles representativos con los resultados del análisis CAPS de plántulas  $F_2$  de los cruzamientos BGV006865 × Moneymaker (Figura 10A), BGV006229 × Moneymaker (Figura 10B), BGV007339 × BGV007109 (Figura 10C) y BGV007366 × BGV007109 (Figura 10D). En la  $F_2$  de BGV006865 × Moneymaker, ninguna de las cuatro plantas con callo ectópico seleccionadas presentó la inserción “TAGTTGGAGGCAC” (Figura 10A), mientras que en la  $F_2$  de BGV006229 × Moneymaker sólo una de las cuatro plantas con callo ectópico la presentaron (Figura 10B). Por otro lado, las plantas seleccionadas sin callo ectópico no presentaron la inserción en ningún caso. Estos resultados indican claramente que la presencia de la inserción “TAGTTGGAGGCAC” no está asociada a la formación de callo ectópico en las líneas BGV006865 y BGV006229, en fondo SLC.

En la  $F_2$  de BGV007339 × BGV007109, ninguna de las tres plantas con callo ectópico seleccionadas presentó la inserción “TAGTTGGAGGCAC” (Figura 10C). Tampoco ninguna la presentó en la  $F_2$  de BGV007366 × BGV007109 de las cuatro plantas con callo ectópico, tan solo dos de ellas la manifestaron de forma homocigota (Figura 10D). Por otro lado, las plantas seleccionadas sin callo ectópico presentaron la inserción en tres casos (Figura 10). Estos resultados indican claramente que la presencia de la inserción “TAGTTGGAGGCAC” tampoco está asociada a la formación de callo ectópico en las líneas BGV007339 y BGV007366, en fondo SP.



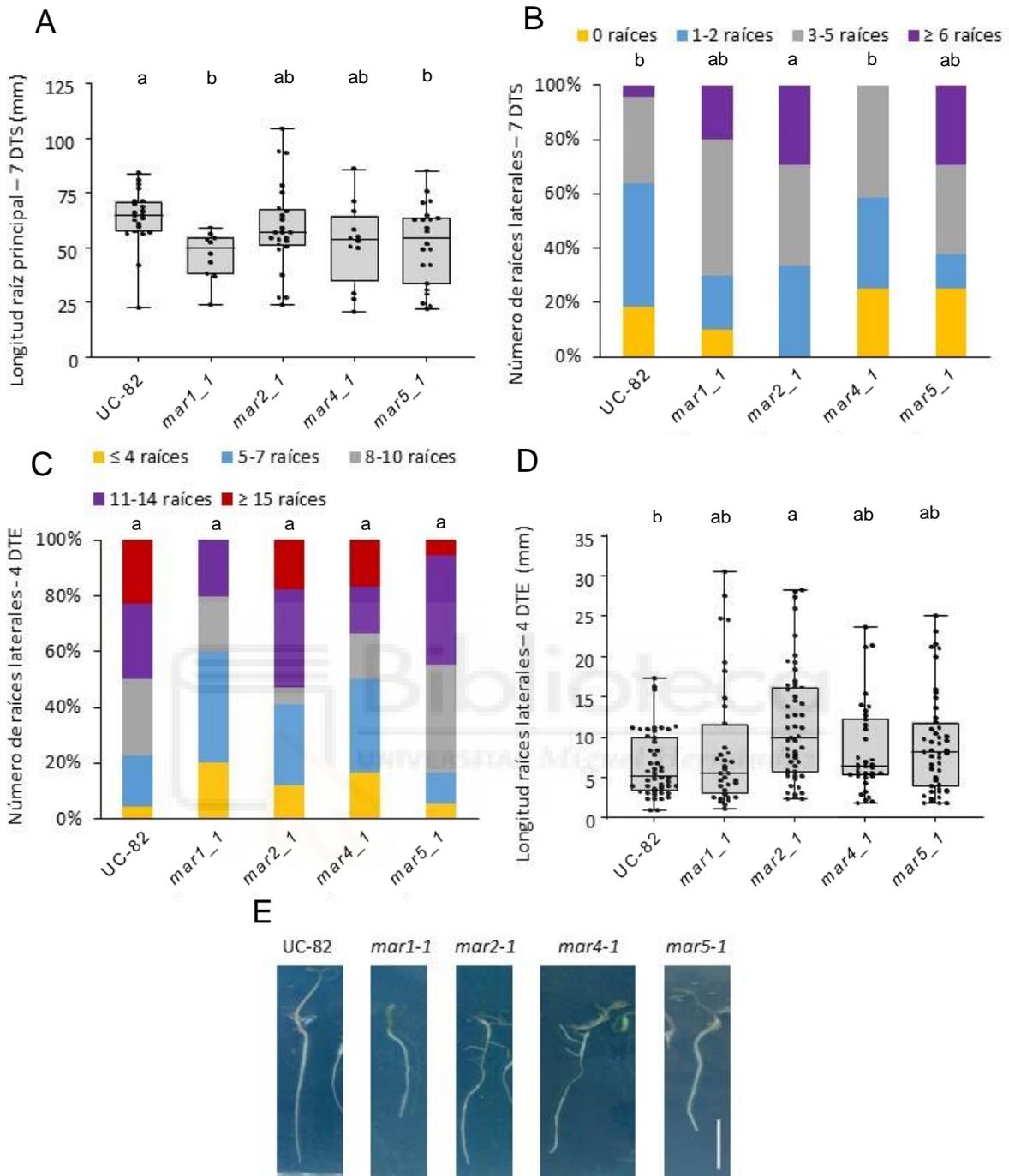
**Figura 10.** (A) Análisis CAPS de la F<sub>2</sub> de BGV006865 × Moneymaker. (B) Análisis CAPS de la F<sub>2</sub> del genotipo BGV006229 × Moneymaker. (C) Análisis CAPS de la F<sub>2</sub> del genotipo BGV007339 × BGV007109. (D) Análisis CAPS de la F<sub>2</sub> del genotipo BGV007366 × BGV007109. Cada número representa una planta diferente. Si el número de la planta es verde, significa que la planta presentaba formación de callos ectópicos. En cambio, si es negro, significa que la planta no presentaba formación de callos ectópicos. MW es el marcador de peso molecular. WT para las plantas que no presentaron la inserción, HT para las plantas que presentaron la inserción en heterocigosis y HM para las plantas que presentaron la inserción en homocigosis.

## 4.2. Mutantes *mar*

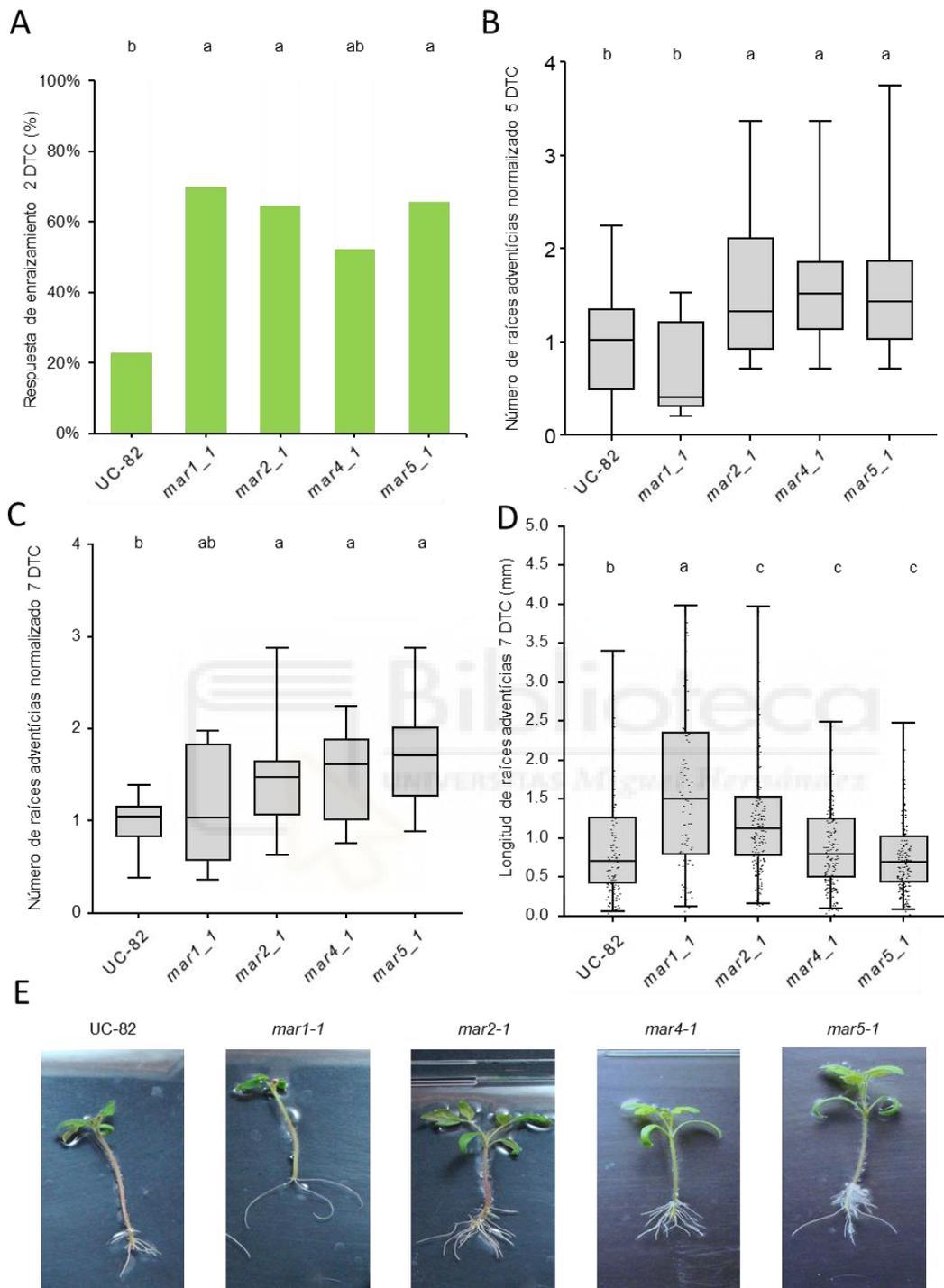
### 4.2.1. Fenotipado radicular de los mutantes *mar*

En la Figura 11 se muestran los resultados del estudio fenotípico del sistema radicular temprano de los mutantes *mar* en comparación con la estirpe silvestre UC-82. A los 7 DTS, la raíz principal de los mutantes *mar1-1* y *mar5-1* presentó una menor longitud que UC-82, mientras que en los mutantes *mar2-1* y *mar4-1* las diferencias en la longitud de la raíz principal no fueron significativas (Figura 11A). Aunque a los 7 DTS, el número de raíces laterales en la mayoría de los mutantes *mar* fue mayor que en UC-82 (Figura 11B), no se encontraron diferencias significativas en el número de raíces laterales entre los mutantes *mar* y UC-82 tras la escisión del ápice radicular (Figura 11C). La longitud de las raíces laterales a los 4 días tras la escisión (DTE) fue sensiblemente mayor en los mutantes *mar* que en la estirpe UC-82 (Figura 11D). En consecuencia, las diferencias fenotípicas entre la estirpe UC-82 y los mutantes *mar* estudiados en este trabajo en la etapa temprana del crecimiento vegetativo no son demasiado aparentes (Figura 11E).

A los 12 DTS se cortó el sistema radicular de raíz principal y laterales en la base del hipocótilo y se determinó la aparición de raíces adventicias en la base del hipocótilo a diferentes días tras el corte (DTC). La mayoría de los mutantes *mar* presentaron una respuesta de formación de raíces adventicias similar a la estirpe UC-82. La excepción fue *mar1-1*, que presentó un adelanto en la formación de raíces adventicias en respuesta a herida en comparación con la estirpe UC-82 o el resto de mutantes *mar* estudiados (Figura 12A). A pesar de ello, el número de raíces adventicias en respuesta a herida producidas por los mutantes *mar2-1*, *mar4-1* y *mar5-1* fueron mucho mayores que las producidas por UC-82 o el mutante *mar1-1*, tanto a los 5 como a los 7 DTC (Figura 12B, C). Solo la longitud de las raíces adventicias del mutante *mar1-1* fue claramente mayor que la de la estirpe UC-82 (Figura 12D), aunque la longitud de algunas raíces adventicias del mutante *mar2-1* fue mayor que el promedio de las de UC-82 (Figura 12E).



**Figura 11.** Sistema radicular temprano de los mutantes *mar*. (A) Longitud, en mm, de la raíz principal a los 7 DTS. (B) Número de raíces laterales a los 7 DTS. (C) Número de raíces laterales a los 4 DTE. (D) Longitud, en mm, de las raíces laterales a los 4 DTE. (E) Fotografía representativa de plántulas de 7 DTS de cada genotipo. La línea de escala representa 3 cm. Las letras minúsculas en A-B indican las diferencias estadísticamente significativas (valor de  $p < 0.01$ ; ANOVA) entre los distintos genotipos para el tiempo indicado.



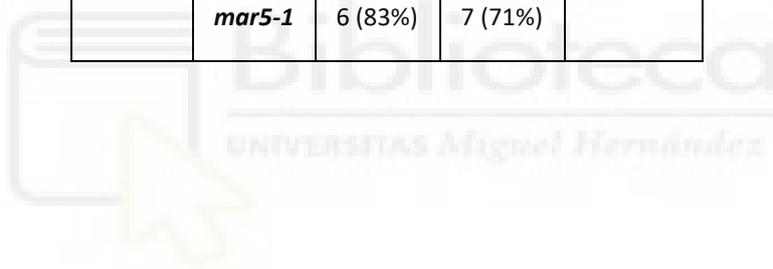
**Figura 12.** Formación de raíces adventicias en los mutantes *mar*. (A) Porcentaje de plantas que desarrollaron raíces adventicias a los 3 DTC. (B) Número de raíces adventicias a los 5 DTC. (C) Número de raíces adventicias a los 7 DTC. (D) Longitud, en cm, de las raíces adventicias a los 7 DTC. (E) Fotografías representativas de plantas de cada genotipo a los 7 DTC. La barra de escala representa 3 cm. Las letras minúsculas A-C indican las diferencias estadísticamente significativas (valor de  $p < 0.01$ ; ANOVA) entre los distintos genotipos.

#### 4.2.2. Cruzamiento entre los mutantes *mar*

Tras realizar los cruces pertinentes entre las líneas *mar* para iniciar la obtención de los dobles mutantes de todas las combinaciones posibles, se obtuvieron los resultados mostrados en la Tabla 5. El porcentaje de éxito se refiere a los cruzamientos realizados que finalmente culminaron en formación de tomates maduros con semillas. La diferencia de éxito entre los diferentes cruces se debe a una combinación de factores relacionados con la experiencia a la hora de realizar los cruces. También influyen otros factores como la flor utilizada como parental femenino, siendo óptimas aquellas flores que están a punto de abrirse.

**Tabla 5.** Cruces realizados entre los mutantes *mar* y su porcentaje de éxito (entre paréntesis).

		♂		
		<i>mar2-1</i>	<i>mar4-1</i>	<i>mar5-1</i>
♀	<i>mar2-1</i>		5 (60%)	13 (69%)
	<i>mar4-1</i>	8 (25%)		6 (33%)
	<i>mar5-1</i>	6 (83%)	7 (71%)	



## 5. DISCUSIÓN

El estudio detallado de las plántulas  $F_2$  de los cruzamientos estudiados en este trabajo reveló una segregación de  $\frac{1}{4}$  para el fenotipo de formación de callos ectópicos observado en algunas líneas SP y SLC de la colección Varitome-COMAV. Dado que en un trabajo previo de asociación a genoma completo se había identificado que la presencia de la inserción “TAGTTGGAGGCAC” estaba altamente correlacionada con la formación de raíces adventicias, se procedió a su comprobación. Esta misma segregación, era la esperada para la inserción en el polimorfismo en la  $F_2$  en homocigosis. Ya que, si los parentales eran homocigotos para la inserción, se cruzaban con plantas sin esa inserción y la generación resultante se autofecundaba, se obtenía un 25% de probabilidad de que el individuo fuera homocigoto para la inserción. Como consecuencia, este suceso apoya la hipótesis inicial que se desea comprobar de ver si la inserción “TAGTTGGAGGCAC” en el polimorfismo es determinante en el proceso de formación de callos ectópicos.

Sin embargo, el posterior análisis CAPS rechaza la hipótesis propuesta. La razón fundamental es que, en las digestiones con la enzima de restricción, deberíamos haber obtenido que las plantas que formaban callos fueran todas homocigotas para la inserción presentando así el correspondiente patrón de bandas. Pero este suceso no ocurrió y en las plantas que formaban callo, en los cuatro genotipos de sus respectivas especies, había tanto plantas tanto homocigotas como heterocigotas para la inserción y además también había algunas que ni la presentaban. Además, algunas de las plantas que no presentaban callo contenían la inserción incluso en homocigosis. Estos dos hechos descartan la posibilidad de que la inserción en la región candidata sea determinante en la formación de los callos ectópicos que hemos observado en estas líneas. Tendría sentido que la inserción en la región 5'-UTR del gen *SIARF24* estuviera implicada directamente en el proceso de formación de callo, ya que esto podría provocar alguna alteración en la regulación de la expresión de este gen y como consecuencia, que los niveles de auxinas se vieran afectados y ese desequilibrio promoviese la formación de callos. Porque como se menciona en la introducción del trabajo, un mismo nivel de auxinas y citoquininas induce la formación de callos (Melnyk, 2023). Pero al tratarse de una región candidata, no tiene por qué ser la indicada y pueden ser las otras dos regiones determinadas como candidatas en el estudio previo, ya que la segregación de callos producida en la  $F_2$  de los cruzamientos cumple con la segregación de un polimorfismo en homocigosis con un modo de herencia recesivo.

En cuanto a las líneas genéticas *mar*, podemos observar que no se observan diferencias significativas en cuanto al número de raíces laterales inducidas por corte en comparación con su ancestro silvestre. Lo que sí se aprecia, es una diferencia significativa en relación con el tamaño de esas raíces laterales si se comparan algunos de los mutantes con la variedad UC-82. Pero poniendo el foco de atención en las raíces adventicias, podemos afirmar que todos los mutantes *mar* producen

significativamente más raíces adventicias que la variedad UC-82, confirmando así también lo establecido en el trabajo previo en condiciones de invernadero. En la longitud de las raíces adventicias, solo dos de los cuatro genotipos estudiados producen raíces adventicias más largas. Con estos resultados, se confirma la hipótesis y el fenotipado realizado previamente, de que estas 4 líneas genéticas tienen una producción alterada de raíces adventicias y tienen una capacidad de regeneración atípica, lo que resulta interesante para investigar más a fondo y averiguar que procesos genéticos son los responsables de dicho fenómeno.



## 6. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

- 11 de las 14 líneas Varitome-COMAV que formaban callo de forma ectópica presentaban la inserción “TAGTTGGAGGCAC” en la región 5'-UTR del gen *SIARF24*, 9 de ellas en homocigosis.
- El fenotipo de formación de callo ectópico presentó un modo de herencia compatible con un carácter monogénico recesivo en las cuatro familias F<sub>2</sub> que se han analizado en este trabajo.
- Según los resultados obtenidos en el análisis CAPS, se descarta la asociación entre el polimorfismo en la región 5'-UTR del gen *SIARF24* y la formación de callo ectópico en las cuatro familias F<sub>2</sub> que se han analizado en este trabajo.
- Las líneas mutantes *mar2-1*, *mar4-1* y *mar5-1* presentan un incremento en la formación de raíces adventicias en explantos de hipocótilo respecto a la estirpe silvestre UC-82.
- Tanto *mar1-1* como *mar2-1* presentan unas raíces adventicias más largas que UC-82.
- Los mutantes *mar* no presentan problemas de fertilidad, ya que se han cruzado con éxito entre ellos en todos los casos ensayados.

Para poder completar este trabajo, sería conveniente genotipar las plántulas seleccionadas para otros polimorfismos presentes en la región candidata, así como para las otras dos regiones candidatas identificadas en el análisis GWA. Alternativamente, se podrían utilizar otras familias F<sub>2</sub> obtenidas del cruzamiento con el resto de los genotipos productores de callo ectópico y estudiar la segregación de estos polimorfismos.

Para continuar el trabajo con los mutantes *mar*, se deberían obtener familias F<sub>2</sub> y realizar estudios de segregación para identificar el fenotipo doble mutante y la interacción aditiva, epistática o sinérgica de las mutaciones *mar*.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Alaguero-Cordovilla, A., Gran-Gómez, F. J., Tormos-Moltó, S., & Pérez-Pérez, J. M.** (2018). Morphological characterization of root system architecture in diverse tomato genotypes during early growth. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 3888.
- Alaguero-Cordovilla, A., Sánchez-García, A. B., Ibáñez, S., Albacete, A., Cano, A., Acosta, M., & Pérez-Pérez, J. M.** (2021). An auxin-mediated regulatory framework for wound-induced adventitious root formation in tomato shoot explants. *Plant, Cell & Environment*, 44, 1642-1662.
- Bai, Y., & Lindhout, P.** (2007). Domestication and breeding of tomatoes: what have we gained and what can we gain in the future? *Annals of Botany*, 100, 1085-1094.
- Bellini, C., Pacurar, D. I., & Perrone, I.** (2014). Adventitious roots and lateral roots: similarities and differences. *Annual Review of Plant Biology*, 65, 639-666.
- Bedinger, P. A., Chetelat, R. T., McClure, B., Moyle, L. C., Rose, J. K., Stack, S. M., ... & Royer, S.** (2011). Interspecific reproductive barriers in the tomato clade: opportunities to decipher mechanisms of reproductive isolation. *Sexual Plant Reproduction*, 24, 171-187.
- Bergougnoux, V.** (2014). The history of tomato: from domestication to biopharming. *Biotechnology Advances*, 32, 170-189.
- Blanca, J., Cañizares, J., Cordero, L., Pascual, L., Díez, M. J., & Nuez, F.** (2012). Variation revealed by SNP genotyping and morphology provides insight into the origin of the tomato. *PLoS ONE*, 7, e48198.
- Blanca, J., Montero-Pau, J., Sauvage, C., Bauchet, G., Illa, E., Díez, M. J., ... & Cañizares, J.** (2015). Genomic variation in tomato, from wild ancestors to contemporary breeding accessions. *BMC Genomics*, 16, 1-19.
- Bustillo-Avendaño, E., Ibáñez, S., Sanz, O., Sousa Barros, J. A., Gude, I., Perianez-Rodríguez, J., ... & Pérez-Pérez, J. M.** (2018). Regulation of hormonal control, cell reprogramming, and patterning during de novo root organogenesis. *Plant Physiology*, 176, 1709-1727.
- Cambiaso, V., Rodríguez, G.R., Francisco, D.M.** (2020). La fidelidad de propagación y el parentesco de las variedades de tomate 'UC 82' y 'M82' se revelaron mediante el análisis de la variación de la secuencia. *Agronomía*, 10, 538.
- Chetelat, R. T., & Rick, C. M.** (2005). Revised list of monogenic stocks. *Report of the Tomato Genetics Cooperative*, 55, 48-69.
- Diesh, C., Stevens, G. J., Xie, P., De Jesus Martínez, T., Hershberg, E. A., Leung, A., ... & Holmes, I. H.** (2023). JBrowse 2: a modular genome browser with views of synteny and structural variation. *Genome Biology*, 24, 74.
- Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K., & Scheres, B.** (1993). Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development*, 119, 71-84.
- Du, Y., & Scheres, B.** (2018). Lateral root formation and the multiple roles of auxin. *Journal of Experimental Botany*, 69, 155-167.
- Fernandez-Pozo, N., Menda, N., Edwards, J., Saha, S., Tecle, I., Strickler, S., Bombarely, A., Fisher-York, T., Pujar, A., Foerster, H., Yan, A., Mueller, L.** (2015) The Sol Genomics Network (SGN)—from genotype to phenotype to breeding, *Nucleic Acids Research*, 43, 1036–1041.

- Gedion, B. W.** (2018). Genetic determinates of tomato (*Solanum lycopersicum*) adventitious roots development [M.Sc. Thesis, Robert H. Smith Faculty of Agricultural, Food and Environment, The Hebrew University of Jerusalem].
- Gonin, M., Bergougnoux, V., Nguyen, T. D., Gantet, P., & Champion, A.** (2019). What makes adventitious roots? *Plants*, 8, 240.
- Huang, X., & Han, B.** (2014). Natural variations and genome-wide association studies in crop plants. *Annual Review of Plant Biology*, 65, 531-551.
- Ibáñez, S., Carneros, E., Testillano, P. S., & Pérez-Pérez, J. M.** (2020). Advances in plant regeneration: Shake, rattle and roll. *Plants*, 9, 897.
- Ikeuchi, M., Sugimoto, K., & Iwase, A.** (2013). Plant callus: mechanisms of induction and repression. *The Plant Cell*, 25, 3159-3173.
- Justamante, M. S., Mhimdi, M., Molina-Pérez, M., Albacete, A., Moreno, M. Á., Mataix, I., & Pérez-Pérez, J. M.** (2022). Effects of auxin (Indole-3-butyric Acid) on adventitious root formation in peach-based Prunus rootstocks. *Plants*, 11, 913.
- Kareem, A., Radhakrishnan, D., Sondhi, Y., Aiyaz, M., Roy, M. V., Sugimoto, K., & Prasad, K.** (2016). De novo assembly of plant body plan: a step ahead of Deadpool. *Regeneration*, 3, 182-197.
- Kevei, Z., Larriba, E., Romero-Bosquet, M. D., Nicolás-Albuje, M., Kurowski, T. J., Mohareb, F., ... & Thompson, A. J.** (2024). Genes involved in auxin biosynthesis, transport and signalling underlie the extreme adventitious root phenotype of the tomato *aer* mutant. *Theoretical and Applied Genetics*, 137, 76.
- Lakehal, A., & Bellini, C.** (2019). Control of adventitious root formation: insights into synergistic and antagonistic hormonal interactions. *Physiologia Plantarum*, 165, 90-100.
- Larriba, E., Sánchez-García, A. B., Martínez-Andújar, C., Albacete, A., & Pérez-Pérez, J. M.** (2021). Tissue-specific metabolic reprogramming during wound-induced organ formation in tomato hypocotyl explants. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 10112.
- Larriba, E., Sánchez-García, A. B., Justamante, M. S., Martínez-Andújar, C., Albacete, A., & Pérez-Pérez, J. M.** (2021). Dynamic hormone gradients regulate wound-induced de novo organ formation in tomato hypocotyl explants. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 11843.
- Larriba, E., Nicolás-Albuje, M., Sánchez-García, A. B., & Pérez-Pérez, J. M.** (2022). Identification of transcriptional networks involved in de novo organ formation in tomato hypocotyl explants. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 16112.
- Larriba, E., Yaroshko, O., & Pérez-Pérez, J. M.** (2024). Recent advances in tomato gene editing. *International Journal of Molecular Sciences*, 25, 2606.
- Lozano, R., Giménez, E., Cara, B., Capel, J., & Angosto, T.** (2009). Genetic analysis of reproductive development in tomato. *International Journal of Developmental Biology*, 53, 1635.
- Mata-Nicolás, E., Montero-Pau, J., Gimeno-Paez, E., Garcia-Carpintero, V., Ziarsolo, P., Menda, N., ... & Díez, M. J.** (2020). Exploiting the diversity of tomato: the development of a phenotypically and genetically detailed germplasm collection. *Horticulture Research*, 7, 66.
- Melnyk, C. W.** (2023). Quantitative regeneration: Skoog and Miller revisited. *Quantitative Plant Biology*, 4, e10.
- Modrego, A., Pasternak, T., Omary, M., Albacete, A., Cano, A., Pérez-Pérez, J. M., & Efroni, I.** (2023). Mapping of the classical mutation rosette highlights a role for calcium in wound-induced rooting. *Plant and Cell Physiology*, 64, 152-164.

- Motte, H., Vanneste, S., & Beeckman, T.** (2019). Molecular and environmental regulation of root development. *Annual Review of Plant Biology*, 70, 465-488.
- Mroginski, L. A., & Roca, W. M.** (1991). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales in vitro. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. *Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT)*, Cali, Colombia, 19-40.
- Negi, S., Sukumar, P., Liu, X., Cohen, J. D., & Muday, G. K.** (2010). Genetic dissection of the role of ethylene in regulating auxin-dependent lateral and adventitious root formation in tomato. *The Plant Journal*, 61, 3-15.
- Nuez, F., Diez, M. J., Prohens, J., Blanca, J. M., Sifres, A., Pico, B., ... & Zuriaga, E.** (2008). The study of molecular diversity in natural populations of wild and weedy tomatoes and its implications in tomato breeding. *Acta Horticulturae*, 789, 249.
- Peralta, I. E., & Spooner, D. M.** (2005). Morphological characterization and relationships of wild tomatoes (*Solanum* L. Section *Lycopersicon* [Mill.] Wettst. Subsection *Lycopersicon*). *Monographs in Systematic Botany, Missouri Botanical Garden*, 104, 227257.
- Ranc, N., Muños, S., Santoni, S., & Causse, M.** (2008). A clarified position for *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* in the evolutionary history of tomatoes (*Solanaceae*). *BMC Plant Biology*, 8, 1-16.
- Razali, R., Bougouffa, S., Morton, M. J., Lightfoot, D. J., Alam, I., Essack, M., ... & Negrão, S.** (2018). The genome sequence of the wild tomato *Solanum pimpinellifolium* provides insights into salinity tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 9, 390082.
- Segretín, M. E.** (2006). Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales). *Consejo argentino para la información y el desarrollo de la biotecnología*, 2, 5-8.
- Sim, S. C., Robbins, M. D., Van Deynze, A., Michel, A. P., & Francis, D. M.** (2011). Population structure and genetic differentiation associated with breeding history and selection in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Heredity*, 106, 927-935.
- Steffens, B., & Rasmussen, A.** (2016). The physiology of adventitious roots. *Plant Physiology*, 170, 603-617.
- Takei, H., Shirasawa, K., Kuwabara, K., Toyoda, A., Matsuzawa, Y., Iioka, S., & Ariizumi, T.** (2021). De novo genome assembly of two tomato ancestors, *Solanum pimpinellifolium* and *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*, by long-read sequencing. *DNA Research*, 28, dsaa029.
- Tanksley, S. D., & McCouch, S. R.** (1997). Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. *Science*, 277, 1063-1066.
- The tomato Genome Consortium, X.** (2012). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, 485, 635.
- Verstraeten, I., Schotte, S., & Geelen, D.** (2014). Hypocotyl adventitious root organogenesis differs from lateral root development. *Frontiers in Plant Science*, 5, 100160.
- Wang, X., Gao, L., Jiao, C., Stravoravdis, S., Hosmani, P. S., Saha, S., ... & Fei, Z.** (2020). Genome of *Solanum pimpinellifolium* provides insights into structural variants during tomato breeding. *Nature Communications*, 11, 5817.
- Zuriaga, E., Blanca, J. M., Cordero, L., Sifres, A., Blas-Cerdán, W. G., Morales, R., & Nuez, F.** (2009). Genetic and bioclimatic variation in *Solanum pimpinellifolium*. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 56, 39-51.

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo se ha realizado con la financiación de los proyectos AGROALNEXT2022/036 y TED2021-132256B-C22.

A José Manuel Pérez Pérez, por haberme permitido realizar este trabajo en su laboratorio, bajo su atenta dirección y ayuda.

A Adrián Luque Torres, por su dirección incansable y múltiples enseñanzas a lo largo de la experiencia. También por todo el sacrificio y ayuda ofrecidos en todo momento.

A mi familia y amigos, por apoyarme y ayudarme en los momentos más complicados y darme la seguridad y ánimo que necesitaba.

