



**Estudio de la capacidad organogénica en tomate y especies relacionadas: localización de QTLs implicados y estudio de la influencia del etileno**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:  
Carlos Trujillo Moya

Dirigida por:  
Dra. Carmina Gisbert Domenech

Valencia, junio 2013





UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Instituto de Conservación y Mejora  
de la Agrodiversidad Valenciana

**Dña. Carmina Gisbert Doménech**, doctora en Ciencias Biológicas y Profesora Titular del Departamento de Biotecnología de la Universitat Politècnica de València,

**CERTIFICA:**

Que **D. Carlos Trujillo Moya** licenciado en Biología por la Universitat de València, ha realizado bajo mi dirección la tesis doctoral titulada: “Estudio de la capacidad organogénica en tomate y especies relacionadas: localización de QTLs implicados y estudio de la influencia del etileno” y constituye su Memoria de Tesis para optar al grado de Doctor en Biotecnología.

Y para que así conste, firmo la presente en Valencia a 18 de junio de 2013

Fdo: Dra. Carmina Gisbert





**Carlos Trujillo Moya ha disfrutado de una beca predoctoral financiada por el Ministerio de Ciencia e Innovación, Formación Profesorado Universitario (FPU), para la realización de la presente tesis doctoral.**



Dedicado a todos los que creen en mí y a  
todos los que creen que es posible un mundo  
mejor.





## RESUMEN

La regeneración de plantas a partir de explantes es la base de partida para poder aplicar tecnologías tales como la obtención de plantas haploides o la transformación genética. Este carácter presenta una amplia variabilidad inter e intraespecífica. Así, incluso dentro de la misma especie, podemos encontrarnos genotipos recalcitrantes cuya falta o escasa regeneración limita la aplicación de estas técnicas. Además del componente genético, otros factores que condicionan el éxito de la regeneración son: las condiciones fisiológicas del material de partida, los componentes del medio de cultivo, los reguladores de crecimiento, la temperatura, la luz, etc... La falta de información acerca de qué factores determinan que este proceso se produzca por una u otra vía morfogénica (la vía organogénica o la embriogénica) y la incertidumbre de cuantos genes están implicados, indica la necesidad de investigación básica de este proceso.

El objetivo principal de este trabajo se centra en incrementar el conocimiento de la base genética así como la localización de QTLs implicados en la regeneración por la vía organogénica que es la predominante en tomate. Para ello, se han utilizado dos poblaciones de mapeo ( $F_2$ ,  $BC_1$ ) obtenidas por la Dra. Gisbert. La población  $F_2$  se obtuvo a partir de la autofecundación de una planta  $F_1$ , resultante del cruce de una planta de tomate (*S. lycopersicum* L.) seleccionada por su escasa capacidad regenerativa (Anl27) y la accesión PE-47 de *S. pennellii* Correll. con alta capacidad de regeneración. Por su parte, la población  $BC_1$  se obtuvo a partir del cruce (Anl27 x  $F_1$ ). Con estos materiales se ha realizado una caracterización fenotípica y genotípica en clones de cada genotipo, que se han mantenido en cultivo *in vitro*. Utilizando el programa informático MapQTL® se han identificado seis QTL implicados en la regeneración localizados en los cromosomas 1, 3, 4, 7 y 8. Cinco de los QTLs (*SpRg-1*, *Rg-3*, *SpRg-4a*, *SpRg-4b*, *SpRg-7*) proceden del tomate silvestre *S. pennellii* y uno (*SlRg-8*) procede de *S. lycopersicum*. El porcentaje de varianza explicada por cada QTL va desde el 7,4% al 27%, dentro del rango común (6-26%) registrado en el mapeo genético de QTLs relacionados con la regeneración *in vitro* en otros cultivos. *SpRg-1* es el mayor responsable de la respuesta morfogénica mientras que *SpRg-7* promueve el desarrollo del brote hacia una planta completa. Por otra parte, los QTLs detectados en los cromosomas 8 (*SlRg-8*) y 4 (*SpRg-4a*, *SpRg-4b*), podrían contener genes que influyen en la formación de yemas y su desarrollo, respectivamente. Finalmente *Rg-3*, situado en la mitad del cromosoma 3 y ligado al gen de la invertasa ácida, se presenta como un alelo putativo del gen *Rg* detectado en *S. peruvianum* (*Rg-1*) y *S. chilense* (Dunal) Reiche. (*Rg-2*).

Además del genotipo, el tipo y combinación de reguladores de crecimiento son importantes para el éxito de los protocolos de regeneración. En tomate, los reguladores de crecimiento más utilizados son las citoquininas, o la combinación de éstas con auxinas. Otros

reguladores como el etileno se han estudiado poco y los trabajos publicados muestran conclusiones dispares. Con el fin de estudiar la influencia del etileno en la regeneración se han realizado ensayos con dos compuestos liberadores de etileno (Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico “ACC” y ácido 2-Cloroetil fosfónico “Ethephon”) y dos inhibidores de etileno: AgNO<sub>3</sub>, que inhibe la acción del etileno; y CoCl<sub>2</sub>, que inhibe la producción de etileno. Los resultados obtenidos muestran que la concentración y el momento de la aplicación son dos factores fundamentales a tener en cuenta para el éxito de la respuesta organogénica. En concreto, la aplicación de inhibidores de etileno y su consecuente disminución tiene un efecto negativo sobre la regeneración en tomate ya que se disminuye y se retrasa la respuesta. Así mismo, las plantas regenerantes obtenidas presentan tamaño reducido, pudiendo aparecer vitrificación y malformaciones. Por otra parte, la suplementación de etileno puede mejorar la regeneración. Así, el número de plantas regeneradas a partir de explantes de *S. pennellii* se duplicó en los medios con ACC respecto al medio control. Si la aplicación de ACC se realiza tras la inducción de las yemas, pasados 10 días, el rendimiento total será mayor. Este resultado indica que este compuesto podría ser utilizado para mejorar la regeneración en aquellos genotipos donde una vez formadas las yemas, el desarrollo de éstas hacia plantas es el paso limitante. Por otra parte, las plantas regenerantes obtenidas muestran buen desarrollo, por lo que la suplementación de etileno no afecta al posterior crecimiento de las plantas regeneradas.

Finalmente se ha estudiado la capacidad organogénica de las especies silvestres de tomate derivadas del complejo *S. peruvianum* L. sensu lato (s.l.): *Solanum arcanum* Peralta., *Solanum huaylasense* Peralta., *Solanum corneliomulleri* J. F. Macbr. y *Solanum peruvianum* L. sensu stricto (s.s.). Estas especies pueden tener un papel fundamental en la mejora, sobre todo de resistencias a factores bióticos. Sin embargo, debido a las barreras de hibridación que existen entre éstas y el tomate cultivado, no se han explotado en su totalidad en la mejora del cultivo. Para realizar cruces se ha recurrido a la fusión de protoplastos y el rescate de embriones. Sin embargo, no se ha estudiado la capacidad organogénica de las especies derivadas del complejo Peruvianum, lo que limita la aplicación de estas técnicas. En este trabajo se ha encontrado variabilidad intra e interespecífica en la capacidad organogénica de las especies silvestres derivadas de este complejo. En general, todas las accesiones ensayadas de *S. corneliomulleri* y *S. huaylasense* mostraron una elevada capacidad regenerativa y se han identificado accesiones recalcitrantes en *S. arcanum* (LA-2185) y *S. peruvianum* s.s (ECU-106 y CH-20). En este trabajo, también se ha realizado un análisis morfológico de las hojas que ha determinado que el número de foliolos y el nivel de dentición de los mismos pueden ser utilizados en la identificación *in vitro* de las especies del complejo. Sin embargo, el área de foliolo solo permite distinguir a *S. arcanum* del resto de especies. Finalmente, se ha observado que las accesiones cuyas hojas tienen mayor número de foliolos y mayor nivel de dentición tienen una mayor regeneración.

## RESUM

La regeneració de plantes a partir d'explants és el punt de partida per poder aplicar tecnologies tals com l'obtenció de plantes haploides o la transformació genètica. Aquest caràcter presenta una àmplia variabilitat inter i intraespecífica. Així, fins i tot dins de la mateixa espècie, podem trobar-nos genotips recalcitrants que la seva escassa regeneració limita l'aplicació d'aquestes tècniques. A més del component genètic, altres factors que condicionen l'èxit de la regeneració són: les condicions fisiològiques del material de partida, els components del medi de cultiu, els reguladors de creixement, la temperatura, la llum, etc... La falta d'informació sobre quins factors determinen que aquest procés es produïska per una o una altra via morfogènica (la via organogènica o la embriogènica) i la incertesa de quants gens estan implicats, indica la necessitat de recerca bàsica d'aquest procés.

L'objectiu principal d'aquest treball es centra en incrementar el coneixement de la base genètica així com la localització de QTLs implicats en la regeneració per la via organogènica que és la predominant en tomaca. Per a això, s'han utilitzat dues poblacions de mapatge ( $F_2$ ,  $BC_1$ ) obtingudes per la Dra. Gisbert. La població  $F_2$  es va obtenir a partir de la autofecundació d'una planta  $F_1$ , resultant de l'encreuament d'una planta de tomaca (*S. lycopersicum* L.) seleccionada per la seva escassa capacitat regenerativa (An127) i l'accessió PE-47 de *S. pennellii* Correll. amb alta capacitat de regeneració. Per la seva banda, la població  $BC_1$  es va obtenir a partir de l'encreuament (An127 x  $F_1$ ). Amb aquests materials s'ha realitzat una caracterització fenotípica i genotípica en clons de cada genotip, que s'han mantingut en cultiu *in vitro*. Utilitzant el programa informàtic MapQTL® s'han identificat sis QTL implicats en la regeneració localitzats en els cromosomes 1, 3, 4, 7 i 8. Cinc dels QTLs (*SpRg-1*, *Rg-3*, *SpRg-4a*, *SpRg-4b*, *SpRg-7*) procedeixen de la tomaca silvestre *S. pennellii* i un (*SlRg-8*) procedeix de *S. lycopersicum*. El percentatge de variància explicada per cada QTL va des del 7,4% al 27%, dins del rang comú (6-26%) registrat en el mapatge genètic de QTLs relacionats amb la regeneració *in vitro* en altres cultius. *SpRg-1* és el major responsable de la resposta morfogènica mentre que *SpRg-7* promou el desenvolupament del brot cap a una planta completa. D'altra banda els QTLs detectats en els cromosomes 8 (*SlRg-8*) i 4 (*SpRg-4a*, *SpRg-4b*) podrien contenir gens que influeixen en la formació de gemmes i en el seu desenvolupament, respectivament. Finalment *Rg-3*, situat en la meitat del cromosoma 3 i lligat al gen de la invertasa àcida, es presenta com un al·lel putatiu del gen *Rg* detectat en *S. peruvianum* (*Rg-1*) i *S. chilense* (Dunal) Reiche. (*Rg-2*).

A més del genotip, el tipus i combinació de reguladors de creixement són importants per a l'èxit dels protocols de regeneració. En tomaca, els reguladors de creixement més utilitzats són les citoquinines, o la combinació d'aquestes amb auxines. Altres reguladors com l'etilè s'han

estudiat poc i els treballs publicats mostren conclusions dispars. Amb la finalitat d'estudiar la influència de l'etilè en la regeneració s'han realitzat assajos amb dos compostos alliberadors d'etilè (Àcid 1-aminociclopropà-1-carboxílic "ACC" i àcid 2-Cloroetil fosfònic "Ethephon") i dos inhibidors d'etilè:  $\text{AgNO}_3$ , que inhibeix l'acció de l'etilè; i  $\text{CoCl}_2$ , que inhibeix la producció d'etilè. Els resultats obtinguts mostren que la concentració i el moment de l'aplicació són dos factors fonamentals a tenir en compte per a l'èxit de la resposta organogènica. En concret, l'aplicació d'inhibidors d'etilè i la seua conseqüent disminució té un efecte negatiu sobre la regeneració en tomaca ja que es disminueix i es retarda la resposta. Així mateix, les plantes regenerants obtingudes presenten creixement reduït, i pot aparèixer vitrificació i malformacions. D'altra banda, l'addició d'etilè pot millorar la regeneració. Així, el nombre de plantes regenerades a partir de explantes de *S. pennellii* es va duplicar en els medis amb ACC respecte al medi control. Si l'aplicació d'ACC es realitza després de la inducció de les gemmes, passats 10 dies, el rendiment total serà major. Aquest resultat indica que aquest compost podria ser utilitzat per millorar la regeneració en aquells genotips on, una vegada formades les gemmes, el desenvolupament d'aquestes cap a plantes és el pas limitant. D'altra banda, les plantes regenerants obtingudes mostren bon desenvolupament, per la qual cosa l'addició d'etilè no afecta al posterior creixement de les plantes regenerades.

Finalment s'ha estudiat la capacitat organogènica de les espècies silvestres de tomaca derivades del complex *S. peruvianum* L. sensu lato (s.l.): *Solanum arcanum* Peralta., *Solanum huaylasense* Peralta., *Solanum corneliomulleri* J. F. Macbr. i *Solanum peruvianum* L. sensu stricto (s.s.). Aquestes espècies poden tenir un paper fonamental en la millora, sobretot de resistències a factors biòtics. No obstant això, a causa de les barreres d'hibridació que existeixen entre aquestes i el tomaca cultivada, no s'han explotat íntegrament en la millora del cultiu. Per realitzar creuaments s'ha recorregut a la fusió de protoplastes i al rescat d'embrions. No obstant això, no s'ha estudiat la capacitat organogènica de les espècies derivades del complex Peruvianum, la qual cosa limita l'aplicació d'aquestes tècniques. En aquest treball s'ha trobat variabilitat intra i interespecífica en la capacitat organogènica de les espècies silvestres derivades d'aquest complex. En general, totes les accessions assajades de *S. corneliomulleri* i *S. huaylasense* van mostrar una elevada capacitat regenerativa i s'han identificat accessions recalcitrants en *S. arcanum* (LA-2185) i *S. peruvianum* s.s (ECU-106 i CH-20). En aquest treball, també s'ha realitzat un anàlisi morfològic de les fulles que ha determinat que el nombre de folíols i el nivell de dentició de les mateixes poden ser utilitzats en la identificació *in vitro* de les espècies del complex. No obstant això, l'àrea de folíol solament permet distingir a *S. arcanum* de la resta d'espècies del complex. Finalment s'ha observat que les accessions, les fulles dels quals tenen major nombre de folíols i major nivell de dentició, mostren una major regeneració.

## ABSTRACT

Plant regeneration from explants is the starting point to apply technologies such as haploid regeneration or genetic transformation. This character shows a wide inter and intra-specific variability. Thus, even within the same species we can find recalcitrant genotypes whose lack or insufficient regeneration ability limits the application of these techniques. In addition, other factors affecting the success of regeneration are: the physiological conditions of the starting material, the components of the culture medium, growth regulators, temperature, light, etc... The lack of information about what factors determine that this process occurs for one or another morphogenetic way (organogenic or embryogenic) and of how many genes are involved, indicates the need for basic research of this process.

The main goal of this work is focused on increasing the knowledge of the genetic basis as well as the localization of QTLs involved in organogenic regeneration way that is predominant in tomato. We have used two mapping populations ( $F_2$ ,  $BC_1$ ) obtained by Dr. Gisbert. The  $F_2$  population was obtained from self-pollination of a  $F_1$  plant, resulting from the crossing of a tomato plant (*S. lycopersicum* L.) selected by its limited regenerative capacity (Anl27) and the PE-47 accession of *Solanum pennellii* Correll. with high regeneration capacity. Furthermore, the  $BC_1$  population was obtained from the cross (Anl27 x  $F_1$ ). Phenotypic and genotypic characterization has been done in clones of each genotype maintained on *in vitro* culture. Using the computer program MapQTL<sup>®</sup> we identified six QTLs involved in regeneration and located on chromosomes 1, 3, 4, 7 and 8. Five of the QTLs (*SpRg-1*, *Rg-3*, *SpRg-4a*, *SpRg-4b*, *SpRg-7*) come from the wild tomato *S. pennellii* and one (*SlRg-8*) comes from *S. lycopersicum*. The variance percentage explained by each QTL was in the range 7.4-27%, within the common range (6-26%) recorded for the genetic mapping of QTLs associated with *in vitro* regeneration in other crops. *SpRg-1* is most responsible for the morphogenetic response while *SpRg-7* promotes the development of the bud to a complete plant. On the other hand, the QTLs detected in chromosomes 8 (*SlRg-8*) and 4 (*SpRg-4a*, *SpRg-4b*) may contain genes that influence in the formation of buds and its development, respectively. Finally *Rg-3*, located in the middle of chromosome 3 and linked to Acid Invertase gene, is presented as a putative allele of the *Rg* gene detected in *S. peruvianum* (*Rg-1*) and *S. chilense* (Dunal) Reiche. (*Rg-2*).

Type and combination of growth regulators are important to the success of regeneration protocols. In tomato, cytokinins or a combination of these with auxins are the growth regulators most commonly used. Other regulators such as the Ethylene has been little studied and published works show disparate conclusions. In order to study the influence of ethylene in the regeneration many tissue culture experiments were performed using two compounds releasing

ethylene (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid "ACC" and 2-Chloroethylphosphonic acid phosphonic "Ethephon") and two inhibitors of ethylene: AgNO<sub>3</sub>, which inhibits the action of ethylene; and CoCl<sub>2</sub>, which inhibits the production of ethylene. The results show that concentration and time of application are two key factors to take into account for the success of the organogenic response. In particular, the application of ethylene inhibitors and its consequent decrease has a negative effect on regeneration in tomato since response is delayed and decreased. Likewise, regenerating plants obtained are reduced in size, and can show vitrification and malformations. On the other hand, ethylene supplementation can improve regeneration. Thus, the number of plants regenerated from explants of *S. pennellii* on ACC supplemented medium doubled the number obtained on control medium. If ACC is applied after the induction of buds, after 10 days, total yield is greater. This result indicates that this compound could be used to improve regeneration in those genotypes which once formed the buds, the development of these to plants is the limiting step. On the other hand, the regenerating plants obtained show good development. Ethylene supplementation does not affect the subsequent growth of the regenerated plants.

Finally we have studied the organogenic capacity of wild tomato species derived from the complex *S. peruvianum* l. sensu lato (s.l.): *Solanum arcanum* Peralta., *Solanum huaylasense* Peralta., *Solanum corneliomulleri* J. F. Macbr. and *Solanum peruvianum* L. sensu stricto (s.s.). These species can be very important on tomato plant breeding for resistance to biotic factors. However, due to hybridization barriers they are not extensively used yet: protoplasts fusion and embryo rescue can be the best way to hybridize. However, it has not been studied the organogenic capacity of the species derived from the Peruvianum complex, which limits the application of these techniques. This work has found intra and interspecific variability in organogenic capacity of wild species from this complex. In general, all *S. corneliomulleri* and *S. huaylasense* tested accessions showed an elevated regenerative capacity and we have identified recalcitrant accessions in *S. arcanum* (LA-2185) and *S. peruvianum* s.s (ECU-106 and CH-20). In this work, a morphological analysis of the leaves has determined that the number of leaflets and dentition can be used to identify *in vitro* species of the complex. However, the leaflet area only allows to identify *S. arcanum* of the rest of the complex species. Finally it has been observed that the accessions whose leaves have greater number of leaflets and higher level of dentition have a greater regeneration response.

# ÍNDICE





## ÍNDICE

RESUMEN.....	9
I. INTRODUCCIÓN .....	19
1. Origen, domesticación y difusión del tomate.....	21
2. Importancia económica del tomate .....	25
3. Mejora vegetal en el tomate .....	28
3.1. Las especies silvestres como fuente de variabilidad .....	28
3.2. Los marcadores moleculares .....	30
3.2.1. Detección y análisis de QTLs.....	32
3.3. Técnicas de cultivo <i>in vitro</i> y transformación genética.....	36
3.3.1 Regeneración de plantas a partir de explantes. La morfogénesis en tomate .....	38
3.3.1.1 Vías de regeneración .....	38
3.3.1.2 La influencia del genotipo, transferencia de la capacidad organogénica y genética de la regeneración .....	40
3.3.1.3 Los reguladores de crecimiento y su papel en la regeneración .....	43
4. Bibliografía Introducción .....	47
II. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN .....	71
III. PUBLICACIONES. ....	75
Localization of QTLs for <i>in vitro</i> plant regeneration in tomato.....	77
The influence of ethylene and ethylene modulators on shoot organogenesis in tomato .....	125
Leaf morphology and shoot regeneration of <i>in vitro</i> cultured explants from species of the <i>S. peruvianum</i> L. <i>sensu lato</i> complex .....	147
IV. DISCUSIÓN GENERAL.....	173
Bibliografía Discusión General .....	184
V. CONCLUSIONES .....	193



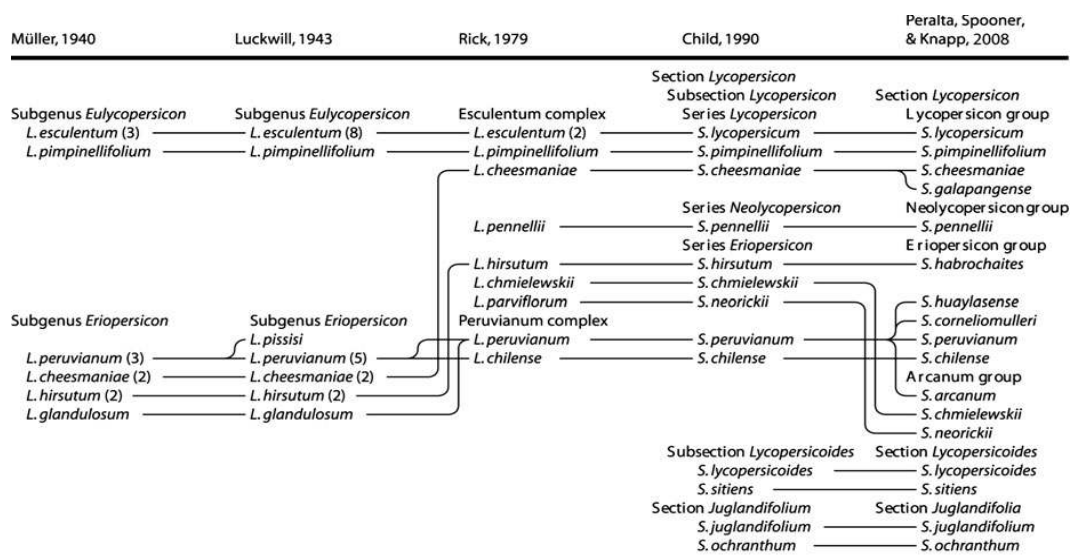
# **I. INTRODUCCIÓN**



## 1. Origen, domesticación y difusión del tomate

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.), cultivado en todo el mundo por su fruto comestible, pertenece a la familia de las Solanáceas (*Solanaceae*), que incluye más de 3.000 especies y que ocupan una gran variedad de hábitats (Knapp 2002). El centro de origen del género *Solanum*, al cual pertenece también la patata y la berenjena, es la región andina que hoy comparte Chile, Bolivia, Perú, Ecuador y Colombia (Esquinas-Alcázar y Nuez 1995).

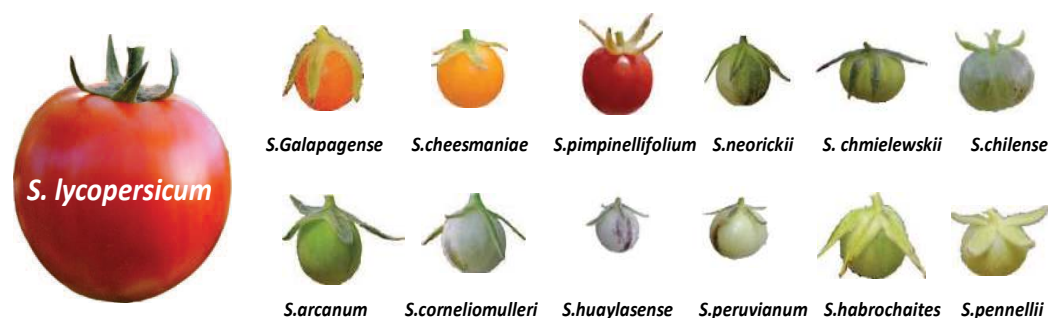
La taxonomía del tomate y especies silvestres relacionadas, ha sido motivo de controversia desde el siglo dieciocho. Clasificado por Miller (1754) como *Lycopersicon esculentum* Mill., el tomate cultivado fue renombrado por Child (1990) como *Solanum lycopersicum* L., nombre científico que se mantiene en la actualidad. Según Peralta *et al.* (2008) 13 especies o subspecies relacionadas componen el sector *Lycopersicon* (Mill.) Wettst. : el tomate cultivado *Solanum lycopersicum*, que incluye el tomate domesticado, la forma silvestre tomate cherry (*S. lycopersicum* L. var. *cerasiforme*) (Peralta *et al.* 2008), y las especies silvestres *Solanum arcanum* Peralta, *S. cheesmaniae* (L. Riley) Fosberg, *S. chilense* (Dunal) Reiche, *S. chmielewskii* (C.M. Rick, Kesicki, Fobes & M. Holle) D.M. Spooner, G.J. Anderson & R. K. Jansen, *S. corneliomulleri* J. F. Macbr, *S. galapagense* S. Darwin & Peralta, *S. habrochaites* S. Knapp & D.M. Spooner, *S. huaylasense* Peralta, *S. neorickii* D.M. Spooner, G.J. Anderson & R.K. Jansen, *S. pennellii* Correll, *S. peruvianum* L., y *S. pimpinellifolium* L. (Figura 1).



**Figura 1:** Diagrama cronológico de las hipótesis acerca de los límites y relaciones de las especies de *Solanum* sección *Lycopersicon*, *Lycopersicoides* y *Juglandifolia* según Müller (1940), Luckwill (1943),

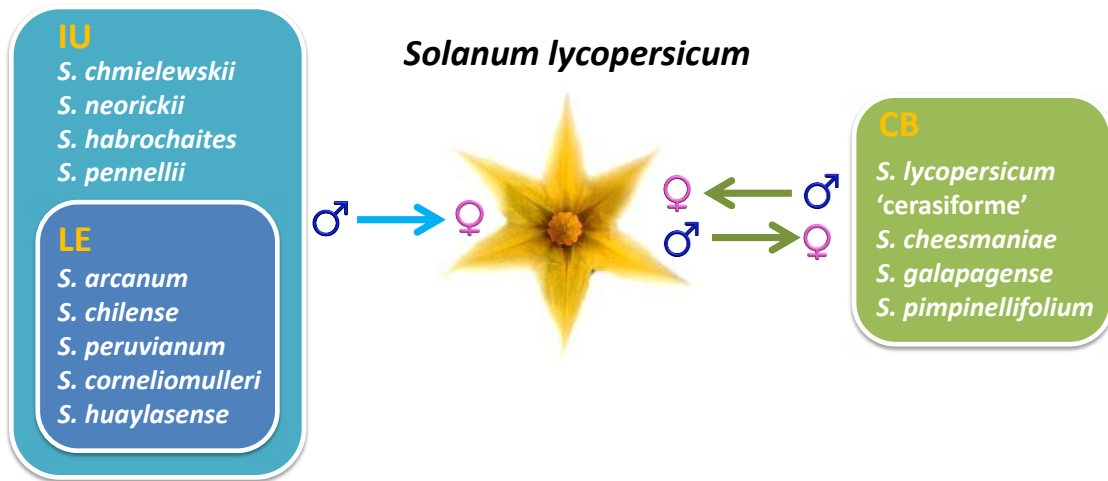
Rick (1979), Child (1990), y Peralta *et al.* (2008). Los números entre paréntesis representan el número de los taxones infraespecíficos reconocidos por estos autores. Figura original de Grandillo *et al.* 2011.

A partir del complejo de frutos verdes *S. peruvianum* sensu lato (s.l.) se han derivado cuatro especies (Figura 2); dos de ellas *S. arcanum* y *S. huaylasense* se han descrito como nuevas especies de Perú (Peralta *et al.* 2005), mientras que las otras dos *S. peruvianum* y *S. corneliomulleri* ya habían sido nombradas por Linnaeus (1753) y MacBride (1962), respectivamente. No obstante, existe una serie de formas intermedias entre ellas, constituyendo una situación compleja donde algunos especímenes son bastante difíciles de clasificar sólo con caracteres morfológicos, por lo que es necesario el uso de marcadores moleculares (Zuriaga *et al.* 2009). Por otra parte, *S. galapagense*, otra de las especies de fruto amarillo o anaranjado, segregó a partir de *S. cheesmaniae*; ambas especies son endémicas de las Islas Galápagos (Darwin *et al.* 2003; Knapp y Darwin 2007). Así mismo *S. hirsutum* ha cambiado su nomenclatura por la de *S. habrochaites* (Knapp y Spooner 1999).



**Figura 2:** Frutos de las 13 especies que componen el sector *Lycopersicon*. Foto original de Li y Chetelat (2010).

El tomate y las especies silvestres relacionadas son diploides ( $2n=24$ ) (Peralta y Spooner 2001; Nesbitt y Tanksley 2002), están caracterizadas por un elevado grado de sintenia genómica (Chetelat y Ji 2007; Stack *et al.* 2009) y son en cierto grado intercruzables (Díez y Nuez 2008). La cruzabilidad de las especies silvestres con el tomate cultivado queda reflejada en la Figura 3, pudiéndose encontrar casos de compatibilidad bilateral (CB), casos de incompatibilidad unilateral (IU) y casos de letalidad embrionaria (LE) (Grandillo *et al.* 2011).



**Figura 3:** Esquema de cruzabilidad de las especies silvestres con el tomate cultivado. Figura creada a partir de los datos de Grandillo *et al.* (2011). CB: Compatibilidad bilateral (no hay barreras de cruzabilidad en ningún sentido). IU: Incompatibilidad unilateral (cruces tienen éxito solo cuando el tomate cultivado es usado como parental femenino); LE: Letalidad embrionaria (puede ser superada en ocasiones por el rescate de embriones). Las flechas representan el sentido del polen en los cruces.

De entre todas las formas de tomate silvestre, el ancestro más probable del tomate cultivado es *S. pimpinellifolium* (Nesbitt y Tanksley 2002). Sin embargo, la hipótesis acerca de un origen a partir del tomate cherry silvestre (*Solanum lycopersicum* L. var. *cerasiforme*) ha cobrado fuerza con las investigaciones recientes basadas en marcadores SNP (Blanca *et al.* 2012).

La domesticación del tomate tuvo lugar en América central, probablemente, en México, centro de la cultura azteca (Esquinas-Alcázar y Nuez 1995). Aunque se han propuesto teorías que sugieren una domesticación independiente y paralela por parte de las culturas precolombinas que habitaban en las zonas que ahora ocupan México y Perú (Peralta y Spooner 2007), la mayoría de investigadores parecen coincidir con la primera de las hipótesis ya que el tomate era un fruto totalmente integrado en la cultura azteca en el siglo XVI. Las referencias históricas describen la presencia de los tomates en mercados mexicanos, e incluso se sabe que se utilizaban para la elaboración de platos típicos en algunas localidades: el misionero franciscano Bernardino de Sahagún dió fe a través de sus escritos del uso del tomate en el periodo 1548-1578 en México. Los textos editados se pueden encontrar en la cita Sahagún 1988.

No existen referencias concretas acerca de cuándo ocurrió la domesticación del tomate, pero los españoles a su llegada al Nuevo Mundo (Siglo XV) ya se encontraron

con un fruto que presentaba signos evidentes de domesticación: aumento del tamaño del fruto, la aparición de morfologías distintas, el aumento del tamaño de las semillas y la tendencia a favorecer la autogamia; lo cual indica que llevaba cultivándose con bastante anterioridad.

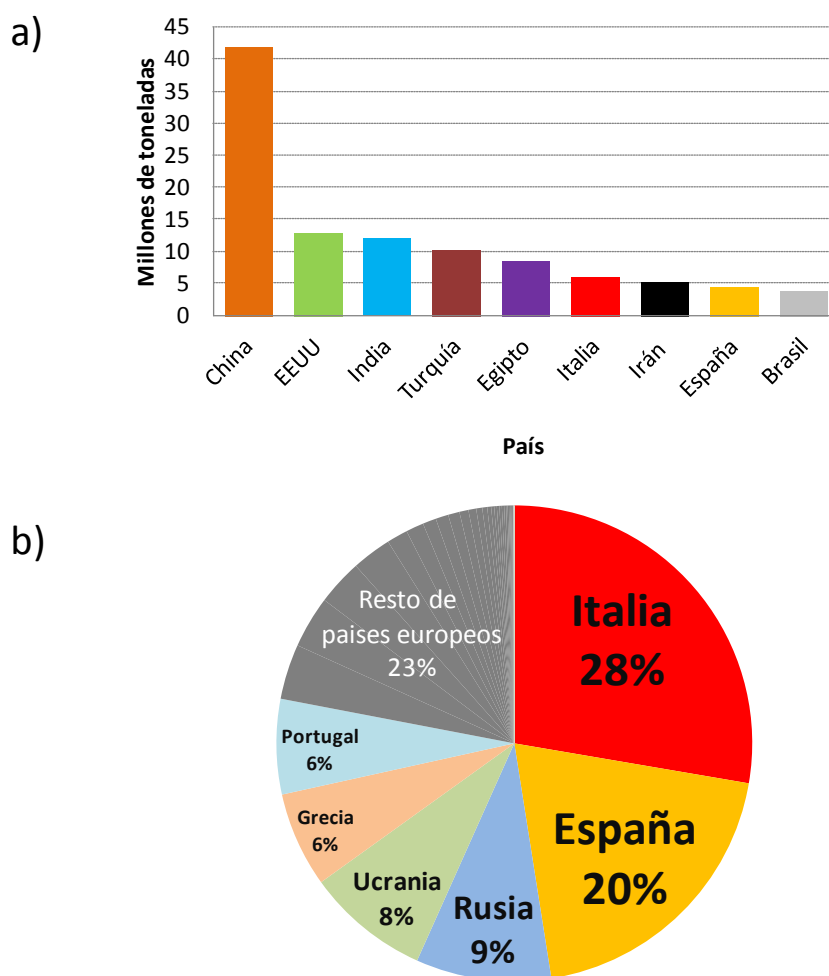
La introducción y difusión del tomate en Europa estuvo acompañada por la transdomesticación que provocó el desarrollo de diferentes tipos asociados a nuevos usos y sistemas de cultivo. Como resultado, un incremento en la producción y la calidad del fruto relativa a sus nuevos usos tuvo lugar en este periodo (Díez y Nuez 2008). El primer registro sobre la utilización del tomate en España data de 1608, aparece en la lista de compras del Hospital de La Sangre, edificio que se encuentra situado en la ciudad de Sevilla y que actualmente constituye la sede del Parlamento Andaluz (Hamilton 1976). Esto confirma que el tomate, para aquel entonces, ya se había convertido en un alimento habitual, al igual que en Italia conocido con el nombre de *pomo d'oro* (Matthioli 1544). Sin embargo la aceptación de este nuevo cultivo por las culturas del norte de Europa fue un proceso más lento, su poca adaptación al clima más frío y el cierto parecido a plantas venenosas de la misma familia como la mandrágora o la belladona, hacía que esta planta se cultivase simplemente con fines ornamentales o farmacéuticos (Esquinas-Alcázar y Nuez 1995).

Comerciantes españoles y portugueses difundieron el tomate por Oriente Medio, África y Filipinas; debido al imparable comercio marítimo en este país insular, el tomate llegó a países como China, Japón e India, que pudieron contribuir a su posterior difusión por todo el continente asiático. El establecimiento del cultivo del tomate en China con una verdadera importancia comercial, no tuvo lugar hasta finales del siglo XIX, principios del siglo XX (Esquinas-Alcázar y Nuez 1995). Por otra parte, la difusión del tomate por Norteamérica fue llevada a cabo por los colonos europeos (Esquinas-Alcázar y Nuez 1995). No hay evidencias que muestren una difusión desde México. Aun así, el tomate no tuvo importancia real en toda Norteamérica hasta finales del siglo XIX y principios del XX.



## 2. Importancia económica del tomate

En la actualidad el éxito de este cultivo es evidente. Tras una dudosa aceptación en su llegada a Europa, el tomate ha pasado a ocupar el primer puesto entre los cultivos hortícolas con una producción mundial que alcanzó en 2010 los 145 millones de toneladas. China es el mayor productor mundial seguido de EEUU, India, Turquía, y Egipto (Figura 4a); España situada en octavo lugar es, con un 20% de la producción europea, el segundo productor a nivel europeo (Figura 4b) (FAOSTAT 2010).



**Figura 4:** Producción de tomate. a) Ranking de los países productores en el mundo en millones de toneladas. b) Distribución del porcentaje de producción de tomate por país en Europa (datos FAOSTAT 2010).

En la actualidad, para cultivo intensivo de tomate se utilizan híbridos  $F_1$  de alto rendimiento y uniformidad, producidos por las empresas de semillas que en los últimos años han tenido claras dos premisas en el desarrollo de variedades mejoradas:

- La introgresión de un alto número de genes de resistencia a enfermedades a partir de los parientes silvestres, mediante el desarrollo de técnicas que permiten superar las barreras de cruzabilidad.
- La explotación de la heterosis con el desarrollo de híbridos que ha permitido aumentos importantes de la producción.

Por otra parte las variedades tradicionales se cultivan sólo en huertos familiares y, aún en ellos, los híbridos van ganando terreno día a día dada su capacidad de cuajar en condiciones de estrés, lo que mejora los rendimientos. No obstante la pérdida de calidad organoléptica de las variedades comerciales de tomate (Powell *et al.* 2012) ha provocado un cambio en la demanda actual del consumidor, que vuelve a exigir frutos con mayor calidad interna, lo que ha obligado a modificar esta tendencia previa que solo favorecía al sector comercial (Grasselly *et al.* 2000).

El tomate es un fruto de bajo poder energético y su valor nutritivo reside en sus sales minerales y vitaminas (Tabla 1). Aunque hay otras frutas y hortalizas con mayores contenidos vitamínicos, el alto consumo del tomate lo convierte en la principal fuente de vitaminas en muchos países (Cuartero 2001).

**Tabla 1:** Composición del tomate maduro en 100 g de materia seca y fresca. Original de (Cuartero 2001)

En 100 g de materia seca		En 100g de materia fresca	
Glucosa	22 g	Vitamina A ( $\beta$ caroteno)	<b>540-760</b> $\mu$ g
Fructosa	25 g	Vitamina B <sub>1</sub> (tiamina)	50-60 $\mu$ g
Sacarosa	1 g	Vitamina B <sub>2</sub> (riboflavina)	20-50 $\mu$ g
Proteínas	8 g	Vitamina B <sub>3</sub> (ác. pantoténico)	50-750 $\mu$ g
Pectinas	7 g	Vitamina B <sub>6</sub> (complejo)	80-110 $\mu$ g
Celulosa y hemicelulosa	10 g	Niacina	<b>500-700</b> $\mu$ g
Ácido cítrico	9 g	Ácido fólico	6-20 $\mu$ g
ácido Málico	4 g	Biotina	1-4 $\mu$ g
Sales minerales (K, Ca, Mg, P)	8 g	Vitamina C	15-23 $\mu$ g
Lípidos	2 g	Vitamina E ( $\alpha$ tocoferol)	<b>40-1200</b> $\mu$ g
Otros	4 g		

Pocos productos hortícolas permiten tal diversidad de usos como el tomate; se puede servir crudo, cocido, estofado, frito, encurtido, como una salsa o en combinación con otros alimentos. El tomate es la hortaliza que se dedica en mayor volumen a la transformación industrial en el mundo. Desde que a finales del siglo XX se puso a punto la técnica de la apertización y se inició la conservación de volúmenes importantes de

hortalizas, el tomate constituyó una de las bases fundamentales de la industria naciente. Aunque en un principio la transformación industrial estaba subordinada a los excedentes de la producción para el mercado en fresco, a partir de la década de los 50 el cultivo se independiza de la producción para fresco, estableciéndose en áreas distintas, con variedades distintas y con una tecnología de la producción totalmente diferente (Rodríguez 2001).

Mientras que el tomate se cultiva como anual en todo el mundo, sus parientes silvestres tienen una importancia económica menor. Entre ellos, los tomates cherry *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*, se consumen probablemente más que cualquier otra de las especies silvestres (Figura 5). Esta planta de frutos pequeños, común en las estribaciones de la región oriental de los Andes peruanos, puede encontrarse frecuentemente alrededor de campos de cultivo (Rick y Holle 1990; Peralta *et al.* 2008), y en la actualidad se han incorporado de forma potente al mercado internacional como adorno de platos (Díez y Nuez 2008) y para ensaladas. La baya silvestre de *S. pimpinellifolium* es popular en algunos huertos familiares y sus semillas pueden encontrarse en el mercado, pero no es un cultivo comercial importante. En la región nativa, los frutos se consumen de forma eventual recogidos a partir de las plantas silvestres que crecen entre la maleza.

El resto de parientes silvestres se consumen solo marginalmente y no en cantidades significativas. Existen informes sobre diversos usos medicinales de las hojas o frutos silvestres de tomates por parte de los pueblos indígenas en la región andina. Por ejemplo: *S. habrochaites* se utiliza para tratar enfermedades de la piel, mal de altura, y problemas de gases intestinales; *S. chilense*, para las dolencias del estómago; y *S. ochranthum*, como un purgante o como un sustituto de jabón (Grandillo *et al.* 2011).



**Figura 5:** a) *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* recolectado en el patio de una casa abandonada en las proximidades de la localidad de Coroico (Bolivia). b) Detalle del fruto: menor tamaño que el tomate cultivado, y color amarillento, conocido localmente como “tomate chulto amarillo”. Expedición de prospección y recolección del COMAV en Bolivia.

### 3. Mejora vegetal en el tomate

La mejora genética del tomate depende en gran medida de las especies silvestres relacionadas que son la fuente principal de variabilidad. Cuando se dispone de marcadores moleculares asociados a los genes de interés se facilita la transferencia a la especie cultivada. En los caracteres complejos (Cuantitativos) la identificación de QTLs (Quantitative Trait Loci) es importante para su manejo. Por otra parte, en los programas de mejora, las técnicas de cultivo *in vitro* son muy útiles. Sin embargo para poder utilizarlas es importante disponer de protocolos de regeneración ajustados a cada genotipo y el empleo de reguladores de crecimiento adecuados.

#### 3.1. Las especies silvestres como fuente de variabilidad

Los protocolos tradicionales de mejora genética vegetal, basados en la selección fenotípica y prueba de descendencia, han sido muy efectivos en la mejora de la productividad y calidad del cultivo durante las décadas pasadas (Duvick 1986; Duvick 1996; Warren 1998). La explotación de la heterosis (Georgiev 1991; Scott *et al.* 1998), y de la variabilidad extraespecífica, han dado lugar al desarrollo de las variedades actuales (Díez y Nuez 2008). Sin embargo, para afrontar los futuros retos de mejora, se necesita de diversidad genética ya que en tomate es escasa como consecuencia del sistema de reproducción autógama y los severos cuellos de botella genéticos que se han producido a lo largo de su domesticación.

Las especies silvestres son muy importantes en la mejora del tomate debido a que son fuentes potenciales para la mejora de muchas características agronómicas deseables, como la resistencia a plagas y enfermedades, tolerancia a estreses abióticos y calidad del fruto (Robertson y Labate 2007). Estas especies se han adaptado a una amplia variedad de condiciones ambientales y muestran una amplia gama de variabilidad morfológica, fisiológica, de sistema de apareamiento, y características bioquímicas. De entre todas las especies silvestres, las cuatro especies derivadas del complejo peruvianum: *S. arcanum*, *S. huaylasense*, *S. corneliomulleri* y *S. peruvianum*, representan una rica reserva de genes potencialmente valiosos para conferir resistencia a enfermedades, así como para mejorar otros caracteres agronómicamente importantes. Así, por ejemplo, en *S. peruvianum* se han identificado genes responsables de la resistencia a tres tipos de virus: Tomato Mosaic Virus (TMV), Tomato Spotted Wilt

Virus (TSWV), Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV) (Pereira-Carvalho *et al.* 2010). Por otra parte, *S. arcanum* se ha descrito como fuente de varias características beneficiosas para los tomates cultivados, tales como la tolerancia al frío, la resistencia a las enfermedades bacterianas y fúngicas (Chaerani *et al.* 2007), y resistencia a diferentes especies de *Meloidogyne* (Jablonska *et al.* 2007). En Grandillo (2011) podemos encontrar una revisión de los principales genes de resistencia detectados y mapeados en las especies silvestres de tomate.

A pesar del interés de las especies silvestres, no han sido totalmente explotadas en mejora debido a las barreras de hibridación (letalidad embrionaria) que existen entre estas especies y el tomate cultivado (Figura 2). En muchos cruces es necesario el rescate de embriones (Taylor 1986) y la regeneración de plantas a partir de estos o de los callos que se originan. Por otra parte, cuando se consigue la hibridación, la eliminación de la mayor parte de los genes indeseables de la especie silvestre y la selección de la característica deseada es un proceso largo, basado en la alternancia de cruces recurrentes con la especie cultivada y autofecundaciones. Así, la duración media de un proyecto de mejora para un cultivo hortícola, desde la hibridación, la selección de nuevas combinaciones genéticas tras una prueba en campo y la introducción en el mercado, es de entre diez y quince años (Foolad 2007).

En el proceso de selección de caracteres cuantitativos (QTLs: Quantitative Trait loci), algunos de los genes de interés de los donantes silvestres se pueden perder, lo que puede limitar el nivel de expresión del carácter en la descendencia. Además, las amplias diferencias fenotípicas existentes entre el parental cultivado y los parentales de tipo salvaje pueden dar lugar a confusión durante los procedimientos de evaluación y selección, lo que reduce la eficacia de selección fenotípica, por lo que es necesario el empleo de técnicas que ofrezcan una mayor resolución (Foolad 2007).

En los últimos años, la aplicación de diversas metodologías de genética molecular, así como el cultivo *in vitro* y la transformación genética, han proporcionado las herramientas necesarias para superar los problemas asociados a la utilización de variedades silvestres en la mejora del tomate cultivado: las barreras de incompatibilidad pre y postcigóticas, la dificultad en la eliminación del fondo silvestre y restablecimiento del fondo cultivado. Por ello, existe la posibilidad de dirigirse hacia nuevos objetivos técnicamente inalcanzables hasta no hace mucho y en algunos casos, reducir el tiempo necesario para la consecución de los objetivos de manera considerable (Díez y Nuez 2008).

### 3.2. Los marcadores moleculares

Desde principios de siglo XX (Sax 1923) los marcadores morfológicos se han utilizado como criterio indirecto de selección, pero la dominancia, las interacciones epistáticas, los efectos pleiotrópicos y las penetrancia o expresión incompleta, limitan la aplicación de los mismos en la mejora. En la década de 1970 y principios de 1980 se dio un gran salto con el desarrollo de marcadores isoenzimáticos (Tanksley y Orton 1983). Pero a pesar de sus grandes ventajas respecto a los marcadores morfológicos, los marcadores isoenzimáticos son muy pocos y muchas veces no son polimórficos entre genotipos estrechamente relacionados (Tanksley 1993a). Con la aparición de las técnicas modernas de la biología molecular surgieron diferentes métodos de detección de polimorfismo genético; toda secuencia genómica que presenta polimorfismo es susceptible de ser útil como marcador molecular de ADN. Así los marcadores moleculares basados en el ADN han supuesto toda una revolución en la mejora genética y en otros campos de investigación. En mejora vegetal pueden utilizarse con diversas finalidades como pueden ser: estimación de distancias genéticas entre genotipos y la selección de aquellos más útiles para generar híbridos, establecimiento de relaciones de parentesco, selección asistida de genes (Nuez y Carrillo 2000) o QTLs ligados a caracteres de interés (Ferreira y Prohens 2012), distinción de variedades y especies (Zuriaga *et al.* 2009). El número ilimitado de polimorfismo encontrado ha permitido explorar todo el genoma y cubrir los cromosomas con una alta densidad de marcadores moleculares (Foolad 2007).

Durante las últimas dos décadas se han desarrollado diferentes tipos de marcadores moleculares como los RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Botstein *et al.* 1980), RAPDs (Randomly Amplified Polymorphic DNA) (Williams *et al.* 1990), AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphism)(Vos *et al.* 1995), VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) (Jeffreys *et al.* 1985), SSR (Short Sequence Repeat) (Tautz 1989; He *et al.* 2003), CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) (Konieczny y Ausubel 1993), SCARs (Sequence characterized amplified regions) (Paran y Michelmore 1993), SSCPs (Single-strand conformation polymorphism) (Orita *et al.* 1989), ESTs (Expressed Sequence Tags) (Adams *et al.* 1991), COS (Conserved Ortholog Set) (Fulton *et al.* 2002), SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) e InDels (Inserciones y deleciones) (Landegren *et al.*1998). De entre las especies cultivadas, el tomate dispone de una gran cantidad de marcadores

moleculares. Pero al igual que en otras especies vegetales, la cantidad, variedad, y la disponibilidad de marcadores moleculares en tomate están en cambio continuo; la última cifra se puede encontrar en la web de solanáceas, Sol Genomics Network (SGN) (<http://solddb.cit.cornell.edu>).

De entre los marcadores basados en PCR, el uso de los SSR ha aumentado en tomate ya que estos marcadores son generalmente más fáciles, más baratos, más rápidos y menos costosos en comparación que los RFLP y AFLP (Fulton *et al.* 1999; Huang *et al.* 2000; Zhang y Stommel 2001; Frary *et al.* 2005). Además, la completa secuenciación del genoma de tomate, permite que el usuario de SGN pueda descargar las secuencias de las regiones de interés, detectar microsatélites, y diseñar cebadores específicos; una herramienta muy útil en cruces interespecíficos. Sin embargo, uno de los principales problemas en el desarrollo de marcadores en tomate es que la mayoría de los marcadores disponibles no permiten detectar el polimorfismo dentro de la especie cultivada o entre ésta y las especies estrechamente relacionadas como *S. pimpinellifolium* (Miller y Tanksley 1990; Foolad *et al.* 1993; Williams y Clair 1993; Saliba-Colombani *et al.* 2000; Ruiz *et al.* 2005). Esta resolución limitada restringe el uso de marcadores en muchos programas de mejora y estudios genéticos de tomate que tratan de explotar la variación genética intraespecífica o dentro de *S. pimpinellifolium* (Foolad 2007). Por lo tanto, los últimos esfuerzos importantes se han dedicado al descubrimiento de marcadores genéticos de alta resolución como son los SNPs e InDels (Suliman-Pollatschek *et al.* 2002; Yang *et al.* 2004; Labate y Baldo 2005), marcadores que permiten la detección de polimorfismo entre individuos estrechamente relacionados, dentro de la misma especie por ejemplo, entre variedades élite, entre variedades tradicionales o entre *S. lycopersicum* y especies estrechamente relacionadas (García-Gusano *et al.* 2004). Las nuevas técnicas de secuenciación, más económicas que sus antecesoras, han permitido asumir los costes a pequeñas instituciones o grupos de investigación, que gracias a las herramientas bioinformáticas pueden diseñar una batería de SNPs específicos para una población de estudio. Una revisión completa de las aplicaciones de los marcadores moleculares en la mejora vegetal se encuentra en Xu (2010). Para una revisión de marcadores moleculares en tomate, ver Grandillo *et al.* (2011).

### 3.2.1. Detección y análisis de QTLs

La gran mayoría de los caracteres complejos que se investigan en mejora son poligénicos. La detección y localización de caracteres poligénicos en el genoma ha de realizarse mediante un análisis de caracteres cuantitativos (Quantitative Trait Loci: QTL). Para el cual el mejorador debe disponer de: (1) una población segregante para el carácter en estudio, derivada de parentales que difieran en el mismo (población de mapeo), (2) un buen método de evaluación del carácter (fenotipado), (3) marcadores para la identificación de polimorfismo y genotipado, (4) programas para el análisis de ligamiento de los marcadores y construcción de un buen mapa de ligamiento, (5) programas estadísticos óptimos para análisis de QTLs.

Este procedimiento se detalla fase a fase a continuación:

#### *(1) Creación de una población de mapeo*

La construcción de un mapa de ligamiento requiere una población segregante de plantas (es decir, una población derivada de un cruce) donde los padres seleccionados para formar la población han de ser diferentes para uno o más rasgos de interés. Las poblaciones de mapeo más simples son las  $F_2$ , derivadas de autofecundación de híbridos  $F_1$ , y las poblaciones de retrocruzamientos (BC), derivadas del cruce entre el híbrido  $F_1$  y uno de los padres. Otras poblaciones de mapeo son las líneas recombinantes (RILs) y los doble haploides (DH). Las RILs consisten en una serie de líneas homocigóticas derivadas de sucesivas autofecundaciones de plantas  $F_2$ , en la que cada individuo tiene una combinación única de segmentos cromosómicos de los padres originales. Por otra parte, las poblaciones de doble haploides, la componen plantas que se obtienen tras la inducción de duplicación cromosómica en brotes regenerados a partir de tejidos haploides (Collard *et al.* 2005).

Las ventajas principales de las familias  $F_2$  y BC es que son fáciles de construir y requieren poco tiempo en su constitución, a diferencia de las poblaciones RILs que por lo general requieren de seis a ocho generaciones. Por otra parte, la elaboración de una población DH sólo es posible en especies que tienen un buen comportamiento para la regeneración a partir de tejidos haploides (Collard *et al.* 2005).



*(2) Fenotipado*

Para medir la variación fenotípica relacionada con un carácter poligenico, se recomienda el uso de diversos parámetros que expliquen la expresión del carácter (Bolibok y Rakoczy-Trojanowska 2006), lo que permite diseccionar el carácter y detectar regiones cromosómicas implicadas en las diferentes etapas de expresión del mismo (Murigneux *et al.* 1994; Ben Amer *et al.* 1997; Flores-Berrios *et al.* 2000; Manninen 2000; Schiantarelli *et al.* 2001).

*(3) Identificación de polimorfismo y genotipado*

Se seleccionan los marcadores para detectar polimorfismo en función de la disponibilidad y cercanía genética de los parentales. Actualmente los SNPs permiten detectar polimorfismo dentro de la especie cultivada así como entre ésta y los silvestres más cercanos. Otros marcadores moleculares como los SSR o CAPs que son más económicos, se pueden utilizar cuando hay una mínima distancia evolutiva entre los parentales seleccionados, como ocurre en cruces entre las especies silvestres y diferentes tipos cultivados de tomate. Una vez seleccionados los marcadores polimórficos se realiza el genotipado de la población/es de estudio.

*(4) Análisis de ligamiento de los marcadores. Construcción del mapa de ligamiento*

Tras el genotipado de la población utilizada, los marcadores se codifican para realizar el análisis de ligamiento utilizando programas informaticos; uno de los más utilizados es JoinMap<sup>®</sup> 4.0 software (Van Ooijen 2006). La distancia en un mapa de ligamiento se mide en términos de frecuencia de recombinación entre los marcadores genéticos (Paterson 1996). Las funciones de mapa permiten convertir fracciones de recombinación en centimorgans (cM), a partir de los cuales se dibujan los mapas de ligamiento. Finalmente programas como MapChart software (Voorrips 2002) permiten representar gráficamente los mapas.

(5) *Análisis de QTLs*

El análisis de QTLs permite detectar en una población segregante una asociación entre el genotipo y el fenotipo. Los marcadores moleculares permiten la división de la población de mapeo en diferentes grupos genotípicos, basados en la presencia o ausencia de un alelo y el análisis determina si existen diferencias significativas entre los grupos con respecto al rasgo fenotipado (Tanksley 1993b; Young 1996). Una diferencia significativa entre las medias fenotípicas de los grupos establecidos en base a un marcador, indica que éste está ligado a un QTL que controla el carácter, dado que cuanto más próximo está el marcador de un QTL, menor es la probabilidad de recombinación (Collard *et al.* 2005).

La detección de QTL es un proceso complejo que requiere de programas informáticos como MapQTL<sup>®</sup> 6.0 software (Van Ooijen 2009). En estos programas se pueden encontrar tres métodos ampliamente utilizados: single-marker analysis, simple interval mapping (SIM) y composite interval mapping (CIM) (Tanksley 1993b; Liu 1998). El SIM analiza simultáneamente los intervalos entre pares adyacentes de marcadores ligados a lo largo de los cromosomas, en lugar de analizar los marcadores individuales (single-marker analysis) (Lander y Botstein 1989). El uso de marcadores ligados para el análisis, compensa la recombinación entre los marcadores y el QTL, lo que se considera estadísticamente más potente que el análisis con un solo punto (single-marker analysis) (Lander y Botstein 1989; Liu 1998).

Cuando a través de SIM se detectan varios QTLs, es conveniente el uso de CIM (Zeng 1994; Jansen y Stam 1994) que consiste en intentar separar y aislar los efectos individuales de los QTL mediante la combinación de mapeo de intervalo y la regresión múltiple. De este modo se evita que la detección de varios QTLs no afecte a la potencia de detección de cada uno de ellos. Mediante el uso de marcadores íntimamente ligados a los QTL detectados (cofactores) podemos eliminar el ruido de fondo y ver los efectos de cada QTL por separado.

La detección de QTLs requiere determinar el umbral de significación. Para ello se realiza el test de permutación (Churchill y Doerge 1994), que consiste barajar los valores fenotípicos de la población mientras que el genotipado permanece constante, de este modo se rompe cualquier asociación real entre los marcadores y los QTLs. A continuación se realiza un análisis de QTL para evaluar el nivel de falsas asociaciones (Churchill y Doerge 1994; Haley y Andersson 1997; Hackett 2002;). Este proceso,

llamado test de permutación, se repite (500 o 1000 veces) y permite determinar los niveles de significación.

En términos generales, los QTL detectados se pueden describir como «mayores» o «menores» en base al porcentaje de variación fenotípica explicada: los QTLs «mayores» o principales, representan así más del 10% de la variación, valor por debajo del cual se consideran «menores» (Collard *et al.* 2005).

Hay muchos factores que influyen en la detección de QTLs en una población (Tanksley 1993b; Asins 2002), los principales son:

- Efecto de los QTLs que controlan un carácter: Sólo se detectarán aquellos QTLs con efectos fenotípicos lo suficientemente grandes; QTL con efectos pequeños pueden caer por debajo el umbral de significación. Así mismo los QTL que están ligados (aproximadamente 20 cM o menos) generalmente se detectan como uno solo en tamaños poblacionales bajos (<500) (Tanksley 1993b).
- Efectos ambientales: Pueden tener una profunda influencia sobre la expresión de los caracteres cuantitativos. La réplica del fenotipado permite investigar las influencias ambientales en QTLs responsables del carácter de interés (Paterson *et al.* 1991b; Price y Courtois 1999; Hittalmani *et al.* 2002; Jampatong *et al.* 2002; Lindhout 2002; George *et al.* 2003).
- Tamaño de la población de mapeo utilizada: Es el factor de diseño experimental más importante. Cuanto más grande sea la población, más preciso será el mapa y más probable es que permita la detección de QTL con efectos más pequeños (Tanksley 1993b; Haley y Andersson 1997). Un aumento de tamaño de la población permite una mejor estima de los efectos e intervalos de confianza de los QTL localizados (Beavis 1998; Darvasi *et al.* 1993).
- Error experimental: Las principales fuentes de error experimental son los errores en el análisis de marcadores genotipados y los errores en la evaluación fenotípica. Los errores de genotipado así como los datos vacíos afectan al orden y la distancia entre los marcadores dentro de mapas de ligamiento (Hackett 2002). Por otra parte la precisión de la evaluación fenotípica es de suma importancia para la exactitud en la detección de QTL. La réplica de fenotipado así como el uso de clones (a través de esquejes o plantas clonadas *in vitro*)

permite mejorar la precisión del mapeo de QTLs (Danesh *et al.* 1994; Haley y Andersson 1997).

La utilización de los marcadores moleculares en la construcción de mapas genéticos permite la determinación del número de genes o QTLs responsables de caracteres de interés, su efecto y localización cromosómica ( Tanksley 1993b). El estrecho ligamiento entre marcadores y loci, que en ocasiones puede llegar a ser total, permite por un lado su introgresión en fondos deseables mediante la selección asistida por marcadores (MAS) (Paterson *et al.* 1991a) complementaria a la selección fenotípica, y por otra parte el aislamiento de los loci mediante el paseo cromosómico o clonación posicional (Zhang *et al.* 1994).

En tomate se han realizado diversos estudios de mapeo de QTL relacionados con estreses abióticos y bióticos. Se han identificado múltiples QTLs, muchos de los cuales tienen un valor potencial para la mejora del tomate, aunque su base molecular está todavía por descifrar. El mapeo de QTLs en el tomate ha sido objeto de varias revisiones recientes como la de Grandillo *et al.* (2011).

### **3.3. Técnicas de cultivo *in vitro* y transformación genética.**

El cultivo *in vitro* de plantas ha dotado a la mejora genética vegetal de herramientas muy útiles. Así por ejemplo, la obtención de plantas haploides mediante el cultivo *in vitro* de anteras nos permite obtener líneas puras (por duplicación cromosómica) de una manera cuasi-directa disminuyendo de manera drástica el tiempo requerido para ello por la vía tradicional; también es una herramienta de interés para el estudio de mutaciones y para generar poblaciones para el mapeo de genes. Por otra parte, La transformación genética permite la introducción de genes de cualquier especie, sin arrastrar el fondo genético del parental del que proceden y es también una herramienta muy poderosa para el estudio de la función génica. El rescate de embriones y la hibridación somática (fusión de protoplastos), nos permiten superar ciertas barreras de incompatibilidad pudiendo aprovechar la variabilidad interespecífica que no es aprovechable por cruzamiento sexual. Todas estas herramientas tan importantes para la mejora vegetal ven limitada su aplicación si los explantes de partida no muestran una buena capacidad de regeneración. Los genotipos que tienen limitada esta capacidad se llaman recalcitrantes.

La explotación biotecnológica de ciertas especies de importancia económica se ve limitada por este motivo (Benson 2000). La recalcitrancia del cultivo de tejidos está influenciada principalmente por cuatro factores: el genotipo, el estado fisiológico de la planta donadora de tejidos, la fisiología asociada a estrés de la planta en cultivo *in vitro* y las manipulaciones realizadas *in vitro*. La mayor parte de esta recalcitrancia está determinada genéticamente y por lo tanto es difícil el control de la misma mediante una manipulación ambiental y nutricional del cultivo (McCown 2000). A pesar de ello, la manipulación u optimización de los factores del cultivo *per se*, puede ser una aproximación adecuada para superar los problemas (Hall 1999). Es importante considerar la elección del explante, los componentes del medio de cultivo y las condiciones ambientales de cultivo. El ajuste de las concentraciones de los reguladores de crecimiento para conseguir un equilibrio adecuado en la inducción es muy importante para evitar posibles cambios epigenéticos y genéticos, que comprometan el crecimiento y desarrollo normal, resultando en problemas de recalcitrancia e inestabilidad genética (Harding 1996). Por otra parte, la producción de etileno por parte de los explantes cultivados también podría promover efectos de interacciones inhibitorias entre hormonas endógenas y exógenas y ha sido relacionada con la recalcitrancia en algunos casos (Mohiuddin *et al.* 1997). No obstante, también se ha descrito que el etileno puede promover la regeneración *in vitro* (Dimasi-Theriou y Economou 1995).

En el caso particular del tomate, el genotipo es uno de los factores que más influye en la capacidad regenerativa, no habiéndose conseguido todavía protocolos de regeneración de plantas a partir de tejidos haploides. No obstante, y debido a la importancia de la técnica, se está trabajando para su consecución (Shtereva *et al.* 1998; Seguí-Simarro y Nuez 2005). El rescate de embriones y la hibridación de protoplastos en tomate no se han utilizado con mucha frecuencia, pero la capacidad regenerativa también es limitante (Chen y Adachi 1998). Sí se han obtenido plantas transgénicas de tomate con fines diversos como el retraso de la maduración y ablandamiento del fruto (Hamilton *et al.* 1991; Smith *et al.* 1998), resistencia a estreses de tipo abiótico (Gisbert *et al.* 2000; Cheng *et al.* 2009), resistencia a estreses de tipo biótico (Ultzen *et al.* 1995; Nervo *et al.* 2003; Thipyapong *et al.* 2006), etc... No obstante, esta técnica se ha utilizado en ciertos genotipos con elevada regeneración, de momento, no ha podido ser aplicada de manera rutinaria ya que en algunos cultivares interesantes la capacidad regenerativa es baja. Debido al valor comercial del cultivo y su susceptibilidad de futura

mejora (Evans 1989) se han realizado varios estudios de regeneración a partir de diferentes tejidos y órganos procedentes de variedades cultivadas de tomate y algunas especies silvestres relacionadas (Steinitz *et al.* 2006). Sin embargo, todavía existe mucho desconocimiento acerca de qué factores determinan que la regeneración se produzca por una vía morfogénica concreta y cuántos genes están implicados en la determinación de la capacidad de regeneración.

### **3.3.1 Regeneración de plantas a partir de explantes. La morfogénesis en tomate**

La morfogénesis se define como la capacidad para regenerar plantas a partir de una célula indiferenciada que es sometida a un estímulo y como consecuencia se reorganiza para desarrollar un meristemo (vía organogénica) o un embrión (vía embriogénica). Este proceso está muy influenciado por el genotipo y los reguladores de crecimiento que se añaden para estimular la regeneración. Es por ello que se han realizado diferentes estudios para analizar la variabilidad de este carácter y su herencia; y así poder transferir esta capacidad.

#### **3.3.1.1 Vías de regeneración**

*Vía organogénica:* Durante la organogénesis *in vitro*, las células y tejidos vegetales pasan por tres estados del desarrollo experimentalmente distinguibles definidos como “competencia morfogénica”, “determinación del desarrollo” y “diferenciación morfológica” (Christianson y Warnick 1983, 1984, 1985; Hicks 1994; Lakshmanan *et al.* 1997; Sugiyama 1999). Las células competentes son sensibles a la inducción y por tanto capaces de reconocer señales ambientales que alteren su estado del desarrollo. A continuación las células quedan determinadas y se dirigen a la diferenciación de órganos. El desarrollo correcto es el producto de una expresión genética estrictamente regulada lograda por la transducción de señales ambientales e internas como la luz, los nutrientes y principalmente los reguladores de crecimiento, detectadas por las células y difundidas por una comunicación eficiente célula a célula. Los reguladores de crecimiento como las auxinas y citoquininas, así como el etileno, juegan un papel clave en el cultivo *in vitro*, y su balance determina la respuesta morfogénica de los explantes. La activación de patrones específicos de expresión

génica, como consecuencia de la activación hormonal, puede dar cuenta del establecimiento de las diferentes fases del desarrollo en la organogénesis *in vitro*. La obtención de marcadores moleculares para cada estado permitirá ahondar en la mejor comprensión del proceso (Torelli *et al.* 2004ab).

*Vía embriogénica:* La embriogénesis somática es el proceso que permite obtener embriones a partir de tejidos vegetales somáticos, sin fusión de gametos. El proceso de inducción embrionaria es resultado de un delicado balance hormonal entre citoquininas y auxinas en el tejido vegetal. Es un proceso tan natural como la embriogénesis cigótica, con casos tan conocidos como el de los cítricos, en los que ambos tipos de embriogénesis ocurren casi simultáneamente en el interior de la semilla. Existen dos tipos de embriogénesis somática *in vitro*: directa e indirecta. La forma directa implica la existencia de células somáticas predeterminadas a seguir la vía embriogénica y las células del explante primario se desarrollan para formar embriones (ej. nucela de cítricos). La forma indirecta implica la necesidad de una inducción para que las células sigan la vía embriogénica, tras pasar por una fase proliferativa (callo) y cambiar su competencia a la expresión de embriogénesis. El proceso ocurre en dos etapas: En la primera fase células competentes aisladas en medios ricos en auxinas forman grupos de células embriogénicas (centros embriogénicos). En la siguiente fase, una vez repicados los centros embriogénicos a un medio sin auxinas, éstos proliferan de forma lenta e indiferenciada. Luego se producen una serie de rápidas y sucesivas divisiones celulares en distintas zonas del centro embriogénico, se conforman embriones globulares que se desarrollan hasta la maduración y germinan dando lugar a plantas completas (Ammirato 1983).

En tomate, el modo principal de regeneración es por la vía organogénica y ésta puede conseguirse directamente (Padmanabhan *et al.* 1974; Ohki *et al.* 1978; Behki y Lesley 1980; Zelcer *et al.* 1984; Tan *et al.* 1987; Garcia-Reina y Luque 1988; Dwivedi *et al.* 1990; Compton y Veilleux 1991) o indirectamente a través de una fase intermedia de callo que es originado por desdiferenciación de explantes foliares, radiculares, cotiledonares o de hipocotilo (Meredith 1979; Koornneef *et al.* 1987; Locky 1983; Geetha *et al.* 1998). La inducción de embriones somáticos en tomate se ha conseguido a partir de protoplastos (Chen y Adachi 1994), hipocotilos (Newman *et al.* 1996) y de plántulas intactas creciendo en un medio que contenía una elevada concentración de

citoquinina (Gill *et al.* 1995; Kaparakis y Anderson 2002). A pesar de la reconocida importancia y utilidad de la embriogénesis somática para micropropagar híbridos F<sub>1</sub> que son encapsulados en semillas sintéticas (Redenbaugh *et al.* 1987; Gill *et al.* 1995), todavía no existen protocolos eficientes de propagación a gran escala en tomate.

De los trabajos publicados puede concluirse que el éxito de la regeneración en tomate varía con los nutrientes del medio, la concentración y combinación de reguladores de crecimiento, los regímenes de luz y temperatura en la cámara de cultivo, el tipo de explante y en gran medida del genotipo (El-Farash 1993; Bhatia *et al.* 2004) por lo que la estandarización de condiciones para la regeneración de plantas *in vitro* sigue siendo un proceso empírico (Devi *et al.* 2008). Además, es bastante común la formación de regenerantes aberrantes ausentes de yema, defecto irreparable que detiene el desarrollo normal del tallo, bloquea el establecimiento de la planta y limita la capacidad regenerativa de la planta. El hecho de que estas estructuras, que no conducen a la formación de planta, tengan una mayor incidencia en *S. lycopersicum* que en otras especies de *Solanum*, donde es insignificante, parece indicar una componente genética en la aparición de las mismas (Steinitz *et al.* 2006).

### **3.3.1.2 La influencia del genotipo, transferencia de la capacidad organogénica y genética de la regeneración**

#### ***Variabilidad inter e intraespecífica***

Se han descrito diferencias genotípicas en la competencia organogénica entre genotipos de *S. lycopersicum* y especies relacionadas en condiciones de cultivo que incluían reguladores de crecimiento (Stommel y Sinden 1991; Koornneef *et al.* 1993; Peres *et al.* 2001; Faria *et al.* 2002; El-Bakry 2002; Pratta *et al.* 2003; Bhatia *et al.* 2004, 2005) y en medios en los que no se había adicionado reguladores de crecimiento (Pozueta-Romero *et al.* 2001; Steinitz *et al.* 2006). En general, se considera que muchos de los cultivares de tomate, tienen nula o escasa capacidad regenerativa (Frankenberger *et al.* 1981a, 1981b; Kurtz y Lineberger 1983; Lipucci Di Paolo *et al.* 1983; Davis *et al.* 1994; Plastira y Perdirakis 1997), mientras que las especies silvestres relacionadas como *S. peruvianum* (Koornneef 1987), *S. pennellii* (Gisbert *et al.* 1999), *S. chilense* (Takashina *et al.* 1998), *S. cheesmaniae* (Arrillaga *et al.* 2001) muestran mejores capacidades regenerativas, existiendo en todos los casos, diferencias dentro de cada especie. Así por



ejemplo, no todos los genotipos de *S. habrochaites* [anteriormente *L. hirsutum*] (Stommel y Sinden 1991) y *S. pimpinellifolium* (Tal *et al.* 1977; Pratta *et al.* 1997) muestran una elevada capacidad regenerativa.

Debido a las últimas revisiones taxonómicas, *S. peruvianum* (s.l.) derivó en cuatro especies: *S. arcanum*, *S. huaylasense*, *S. corneliomulleri* y *S. peruvianum* (s.s.). La capacidad organogénica en estas especies no ha sido analizada, y su estudio es de interés puesto que muestran características deseables para la mejora del tomate (sobre todo resistencia a factores bióticos). Las barreras de hibridación que existen entre estas especies y el tomate cultivado, dificultan su utilización en la mejora por métodos clásicos que implican cruzamiento por lo que es necesario en muchas ocasiones el rescate de embriones (Cap *et al.* 1991) o la fusión de protoplastos (Chen y Adachi 1998). Los materiales caracterizados y seleccionados en base a su potencial organogénico podrían ser de interés para aplicar estas técnicas.

### ***Transferencia de la capacidad organogénica.***

El problema de potenciar la capacidad de regeneración de las plantas recalcitrantes por control genético esta aún sin resolver (Takashina 1998). Las hibridaciones interespecíficas han supuesto una alternativa a la introducción de los alelos de regeneración en los cultivares comerciales recalcitrantes de tomate a partir de las especies silvestres relacionadas. Así por ejemplo, alelos de regeneración de *S. peruvianum* (Koorneef *et al.* 1987), *S. chilense* (Takashina *et al.* 1998) y *S. pimpinellifolium* (Faria y Illg 1996) se han transferido a tomate por cruces y retrocruces convencionales, y mediante fusión de protoplastos a partir de *S. peruvianum* (Wijbrandi *et al.* 1988). Otro ejemplo es la transferencia de la capacidad de regeneración a “Micro-Tom” (Pino *et al.* 2010), variedad que se utiliza comúnmente en experimentos de transformación como planta modelo por ocupar poco espacio y tener un ciclo reproductivo más corto.

### ***La genética de la regeneración***

En tomate se han realizado varios estudios para conocer la genética de la regeneración, observándose la heredabilidad del carácter (Frankenberger *et al.* 1981b; Koorneef *et al.* 1987) y la dominancia del mismo (Ohki *et al.* 1978; Kut y Evans 1982; Adams y Quiros 1985; Tan *et al.* 1987; Wijbrandi *et al.* 1988; Faria y Illg 1996). En estos

estudios se han utilizado distintas especies como fuentes de alelos que incrementarían la regeneración y distintos tipos de poblaciones para su estudio. En todos los trabajos se utilizan como parentales con alta capacidad de regeneración especies silvestres emparentadas con tomate, a excepción del trabajo de Marchionni *et al.* (2007) que utilizan un cultivar de tomate con alta capacidad de regeneración y una accesión de *S. pimpinellifolium* como receptor. Así pues se ha utilizado *S. peruvianum* (Koorneef *et al.* 1987, 1993), *S. chilense* (Takashina *et al.* 1998; Satoh *et al.* 2000) y *S. pimpinellifolium* (Faria y Illg 1996).

En cuanto al número de genes responsables de la capacidad de regeneración los resultados de estos trabajos apuntan a dos o más genes. Koorneef *et al.* (1993) concluyen que un alelo dominante *Rg-1* procedente de *S. peruvianum*, determina la alta capacidad regenerativa de explantes radiculares de tomate, en combinación con alelos dominantes en uno u otros dos loci. Por otra parte, Takashina *et al.* (1998) y Satoh *et al.* (2000) sugieren que dos o más loci contribuyen a la capacidad regenerativa de *S. chilense* mientras que Faria y Illg (1996) concluyen que en *S. pimpinellifolium* un carácter cualitativo de herencia dominante gobierna la capacidad regenerativa, sugiriendo un modelo digénico, con interacción de dos genes independientes dominantes. Por otra parte, Pratta *et al.* (2003) proponen que diferentes genes son responsables de la formación de callo, de la formación de yemas y de la formación de plantas.

La utilización de marcadores morfológicos y moleculares (RFLPs) ha permitido situar al alelo *Rg-1* en la mitad del cromosoma 3 (Koorneef *et al.* 1993). Próximo a esta zona se ha ubicado a un alelo de *S. chilense* que podría ser un alelo del mismo gen y por ello le han denominado *Rg-2* (Satoh *et al.* 2000). Un estudio realizado por Boiten *et al.* (2004) describe al alelo *Rg-1* como responsable de la competencia morfogenética, sin intervenir en la sensibilidad al tratamiento hormonal, ni la alteración de la homeostasis de citoquininas.

Otros estudios relacionados con la identificación de genes relacionados con la capacidad de regeneración son los de Torelli *et al.* (1996, 2004a, 2004b, 2006). Estos autores utilizaron la técnica del mRNA-Diferencial-Display y clonaron un c-DNA que es parte de un gen cuya expresión está potenciada específica y transitoriamente por la exposición a un tratamiento hormonal para inducir la organogénesis; a este gen, que no está mapeado, le han llamado LESK1 (*Lycopersicum Enhanced Shoot Kinase*).

Recientemente, Arikita *et al.* (2013) han localizado 6 regiones cromosómicas implicadas en la regeneración situadas en los cromosomas: 3, 6, 7, 8, 9,10; mediante el estudio de la regeneración a partir líneas de introgresión de *S. pennellii* en el fondo de tomate M82 (Eshed *et al.* 1992).

A pesar de que en la actualidad es posible estimar el número de loci implicados en la regeneración *in vitro* así como su posición en el genoma gracias al mapeo de QTL, no se han realizado estudios en tomate. La mayoría de los análisis de QTL para la respuesta de cultivo de tejidos se ha llevado a cabo en monocotiledóneas, en arroz (Taguchi-Shiobara *et al.* 1997), trigo (Ben Amer *et al.* 1997) y en el maíz (Murigneux *et al.* 1994). El número de QTL implicados en el cultivo *in vitro* de tejidos en estos casos van desde 1 a 8. Por otra parte, el porcentaje de la variación fenotípica explicada por un QTL varía desde el 2,7-65,4%, siendo lo más común valores comprendidos entre 6-26%.

El mapeo de QTL asociados a caracteres de cultivo *in vitro* en tomate es una tecnología que podría aportar mayor conocimiento sobre qué factores determinan capacidad de regeneración por la vía organogénica en tomate. La determinación de los marcadores moleculares ligados a un QTL responsable de la respuesta del cultivo de tejidos supondría una valiosa herramienta biotecnológica para mejorar la capacidad de regeneración (Bolibok y Rakoczy-Trojanowska 2006).

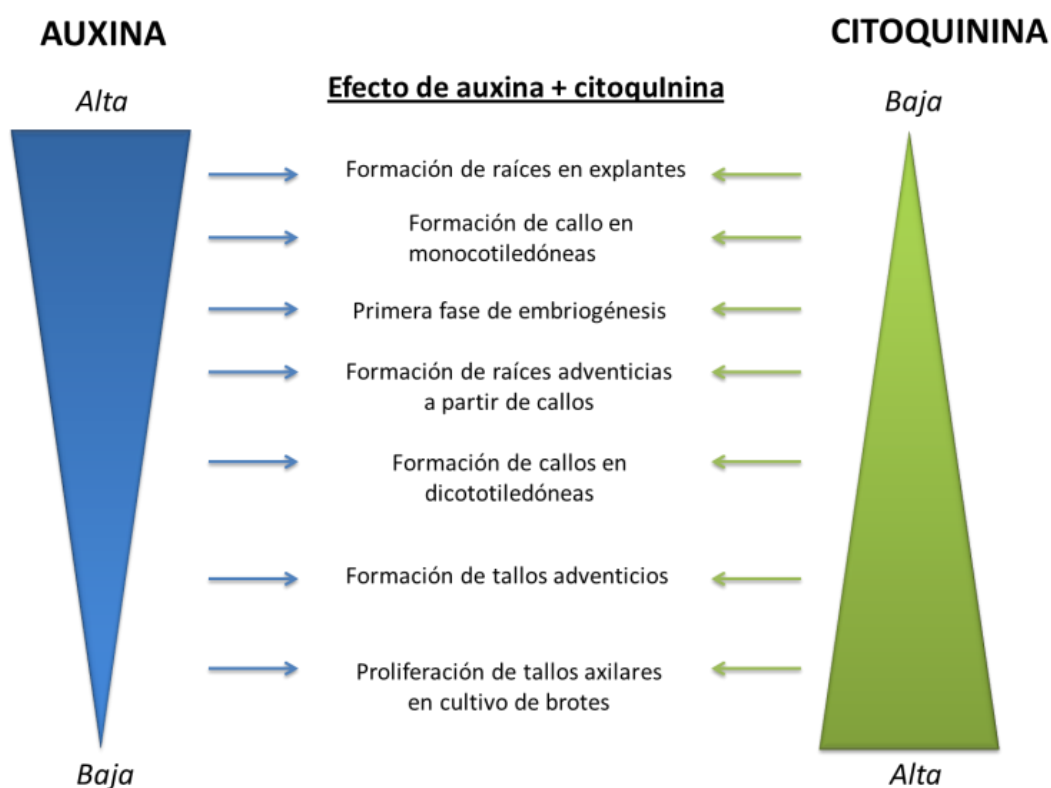
### **3.3.1.3 Los reguladores de crecimiento y su papel en la regeneración**

Las hormonas vegetales son productos químicos presentes de forma natural en los tejidos de la planta y que tienen un papel regulador en el crecimiento y desarrollo. Estos compuestos producidos endógenamente son generalmente muy activos a bajas concentraciones; no obstante, existen productos químicos sintéticos con actividades fisiológicas similares. Tanto las hormonas vegetales como los productos sintéticos se engloban en el término “reguladores de crecimiento”.

Hasta hace relativamente poco, sólo se reconocían cinco grupos de hormonas vegetales: auxinas, citoquininas, giberelinas, etileno y ácido abscísico. Pero en la última década ha quedado claro que son muchos más, tales como los brasinoesteroides, jasmonatos, poliaminas, ácido salicílico, oligosacarinas, sistemina, etc... (Moshkov *et*

al. 2008). Para una revisión detallada de los factores de crecimiento y hormonas utilizadas en cultivo *in vitro* ver Gaspar *et al.* (1996) y George *et al.* (2008).

De todas estas hormonas, las auxinas (Machakova *et al.* 2008) y citoquininas (Van Staden *et al.* 2008) son las hormonas más importantes en la morfogénesis *in vitro*, y sus análogos sintéticos descubiertos tienen una actividad biológica que les iguala o supera. En 1957, Skoog y Miller lograron obtener formación de brotes *in vitro* a partir de callos de tabaco aplicando en el medio de cultivo niveles relativamente bajos de auxina y altos de citoquinina. Desde este descubrimiento se ha determinado que la interacción entre concentraciones de citoquinina y auxina controlan muchos aspectos de la diferenciación celular y organogénesis *in vitro* de tejidos y órganos (Figura 6).



**Figura 6:** Concentraciones relativas de auxina y citoquinina que se requiere para las diferentes respuestas morfológicas. Figura adaptada de Van Staden *et al.* (2008).

### Principales auxinas y citoquininas que se utilizan *in vitro*.

En cultivo *in vitro*, las auxinas se utilizan principalmente para la diferenciación de raíces y la inducción de callo. Las auxinas más utilizadas son: ácido indol-3-butírico (IBA), ácido naftalenacético (NAA), ácido indolacético (IAA) y ácido 2,4-

diclorofenoxiacético (2,4-D). Todas estas se usan frecuentemente para enraizamiento mientras que el 2,4-D es muy efectivo en la inducción de callos (Machakova *et al.* 2008). Por otra parte, las citoquininas son utilizadas para promover la división celular y la inducción de yemas adventicias en callos y órganos (explantes). Las citoquininas más usadas son: 6-bencilaminopurina (6-BAP), kinetina (K), Zeatina (Z) y el Thidiazurón (TDZ) (Van Staden *et al.* 2008). De todos estos reguladores de crecimiento tan sólo IAA y Z son reguladores naturales, mientras que el resto se han sintetizado a lo largo de los últimos años y en muchas ocasiones resultan tener efectos mayores.

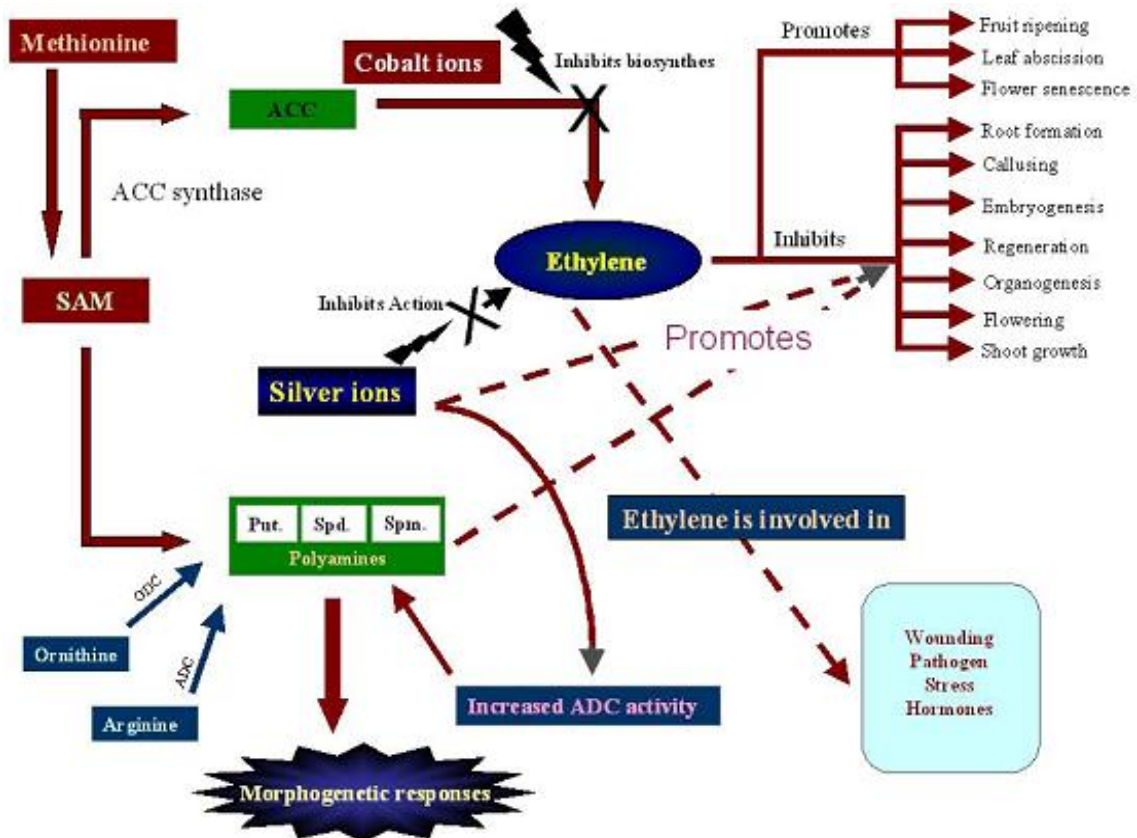
### **El papel del etileno en la morfogénesis**

El etileno ( $C_2H_4$ ) es el único hidrocarburo con efectos sobre las plantas. Su síntesis tiene lugar a partir de la metionina en respuesta a situaciones de estrés, en tejidos senescentes o en proceso de maduración. Al ser una hormona gaseosa su transporte es por difusión desde el lugar de su síntesis. Sin embargo el precursor de su biosíntesis, el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), se transporta por los sistemas conductores. Se han descrito una gran cantidad de efectos del etileno en las plantas: ruptura de la dormición, alteración del crecimiento y diferenciación de tallos y raíces, formación de raíces adventicias, abscisión de hojas y frutos, inducción de floración en algunas especies, inducción de feminidad en flores de plantas monoicas, apertura de flores, senescencia de flores y hojas, maduración de frutos climatéricos (Van Staden *et al.* 2008).

Además del papel de las auxinas y citoquininas en la morfogénesis *in vitro*, existen evidencias considerables acerca de la importancia del etileno en este proceso (Biddington 1992; Moshkov *et al.* 2008). El etileno se produce de forma endógena como consecuencia del aislamiento del explante *in vitro* (Kumar *et al.* 1998; Moshkov *et al.* 2008). Así mismo, la aplicación exógena de citoquinina y auxina estimulan la producción de etileno induciendo (revisado Tsuchisaka y Theologis 2004), o modificando (Vogel *et al.* 1998), enzimas específicas de su ruta biosintética.

El etileno se puede aplicar de forma exógena, pero al ser un gas, es difícil de administrar y controlar la concentración disponible, excepto en recipientes bien cerrados. Sin embargo, algunos productos químicos son capaces de liberar etileno; estos compuestos son asimilados por las plantas como moléculas intactas, que luego se descomponen para liberar de etileno en el tejido vegetal. Es el caso del "Ethephon"

(ácido 2-Cloroetil fosfónico) que se utiliza como un regulador de crecimiento en el cultivo de tejidos. Otra manera de aplicar etileno es mediante su precursor más inmediato el ACC (Kumar *et al.* 2009). Por otra parte, también hay algunos inhibidores muy específicos tanto de la biosíntesis del etileno ( $\text{Cl}_2\text{Co}$ ) como de su acción ( $\text{AgNO}_3$ ). El primer compuesto inhibe la acción de la enzima ACC oxidasa que convierte el ACC en etileno, y el segundo bloquea los receptores de etileno impidiendo o dificultando su unión (Figura 7).



**Figura 7:** La biosíntesis de etileno, influencias en diversos procesos fisiológicos y el efecto de los iones de cobalto y plata. El etileno está involucrado en muchos aspectos del ciclo de vida de las plantas, incluida la morfogénesis, la defensa, la floración, la expresión sexual, la embriogénesis, la germinación, desarrollo radicular, nodulación radicular, la senescencia floral, la abscisión, maduración de los frutos etc. (Kumar *et al.* 2009).

La manipulación de los niveles de etileno en diferentes sistemas *in vitro*, han mostrado que la hormona tiene el potencial tanto de inhibir como de mejorar la organogénesis, dependiendo de la especie, el genotipo, el tejido, el sistema de cultivo y la presencia de otros reguladores del crecimiento vegetal (Biddington 1992; Kumar *et al.* 1998; Moshkov *et al.* 2008). Las experiencias desarrolladas en tomate parecen indicar que el

etileno tiene un efecto negativo en la regeneración (Lima *et al.* 2009; Osman y Khalafalla 2010). No obstante, dada la escasez de trabajos publicados al respecto en tomate y las conclusiones tan dispares a las que se han llegado en otras especies no se puede hacer una afirmación definitiva del papel del etileno en el crecimiento y el desarrollo *in vitro*, por lo que es necesario investigar este aspecto con un material caracterizado fenotípica y genotípicamente.

#### 4. Bibliografía Introducción

Adams MD, Kelley JM, Gocayne JD, *et al.*: **Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project.** Science 1991, 252(5013): 1651-1656.

Adams TL, Quiros CF: **Somatic hybridization between *Lycopersicon peruvianum* and *L. pennellii*: regenerating ability and antibiotic resistance as selection systems.** Plant Sci 1985, 40: 209-219.

Ammirato PV: **Embryogenesis.** In *Handbook of Plant Cell Culture: Techniques for propagation and Breeding. Volume 1.* 1<sup>st</sup> edition. Edited by Evans DA, Sharp WR, Ammirato PV, Yamada Y. New York: Macmillan Publishing Compagny; 1983: 82-123.

Arikita FN, Azevedo MS, Scotton DC, Pinto MdS, Figueira A, Peres LEP: **Novel natural genetic variation controlling the competence to form adventitious roots and shoots from the tomato wild relative *Solanum pennellii*.** Plant Sci 2013, 199-200: 121-130.

Arrillaga I, Gisbert C, Sales E, Roig L, Moreno V: **In vitro plant regeneration and gene transfer on the wild tomato *Lycopersicon chesmanii*.** J Hortic Sci Biotech 2001, 76: 413-418.

Asins M: **Present and future of quantitative trait locus analysis in plant breeding.**

Plant Breeding 2002, 121: 281-291.

Beavis W: **QTL Analyses: Power, Precision and Accuracy.** *In Molecular Dissection*

*of Complex Traits.* Edited by Paterson AH. Boca Raton: CRC Press; 1998.

Behki RM, Lesley SM: **Shoot regeneration from leaf callus of *Lycopersicon***

*esculentum.* Z. Pflanzenphysiol 1980, 98: 83-87.

Ben Amer IM, Korzun V, Worland AJ, Börner A: **Genetic mapping of QTLs**

**controlling tissue-culture response on chromosome 2B of wheat (*Triticum aestivum* L.) in relation to major genes and RFLP markers.** Theor Appl

Genet 1997, 94: 1047-1052.

Benson EE: **Special symposium: In vitro plant recalcitrance: An introduction.** In

Vitro Cell Dev Biol Plant 2000, 36: 141-148.

Bhatia P, Ashwath N, Midmore DJ: **Effects of genotype, explant orientation, and**

**wounding on shoot regeneration in tomato.** In Vitro Cell Dev Biol-Plant 2005, 41: 457-464.

Bhatia P, Ashwath N, Senaratna T, David M: **Tissue culture studies of tomato**

**(*Lycopersicon esculentum*).** Plant Cell Tiss Org Cult 2004, 78: 1-21.

Biddington NL: **The Influence of ethylene in plant-tissue culture.** Plant Growth

Regul 1992, 11: 173-187.

Blanca J, Cañizares J, Cordero L, Pascual L, Diez MJ, Nuez F: **Variation Revealed by**

**SNP Genotyping and Morphology Provides Insight into the Origin of the Tomato.** PLoS ONE 2012, 7(10): e48198.

Boiten H, Azmi A, Dillen W, De Schepper S, Debergh P: **The *Rg-1* encoded**

**regeneration capacity of tomato is not related to an altered cytokinin homeostasis.** New Phytol 2004, 161: 761-771.



- Bolibok H, Rakoczy-Trojanowska M: **Genetic mapping of QTLs for tissue-culture response in plants.** *Euphytica* 2006, 149: 73-83.
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW: **Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms.** *Am J Hum Genet* 1980, 32(3): 314-331.
- Cap GB, Roberts PA, Thomason IJ, Murashige T: **Embryo Culture of *Lycopersicon esculentum* x *L. peruvianum* Hybrid Genotypes Possessing Heat-stable Resistance to *Meloidogyne incognita*.** *J Amer Soc Hort Sci* 1991, 116(6): 1082-1088.
- Chaerani R, Smulders MJ, van der Linden CG, Vosman B, Stam P, Voorrips RE: **QTL identification for early blight resistance (*Alternaria solani*) in a *Solanum lycopersicum* x *S. arcanum* cross.** *Theor Appl Genet* 2007, 114: 439-50.
- Chen LZ, Adachi T: **Plant regeneration via somatic embryogenesis from cotyledon protoplasts of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill).** *Breeding Sci* 1994, 44: 337-338.
- Cheng L, Zou Y, Ding S, Zhang J, Yu X, Cao J, Lu G: **Polyamine Accumulation in Transgenic Tomato Enhances the Tolerance to High Temperature Stress.** *J Integr Plant Biol* 2009, 51(5): 489-499.
- Chetelat RT, Ji Y: **Cytogenetics and evolution.** In *Genetic improvement of solanaceous crops: Tomato. Volume 2.* Edited by Razdan MK, Mattoo AK. Enfield: Science; 2007: 77-112.
- Child A: **A synopsis of *Solanum* subgenus *Potatoe* (G. Don) (D'Arcy) (*Tuberarium* (Dun.) Bitter (s.l.)).** *Feddes Repertorium* 1990, 101: 209-235.
- Christianson ML, Warnick DA: **Competence and determination in the process of in vitro shoot organogenesis.** *Dev Biol* 1983, 95: 288-293.

- Christianson ML, Warnick DA: **Phenocritical times in the process of in vitro shoot organogenesis.** Dev Biol 1984, 101: 382-390.
- Christianson ML, Warnick DA: **Temporal requirement for phytohormone balance in the control of organogenesis in vitro.** Dev Biol 1985, 112: 494-497.
- Churchill GA, Doerge RW: **Empirical threshold values for quantitative trait mapping.** Genetics 1994, 138: 963-971.
- Collard B, Jahufer M, Brouwer J, Pang E: **An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts.** Euphytica 2005, 142: 169-196.
- Compton ME, Veilleux RE: **Shoot, root and flower morphogenesis on tomato inflorescence explants.** Plant Cell Tiss Org Cult 1991, 24: 223-231.
- Cuartero J: **Tomate para consumo en fresco.** In *La Horticultura Española*. Coordinated by Nuez F, Llácer G (Coord.). Edited by SECH y Ediciones de Horticultura S.L; 2001: 233-237.
- Danesh D, Aarons S, McGill G, Young N: **Genetic dissection of oligogenic resistance to bacterial wilt in tomato.** Mol Plant–Microbe Interact 1994, 7: 464-471.
- Darvasi A, Weinreb A, Minke V, Weller JI, Soller M: **Detecting marker-QTL linkage and estimating QTL gene effect and map location using a saturated genetic map.** Genetics 1993, 134: 943-951.
- Darwin SC, Knapp S, Peralta IE: **Taxonomy of tomatoes in the Galapagos Islands: native and introduced species of *Solanum* section *Lycopersicon* (*Solanaceae*).** Syst Biodivers 2003, 12: 29-53.
- Davis DG, Breiland KA, Frear DS, Secor GA: **Callus initiation and regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum*) cultivars with different sensitivities to metribuzin.** Plant Growth Reg Soc Am Quart 1994, 22: 65-73.

- Devi R, Dhaliwal MS, Kaur A, Gosal SS: **Effect of growth regulators on in vitro morphogenic response of tomato.** Indian J Biotechnol 2008, 7: 526-530.
- Díez MJ, Nuez F: **Tomato.** In *Handbook of Plant Breeding; Vegetables II; Fabaceae, Liliaceae, Solanaceae, and Umbelliferae. Volume 2.* Edited by Nuez F, Prohens J. Springer; 2008.
- Dimasi-Theriou K, Economou AS: **Ethylene enhances shoot formation in cultures of the peach rootstock GF-677 (*Prunus persica* x *P. amygdalus*).** Plant Cell Rep 1995, 15: 87-90.
- Duvick DN: **Plant breeding: past achievements and expectations for the future.** Eco Bot 1986, 40(3): 289-297.
- Duvick DN: **Personal perspective plant breeding, an evolutionary concept.** Crop Sci 1996, 36(3): 539-548.
- Dwivedi K, Srivastava P, Verma HN, Chaturvedi HC: **Direct regeneration of shoots from leaf segments of tomato (*Lycopersicon esculentum*) cultured in vitro and production of plants.** Indian J Exp Biol 1990, 28: 32-35.
- El-Bakry AA: **Effect of genotype, growth regulators, carbon source, and pH on shoot induction and plant regeneration in tomato.** In Vitro Cell Dev Biol-Plant 2002, 38: 501-507.
- El-Farash EM, Abdalla HI, Taghian AS, Ahmad MH: **Genotype, explant age and explant type as effecting callus and shoot regeneration in tomato.** Assiut J Agric Sci 1993, 24: 3-14.
- Eshed Y, Abu-Abied M, Saranga Y, Zamir D: ***Lycopersicon esculentum* lines containing small overlapping introgressions from *L. pennellii*.** Theor Appl Genet 1992, 83: 1027-1034.

Esquinas-Alcázar J, Nuez F: **Situación taxonómica, domesticación y difusión.** In *El cultivo del tomate*. Edited by Nuez F. Madrid: Ediciones Mundi Prensa; 1995: 14-42.

FAOSTAT (2011). Base de datos estadísticos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.  
[Http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx](http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx)

Faria RT, Destro D, Bessalho JC, Illg RD: **Introgression of in vitro regeneration capability of *Lycopersicon pimpinellifolium* Mill. into recalcitrant tomato cultivars.** *Euphytica* 2002, 124: 59-63.

Faria RT, Illg RD: **Inheritance of in vitro plant regeneration ability in the tomato.** *Braz J Genet* 1996, 19: 113-116.

Ferreira JJ, Prohens J: **Utilización del etiquetado de genes/QTLs mediante marcadores moleculares para el desarrollo de programas de mejora genética en vegetales.** In *La genética de los caracteres cuantitativos en la mejora vegetal del siglo XXI*. Edited by Ferreira JJ, Ordás A, Perez de la Vega M. Sociedad Española de Genética, Sociedad Española de Ciencias Hortícolas; 2012: 245-272.

Flores Berrios E, Sarrafi A, Fabre F, Alibert G, Gentzbittel L: **Genotypic variation and chromosomal location of QTLs for somatic embryogenesis revealed by epidermal layers culture of recombinant inbred lines in the sunflower (*Helianthus annuus* L.).** *Theor Appl Genet* 2000, 101: 1307-1312.

Foolad MR: **Genome Mapping and Molecular Breeding of Tomato.** *Int J Plant Genomics* 2007. Article ID 64358.

Foolad MR, Jones RA, Rodriguez RL: **RAPD markers for constructing intraspecific tomato genetic maps.** *Plant Cell Rep* 1993, 12(5): 293-297.

- Frankenberger EA, Hasegawa PM, Tigchelaar EC: **Influence of environment and developmental state on the shoot-forming capacity of tomato genotypes.** Z. Pflanzenphysiol 1981a, 102: 221-232.
- Frankenberger EA, Hasegawa PM, Tigchelaar EC: **Diallel analysis of shoot-forming capacity among selected tomato genotypes.** Z. Pflanzenphysiol 1981b, 102: 233-242.
- Frary A, Xu Y, Liu J, Mitchell S, Tedeschi E, Tanksley SD: **Development of a set of PCR-based anchormarkers encompassing the tomato genome and evaluation of their usefulness for genetics and breeding experiments.** Theor Appl Genet 2005, 111(2): 291-312.
- Fulton TM, van der Hoeven R, Eannetta NT, Tanksley SD: **Identification, analysis, and utilization of conserved ortholog set markers for comparative genomics in higher plants.** The Plant Cell 2002, 14(7): 1457–1467.
- Fulton TM, Xu Y, Siew FL, Tanksley SD: **Efficiency of using CAPS as an alternative and potentially automatable mapping system.** Rep Tom Genet Coop 1999, 49: 15-17.
- García-Gusano M, García-Martínez S, Ruiz JJ: **Use of SNP markers to genotype commercial hybrids and Spanish local cultivars of tomato.** Tomato Genet Coop Rep 2004, 54: 12-15.
- García-Reina G, Luque A: **Analysis of the organogenetic potential of calli of three Canary Island *Lycopersicon esculentum* land races.** Plant Cell Tiss Org Cult (1988) 12: 279-283.
- Gaspar T, Kevers C, Penel C, Greppin H, Reid DM, Thorpe TA: **Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture.** In Vitro Cell Dev Biol Plant 1996, 32(4): 272-289.

- Geetha N, Venkatachalam P, Reddy PS, Rajaseger G: **In vitro plant regeneration from leaf callus cultures of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.)**. Adv Plant Sci 1998, 11: 253-257.
- George EF, Hall MA, Klerk G-JD (eds): **Plant Propagation by Tissue Culture. Volume 1**. 3rd edition. The Netherlands: Springer; 2008: 239–248.
- George MLC, Prasanna BM, Rathore RS, Setty TAS, Kasim F, Azrai M, Vasal S, Balla O, Hautea D, Canama A, Regalado E, Vargas M, Khairallah M, Jeffers D, Hoisington D: **Identification of QTLs conferring resistance to downy mildews of maize in Asia**. Theor Appl Genet 2003, 107: 544-551.
- Georgiev H: **Heterosis in tomato breeding**. In *Genetic improvement of tomato*. Edited by Kaloo G. Berlin, Heidelberg, New York: Springer; 1991: 83-98.
- Gill R, Malik KA, Sanago MHM, Saxena PK: **Somatic embryogenesis and plant regeneration from seedling cultures of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.)**. J Plant Physiol 1995, 147: 273-276.
- Gisbert C, Arrillaga I, Roig LA, Moreno V: **Acquisition of a collection of *Lycopersicon pennellii* (Corr. D’Arcy) transgenic plants with *uidA* and *nptII* marker genes**. J Horticult Sci Biotech 1999, 74(1): 105-109.
- Gisbert C, Rus AM, Bolarín MC, López-Coronado JM, Arrillaga I, Montesinos C, Caro M, Serrano R, Moreno V: **The yeast *HAL1* gene improves salt tolerance of transgenic tomato**. Plant Physiol 2000, 123: 393-402.
- Grandillo S, Chetelat R, *et al.*: ***Solanum* sect. *Lycopersicon* Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources**. Edited by Kole C. Berlin Heidelberg: Springer; 2011: 129-215.
- Grasselly D, Navez B, Letard M: **Tomate: Pour un produit de qualité**. Paris: CTIFL; 2000.

- Hackett C: **Statistical methods for QTL mapping in cereals.** *Plant Mol Biol* 2002, 48: 585-599.
- Haley C, Andersson L: **Linkage mapping of quantitative trait loci in plants and animals.** In *Genome mapping—A practical approach*. Edited by Dear P. New York: Oxford University Press; 1997: 49-71.
- Hall RD: **Methods in molecular biology-Plant cell culture protocols.** *Volume II.* Humana Press; 1999.
- Hamilton AJ, Bouzayen M, Grierson D: **Identification of a tomato gene for the ethylene-forming enzyme by expression in yeast.** *Proc Natl Acad Sci* 1991, 88: 7434-7437.
- Hamilton EE: **What the New World economy gave the Old.** In *First images of America: the impact of the New World on The Old. Volume 2.* Edited by Chiappelli F. Los Angeles: University of California Press; 1976: 853-884.
- Harding K: **Approaches to assess the genetic stability of plants recovered from in vitro culture.** In *In-vitro conservation of plant genetic resources*. Edited by Normah MN, Narimah MK, Clyde MM. Malaysia: University Kebangsaan; 1996: 135-168.
- He C, Poysa V, Yu K: **Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers and their use in determining relationships among *Lycopersicon esculentum* cultivars.** *Theor Appl Genet* 2003, 106(2): 363-373.
- Hicks GS: **Shoot induction and organogenesis in vitro: A developmental perspective.** *In Vitro Cell Dev Biol* 1994, 30: 10-15.
- Hittalmani S, Shashidhar HE, Bagali, Huang N, Sidhu JS, Singh VP, Khush GS: **Molecular mapping of quantitative trait loci for plant growth, yield and**

- yield related traits across three diverse locations in a doubled haploid rice population.** *Euphytica* 2002, 125: 207-214.
- Huang CC, Cui YY, Weng CR, Zabel P, Lindhout P: **Development of diagnostic PCR markers closely linked to the tomato powdery mildew resistance gene *Ol-1* on chromosome 6 of tomato.** *Theor Appl Genet* 2000, 101(5-6): 918-924.
- Jablonska B, Ammiraju JSS, Bhattarai K, Mantelin S, Martinez de Ilarduya O, Roberts PA, Kaloshian I: **The *Mi-9* Gene from *Solanum arcanum* Conferring Heat-Stable Resistance to Root-Knot Nematodes Is a Homolog of *Mi-1*.** *Plant Physiol* 2007, 143: 1044-1054.
- Jompatong C, McMullen M, Barry B, Darrah L, Byrne P, Kross H: **Quantitative trait loci for first- and second-generation European corn borer resistance derived from maize inbred Mo47.** *Crop Sci* 2002, 42: 584-593.
- Jansen R, Stam P: **High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping.** *Genetics* 1994, 136: 1447-1455.
- Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL: **Hypervariable ‘minisatellite’ regions in human DNA.** *Nature* 1985, 314(6006): 67-73.
- Kaparakis G, Alderson PG: **Influence of high concentrations of cytokinins on the production of somatic embryos by germinating seeds of tomato, aubergine and pepper.** *J Hort Sci Biotech* 2002, 77: 186-190.
- Knapp S: *Solanum section Geminata*. *FL Neotrop* 2002, 84: 1-405.
- Knapp S, Darwin SC: **Proposal to conserve the name *Solanum cheesmaniae* (L. Riley) Fosberg against *S. cheesmanii* Geras. (Solanaceae).** *Taxon* 2007, 55: 806-807.
- Knapp S, Spooner DM: **A new name for a common Ecuadorian and Peruvian wild tomato species.** *Novon* 1999, 9: 375-376.



- Konieczny A, Ausubel FM: **A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers.** Plant J 1993, 4(2): 403-410.
- Koornneef M, Bade J, Hanhart C, Horsman K, Schel J, Soppe W, Vekerk R, Zabel P: **Characterization and mapping of a gene controlling shoot regeneration in tomato.** Plant J 1993, 3: 131-141.
- Koornneef M, Hanhart CJ, Martinelli L: **A genetic analysis of cell culture traits in tomato.** Theor Appl Genet 1987, 74: 633-641.
- Kumar PP, Lakshmanan P, Thorpe TA: **Regulation of morphogenesis in plant tissue culture by ethylene.** In Vitro Cell Dev Biol Plant 1998, 34: 94-103.
- Kurtz SM, Lineberger RD: **Genotypic differences in morphogenetic capacity of cultured leaf explants of tomato.** J Am Soc Hortic Sci (1983) 108, 710-714.
- Kut SA, Evans DA: **Plant regeneration from cultured leaf explants of eight wild tomato species and two related *Solanum* species.** In Vitro Cell Dev Biol 1982, 8: 593-598.
- Labate JA, Baldo AM: **Tomato SNP discovery by EST mining and resequencing.** Mol Breeding 2005, 16(4): 343-349.
- Lakshmanan P, Ng SK, Loh CS, Gof CJ: **Auxin, cytokinin and ethylene differentially regulate specific developmental states associated with shoot bud morphogenesis in leaf tissues of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) cultured in vitro.** Plant Cell Physiol 1997, 38: 59-64.
- Landegren U, Nilsson M, Kwok PY: **Reading bits of genetic information: methods for single-nucleotide polymorphism analysis.** Genome Res 1998, 8(8): 769-776.

- Lander E, Botstein D: **Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps.** *Genetics* 1989, 121: 185-199.
- Li W, Chetelat RT: **A Pollen Factor Linking Inter- and Intraspecific Pollen Rejection in Tomato.** *Science* 2010, 330: 1827-1830.
- Lima JE, Benedito VA, Figueira A, Peres LEP: **Callus, shoot and hairy root formation in vitro as affected by the sensitivity to auxin and ethylene in tomato mutants.** *Plant Cell Rep* 2009, 28: 1169-1177.
- Lindhout P: **The perspectives of polygenic resistance in breeding for durable disease resistance.** *Euphytica* 2002, 124: 217-226.
- Linnaeus C: **Species plantarum.** 1<sup>st</sup> edition. Stockholm: L. Salvius; 1753.
- Lipucci Di Paolo M, Collina Greci F, Scala A: **Shoot forming ability of *Lycopersicon esculentum* Mill. varieties by in vitro cultured cotyledons.** *Acta Hortic* 1983, 131: 111-116.
- Liu B: **Statistical Genomics: Linkage, Mapping and QTL Analysis.** Boca Raton: CRC Press; 1998.
- Locky RD: **Callus formation and organogenesis by explants of six *Lycopersicon* species.** *Canadian Journal of Botany* 1983, 61: 1072-1079.
- Luckwill LC: **The genus *Lycopersicon*: an historical, biological, and taxonomical survey of the wild and cultivated tomatoes.** *Aberdeen Univ Stud* 1943, 120: 1-44.
- MacBride JF: ***Solanaceae*.** In *Flora of Peru*. Field Mus Nat Hist Bot Ser 1962, 13: 3-267.
- Machakova I, Zazimalova E, George EF: **Plant Growth Regulators I: Introduction; Auxins, their Analogues and Inhibitors.** In *Plant Propagation by Tissue*

- Culture. Volume 1.3<sup>rd</sup>* edition. Edited by George EF, Hall MA, Klerk G-JD. The Netherlands: Springer; 2008: 175-204.
- Manninen OM: **Associations between anther-culture response and molecular markers on chromosomes 2H, 3H and 4H of barley (*Hordeum vulgare* L.)**. Theor Appl Genet 2000, 100: 57-62.
- Marchionni BE, Pratta GR, Zorzoli R: **Genetic analysis of the in vitro culture response in tomato**. Plant Cell Tiss Org Cult 2007, 88: 233-239.
- Matthioli PA: **Di Pedacio Dioscoride Anazrbeo libri cinque della historia, et materia medicinale tordote in lingua volgare Italiana**. Venecia; 1544.
- McCown BH: **Recalcitrance of woody and herbaceous perennial plants: Dealing with genetic predeterminism**. In Vitro Cell Dev-Pl 2000, 36: 149-154.
- Meredith CP: **Shoot development in established callus cultures of the cultivated tomato *Lycopersicon esculentum* Mill**. Z. Pflanzenphysiol 1979, 95: 405-411.
- Miller JC, Tanksley SD: **RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon***. Theor Appl Genet 1990, 80(4): 437-448.
- Miller P: **The gardeners dictionary**. 4th edition. London: Abridged; 1754.
- Mohiuddin AKM, Chowdhury MKU, Abdullah ZC, Napis S: **Influence of silver nitrate (ethylene inhibitor) on cucumber in vitro shoot regeneration**. Plant Cell Tiss Org Cult 1997, 51: 75-78.
- Moshkov IE, Novikova GV, Hall MA, George EF: **Plant Growth Regulators III: Gibberellins, Ethylene, Abscisic Acid, their Analogues and Inhibitors; Miscellaneous Compounds**. In *Plant Propagation by Tissue Culture. Volume 1. 3<sup>rd</sup>* edition. Edited by George EF, Hall MA, Klerk G-JD. The Netherlands: Springer; 2008: 227-282.
- Müller CH: **A revision of the genus *Lycopersicon***. USDA Misc Publ 1940, 382: 1-28.

- Murigneux A, Bentollila S, Hardy T, Baud S, Guitton C, Jullien H, Ben Tahar S, Freyssinet G, Beckert M: **Genotypic variation of quantitative trait loci controlling in vitro androgenesis in maize.** *Genome* 1994, 37: 970-976.
- Nervo G, Cirillo C, Accotto GP, Vaira AM (2003): **Characterization of two tomato lines highly resistant to *Tomato spotted wilt virus* following transformation with the viral nucleoprotein gene.** *J Plant Pathol* 2003, 85: 139-144.
- Nesbitt TC, Tanksley SD: **Comparative sequencing in the genus *Lycopersicon*: implications for the evolution of fruit size in the domestication of cultivated tomatoes.** *Genetics* 2002, 162: 365-379.
- Newman PO, Krishnaraj S, Saxena PK: **Regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.): somatic embryogenesis and shoot organogenesis from hypocotyl explants induced with 6-benzyladenine.** *Int J Plant Sci* 1996, 157: 554-560.
- Nuez F, Carrillo JM (eds). **Los Marcadores Genéticos en la Mejora Vegetal.** Edited by Universidad Politécnica de Valencia; 2000.
- Ohki S, Bigot C, Mousseau J: **Analysis of shootforming capacity in vitro in two lines of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and their hybrids.** *Plant Cell Physiol* 1978, 19: 27-42.
- Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T: **Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms.** *Proc Natl Acad Sci* 1989, 86(8): 2766-2770.
- Osman MG, Khalafalla MM: **Promotion of in vitro shoot formation from shoot tip of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Omdurman) by ethylene inhibitors.** *Int J Curr Res* 2010, 4: 82-86.

- Padmanabhan V, Paddock EF, Sharp WR: **Plantlet formation from in vitro from *Lycopersicon esculentum* leaf callus.** Canadian J Bot 1974, 52: 1429-1432.
- Paran I, Michelmore RW: **Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce.** Theor Appl Genet 1993, 85(8): 985-993.
- Paterson AH, Tanksley SD, Sorrells ME: **DNA markers in plant improvement.** Adv Agron 1991a, 46: 39-90.
- Paterson AH, Damon S, Hewitt JD, Zamir D, Rabinowitch HD, Lincoln SE, Lander ES, Tanksley SD: **Mendelian factors underlying quantitative traits in tomato comparison across species generations and environments.** Genetics 1991b, 127: 181-198.
- Paterson AH. **Making genetic maps.** In *Genome Mapping in Plants*. Edited by Paterson AH. San Diego: R.G. Landes Company; Austin: Academic Press; 1996: 23-39.
- Peralta IE, Spooner DM: **History, origin and early cultivation of tomato (*Solanaceae*).** In *Genetic improvement of Solanaceous crops. Volume 2: Tomato*. Edited by Razdan MK, Mattoo AK. Enfield: Science; 2007: 1-27.
- Peralta IE, Spooner DM: **Granule-bound starch synthase (GBSSI) gene phylogeny of wild tomatoes (*Solanum* L. section *Lycopersicon* [MILL.] Wettst. Subsection *Lycopersicon*).** Am J Bot 2001, 88(10): 1888-1902.
- Peralta IE, Knapp S, Spooner DM: **New species of wild tomatoes (*Solanum* section *Lycopersicon*: *Solanaceae*) from Northern Peru.** Syst Bot 2005, 30(2): 424-434.
- Peralta IE, Spooner DM, Knapp S: **Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (*Solanum* sections *Lycopersicoides*, *Juglandifolia*, *Lycopersicon*; *Solanaceae*).** Syst Bot Monogr 2008, 84: 1-186.

- Pereira-Carvalho RC, Boiteux LS, Fonseca MEN, Díaz-Pendón JA, Moriones E, Fernández-Muñoz R, Charchar JM, Resende RO: **Multiple Resistance to *Meloidogyne* spp. and to Bipartite and Monopartite *Begomovirus* spp. in Wild *Solanum (Lycopersicon)* Accessions.** Plant Dis 2010, 94(2): 179-185.
- Peres LEP, Morgante PG, Vecchi C, Kraus JE, Sluys MAV: **Shoot regeneration capacity from roots and transgenic hairy roots of tomato cultivars and wild related species.** Plant Cell Tiss Organ Cult 2001, 65: 37-44.
- Pino LE, Lombardi-Crestana S, Azevedo MS, Scotton DC, Borgo L, Quecini V, Figueira A, Peres LEP: **The *Rg1* allele as a valuable tool for genetic transformation of the tomato Micro-Tom model system.** Plant Methods 2010, 6: 23.
- Plastira VA, Perdikaris A: **Effect of genotype and explant type in regeneration frequency of tomato in vitro.** Acta Hort 1997, 447: 231-234.
- Powell ALT, Nguyen CV, *et al.*: **Uniform ripening encodes a Golden2-like transcription factor regulating tomato fruit chloroplast development.** Science 2012, 336: 1711-1715.
- Pozueta-Romero J, Houlné G, Cañas L, Schantz R, Chamarro J: **Enhanced regeneration of tomato and pepper seedling explants for *Agrobacterium*-mediated transformation.** Plant Cell Tiss Org 2001, 67: 173-180.
- Pratta G, Cánepa LN, Zorzoli R, Picardi LA: **Diallel analysis of in vitro culture traits in the genus *Lycopersicon*.** HortScience 2003, 38: 110-112.
- Pratta G, Zorzoli R, Picardi LA: **Intra and interspecific variability of in vitro culture response in *Lycopersicon* tomatoes.** Braz J Genet 1997, 20: 75-78.

- Price A, Courtois B: **Mapping QTLs associated with drought resistance in rice: Progress, problems and prospects.** *Plant Growth Reg* 1999, 29: 123-133.
- Redenbaugh K, Viss P, Slade D, Fujii J: **Encapsulation of somatic seed coats.** *HortScience* 1987, 22(5): 803-809.
- Rick CM: **Biosystematic studies in *Lycopersicon* and closely related species of *Solanum*.** In *The biology and taxonomy of Solanaceae*. Edited by Hawkes JG, Lester RN, Skelding AD. New York: Linn Soc Symp Ser 7, Academic; 1979: 667-677.
- Rick CM, Holle M: **Andean *Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*: genetic variation and its evolutionary significance.** *Econ Bot* 1990, 44: 69-78.
- Robertson LD, Labate JA: **Genetic resources of tomato (*Lycopersicon esculentum* var. *esculentum*) and wild relatives.** In *Genetic improvement of Solanaceous crops. Volume 2: Tomato*. Edited by Razdan MK, Mattoo AK. Enfield: Science; 2007: 25-75.
- Rodríguez A. **Tomate para industria.** In *La Horticultura Española*. Edited by Nuez F, Llácer G. Ed. SECH y Ediciones de Horticultura, S.L; 2001: 238-242.
- Ruiz JJ, García-Martínez S, Picó B, Gao M, Quiros CF: **Genetic variability and relationship of closely related Spanish traditional cultivars of tomato as detected by SRAP and SSR markers.** *J Amer Soc Hort Sci* 2005, 130(1): 88-94.
- Sahagún B de. **Historia General de las Cosas de Nueva España. Volume 2.** Madrid: Alianza Editorial; 1988(1548-1578).
- Saliba-Colombani V, Causse M, Gervais L, Philouze J: **Efficiency of RFLP, RAPD, and AFLP markers for the construction of an intraspecific map of the tomato genome.** *Genome* 2000, 43(1): 29-40.

- Satoh H, Takashina T, Escalante A, Egashira H, Imanishi S: **Molecular markers mapped around the high shoot regeneration capacity gene *Rg-2* in *Lycopersicon chilense***. *Breed Sci* 2000, 50(4): 251-256.
- Sax K: **The association of size differences with seed coat pattern and pigmentation in *Phaesolus vulgaris***. *Genet* 1923, 8: 552-560.
- Schiantarelli E, De la Peña A, Candela M: **Use of recombinant inbred lines (RILs) to identify, locate and map major genes and quantitative trait loci involved with in vitro regeneration ability in *Arabidopsis thaliana***. *Theor Appl Genet* 2001, 102: 335-341.
- Scott JW, Angell FF: **Tomato**. In *Hybrid Cultivar Development*. Edited by Banga SS, Banga SK. Verlag: Springer; 1998: 451-475.
- Seguí-Simarro JM, Nuez F: **Meiotic metaphase I to telophase II as the most responsive stage during microspore development for callus induction in tomato (*Solanum lycopersicum*)**. *Acta Phys Plant* 2005, 27(4): 675-685.
- Shtereva L, Zagorska N, Dimitrov B, Kruleva M, Oanh H: **Induced androgenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) II: Factors affecting induction of androgenesis**. *Plant Cell Rep* 1998, 18: 312-317.
- Skoog F, Miller CO: **Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures in vitro**. *Symp Soc Exp Biol* 1957, 11: 118-131.
- Smith DL, Starrett DA, Gross KC: **A gene coding for tomato fruit  $\beta$ -galactosidase II is expressed during fruit ripening**. *Plant Physiol* 1998, 117: 417-423.
- Stack SM, Covey PA, Anderson LK, Bedinger PA: **Cytogenetic characterization of species hybrids in the tomato clade**. *Tomato Genet Coop Rep* 2009, 59: 57-61.



- Steinitz B, Amitay A, Gaba V, Tabib Y, Keller M, Levin I: **A simple plant regeneration-ability assay in a range of *Lycopersicon* species.** Plant Cell Tiss Org Cult 2006, 84: 269-278.
- Stommel JR, Sinden SL: **Genotypic differences in shootforming capacity of cultured leaf explants of *Lycopersicon hirsutum*.** HortSci 1991, 26: 1317-1320.
- Suliman-Pollatschek S, Kashkush K, Shats H, Hillel J, Lavi U: **Generation and mapping of AFLP, SSRs and SNPs in *Lycopersicon esculentum*.** Cell Mol Biol Lett 2002, 7(2A): 583-597.
- Sugiyama M: **Organogenesis in vitro.** Curr Opin Plant Biol 1999, 2: 61-64.
- Taguchi-Shiobara F, Lin SY, Tanno K, Komatsuda T, Yano M, Sasaki T, Oka S: **Mapping quantitative trait loci associated with regeneration ability of seed callus in rice. *Oryza sativa* L.** Theor Appl Genet 1997, 95: 828-833.
- Takashina T, Suzuki T, Egashira H, Imanishi S: **New molecular markers linked with the high shoot regeneration capacity of the wild tomato species *Lycopersicon chilense*.** Breed Sci 1998, 48: 109-113.
- Tal M, Dehan K, Heiken H: **Morphogenetic potential of cultured leaf sections of cultivated and wild species of tomato.** Ann Bot 1977, 41: 937-941.
- Tan MMC, Colijn-Hooymans CM, Lindhout WH, Kool AJ: **A comparison of shoot regeneration from protoplasts and leaf discs of different genotypes of the cultivated tomato.** Theor Appl Genet 1987, 75: 105-108.
- Tanksley SD: **Mapping polygenes.** Annu Rev Genet 1993a, 27: 205-233.
- Tanksley SD: **Linkage map of the tomato (*Lycopersicon esculentum*) (2N = 24).** In *Genetic Maps: Locus Maps of Complex Genomes*. Edited by O'Brian SJ. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1993b: 6.3-6.15.

- Tanksley SD, Orton TJ: **Isozymes in Plant Genetics and Breeding**. Amsterdam: Elsevier; 1983.
- Tautz D: **Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers**. Nucl Acids Res 1989, 17(16): 6463-6471.
- Taylor IB: **Biosystematics of the tomato**. In *The tomato crop: a scientific basis for improvement*. Edited by Atherton JG, Rudich J. London: Chapman and Hall; 1986: 1-34.
- Thipyapong P, Mahanil S, Bhonwong A, Attajarusit J, Stout MJ, Steffens JC: **Increasing resistance of tomato to Lepidopteran insects by overexpression of polyphenol oxidase**. Proceedings of the Ninth International Symposium on the Processing Tomato. Acta Horticulturae 2006, 724: 29-38.
- Torelli A, Borinato M, Francia S, Carra A, Ricci A, Branca C: **Adeninic and ureidic cytokinins: Primary response events in in vitro tomato caulogenesis**. Plant Sci 2006, 171: 60-73.
- Torelli A, Soragni E, Borinato M, Branca C: **The expression of LESK1 morphogenetic marker along the tomato hypocotyl axis is linked to a position-dependent competence for shoot regeneration**. Plant Sci 2004a, 166 1: 179-190.
- Torelli A, Borinato M, Soragni E, Bolpagni R, Bottura C, Branca C: **The delay in hormonal treatment modulates the expression of LESK1, a gene encoding a putative serine-threonine kinase, marker of in vitro caulogenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.)**. Plant Sci 2004b, 167(3): 607-620.
- Torelli A, Soragni E, Bolchi A, Petrucco S: **New potential markers of in vitro tomato morphogenesis identified by mRNA differential display**. Plant Mol Biol 1996, 32: 891-900.

- Tsuchisaka A, Theologis A: **Heterodimeric interactions among the 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase polypeptides encoded by the Arabidopsis gene family.** Proc Natl Acad Sci USA 2004, 101: 2275-2280.
- Ultzen T, Gielen J, Venema F, Westerbroek A, De Haan P, Tan M-L: **Resistance to tomato spotted wilt virus in transgenic tomato hybrids.** Euphytica 1995, 85: 159-168.
- Van Ooijen JW: **JoinMap® 4, Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations.** Wageningen, Netherlands: Kyazma BV; 2006.
- Van Ooijen JW: **MapQTL® 6, Software for the mapping of quantitative trait loci in experimental populations of diploid species.** Wageningen, Netherlands: Kyazma BV; 2009.
- Van Staden J, Zazimalova E, George EF: **Plant Growth Regulators II: Cytokinins, their Analogues and Antagonists.** In *Plant Propagation by Tissue Culture. Volume 1.3<sup>rd</sup>* edition. Edited by George EF, Hall MA, Klerk G-JD. The Netherlands: Springer; 2008: 175-204.
- Vogel JP, Woeste KE, Theologis A, Kieber JJ: **Recessive and dominant mutations in the ethylene biosynthetic gene ACS5 of Arabidopsis confer cytokinin insensitivity and ethylene overproduction, respectively.** Proc Natl Acad Sci USA 1998, 95: 4766-4771.
- Voorrips RE: **MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs.** J Hered 2002, 93(1): 77-78.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, *et al.*: **AFLP: a new technique for DNA fingerprinting.** Nucleic Acids Res 1995, 23(21): 4407-4414.

- Warren GF: **Spectacular increases in crop yields in the United States in the twentieth century.** Weed Tech 1998, 12(4): 752-760.
- Wijbrandi J, Vos JGM, Koornneef M: **Transfer of regeneration capacity from *Lycopersicon peruvianum* to *L. esculentum* by protoplast fusion.** Plant Cell Tiss Org Cult 1988, 12: 193-196.
- Williams CE, St. Clair DA: **Phenetic relationships and levels of variability detected by restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA analysis of cultivated and wild accessions of *Lycopersicon esculentum*.** Genome 1993, 36(3): 619-630.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV: **DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers.** Nucleic Acids Res 1990, 18(22): 6531-6535.
- Xu Y: **Molecular Plant Breeding.** UK: CAB International; 2010.
- Yang W, Bai X, Kabelka E, *et al.*: **Discovery of singly nucleotide polymorphisms in *Lycopersicon esculentum* by computer aided analysis of expressed sequence tags.** Mol Breeding 2004, 14(1): 21-34.
- Young ND: **Constructing a plant genetic linkage map with DNA markers.** In *DNA-based markers in plants*. Edited by Ronald IKV, Phillips L. Dordrecht/Boston/London: Kluwer; 1994: 39-57.
- Young ND: **QTL mapping and quantitative disease resistance in plants.** Annu Rev Phytopathol 1996; 34: 479-501.
- Zelcer A, Soferman O, Izhar S: **An in vitro screening for tomato genotypes exhibiting efficient shoot regeneration.** J Plant Physiol 1984, 115:211-215.
- Zeng ZB: **Precision mapping of quantitative trait loci.** Genetics 1994, 136: 1457-1468.

Zhang HB, Martin GB, Tanksley SD, Wing RA: **Map based cloning in crop plants: tomato as a model system II. Isolation and characterization of a set of overlapping yeast artificial chromosomes encompassing the *jointless* locus.**

Mol Gen Genet 1994, 244(6): 613-621.

Zhang Y, Stommel JR: **Development of SCAR and CAPS markers linked to the *Betas* gene in tomato.** Crop Sci 2001, 41(5): 1602-1608.

Zuriaga E, Blanca J, Nuez F: **Classification and phylogenetic relationships in *Solanum* section *Lycopersicon* based on AFLP and two nuclear gene sequences.** Genet Resour Crop Evol 2009, 56: 663-678.



## **II. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN**





## II. Objetivos y justificación

El principal objetivo de la presente tesis es profundizar en el conocimiento de la capacidad de regeneración de plantas a partir de explantes de tomate y otras especies relacionadas, útiles para la mejora de este cultivo, mediante la localización de regiones génicas implicadas en este proceso y el estudio de distintos factores que influyen en la regeneración.

Se plantea este objetivo puesto que son diversas las técnicas que requieren de la regeneración de plantas a partir de explantes (por ejemplo la transformación genética) y son muchos los genotipos en los que esta capacidad es baja, limitando el uso de estas técnicas. Los trabajos que hacen referencia a genes implicados en este proceso son escasos. Por lo tanto, la localización de regiones que puedan contener genes implicados en el proceso de regeneración es de gran interés. Otros factores determinantes de la regeneración son los reguladores de crecimiento y, en esta tesis, nos hemos planteado el estudio de la influencia del etileno que no ha sido estudiada en la regeneración de plantas a partir de explantes de tomate. Por otra parte, la caracterización de la capacidad de regeneración en distintas especies permite profundizar en el conocimiento del proceso y la puesta a punto de protocolos de regeneración eficientes para su utilización con fines diversos.

En resumen, los objetivos que se plantean para conseguir el objetivo principal previamente planteado son los siguientes:

- Detectar y localizar QTLs implicados en la regeneración de plantas a partir de explantes cultivados *in vitro* que se obtendrán de poblaciones desarrolladas previamente para este fin.
- Estudiar la influencia del etileno en la organogénesis utilizando genotipos de tomate que muestran distinta capacidad de regeneración.

## II. Objetivos y justificación

- Estudiar la capacidad de regeneración en las especies silvestres derivadas del complejo *Solanum peruvianum* L. sensu lato (s.l.): *Solanum arcanum* Peralta, *Solanum huaylasense* Peralta, *Solanum corneliomulleri* J. F. Macbr. y *Solanum peruvianum* L. sensu stricto (s.s.).

### **III. PUBLICACIONES.**



## Localization of QTLs for in vitro plant regeneration in tomato

Trujillo-Moya C, Gisbert C, Vilanova S, Nuez F: **Localization of QTLs for in vitro plant regeneration in tomato.** BMC Plant Biology 2011, 11:140, doi: 10.1186/1471-2229-11-140.



**Abstract**

**Background:** Low regeneration ability limits biotechnological breeding approaches. The influence of genotype in the regeneration response is high in both tomato and other important crops. Despite the various studies that have been carried out on regeneration genetics, little is known about the key genes involved in this process. The aim of this study was to localize the genetic factors affecting regeneration in tomato.

**Results:** We developed two mapping populations ( $F_2$  and  $BC_1$ ) derived from a previously selected tomato cultivar (cv. Anl27) with low regeneration ability and a high regeneration accession of the wild species *Solanum pennellii* (PE-47). The phenotypic assay indicated dominance for bud induction and additive effects for both the percentage of explants with shoots and the number of regenerated shoots per explant. Two linkage maps were developed and six QTLs were identified on five chromosomes (1, 3, 4, 7 and 8) in the  $BC_1$  population by means of the Interval Mapping and restricted Multiple QTL Mapping methods. These QTLs came from *S. pennellii*, with the exception of the minor QTL located on chromosome 8, which was provided by cv. Anl27. The main QTLs correspond to those detected on chromosomes 1 and 7. In the  $F_2$  population, a QTL on chromosome 7 was identified on a similar region as that detected in the  $BC_1$  population. Marker segregation distortion was observed in this population in those areas where the QTLs of  $BC_1$  were detected. Furthermore, we located two tomato candidate genes using a marker linked to the high regeneration gene: *Rg-2* (a putative allele of *Rg-1*) and *LESK1*, which encodes a serine/threonine kinase and was proposed as a marker for regeneration competence. As a result, we located a putative allele of *Rg-2* in the QTL detected on chromosome 3 that we named *Rg-3*. *LESK1*, which is also

situated on chromosome 3, is outside *Rg-3*. In a preliminary exploration of the detected QTL peaks, we found several genes that may be related to regeneration.

**Conclusions:** In this study we have identified new QTLs related to the complex process of regeneration from tissue culture. We have also located two candidate genes, discovering a putative allele of the high regeneration gene *Rg-1* in the QTL on chromosome 3. The identified QTLs could represent a significant step toward the understanding of this process and the identification of other related candidate genes. It will also most likely facilitate the development of molecular markers for use in gene isolation.

#### **Background**

In vitro regeneration of cultivated tomato (*Solanum lycopersicum* L.) has been a constant subject of research because of the commercial value of the crop. Consequently, numerous studies on plant regeneration from a wide range of tissues and organs of wild and cultivated tomato germplasm have been published (Bhatia et al. 2004). These studies demonstrate that organogenesis, the common tomato regeneration pathway, is strongly influenced by genotype as well as by several physical and chemical factors. These reports also document the existence of recalcitrance (partial or total inability to respond to in vitro culture), which greatly limits biotechnological breeding. High regeneration is crucial to the success of techniques such as haploid regeneration, genetic transformation, propagation, somatic hybridization, mutation selection and germplasm storage (Engelmann 1991; Benson 2000). For example, the low efficiency of tomato transformation has been associated with the low regeneration potential of the cultivars used (Hamza and Chupeau 1993; Frary and Earle 1996). In addition, in some cultivars, buds may be induced but do not develop into shoots (Peres et al. 2001). In order to



increase regeneration ability in low regenerating tomato cultivars, several introgression programs have been documented (Koornneef et al. 1987; Wijbrandi et al. 1988; Takashina et al. 1998; Faria et al. 2002).

The process of *in vitro* shoot organogenesis usually involves a hormonal response of somatic cells, the dedifferentiation of differentiated cells in order to acquire organogenic competence, cell division of the responding cell(s) and initiation and development of new shoots from the newly dividing cell(s), either directly or indirectly through a callus stage (Sugiyama 1999; Zhang and Lemaux 2004). Thus, many genes may be involved at different steps of this complex process. For instance, the *cdc2* gene expression, which encodes p34, a key cell cycle regulator, has been proposed as an indicator of the state of competence to divide (Hemerly et al. 1993). Genes that encode or regulate cytokinins and auxin may clearly influence regeneration. Both types of growth regulators act synergistically to promote cell division and antagonistically to promote shoot and root initiation from callus cultures (Skoog and Miller 1957). In *Arabidopsis*, a Histidine Kinase (AHK) gene that encodes a cytokinin receptor (CRE1/AHK4) has been identified (Inoue et al. 2001; Ueguchi et al. 2001) and linked, like other AHKs, to cell division and regulation (Nishimura et al. 2004). With regard to the initiation of shoot formation, the most characterized gene reported is *ESR1*, which confers, when overexpressed, cytokinin-independent shoot formation in *Arabidopsis* root explants (Banno et al. 2001). *ESR1* encodes a transcription factor belonging to the ethylene-responsive factor (ERF) family and is classified in subgroup VIII-b. The *ESR2* gene that encodes a protein that is very similar to *ESR1* appears to have redundant functions that regulate shoot regeneration (Ikeda et al. 2006). The expression patterns of other *Arabidopsis* ERF VIII-b subgroup genes may also be involved in early events of shoot regeneration (Mase et al. 2007).

Genetic analysis of regeneration in tomato suggests that dominant alleles determine high regeneration capacity (Koornneef et al. 1987; Faria and Illg 1996; Satoh et al. 2000; Pratta et al. 2003; Marchionni et al. 2007). However, there is no consensus about the number of genes involved. For instance, Koornneef et al. (1993) obtained regeneration segregation ratios in accordance with either a monogenic, digenic or trigenic model depending on the tester tomato line, despite the fact that none of the lines themselves were able to regenerate shoots from root explants. In this study, a dominant allele of *S. peruvianum* L. (*Rg-1*), which determines efficient shoot regeneration in tomato root explants, was mapped near the middle of chromosome 3. In addition, a putative allele of *Rg-1* from *S. chilense* (Dunal) Reiche (*Rg-2*) was reported by Takashina et al. (1998) and Satoh et al. (2000). Both alleles may act in combination with other alleles of either tomato or the wild relatives *S. peruvianum* or *S. chilense* (Koornneef et al. 1993; Satoh et al. 2000). On the other hand, Torelli et al. (1996) identified a cDNA by mRNA-differential display that corresponded to the *LESK1* gene and whose expression is specifically and transiently enhanced by the exposure to the hormonal treatment leading to caulogenesis (shoot induction). This gene encodes a putative serine-threonine kinase and has been reported as an in vitro caulogenesis marker in tomato (Torelli et al. 2004a; Torelli et al. 2004b).

Despite ongoing research into the genetic control of in vitro culture traits in tomato and other crops, there is still not enough information regarding which key genes are responsible for low or high regeneration ability, nor even the number of genes involved. The study and characterization of the reported genes and others that might be identified could greatly improve our understanding of the molecular mechanism underlying the different phases of tomato in vitro organogenesis. In the present study, we developed two mapping populations ( $F_2$  and  $BC_1$ ) from *S. lycopersicum* (as the

recurrent parent) and *S. pennellii* Correll (as the regenerating parent) and conducted a QTL-based analysis. We hereby report the identification of six QTLs on five chromosomes. These QTLs present high significant LOD scores and together represent a high percentage of phenotypic variance. We also report markers associated with QTL peaks. In addition, we located two candidate genes, *Rg-2* and *LESK1*, and performed a preliminary search for genes situated at QTL peaks. Our findings will complement the current knowledge of the genetics of regeneration and facilitate the development of molecular markers for use in tomato breeding and gene isolation.

## Results

### Development of populations and evaluation of the regeneration ability

Two mapping populations, F<sub>2</sub> and BC<sub>1</sub>, were obtained from a low regenerating cultivar of tomato (cv. An127) and the organogenic accession of *S. pennellii* (PE-47). The BC<sub>1</sub> population was obtained using the tomato cultivar as the recurrent parent. In the first assay, the regeneration ability of the parents and the F<sub>1</sub> plant used for obtaining the mapping populations was checked by culturing leaf explants on shoot induction medium. Regeneration occurred with little callus development and can be considered as direct. As expected, *S. pennellii* and F<sub>1</sub> explants manifested a higher regeneration potential versus *S. lycopersicum* explants ( $P < 0.001$ ). The percentage of explants with buds (B) in *S. pennellii* was 100%, whereas only 10% was obtained in tomato cv. An127 (Table 1). Data obtained in F<sub>1</sub> for B do not significantly differ from those obtained for *S. pennellii*. The percentage of explants with shoots (R) and the number of regenerated plants per explant with shoots, considered to be the productivity rate (PR), was also higher in *S. pennellii* and F<sub>1</sub> than in cv. An127. However, for these traits (R and PR), the F<sub>1</sub> values differ significantly from those of *S. pennellii* (Table 1).

**Table 1.** Phenotyping parental genotypes and mapping population

	First Assay Phenotyping parental genotypes and F <sub>1</sub>			Second Assay Phenotyping mapping populations		
	B <sup>a, c</sup>	R <sup>a, c</sup>	PR <sup>b, c</sup>	B <sup>a, c</sup>	R <sup>a, c</sup>	PR <sup>b, c</sup>
<i>S. pennellii</i>	100 b	96 c	6.36 c	100.00 c	95.00 d	6.74 c
<i>S. lycopersicum</i>	10 a	6 a	0.30 a	7.50 a	2.50 a	0.12 a
F <sub>1</sub>	90 b	78 b	3.17 b	87.50 c	70.0 c	3.08 b
F <sub>2</sub>	-	-	-	76.91 bc	63.92 c	2.65 b
BC <sub>1</sub>	-	-	-	59.48 b	36.65 b	1.67 b

Means of the traits: percentage of explants with buds (B), percentage of explants with shoots (R) and number of shoots per explant with shoots (PR) for the parent genotypes (*S. pennellii* and *S. lycopersicum*), F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> and BC<sub>1</sub>.

<sup>a</sup>B and R are the percentages of explants able to develop buds and shoots, respectively. <sup>b</sup>PR is the number of shoots per explant with shoots.

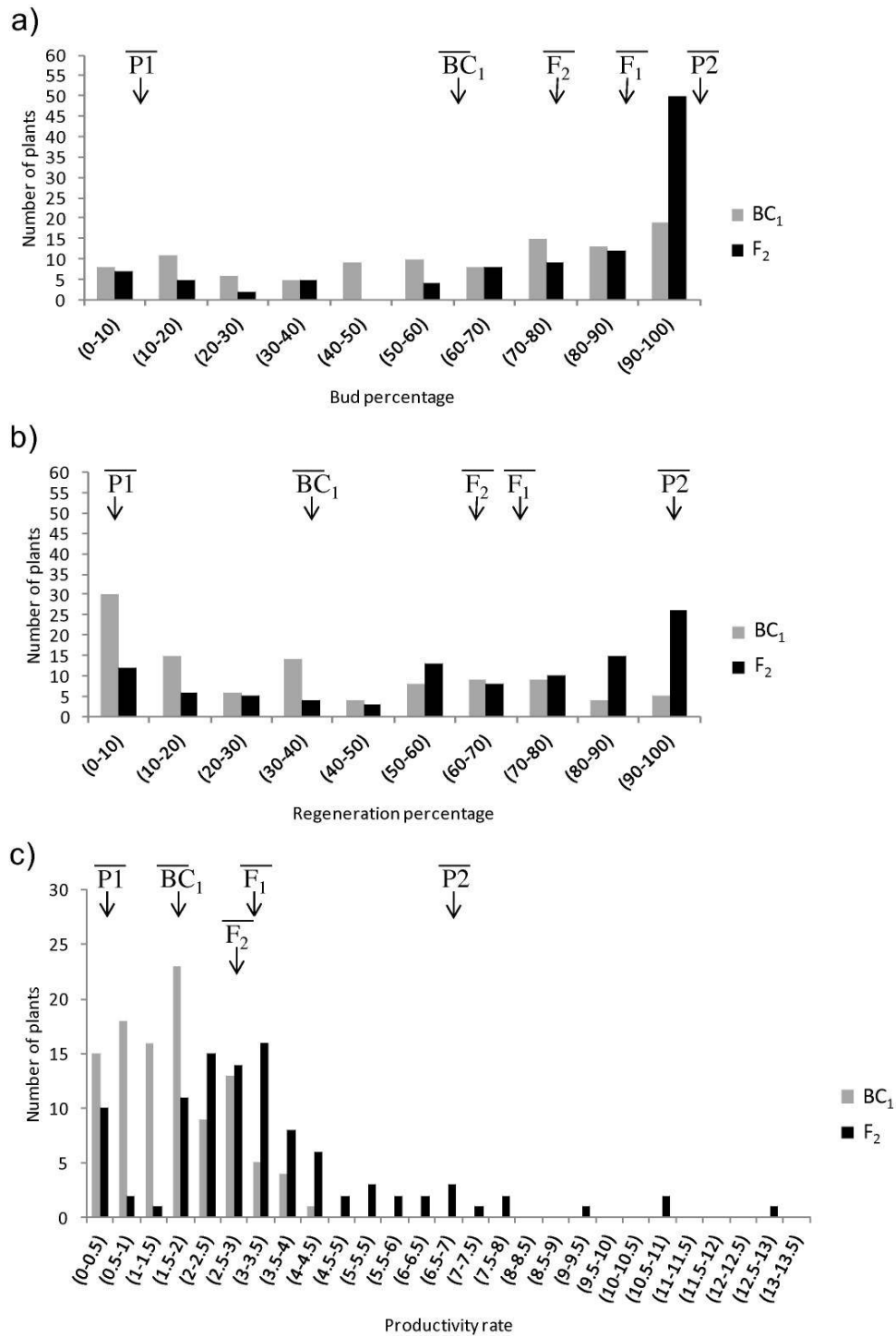
<sup>c</sup>Mean values within a column separated by different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ) according to Duncan's multiple range test.

The F<sub>2</sub> and BC<sub>1</sub> populations were evaluated for regeneration using explants from the parents and F<sub>1</sub> plants as controls (Table 1). The phenotypes are shown in Additional File 1. The distribution obtained for each individual trait as well as the means for controls in this assay are presented in Figure 1. Mean values for B, R and PR in the F<sub>2</sub> population are between F<sub>1</sub> and tomato (P1), but skewed towards F<sub>1</sub>. For the PR trait, some F<sub>2</sub> plants were in a range higher than the *S. pennellii* parent (P2). This can be considered transgressive segregation. BC<sub>1</sub> yielded mean values for B, R and PR that were intermediate between F<sub>1</sub> and cv. Anl27 (Figure 1).

B and R show a high correlation ( $r = 0.88/0.79$   $p < 0, 001$  for F<sub>2</sub> and BC<sub>1</sub> data, respectively), which suggests common or linked genes controlling these traits. The correlation between PR and both B and R was lower ( $r = 0.56/0.52$   $p < 0, 001$ ;  $0.66/0.66$   $p < 0, 001$  for PR and B and R for F<sub>2</sub> and BC<sub>1</sub>, respectively) indicating that different genes may influence the PR trait and/or variations between different biological samples are higher in PR.

#### Linkage maps

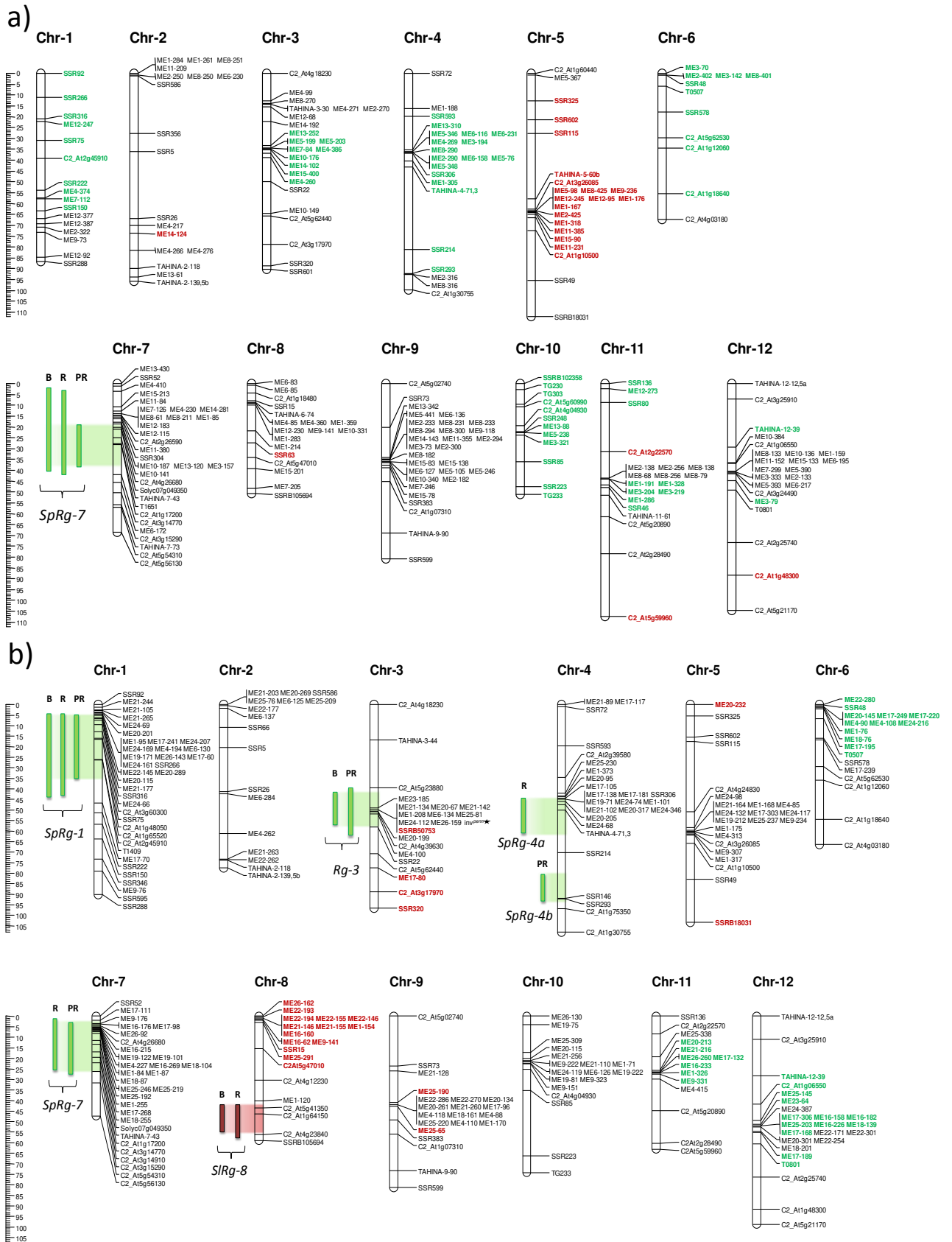
Genetic linkage maps were constructed from 106 F<sub>2</sub> and 113 BC<sub>1</sub> plants genotyped with SSR, COSI, COSII, CAPS and AFLP markers (Figure 2). Of the 149 SSR and 97 other markers (86 COSII, 6 COSI, 5 CAPS) assayed, 78 SSR and 59 (51 COSII, 4 COSI, 4 CAPS) markers exhibited codominant polymorphisms. These markers were obtained from the Sol Genomics Network (SGN) webpage at <http://www.sgn.cornell.edu/> with the exception of 60 SSRs that were designed following the procedure described in Materials and Methods (see Additional File 2).



**Figure 1.** Population distributions for regeneration traits.

a) The percentage of explants with buds (B), b) The percentage of explants with plants (R) and c) The percentage of plants per explant with shoots (PR). The F<sub>2</sub> population (dark) is derived from selfing an F<sub>1</sub>, the result of a cross between the tomato cv. Anl27 (P<sub>1</sub>) and *S. pennellii* PE-47 (P<sub>2</sub>). The BC<sub>1</sub> population (grey) is the result of crossing the tomato cv. Anl27 and the F<sub>1</sub> plants. Maternal (P<sub>1</sub>), Paternal (P<sub>2</sub>), F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> and BC<sub>1</sub> mean values are indicated by arrows.

### III. Publicaciones



**Figure 2.** a) Tomato genetic linkage map of F<sub>2</sub> population derived from *S. lycopersicum* (cv. An127) × *S. pennellii* (PE-47) and QTLs detected for regeneration traits by IM. b) Tomato genetic linkage map of BC<sub>1</sub> population derived from *S. lycopersicum* (cv. An127) × F<sub>1</sub> (cv. An127 × PE-47) and QTLs detected for regeneration traits by rMQM.

The segregated data were classified into 12 linkage groups, which corresponded to the Tomato-EXPEN 2000 map; italics indicate markers with segregation significantly skewed ( $P < 0.05$ ) in favour of parent alleles. The colors specify the direction of the segregation distortion (red: markers skewed toward the alleles of cultivated tomato; green: markers skewed toward the alleles of the wild parent). Green bars reflect QTLs from *S. pennellii*: *SpRg-1*, *Rg-3*, *SpRg-4a*, *SpRg-4b* and *SpRg-7*; the red bar reflects the *SIRg-8* QTL from *S. lycopersicum*. Regeneration traits: B (Bud percentage), R (Regeneration percentage) and PR (Productivity rate). The black star labels the acid invertase gene (*inv<sup>penn</sup>*) mapped on chromosome 3 included in the *Rg-3* QTL range.

For the F<sub>2</sub> linkage map (Figure 2a), a total of 246 polymorphic loci were used, including 151 AFLP, 53 SSR, 35 COSII, 3 COSI and 4 CAPS markers. The markers were aligned in 12 linkage groups, with LOD scores  $\geq 3.0$ . The average number of markers per linkage group was 20 and markers were well distributed over all the 12 linkage groups. The F<sub>2</sub> map spans 963.85 cM with an average interval of 3.72 cM between adjacent markers. There were five intervals  $> 25$  cM in chromosomes 2, 4, 5 and 11. A total of 268 polymorphic loci were used to assemble the genetic linkage map of BC<sub>1</sub> (Figure 2b), including 174 AFLP, 46 SSR, 43 COSII, 3 COSI and 2 CAPS markers. The markers were distributed over 12 linkage groups with LOD scores  $\geq 3.0$ . The average number of markers per linkage group was 22. The total genetic distance covered by the markers was 1014.94 cM, with an average interval of 4.12 cM between adjacent markers. The markers were well distributed over all the 12 linkage groups with only two intervals  $\geq 25$  cM in chromosomes 5 and 10. Marker distribution in both maps indicates that they will be useful for tagging the traits studied.



The order and placement of SSR markers were in agreement with the *S. lycopersicum* x *S. pennellii* reference tomato-EXPEN 2000 map (SGN) with the exception of TAHINA-6-64 (*in silico* designed), which was expected to be positioned on chromosome 6 (position 64) but is positioned on chromosome 8 (position 8.85) in our F<sub>2</sub> map.

#### Distorted segregation

42.45% of the mapped markers deviated significantly from the expected 1:2:1 segregation ratio for the F<sub>2</sub> generation at  $P < 0.05$  (Figure 2a). Segregation distorted markers (SDMs) were mainly observed on chromosomes 1 (0.00-63.17 cM), 3 (33.24-38.85 cM), 4 (19.74-92.09 cM), 5 (12.60-72.26 cM), 6 (0.00-55.38 cM) and 10 (0.00-51.24 cM). SDMs were generally caused by a surplus of *S. pennellii* homozygotes, with the exception of that observed on chromosome 5.

In the BC<sub>1</sub> population (Figure 2b), SDMs were fewer (30.3%) than in F<sub>2</sub>, and were observed mainly on chromosomes 6 (0.00-6.75 cM), 8 (0.00-15.40 cM), 11 (25.80-27.48 cM) and 12 (28.23-60.63 cM). The distortion on chromosome 8 was caused by a surplus of tomato homozygotes, whereas distortions on the other chromosomes were caused by an excess of hybrid genotypes.

#### QTL Identification

In order to identify QTLs, we first used Interval Mapping (IM) analysis that resulted in the identification of one QTL in the F<sub>2</sub> population and six in the BC<sub>1</sub> population (See Additional Files 3, 4, 5 and 6). The QTL identified in F<sub>2</sub>, located on chromosome 7, overlapped for the three traits. In the BC<sub>1</sub> analysis, this QTL also appeared for the R and PR traits. However, in this population, another five QTLs were identified on chromosomes 1, 3, 4 (at two different areas: 4a and 4b) and 8. All these QTLs were

confirmed by restricted Multiple QTL Mapping (rMQM) analysis (Figure 2b, Table 2). With the exception of the QTL on chromosome 8, all QTLs come from *S. pennellii*. These QTLs were named by their origin, *Sp* for *S. pennellii* or *Sl* for *S. lycopersicum*, followed by *Rg* (referring to regeneration) and the number of the chromosome on which they were located.

#### QTLs for regeneration traits in the BC<sub>1</sub> population

##### *Bud percentage (B)*

IM analysis identified two QTLs on chromosomes 1 and 8 (*SpRg-1* and *SlRg-8*; Additional File 4). *SpRg-1* has a maximum LOD score of 5.87 and is spanned by markers SSR316 and ME17-70. This QTL explained 22.9% of the phenotypic variation of the B trait. *SpRg-8*, with a maximum LOD score of 2.8, including just the C2\_At1g64150 marker, explained 11.7% of the phenotypic variation in B. rMQM analysis, using C2\_At2g45910 (chromosome 1) and C2\_At1g64150 (chromosome 8) markers as cofactors, confirmed those QTLs detected by IM and detected a new one on chromosome 3 (Figure 2b, Additional File 4). QTL characteristics are shown in Table 2. Collectively, these QTLs explained 34.6% and 48.3% of phenotypic variance in IM and rMQM, respectively.

##### *Regeneration percentage (R)*

IM analysis identified three QTLs located on chromosomes 1, 4 and 7 denominated *SpRg-1*, *SpRg-4a* and *SpRg-7*, respectively. The three QTLs had maximum LOD scores of 4.20, 3.92 and 3.86, and each explained around 16-17% of the phenotypic variation (see Additional File 5). rMQM analysis, using C2\_At2g45910 (chromosome 1), TAHINA-4-71.3 (chromosome 4) and TAHINA-7-43 (chromosome 7) markers as

### III. Publicaciones

**Table 2.** QTLs for shoot regeneration traits (Bud percentage (B), Regeneration percentage (R) and Productivity Rate (PR)) found to be significant at the empirical genome wide mapping threshold by restricted Multiple QTL Mapping (rMQM) in BC<sub>1</sub> and Interval Mapping (IM) in F<sub>2</sub>.

Test	QTL analysis	Trait	QTL	Genome wide significant threshold level (P < 0.05)	Chr	Start (cM)	Finish (cM)	Coverage (cM)	LOD Peak	Position of LOD peak (cM)	Peak marker <sup>a</sup>	% variance explained	Estimated additive effect	Estimated dominance effect
BC <sub>1</sub>	rMQM	B	<i>SpRg-1</i>	2.7	1	3.87	44.42	40.55	7.12	22.47	C2_At1g65520/ C2_At2g45910	23.9	-31.56	
BC <sub>1</sub>	rMQM	R	<i>SpRg-1</i>	2.7	1	3.87	43.42	39.55	5.52	24.47	C2_At1g65520/ C2_At2g45910	15.0	-24.10	
BC <sub>1</sub>	rMQM	PR	<i>SpRg-1</i>	2.8	1	3.87	34.42	30.55	4.19	22.47	C2_At1g65520/ C2_At2g45910	10.2	-0.70	
BC <sub>1</sub>	rMQM	B	<i>Rg-3</i>	2.7	3	42.41	55.80	13.39	4.64	50.47	ME20-199	12.2	-21.60	
BC <sub>1</sub>	rMQM	PR	<i>Rg-3</i>	2.8	3	32.77	63.10	30.33	4.26	50.47	ME20-199	10.6	-0.68	
BC <sub>1</sub>	rMQM	R	<i>SpRg-4a</i>	2.7	4	44.39	61.24	16.85	4.94	50.24	TAHINA-4-71, 3	13.3	-22.29	
BC <sub>1</sub>	rMQM	PR	<i>SpRg-4b</i>	2.8	4	81.33	93.18	11.85	3.08	86.33	SSR214/SSR146	7.4	-0.63	
F <sub>2</sub>	IM	B	<i>SpRg-7</i>	3.7	7	2.20	40.28	38.08	6.84	19.51	ME10-141/ C2_At4g26680	27.0	-22.20	12.32
F <sub>2</sub>	IM	R	<i>SpRg-7</i>	3.6	7	4.50	40.28	35.78	6.18	19.51	ME10-141/ C2_At4g26680	24.8	-23.29	13.63
F <sub>2</sub>	IM	PR	<i>SpRg-7</i>	4.4	7	19.51	36.28	16.77	5.72	28.28	C2_At1g17200	23.1	-1.53	-0.55
BC <sub>1</sub>	rMQM	R	<i>SpRg-7</i>	2.7	7	0.00	25.08	25.08	5.47	13.44	TAHINA-7-43	14.9	-23.13	
BC <sub>1</sub>	rMQM	PR	<i>SpRg-7</i>	2.8	7	3.54	28.23	24.69	5.28	13.44	TAHINA-7-43	13.5	-0.77	
BC <sub>1</sub>	rMQM	B	<i>SpRg-8</i>	2.7	8	41.18	53.37	12.19	3.84	46.37	C2_At1g64150	12.2	21.25	
BC <sub>1</sub>	rMQM	R	<i>SpRg-8</i>	2.7	8	42.18	58.90	16.72	4.25	53.37	C2_At1g64150/ C2_At4g23840	9.3	19.35	

<sup>a</sup>In case of the absence of a peak marker, loci flanking the likely peak of a QTL are shown.

cofactors, confirmed all QTLs detected by IM and detected the *SIRg-8* QTL (Figure 2b, Additional File 5, Table 2). In this case, the percentage of the phenotypic variation explained by each QTL was 15% for *SpRg-1*, 13.3% for *SpRg-4a*, 14.9% for *SpRg-7* and 9.3% for *SIRg-8*. Collectively, these QTLs explained 48.7% and 52.5% of the phenotypic variance in IM and rMQM, respectively.

#### *Productivity rate (PR)*

IM detected the QTLs located previously for B and R on chromosomes 1, 3 and 7 (Figure 2b, Additional File 6), as well as another QTL on chromosome 4, denominated *SpRg-4b*. The maximum phenotypic variation for PR (17.4%) is explained by *SpRg-7*, and the lowest (11.9%) by a QTL on chromosome 3. rMQM analysis, using SSR92 (chromosome 1), ME20-199 (chromosome 3), SSR146 (chromosome 4) and TAHINA-7-43 (chromosome 7) markers as cofactors, confirmed the QTLs detected by IM (Table 2).

#### Mapping tomato candidate genes

We selected the acid invertase gene linked to the *Rg-2* regeneration gene of *S. chilense* (Satoh et al. 2000) and the *LESK1* gene, described as a marker in tomato for in vitro regeneration competence (Torelli et al. 2004a), as the tomato candidate genes.

The amplification products of the acid invertase gene marker (*inv<sup>pen</sup>*) produce fragments of different sizes: 162 bp for *S. lycopersicum* cv. Anl27 and 173 bp for *S. pennellii* (see Additional File 7). Thus, *inv<sup>pen</sup>* was used for mapping the BC<sub>1</sub> population (Figure 2b, Additional Files 4 and 6). It was located in the QTL detected on chromosome 3, between the C2\_At5g23880 and SSRB50753 markers, at positions 49.9

cM and 49.93 cM, respectively. For this reason, we named this QTL *Rg-3* (a putative allele of *Rg-2*).

The *LESKI* gene is located in the SGN Tomato-EXPEN 2000 map on chromosome 3 between markers C2\_At4g18230 and cLPT-5-e7 (7 - 15 cM). As a result, in our BC<sub>1</sub> map, *LESKI* must be placed between C2\_At4g18230 and TAHINA-3-44 (7 - 44 cM). Thus, this candidate gene is outside the located *Rg-3* QTL.

#### Exploring QTLs

The official annotation for the tomato genome provided by the International Tomato Annotation Group at the SGN was used to carry out a preliminary search for related regeneration genes near the identified QTL peaks. We found a histidine kinase in *SpRg-7*, several serine/threonine kinases in all identified QTLs, ethylene response factors (ERFs) in all identified QTLs with the exception of *SpRg-4b*, cyclins in *SpRg-1*, *Rg-3*, *SpRg-4a* and *SpRg-7* and MADS-box in *SpRg-1*, *SpRg-4a* and *SpRg-7*.

#### **Discussion**

The wild tomato species *S. peruvianum*, *S. pimpinellifolium* L. and *S. chilense* were used as sources of regeneration genes in order to study the genetics of the in vitro regeneration in tomato (Koornneef et al. 1987; Takashina et al. 1998; Faria and Illg 1996). In this study, we used one accession of *S. pennellii* (PE-47) as the high regeneration parent (Gisbert et al. 1999). This accession, along with a previously selected low regenerating tomato cultivar (cv. Anl27), was used to develop two mapping populations (F<sub>2</sub> and BC<sub>1</sub>). The use of the introgression lines of *S. pennellii* in the M82 tomato background (Eshed et al. 1992) had been previously ruled out for this analysis because of the high regeneration ability of both parent lines (data not shown).

Data in Figure 1 and Table 1 seem to indicate complete dominance for B, partial dominance for R and additive effects for PR. This is in agreement with other reported studies on tomato where dominance, to different degrees, depending on the regeneration trait studied, was also reported (Faria and Illg 1996; Satoh et al. 2000; Marchionni et al. 2007; Koornneef et al. 1993). B and R traits show a high correlation in both populations, suggesting that common or linked genes control these traits. The correlation between PR and both B and R was lower. This could imply that other genes may be influencing the PR trait and/or variations between different biological samples are higher in PR (for instance, competition for development due to the presence of different shoots in a similar explant area). Thus, the low sample size may be also a possible explanation for the lower correlation.

Some descendants in the F<sub>2</sub> population showed phenotypes for the PR trait that are more extreme than those shown by the regenerating parent line (Figure 1). Transgressive segregation has already been described in other reports in relation to the genetic control of plant regeneration (Komatsuda et al. 1993, Taguchi-Shiobara et al. 1997; Flores Berrios et al. 2000), and suggests polygenic inheritance (Bolibok and Rakoczy-Trojanowska 2006). It also suggests the existence of alleles that promote, and others that inhibit, *in vitro* regeneration, with only some of the alleles with positive effects occurring in the same parent (Bolibok and Rakoczy-Trojanowska 2006). In fact, in this study, the *SIRg-8* QTL that contributes to regeneration came from the low regenerating parent.

Plant regeneration from cultured tissues is assumed to fall under quantitative genetics (Bolibok and Rakoczy-Trojanowska 2006), although evidence in tomato (Satoh et al. 2000; Koornneef et al. 1993) and other vegetables (Molina and Nuez 1989; Molina and Nuez 1995; Molina and Nuez 1997) indicates that just a few genes could be

responsible for regeneration. We identified 6 QTLs in the BC<sub>1</sub> analysis, which is indicative of the participation of a large number of genes in this character. These QTLs are situated on chromosomes 1, 3, 4, 7 and 8 (Figure 2b). The percentage of variance explained by each QTL ranges from 7.4 to 27%, which is in accordance with the most common range (6-26%) reported in the genetic mapping of QTLs for tissue culture response in plants (Bolibok and Rakoczy-Trojanowska 2006). We used three traits (B, R and PR) as a measurement of regeneration capability that could be useful for detecting chromosome regions that act at different times.

In the F<sub>2</sub> population, only the QTL of chromosome 7 was identified for all analyzed traits (Additional File 3); the SDMs observed in most chromosome areas where QTLs were detected in the BC<sub>1</sub> population are most likely the cause (Figure 2). The SDMs on chromosomes 1, 3, 6, 10 and 11 were also observed in similar areas in the Tomato-EXPEN 2000 map (Shirasawa et al. 2010). SDMs affect the detection power of QTLs when QTLs and SDMs are closely linked (Zhang et al. 2010), as occurred in our case. Deviation from the expected segregation ratio is a common feature of inter-specific tomato crosses (Chaerani et al. 2006). To wit: in a F<sub>2</sub> population from *S. lycopersicum* x *S. pennellii*, De Vicente and Tanksley (1993) reported a skewness rate of up to 80%.

In the BC<sub>1</sub> population, three QTLs were detected for B: *SpRg-1*, *SpRg-3* and *SlRg-8*. These QTLs may be associated with the first stages of regeneration, that is, hormonal induction response and bud formation. *SpRg-1*, which explained the highest percentage of variation for B (23.9%), was also identified for the R and PR traits. Given that bud formation is a necessary prerequisite for the production of shoots, it was expected that this major QTL for B would be found for R and PR, which in fact turned out to be the case (Table 2). For R and PR, a common QTL on chromosome 7 (*SpRg-7*)

was also identified. In addition, two QTLs were detected for R (*SpRg-4a* and *SIRg-8*) and PR (*SpRg-4b* and *Rg-3*). All these QTLs seem to be involved in the development of buds into shoots. As can also be observed in this study, common QTLs for the different regeneration traits, as well as a higher number of QTLs for traits related to plant development compared to those associated with bud induction, have been reported in different studies (Ben Amer et al. 1997; Schiantarelli et al. 2001). For instance, in *Arabidopsis*, Schiantarelli et al. (2001) found a common area of chromosome 1 in all analyzed parameters, a peak in chromosome 4 and another in chromosome 5 when they analyzed the total number of regenerated shoots. In wheat, Ben Amer et al. (1997) identified three QTLs, two that affect green spot initiation and shoot regeneration and a third that only influences plant formation.

A partial common genetic system controlling the regeneration frequency of diverse types of explants has been reported by Molina and Nuez (1995) in melon. This indicates that using different explants for loci detection may lead to the identification of some common QTLs, but also to the possible identification of other new QTLs. Root explants were used by Koornneef et al. (1993) and Satoh et al. (2000) for phenotyping, at which point two alleles for regeneration ability were located on chromosome 3 of tomato. In the present study, leaves were used for phenotyping and a QTL (*Rg-3*) in a similar area of chromosome 3 was detected in addition to other QTLs that influence regeneration and were identified on chromosomes 1, 4, 7 and 8. Differences in root and leaf explants for QTL identification were also found in *Arabidopsis thaliana* (Schiantarelli et al. 2001).

Koornneef et al. (1993) located a dominant allele from *S. peruvianum* (*Rg-1*) near the middle of chromosome 3 that determines efficient shoot regeneration in tomato root explants. Satoh et al. (2000) mapped a putative allele (*Rg-2*) from *S. chilense* on



this chromosome. The acid invertase gene, reported as a marker linked to *Rg-2*, was chosen for mapping *Rg-2* in our population derived from *S. pennellii*. The polymorphisms detected in our parents allow us to map this gene in the QTL detected on chromosome 3 that we named *Rg-3*. We consider *Rg-3* to be a putative allele of the *Rg-2* gene. Allelism must be confirmed.

The other gene chosen as a candidate was *LESK1*, which encodes a serine/threonine kinase, and was reported as a marker of competence for in vitro regeneration in tomato (Torelli et al. 2004a; Torelli et al. 2004b). This gene was positioned on chromosome 3, but it is not located in the *Rg-3* QTL.

The recent release of the entire genome sequence of tomato provides a powerful tool for interrogating QTL data. In this respect, we have taken a preliminary look at genes located at the peak areas of the detected QTLs, and which could be related to organogenesis. Histidine kinases were reported as cytokinin receptors (Inoue et al. 2001; Ueguchi et al. 2001; Nishimura et al. 2004). In our QTL peaks, only one histidine kinase is located in the *SpRg-7* QTL. The candidate tomato gene, *LESK1*, which has been described as a marker for in vitro competence, encodes a serine/threonine kinase. We looked for serine/threonine kinases and found this kind of protein in all identified QTLs. Other putative candidate genes could be *ESR1* and its paralogue, *ESR2*, from *Arabidopsis*, which are the best-characterized genes related to regeneration (Banno et al. 2001; Ikeda et al. 2006). These genes code for ethylene response factors (ERF). We found ERFs, which contain the AP2 domain, in all analysed QTLs with the exception of *SpRg-4b*. Cyclins related to cell division (Hemerly et al. 1993) were found in *SpRg-1*, *Rg-3*, *SpRg-4a* and *SpRg-7*. MADS-box genes, which have been correlated to adventitious regeneration induction and regulation (Prakash and Kumar 2002; Bielenberg et al. 2008), were found in the *SpRg-1*, *SpRg-4a* and *SpRg-7* QTL peaks.

## Conclusions

The results obtained in this study may very well represent a significant step toward the goal of understanding the processes underlying tomato tissue culture and regeneration responses. We have situated six QTLs on chromosomes 1, 3, 4, 7 and 8, five from *S. pennellii* and one from *S. lycopersicum*. The most important QTLs are *SpRg-1*, which is most likely associated with the morphogenetic response, and *SpRg-7*, which promotes bud development. A QTL detected on chromosome 3, *Rg-3*, likely contains a putative allele of the *Rg-1* and *Rg-2* genes, as is shown by mapping the acid invertase gene linked to *Rg-2*. QTLs detected on chromosomes 8 and 4 most likely contain genes influencing bud formation and development, respectively.

## Methods

### Plant materials and growing conditions

*S. pennellii* PE-47, which showed a high ability for regeneration (Gisbert et al. 1999), and the tomato cultivar Anl27 (cv. Anl27), with a low ability for regeneration, were chosen for obtaining the mapping population. The initial genotypes were established in vitro, starting with the sterilization of seeds by immersion for 10 min in a solution of 25% commercial bleach (40 g L<sup>-1</sup> active chlorine), being then washed twice with sterile deionized water for 5 min each and then sown in Petri dishes containing nutrient medium (Murashige and Skoog (1962) salts including vitamins, 2% sucrose, 0.6% plant agar (DUCHEFA, the Netherlands)). The pHs of the media were adjusted to 5.8 before sterilization at 121°C for 20 min. Cultures were incubated in a growth chamber at 26°C ± 2°C under a 16h photoperiod with cool white light provided by Sylvania cool white F37T8/CW fluorescent lamps (90 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). Clones of one plant of each genotype were obtained and maintained in in vitro culture. The clones were multiplied by

transferring nodes to tubes with fresh basal medium (BM: Murashige and Skoog (1962) salts including vitamins, 1.5% sucrose and 7 g L<sup>-1</sup> plant agar) every 3-4 weeks. The tubes were 15 cm in length and 22 mm in diameter, with 15 ml of medium per tube.

#### Mapping population

One clone of tomato and another of *S. pennellii* were transferred to a greenhouse in order to obtain the F<sub>1</sub> plant that was reintroduced in vitro by disinfection of shoots following a similar procedure as that carried out for seed sterilization. F<sub>2</sub> and BC<sub>1</sub> populations were obtained and seeds were germinated in vitro as described above.

The F<sub>2</sub> mapping population was composed of 106 individuals obtained from selfing one F<sub>1</sub> plant, the result of a cross between the tomato cv. Anl27 (P1) and *S. pennellii* PE-47 (P2). The backcross (BC<sub>1</sub>) mapping population, composed of 113 plants, was obtained by crossing the cv. Anl27 and the F<sub>1</sub> plant. To allow the test to be reproduced, the F<sub>1</sub> plant and F<sub>2</sub> and BC<sub>1</sub> individuals were clonally replicated and maintained in vitro as described above.

#### Evaluation of the regeneration capacity

A first assay was performed with cloned P1, P2 and F<sub>1</sub> plants. Leaf disks (0.6-0.8 cm<sup>2</sup>) obtained from in vitro cultured plants that were at a similar growing stage were placed with the abaxial side in contact with the shoot induction medium (SIM) containing Murashige and Skoog (1962) salts, 3% sucrose, 7% plant agar and 0.2 mg L<sup>-1</sup> zeatin riboside (ZR). This growth regulator was sterilized by filtration and added to the sterile SIM. After 30 days of culture on SIM, the explants were transferred to BM for 20 days. In this medium, buds develop into shoots. For each genotype, five explants per plate (90 × 25 mm with 40 ml of medium per plate) and 10 repetitions per genotype were evaluated. At the end of the experiment, the following variables were analyzed:

-Bud percentage (B): number of explants with buds  $\times$  100/total number of cultured explants.

-Regeneration percentage (R): number of cultures that differentiated into completely developed shoots  $\times$  100/total number of cultured explants.

-Productivity rate (PR): total number of completely developed shoots/total number of cultured explants that regenerated plants.

In a second assay, leaf explants of F<sub>2</sub>, BC<sub>1</sub>, P1, P2 and F<sub>1</sub> plants were tested as explained above. In this case, for each genotype, five explants per plate and 4 repetitions per genotype were evaluated. Data for regeneration was obtained for 102 genotypes of the F<sub>2</sub> population and 104 genotypes of BC<sub>1</sub>. The average value for each trait and genotype was used for QTL analysis.

To assess the effect of genotype on regeneration ability, data from the genetically uniform classes (P1, P2 and F<sub>1</sub>) were subjected to a unifactorial analysis of variance (ANOVA), and then means for the different traits were separated by a Duncan test. The correlations between the different traits were calculated using the Statgraphics Plus 4.0 software.

#### Genotyping

##### *Preparation of genomic DNA*

Young leaves from in vitro-cultured plants were collected and immediately frozen with liquid nitrogen and then stored at -80°C. DNA was prepared based on the modified CTAB method of Doyle and Doyle (1990). Subsequently, quality and quantity of the DNA was evaluated on 0.8% agarose gel stained with ethidium bromide and using the NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000 Spectrophotometer.

*Amplified fragment length polymorphism (AFLP) procedure*

AFLPs were obtained following de Vos et al. (1995) procedure. Fifteen and sixteen selective combinations of primers were used for the F<sub>2</sub> and BC<sub>1</sub> populations, respectively. The code of each selective combination is specified in Table 3. Each code followed by the number corresponding to each obtained band (size in bp) is used to name the polymorphic AFLPs. Electrophoresis of the PCR products was conducted using an ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (PerkinElmer Applied Biosystems, Foster City, California, USA). GeneScan™ 600 LIZ® Size Standard, with fluorophore LIZ, was used as a molecular size marker. Raw data were analyzed with the GeneScan 3.1.2 analysis software (PerkinElmer Applied Biosystems) and the resulting GeneScan trace files were imported into Genographer 1.6.0. The AFLP fragments between 60 to 380 bp were scored in Genographer as present (1) or absent (0).

**Table 3.** Selective combinations of primers used for F<sub>2</sub> and BC<sub>1</sub> genotyping

Code	Mapping population	Selective primers combination
ME1	F <sub>2</sub> , BC <sub>1</sub>	<i>MseI</i> CTA- <i>EcoRI</i> AAC
ME2	F <sub>2</sub>	<i>MseI</i> CAA- <i>EcoRI</i> ACC
ME3	F <sub>2</sub>	<i>MseI</i> CAA- <i>EcoRI</i> ACG
ME4	F <sub>2</sub> , BC <sub>1</sub>	<i>MseI</i> CAA- <i>EcoRI</i> AGC
ME5	F <sub>2</sub>	<i>MseI</i> CAC- <i>EcoRI</i> ACA
ME6	F <sub>2</sub> , BC <sub>1</sub>	<i>MseI</i> CAC- <i>EcoRI</i> ACG
ME7	F <sub>2</sub>	<i>MseI</i> CAC- <i>EcoRI</i> AGC
ME8	F <sub>2</sub> , BC <sub>1</sub>	<i>MseI</i> CAA- <i>EcoRI</i> ACA
ME9	F <sub>2</sub> , BC <sub>1</sub>	<i>MseI</i> CAA- <i>EcoRI</i> AAC
ME10	F <sub>2</sub>	<i>MseI</i> CTA- <i>EcoRI</i> AGC
ME11	F <sub>2</sub>	<i>MseI</i> CTC- <i>EcoRI</i> AGC
ME12	F <sub>2</sub>	<i>MseI</i> CCG- <i>EcoRI</i> AAC
ME13	F <sub>2</sub>	<i>MseI</i> CCG- <i>EcoRI</i> ACC
ME14	F <sub>2</sub>	<i>MseI</i> CCG- <i>EcoRI</i> ACG
ME15	F <sub>2</sub>	<i>MseI</i> CTC- <i>EcoRI</i> AGG
ME16	BC <sub>1</sub>	<i>MseI</i> CAA- <i>EcoRI</i> ACT
ME17	BC <sub>1</sub>	<i>MseI</i> CTA- <i>EcoRI</i> ACC
ME18	BC <sub>1</sub>	<i>MseI</i> CTA- <i>EcoRI</i> ATG
ME19	BC <sub>1</sub>	<i>MseI</i> CTA- <i>EcoRI</i> ACA
ME20	BC <sub>1</sub>	<i>MseI</i> CCT- <i>EcoRI</i> ACC
ME21	BC <sub>1</sub>	<i>MseI</i> CCT- <i>EcoRI</i> AAC
ME22	BC <sub>1</sub>	<i>MseI</i> CCT- <i>EcoRI</i> ATG
ME23	BC <sub>1</sub>	<i>MseI</i> CCT- <i>EcoRI</i> ACA
ME24	BC <sub>1</sub>	<i>MseI</i> CAC- <i>EcoRI</i> ACC
ME25	BC <sub>1</sub>	<i>MseI</i> CAC- <i>EcoRI</i> ATG
ME26	BC <sub>1</sub>	<i>MseI</i> CAC- <i>EcoRI</i> AGG

*Microsatellites (SSRs)*

One hundred and forty-nine SSR markers were used to detect polymorphism between P1 and P2, which included 89 SSRs previously reported and mapped onto the Tomato-EXPEN 2000 available at SGN (Frary et al. 2005; Mueller et al. 2005), along with 60 new SSRs: 18 from the COMAV research group "Aprovechamiento de la variabilidad estraespecífica en la mejora del tomate" and 42 designed from sequences deposited in Genbank (see Additional File 2). Primer pairs were designed from these sequences using the SSR Primer 3 tool <http://frodo.wi.mit.edu/webcite> (Rozen and Skaletsky 2000). The criteria used for designing the primers were as follows: the primer  $T_m$  ranged from 55 to 65°C and GC content was 50%. The presence of G or C bases within the last five bases from the 3' end of primers (GC clamp), which helps promote specific binding at the 3' end, was taken into account. In order to design the SSRs, wherever possible the AT/TA repetitions were selected based on the results obtained by Frary et al. (2005).

All the SSRs, with the exception of those specified below, were labelled following the M13-tail method described by Schuelke et al. (2000). DNA amplification was carried out in volumes of 15  $\mu$ L using a sample of 10 ng of DNA. The reaction mixture contained 1.5  $\mu$ L 10  $\times$  PCR buffer [75 mM Tris-HCl (Ph 9.0), 50 mM KCl, 20 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  and 0.001% BSA], 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 200  $\mu$ M dNTPs, 0.133  $\mu$ M of primers, 0.2  $\mu$ M of fluorescent labelled M13 primer and 0.3 units of *TaqI* DNA polymerase (Need S. L., Valencia, Spain). An Eppendorf 5333 Thermal Cycler was used. The PCR parameters included the following: an initial 3 min at 94°C; 35 cycles, each with 30 s DNA denaturation at 94°C; 45 s at an annealing temperature (depending on the primer combination  $T_m$ ) and a 1 min extension at 72°C, and a final extension of 10 min at 72°C. Amplified bands were visualized using a LI-COR sequencing gel (DNA LI-COR

4300; LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, USA); 10  $\mu$ l of loading buffer (95% formamide, 2 mM EDTA, 0.001% bromophenol blue) and 5  $\mu$ l of deionized water were added to the 5  $\mu$ l PCR mix (2.5  $\mu$ l of each IRDye 700 or IRDye800-labeled) samples which were denatured at 96°C for 8 min. Electrophoresis was performed in denaturing conditions at 50°C, using 6% acrylamide gels in TBE buffer.

The SSR356, SSR73, SSR248, SSR46 markers in which polymorphisms were visible in the agarose gels were amplified in volumes of 23.32  $\mu$ l with: 10 ng of DNA, 1.6 mM MgCl<sub>2</sub>, 171.52  $\mu$ M dNTPs, 0.214  $\mu$ M of primers, 2.5  $\mu$ l of 10  $\times$  PCR buffer, and 0.6 U *TaqI* DNA polymerase. The PCR conditions were similar to those applied before, with the exception of a final extension of 30 min in this case. Amplified bands were run in standard agarose gels (1 or 2%) in TAE buffer at 100V and visualized by ethidium bromide staining.

#### *Conserved ortholog set (COS) and cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) markers*

Ninety-six markers (86 COSII, 6 COSI, 4 CAPS) from the Tomato-EXPEN 2000 map (Fulton et al. 2002; Wu et al. 2006) and one developed CAPS marker (Solyc07g049350) were tested for polymorphism between the P1 and P2 parents. The restriction enzymes used when required were those indicated in the SGN database. When restriction enzymes was needed, the protocol described in the commercial product's instructions (Fermentas, York, UK or Biolabs, Takara, Japan) was followed.

The PCR reaction was performed in a total volume of 12  $\mu$ L using a sample of 10 ng of DNA. The reaction mixture contained 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M dNTPs, 0.25  $\mu$ M of primers, 1.2  $\mu$ L PCR buffer 10X, and 0.3 U *TaqI* DNA polymerase. Amplification was performed using an Eppendorf 5333 Thermal Cycler, which was

programmed as follows: 5 min at 94°C, 35 30-s cycles each at 94°C, 1 min at Ta (depending on the primer combination Tm) and a 2 min extension at 72°C, with a final stage of 10 min at 72°C. Amplified bands were separated by 1 or 2% agarose electrophoresis in TAE buffer at 100V, and visualized by ethidium bromide staining.

#### Map construction and QTL mapping

Linkage analysis for both mapping populations was performed with the JoinMap<sup>®</sup> 4.0 software (Van Ooijen 2006). Markers were grouped into linkage groups at LOD  $\geq$  3, with the exception of those in chromosomes 9 and 10 of the BC<sub>1</sub> mapping population with LOD  $\geq$  2. Order was determined with a recombination threshold of 0.40 and distances were calculated using the Kosambi mapping function (Kosambi 1944). For the genetic map construction, AFLP, SSR, COS and CAPS markers were used (Additional File 8). The segregation ratio of alleles was evaluated for each locus by the Chi-square test with a significance threshold of P < 0.05. The expected segregation ratios were 3:1 and 1:1 for F<sub>2</sub> and BC<sub>1</sub>, respectively. Visual representations of the marker maps were created with the MapChart software (Voorrips 2002).

QTL analysis on the F<sub>2</sub> and BC<sub>1</sub> phenotypic data sets was performed with the MapQTL<sup>®</sup> 6.0 software (Van Ooijen 2009). Significance thresholds for the LOD values, corresponding to a genome-wide false discovery rate of 5% (p < 0.05) were calculated by genome-wide permutation tests using 1, 000 permutations. Firstly, IM analysis was performed (simple Interval Mapping). Then, if many putative QTLs were detected by IM, markers close to the likelihood peaks of the detected QTLs were used as cofactors for rMQM (also called composite Interval Mapping) analyses.



#### Locating candidate genes and looking for other regeneration-related genes

The *S. pennellii* acid invertase gene (*inv<sup>penn</sup>*) was analyzed and mapped as a marker. Primers described by Harada et al. (1995) were used for DNA amplification using conditions previously described for COS and CAPS markers. Amplified bands were separated using the multicapillary electrophoresis QIAxcel System (Qiagen, Valencia, California, USA). We searched for the location of the *LESK1* gene at SGN and for its nearest markers at International Tomato Annotation Group. This database was also used for looking for genes putatively related to organogenesis.

#### **Authors' contributions**

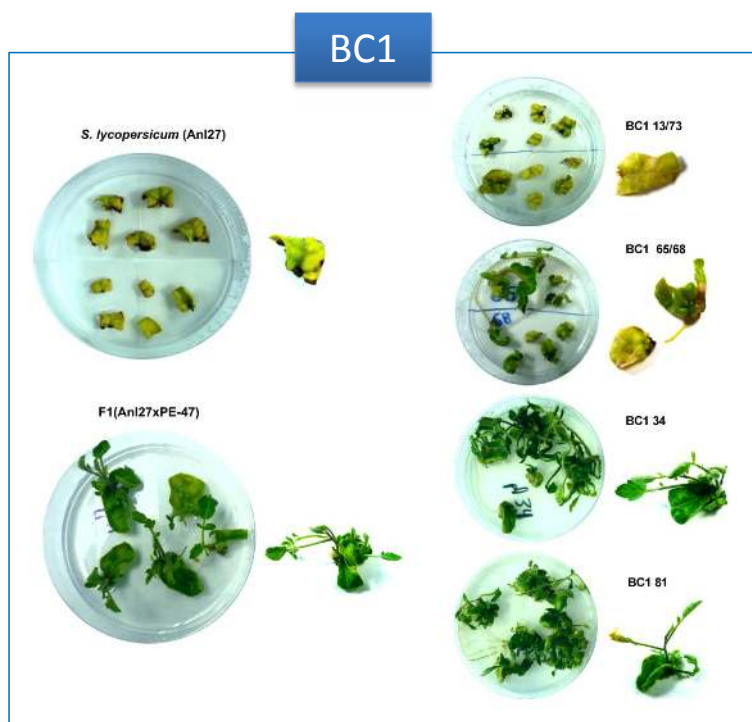
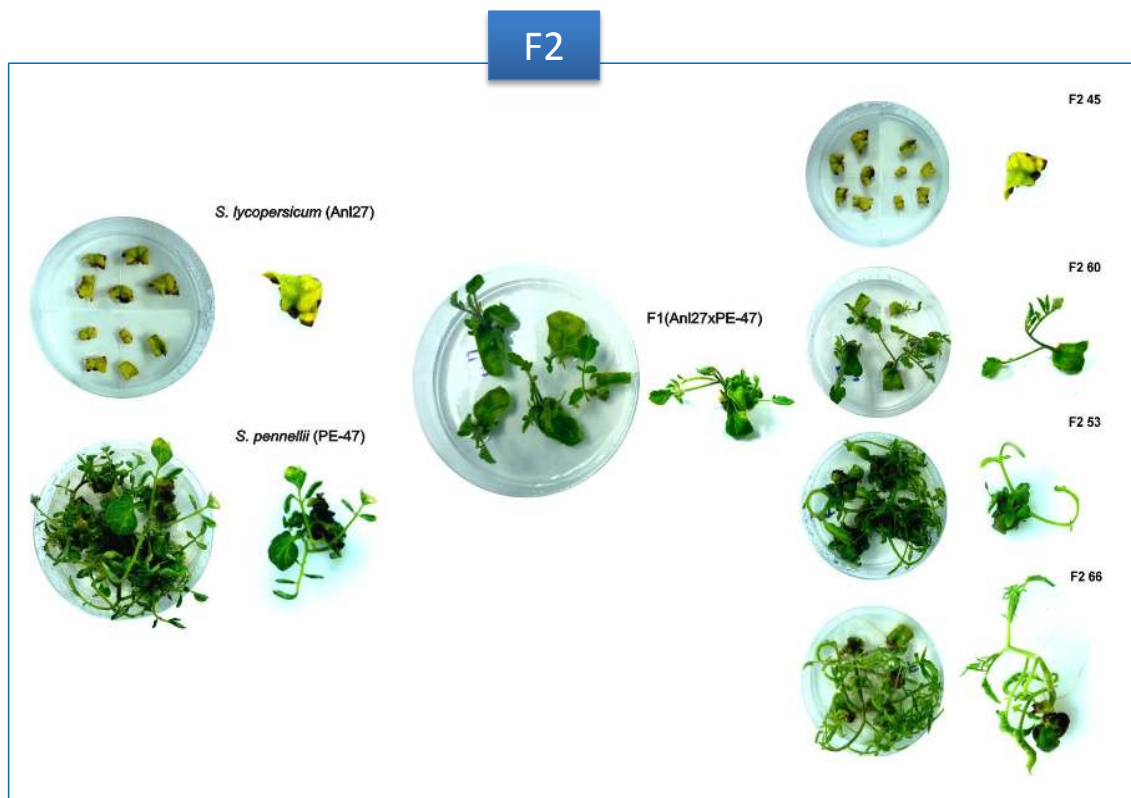
CG obtained the mapping populations. CT conducted the population phenotyping and genotyping and participated in the drafting. CT and SV performed the map construction and QTL mapping. CG collaborated in the phenotyping and genotyping and conceived, supervised and drafted the manuscript. FN conceived of the study and contributed to critically reviewing the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

#### **Acknowledgements**

CG and CT thank the Spanish 'Ministerio de Educación y Ciencia' for a Ramón y Cajal contract and a predoctoral fellowship, respectively. The authors acknowledge the financial support of the Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV), suggestions from Dr. J. Cañizares, SSRs designed by O. Julián and the technical assistance of N. Palacios. The revision and the English revision of the manuscript by A. Monforte and J. Bergen, respectively, are also acknowledged.

**Additional material**

**Additional file 1. Regeneration response of leaf explants.** Regeneration response of leaf explants from parents [tomato (cv. Anl27); *S. pennellii* (PE-47)], F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> and BC<sub>1</sub> populations, cultured on shoot induction medium (SIM) for 30 days and transferred to basal medium (BM) for 20 days.



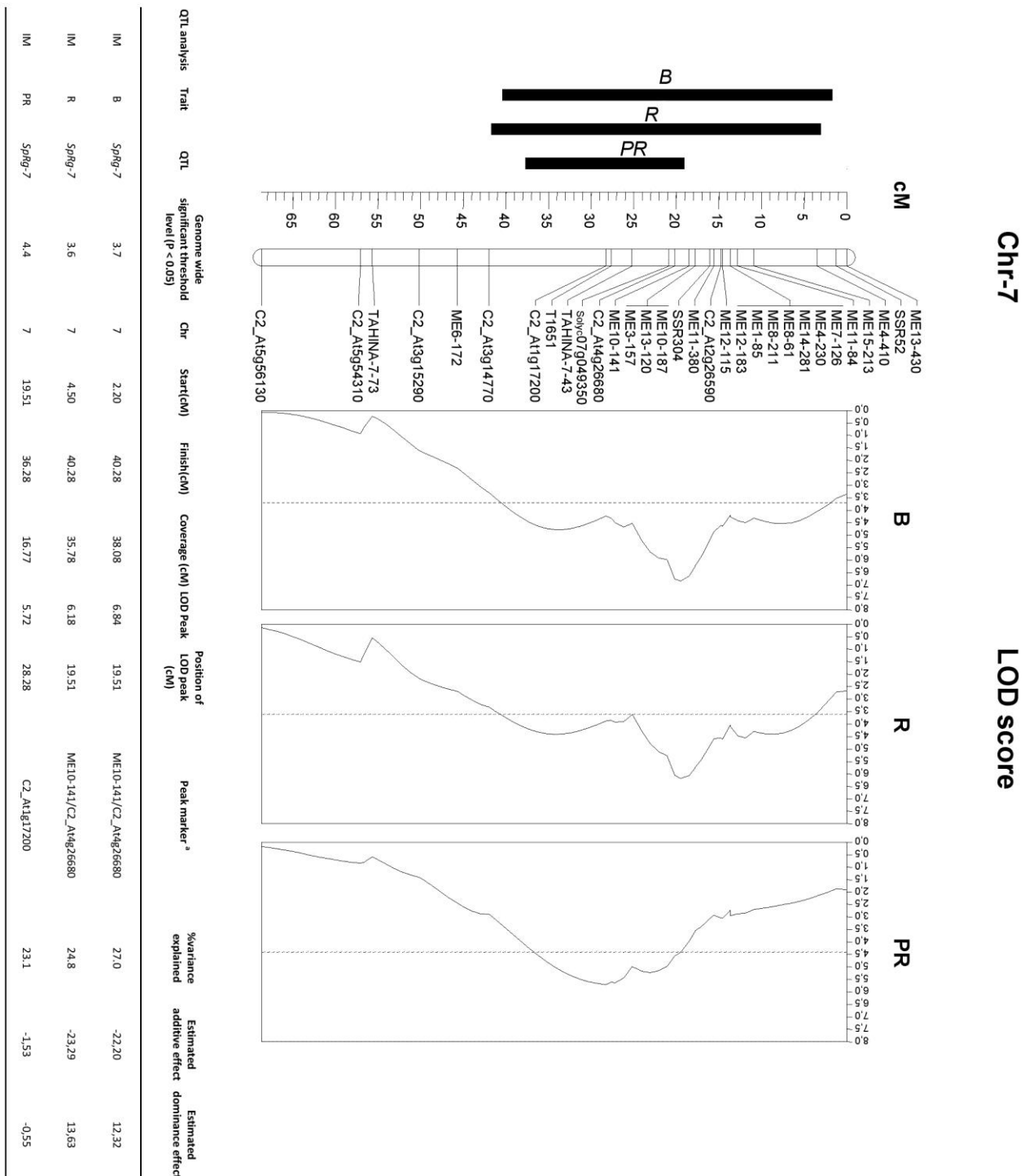
### III. Publicaciones

**Additional file 2. In silico-designed SSR markers.** Table with the name, band size, repeat motif, temperature of annealing and primers sequences of in silico-designed SSR markers.

Name <sup>1</sup>	Band size (bp) <sup>2</sup>	Repeat Motif <sup>3</sup>	Ta (°C) <sup>4</sup>	Sequence (5'-3')	Name <sup>1</sup>	Band size (bp) <sup>2</sup>	Repeat Motif <sup>3</sup>	Ta (°C) <sup>4</sup>	Sequence (5'-3')
<sup>a</sup> TAHINA-2-92*	196	(TA)16	52	F AGCGAATATGCTGTGTG R TTTCTGGGATACGGTTTG	<sup>a</sup> TAHINA-7-63.5b*	187	(TAT)7	53	F GGCCGACATATTAGAGTAG R TTACTATTGGCTGGCTTG
<sup>a</sup> TAHINA-2-118	201	(AT)27	59	F CAGAGATTGAAAGGTGTCT R AAGTGGCTCTCACTGTG	<sup>a</sup> TAHINA-7-72	158	(TA)11	52	F TTATTGTCTGCTTTTATTTT R AACTCCAAAGGATATTGA
<sup>d</sup> TAHINA-2-135.5b	163	(AT)12	58	F CCAATCACTATATGGAGGAGAG R CCGTCCCTTTTGTTC	<sup>a</sup> TAHINA-7-73*	205	(AT)17	50	F GGAACTTGTATTAGGATAG R TTTTGGAGAGAGCTTTTG
<sup>a</sup> TAHINA-2-135.5b	237	(TTA)10	50	F ATGTGCACACGTAAAC R ATGGATATGCTATGCTA	<sup>a</sup> TAHINA-7-92a	221	(TTA)10	59	F TCGACTCCAAKCGGATA R CATTGGCAAAAGGTTAGAG
<sup>a</sup> TAHINA-3-30*	250	(TACA)10	53	F ACCGGCAATCTTGTTC R GGACAAATCTTAGCAAAAC	<sup>a</sup> TAHINA-7-92b*	182	(AT)24	55	F GGAGCTCTAACTCATG R TGGCTACTGCTTCTTC
<sup>a</sup> TAHINA-3-44	161	(TA)7(CA)10	55	F CTAAAGGTGGGCTTCACT R AAACACTCTTAGTTCATCC	<sup>a</sup> TAHINA-7-104a	244	(ATA)11	59	F TGGCTATTATGGCAACG R TGGCAATCTAGTGAATGTC
<sup>a</sup> TAHINA-3-54.5*	220	(AT)21	55	F AAACACTCTTAGTTCATCC R CACGCCCAATATTAAAC	<sup>a</sup> TAHINA-7-104b*	239	(AT)29	52	F TGGCAATCTAGTGAATGTC R TTGGCAATCTAAAGGCAATGAC
<sup>a</sup> TAHINA-3-59	150	(TA)11	54	F ACGATTGTGTGCTATACAGTT R CACATATCCCATGATTAAAGCA	<sup>a</sup> TAHINA-8-2*	257	(TA)21	57	F AAGCTAACATATGGAATGTGAG R TGGTGGAGGATTTAGGGTTG
<sup>a</sup> TAHINA-3-110*	242	(AT)15	55	F AGAAGGACCAATCATGCG R GGCTGGATTGTGAGGATTT	<sup>a</sup> TAHINA-8-71a	238	(TA)11	52	F TCGAATCAATATGCAATATGCG R TCGAATCAATATGCAATATGCG
<sup>b</sup> TAHINA-3-123	244	(AAAT)11	55	F AGCAAAAGGGGTGTACATGCG R GGCTGGATTGTGAGGATTT	<sup>a</sup> TAHINA-8-71b*	195	(AT)12	55	F TCGAATCAATATGCAATATGCG R TCGAATCAATATGCAATATGCG
<sup>b</sup> TAHINA-3-133	189	(TAT)8	53	F AACCAGCAAAAGGAA R GAAATGGTTTACCAAAAGATGC	<sup>a</sup> TAHINA-9-0a	414	(AT)37	59	F TCCCAAGCTTTGGATTCG R TCCCAAGCTTTGGATTCG
<sup>b</sup> TAHINA-3-137	152	(AT)24	58	F CAAGTATATTTGGGAGCTG R GAAATGGTTTACCAAAAGATGC	<sup>a</sup> TAHINA-9-0b	232	(TA)21	52	F AAAGGTTCAAGAGGGAA R AAAGGTTCAAGAGGGAA
<sup>c</sup> TAHINA-3-141	221	(CT)5	55	F CAAGATGCTAGTCCATCTTC R TTGGCCATCACTCACTTC	<sup>a</sup> TAHINA-9-73*	222	(ATT)19	55	F AATCAACCTCTCACTCACT R GCAAGGCACTCACTCACT
<sup>a</sup> TAHINA-4-71.3	175	(TA)20	51	F AAGTTTGGCGAGGTTTG R TTGGCCATCACTCACTTC	<sup>a</sup> TAHINA-9-90	254	(AT)37	58	F CAATGGGAGGATCTCATC R GCAAGGCACTCACTCACT
<sup>b</sup> TAHINA-4-125*	166	(TA)13(KA)T15	55	F AAGTTTGGCGAGGTTTG R TTGGCCATCACTCACTTC	<sup>a</sup> TAHINA-11-45	189	(TA)22	54	F GTCACTGTGTTGATTCG R TCCCTTCTCACTTTTGG
<sup>c</sup> TAHINA-5-10	201	(TA)13(AT)18	58	F TTGTAGTCTGGAGTGTG R AAGCTATGATCTCAAGTGTG	<sup>b</sup> TAHINA-11-53.5*	236	(AT)17	52	F GAGAGGTACAAATATAGTCCAAA R AAGCTATGATCTCAAGTGTG
<sup>c</sup> TAHINA-5-51	192	(AT)24	59	F AAGCTATGATCTCAAGTGTG R TCAATGTAGACTTTAGGGTTC	<sup>a</sup> TAHINA-11-61	242	(TA)27(TT)17	53	F GATAGTATGATCTCAAGTGTG R AATTTTACGTATGCAATG
<sup>b</sup> TAHINA-5-60a	191	(AT)11	58	F AAGCTATGATCTCAAGTGTG R AAGGCAAGCCAGGAGGAA	<sup>a</sup> TAHINA-11-74	246	(TA)17(GA)9	60	F AATTTTACGTATGCAATG R AATTTTACGTATGCAATG
<sup>a</sup> TAHINA-5-60b*	242	(CA)6	58	F AAGCTATGATCTCAAGTGTG R AAGGCAAGCCAGGAGGAA	<sup>b</sup> TAHINA-11-76	312	(AT)25	58	F AATTTTACGTATGCAATG R AATTTTACGTATGCAATG
<sup>c</sup> TAHINA-5-77	154	(ACA)6	57	F AAGCTATGATCTCAAGTGTG R AAGGCAAGCCAGGAGGAA	<sup>a</sup> TAHINA-11-91a	198	(AT)13	59	F TAAAGCAATGCGGAGTGAAG R ACTTCAATGCGGAGTGAAG
<sup>b</sup> TAHINA-5-84a	202	(TA)7(GA)8(G)12	52	F AAGCTATGATCTCAAGTGTG R AAGGCAAGCCAGGAGGAA	<sup>a</sup> TAHINA-11-91b*	223	(A)12(GA)8(TA)4	56	F TAAAGCAATGCGGAGTGAAG R ACTTCAATGCGGAGTGAAG
<sup>b</sup> TAHINA-5-84b*	205	(TA)19	53	F AAGCTATGATCTCAAGTGTG R AAGGCAAGCCAGGAGGAA	<sup>a</sup> TAHINA-11-91.5	224	(CT)9(TA)6	59	F TAAAGCAATGCGGAGTGAAG R ACTTCAATGCGGAGTGAAG
<sup>a</sup> TAHINA-6-18.5	284	(ATA)8	52	F AAGCTATGATCTCAAGTGTG R AAGGCAAGCCAGGAGGAA	<sup>a</sup> TAHINA-12-12.5b	227	(AT)22	58	F TAAAGCAATGCGGAGTGAAG R ACTTCAATGCGGAGTGAAG
<sup>a</sup> TAHINA-6-59	250	(AT)15	53	F AAGCTATGATCTCAAGTGTG R AAGGCAAGCCAGGAGGAA	<sup>a</sup> TAHINA-12-12.5b	262	(TA)11(KA)6	52	F TAAAGCAATGCGGAGTGAAG R ACTTCAATGCGGAGTGAAG
<sup>b</sup> TAHINA-6-69	168	(AT)18	59	F AAGCTATGATCTCAAGTGTG R AAGGCAAGCCAGGAGGAA	<sup>a</sup> TAHINA-12-39	192	(TTA)26	59	F TAAAGCAATGCGGAGTGAAG R ACTTCAATGCGGAGTGAAG
<sup>a</sup> TAHINA-6-74*	248	(CA)11(TA)5(CA)1(KA)2	55	F AAGCTATGATCTCAAGTGTG R AAGGCAAGCCAGGAGGAA	<sup>a</sup> TAHINA-12-71	236	(AT)35	58	F TAAAGCAATGCGGAGTGAAG R ACTTCAATGCGGAGTGAAG
<sup>a</sup> TAHINA-6-85	229	(AT)19	55	F AAGCTATGATCTCAAGTGTG R AAGGCAAGCCAGGAGGAA	<sup>b</sup> TAHINA-12-85.7	338	(TA)10(A)9	58	F TAAAGCAATGCGGAGTGAAG R ACTTCAATGCGGAGTGAAG
<sup>a</sup> TAHINA-6-92.5	287	(AT)27	59	F AAGCTATGATCTCAAGTGTG R AAGGCAAGCCAGGAGGAA	<sup>a</sup> TAHINA-12-97*	197	(AA)17	54	F TAAAGCAATGCGGAGTGAAG R ACTTCAATGCGGAGTGAAG
<sup>a</sup> TAHINA-7-43	247	(AT)23	60	F AAGCTATGATCTCAAGTGTG R AAGGCAAGCCAGGAGGAA	<sup>a</sup> TAHINA-12-116	209	(TA)19(GA)8	58	F TAAAGCAATGCGGAGTGAAG R ACTTCAATGCGGAGTGAAG
<sup>b</sup> TAHINA-7-63.5a	250	(TA)29	59	F AAGCTATGATCTCAAGTGTG R AAGGCAAGCCAGGAGGAA	<sup>b</sup> TAHINA-12-120	150	(AT)36	59	F TAAAGCAATGCGGAGTGAAG R ACTTCAATGCGGAGTGAAG

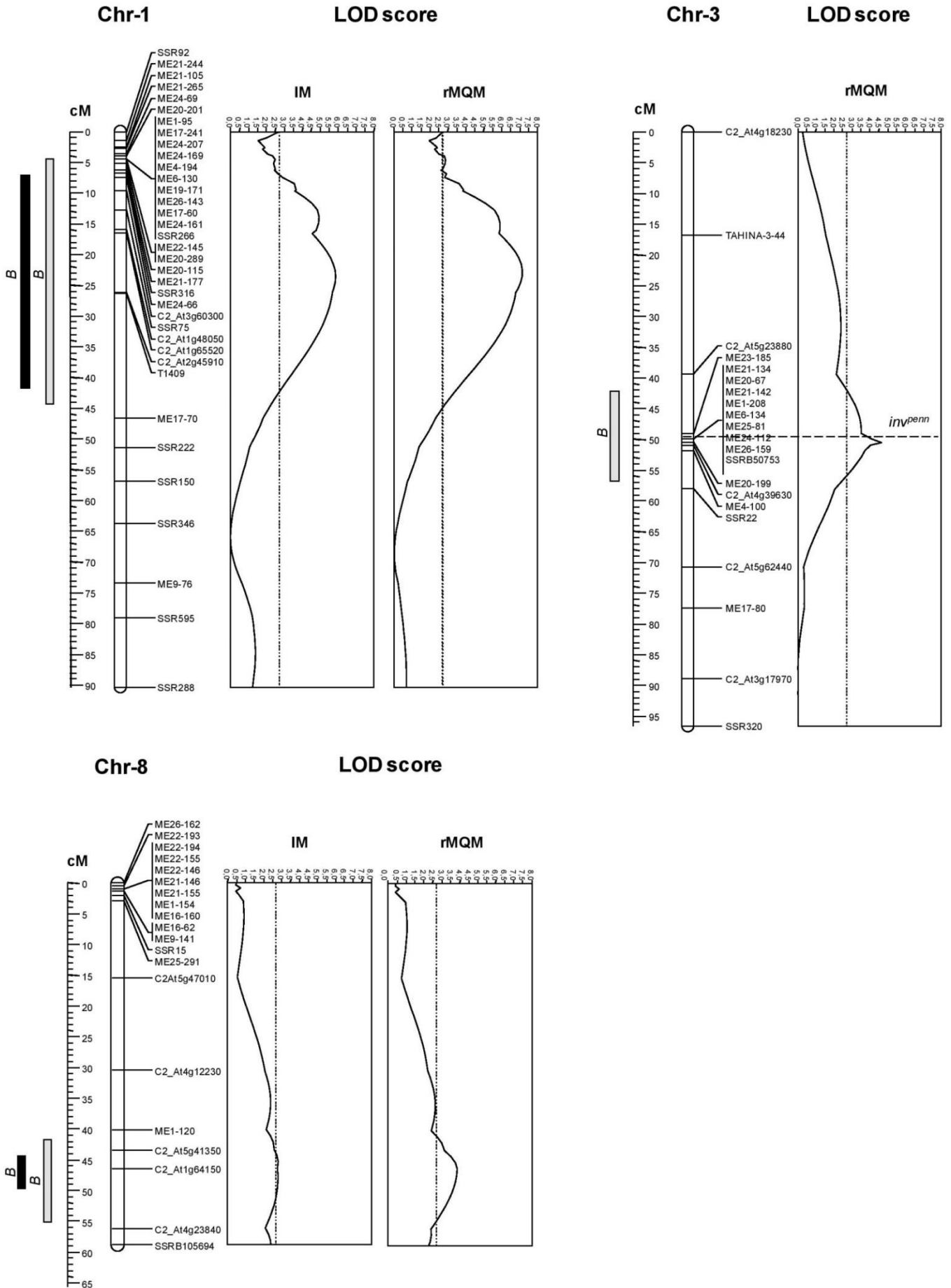
<sup>1</sup> Name is composed by the word TAHINA followed by the number of chromosome and the BAC position  
<sup>2</sup> PstI predicted band sizes for 3.1Kbpc fragment  
<sup>3</sup> Number indicates motif repetitions  
<sup>4</sup> Annealing temperature  
<sup>a</sup> Codominant polymorphic markers  
<sup>b</sup> Dominant polymorphic markers  
<sup>c</sup> Monomorphic markers  
<sup>d</sup> Multiple bands  
<sup>e</sup> No amplification  
<sup>\*</sup> Designed by "Aproximación de la variabilidad extrapoblacional en la especie del tomate "COMAV" research group"

**Additional file 3. Genetic location and LOD score profile of the F<sub>2</sub>-QTLs for regeneration components detected by Interval Mapping on chromosome 7 (*SpRg-7*).** Genetic location and LOD score profile of the F<sub>2</sub>-QTLs for regeneration components (Bud percentage (B), Regeneration percentage (R) and Productivity Rate (PR)). On the left, projections of QTLs as black bars indicate the *SpRg-7* for B, R and PR traits. The vertical dotted line indicates the 95% significant threshold value for declaring a QTL (B LOD threshold = 3.7) (R LOD threshold = 3.6) (PR LOD threshold = 4.4). Map position (cM) and distances are based on the genetic linkage map developed in this study. QTLs characteristics in attached table.



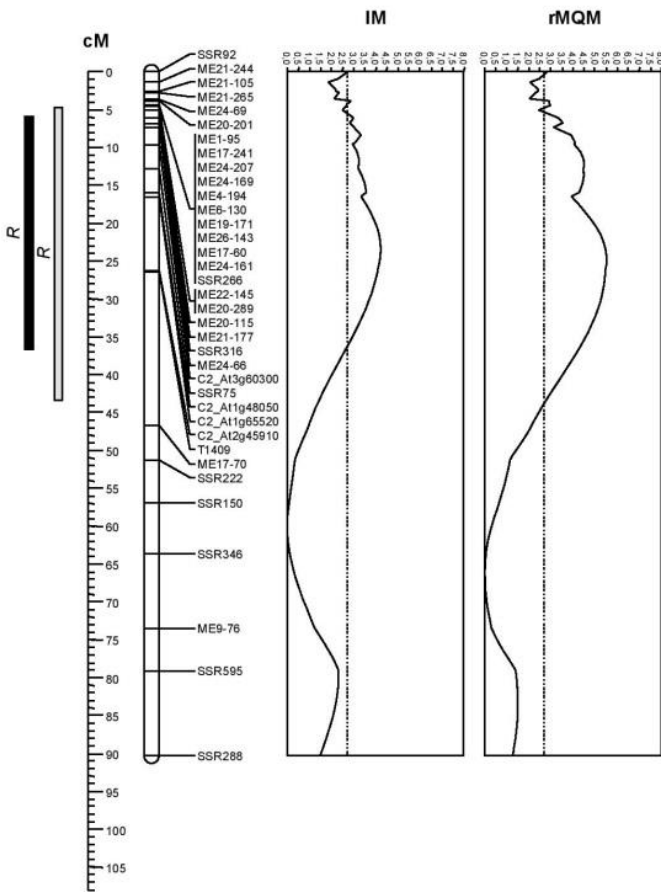
\* In case of the absence of a peak marker, loci flanking the likely peak of a QTL are shown.

**Additional file 4. Genetic location and LOD score profile of the BC<sub>1</sub>-QTLs for Bud percentage (B), detected on chromosomes 1 (*SpRg-1*), 3 (*SpRg-3*) and 8 (*SIRg-8*).** Results from the Interval Mapping (IM) and restricted Multiple QTL Mapping (rMQM) approaches. On the left, projections as black bars (IM) and grey bars (rMQM) indicate the range of *SpRg-1*, *SpRg-3* and *SIRg-8* QTLs for B. The vertical dotted line indicates the 95% significant threshold value for declaring a QTL (B LOD threshold = 2.7). The horizontal dotted line indicates the position of the acid invertase gene (*inv<sup>pen</sup>*) marker included in the chromosome 3 QTL range. Map position (cM) and distances are based on the genetic linkage map developed in this study.

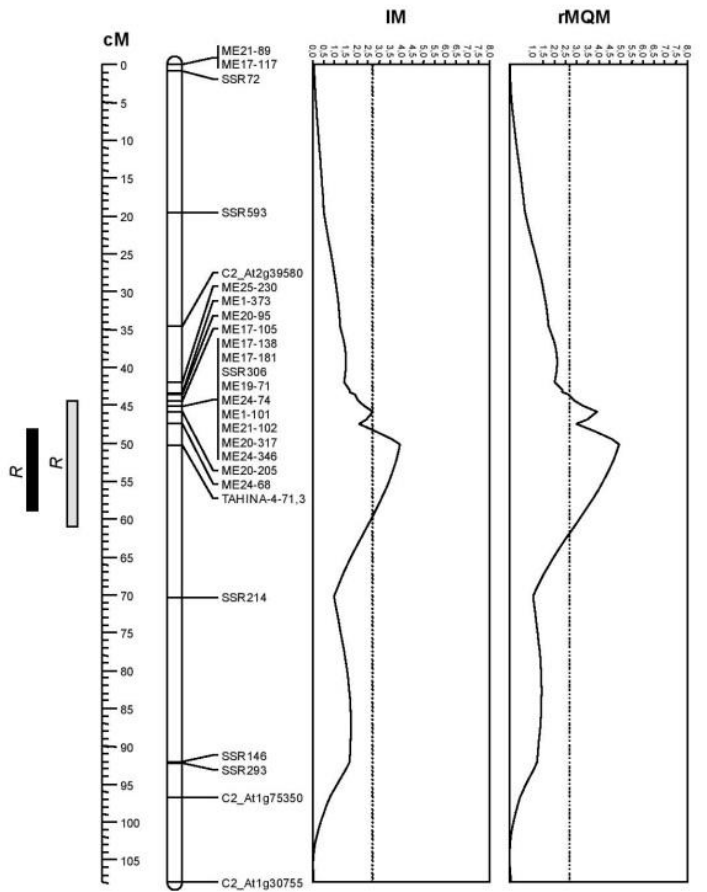


**Additional file 5. Genetic location and LOD score profile of the BC<sub>1</sub>-QTLs for Regeneration percentage (R), detected in this study on chromosomes 1 (*SpRg-1*), 4 (*SpRg-4a*), 7 (*SpRg-7*) and 8 (*SIRg-8*).** Results from the Interval Mapping (IM) and restricted Multiple QTL Mapping (rMQM) approaches. On the left, projections as black bars (IM) and grey bars (rMQM) indicate the range of *SpRg-1*, *SpRg-4a*, *SpRg-7* and *SIRg-8* QTLs for R. The vertical dotted line indicates the 95% significant threshold value for declaring a QTL (R LOD threshold = 2.7). Map position (cM) and distances are based on the genetic linkage map developed in this study.

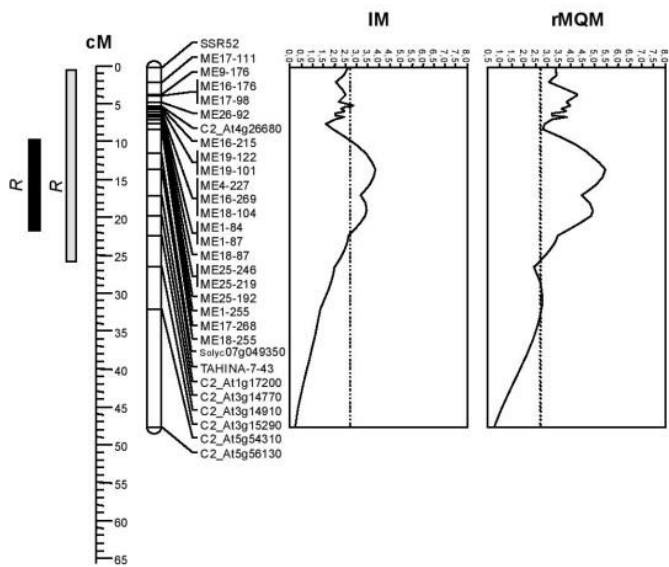
**Chr-1 LOD score**



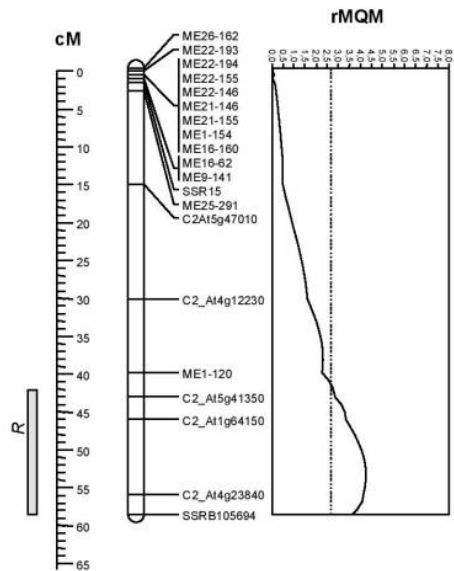
**Chr-4 LOD score**



**Chr-7 LOD score**



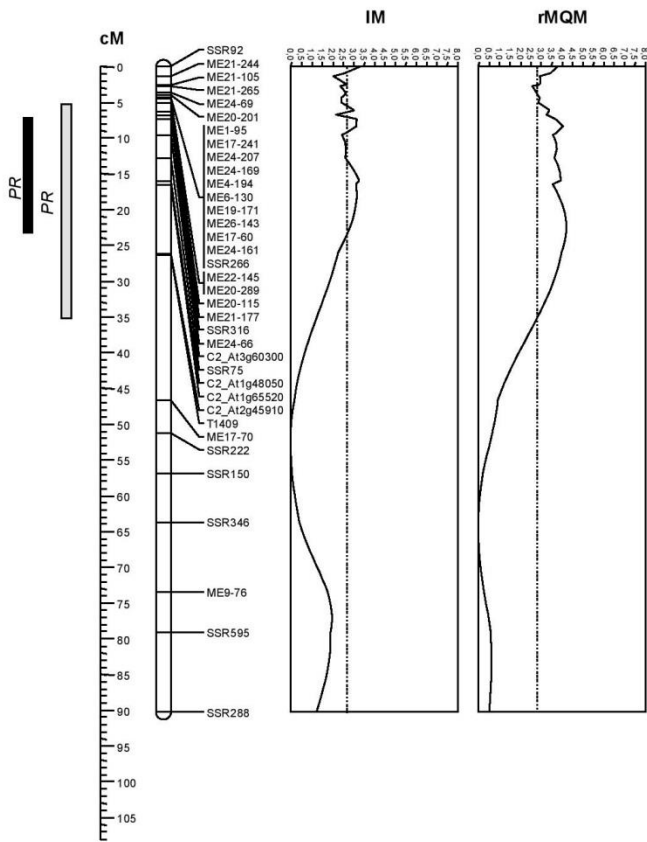
**Chr-8 LOD score**



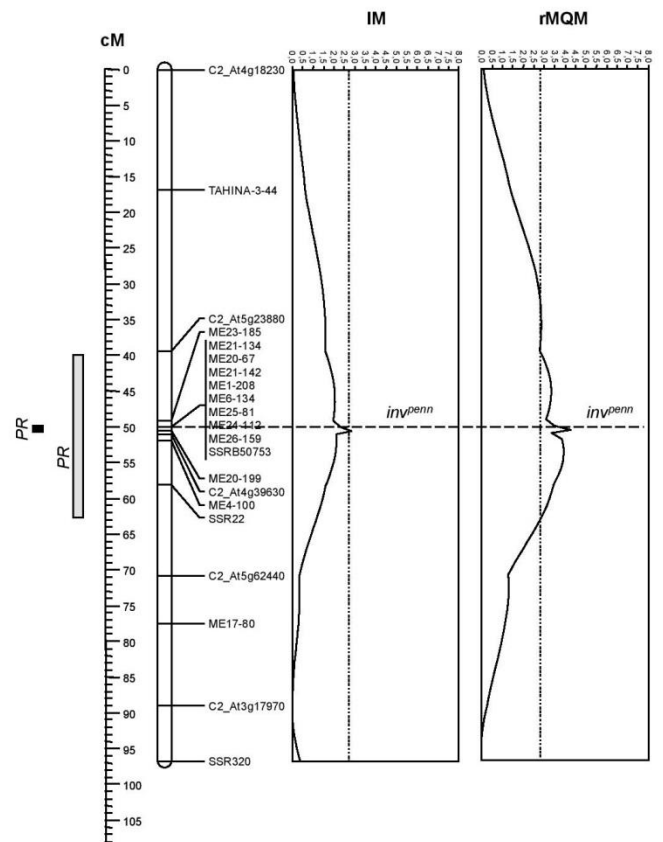


**Additional file 6. Genetic location and LOD score profile of the BC<sub>1</sub>-QTLs for Productivity Rate (PR), detected in this study on chromosomes 1 (*SpRg-1*), 3 (*SpRg-3*), 4 (*SpRg-4b*) and 7 (*SpRg-7*).** Results from the Interval Mapping (IM) and restricted Multiple QTL Mapping (rMQM) approaches. On the left, projections as black bars (IM) and grey bars (rMQM) indicate the range of *SpRg-1*, *SpRg-3*, *SpRg-4b* and *SpRg-7* for PR. The vertical dotted line indicates the 95% significant threshold value for declaring a QTL (PR LOD threshold = 2.8). Horizontal dotted lines indicate the position of the acid invertase gene (*inv<sup>penm</sup>*) marker included in the chromosome 3 QTL range. Map position (cM) and distances are based on the genetic linkage map developed in this study.

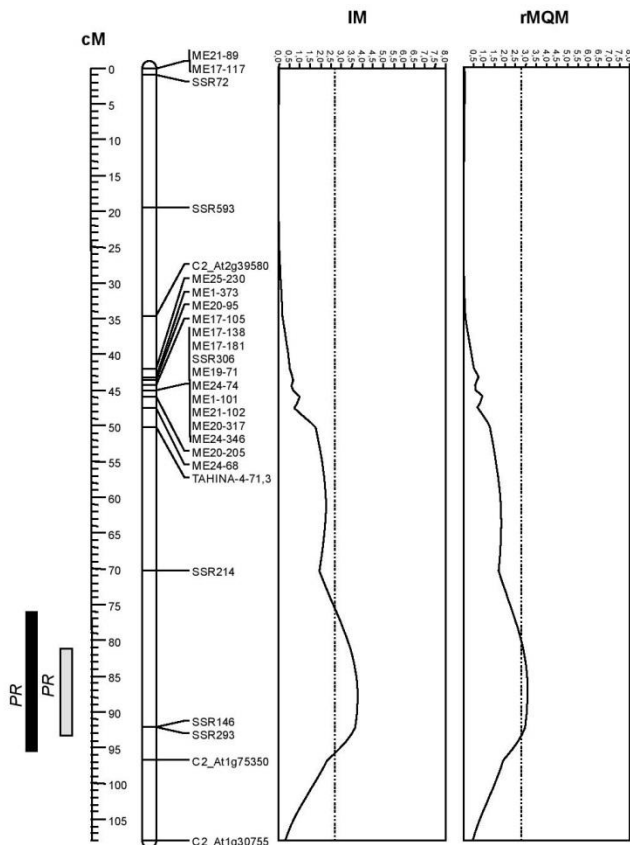
**Chr-1 LOD score**



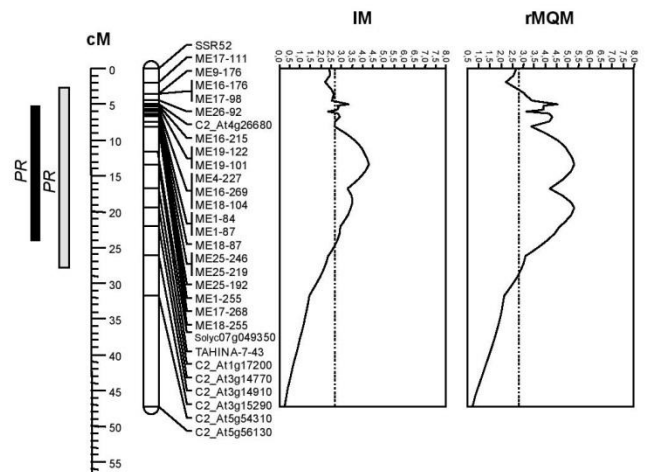
**Chr-3 LOD score**



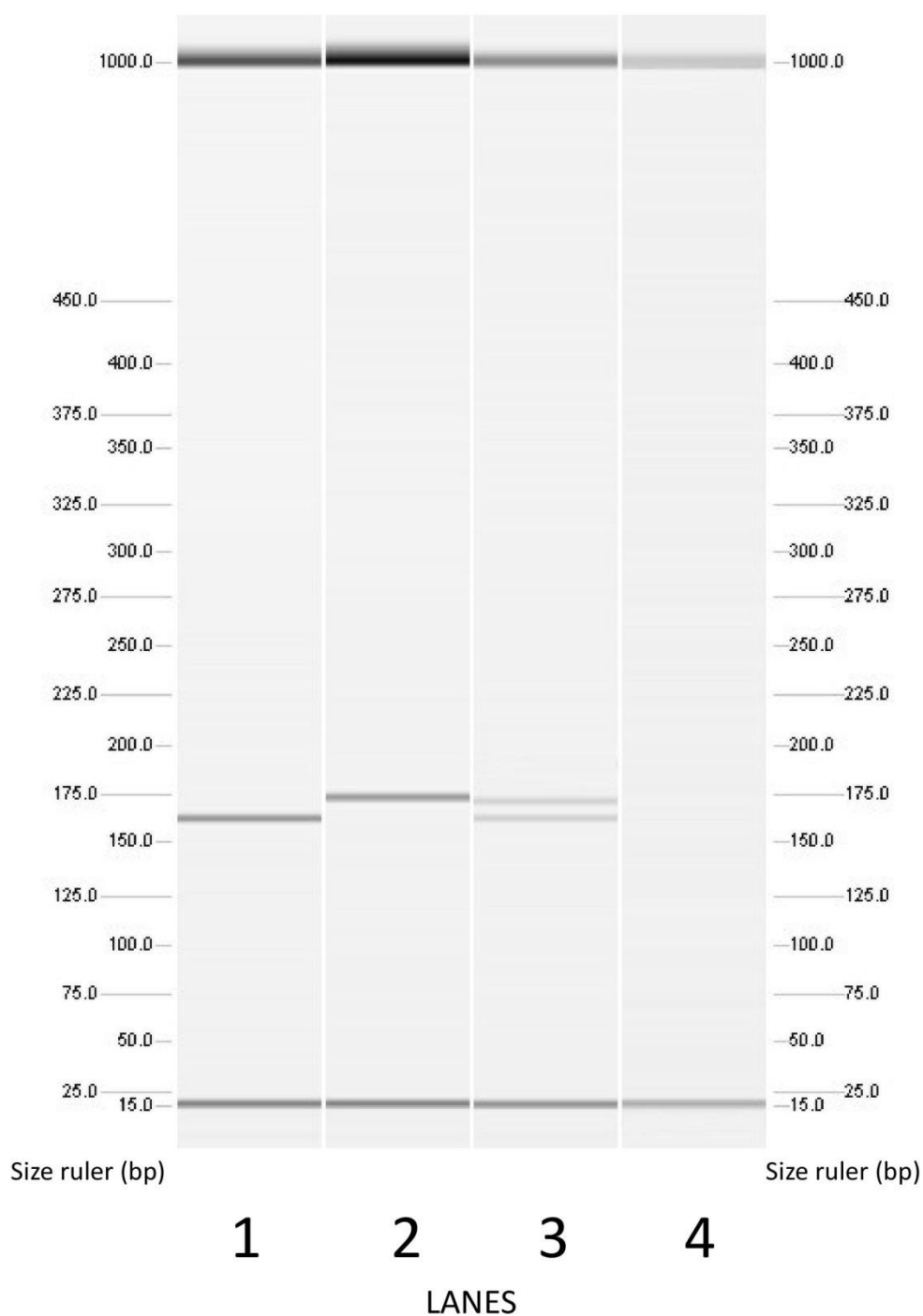
**Chr-4 LOD score**



**Chr-7 LOD score**



**Additional file 7. Polymorphic acid invertase gene marker (*inv<sup>penn</sup>*).** Amplified bands separated using the multicapillary electrophoresis QIAxcel System. Lane 1: *S. lycopersicum* L. (An127), band size (~162bp). Lane 2: *S. pennellii* PE-47, band size (~173bp). Lane 3: F<sub>1</sub> Hybrid *S. lycopersicum* L. (An127) × *S. pennellii* PE-47, both bands (~162bp~173bp). Lane 4: negative control.



III. Publicaciones

**Additional file 8. Markers used for genotyping the F<sub>2</sub> and BC<sub>1</sub> population. SSR, COS, COSII, CAP markers used for genotyping the F<sub>2</sub> and BC<sub>1</sub> population.**

Chr	SSR		COSII		COS		CAP	
	F <sub>2</sub>	BC <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	BC <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	BC <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	BC <sub>1</sub>
1	SSR92; SSR266; SSR316; SSR75; SSR222; SSR150; SSR288	SSR92; SSR266; SSR316; SSR75; SSR222; SSR150; SSR346; SSR595; SSR288	C2_A12g45910	C2_A13g60300; C2_A11g48050; C2_A11g65520; C2_A12g45910		T1409		
2	SSR586; SSR356; SSR5; SSR26; TAHINA-2-118; TAHINA-2-139,5b	SSR586; SSR66; SSR5; SSR26; TAHINA-2-118; TAHINA-2-139,5b						
3	TAHINA-3-30; SSR22; SSR320; SSR601	TAHINA-3-44; SSRB50753; SSR22; SSR320	C2_A44g18230; C2_A15g62440; C2_A13g17970	C2_A44g18230; C2_A15g23880; C2_A44g59530; C2_A15g62440; C2_A13g17970				
4	SSR72; SSR593; SSR306; TAHINA-4-71.3; SSR214; SSR214; SSR293	SSR72; SSR593; SSR306; TAHINA-4-71.3; SSR214; SSR146; SSR293	C2_A11g30755	C2_A12g39580; C2_A11g75350; C2_A11g30755				
5	SSR325; SSR602; SSR115; TAHINA-5-60b; SSR49; SSRB18031	SSR325; SSR602; SSR115; SSR49; SSRB18031	C2_A11g60440; C2_A13g26085; C2_A11g10500	C2_A44g24830; C2_A13g26085; C2_A11g10500		T0507	T0507	
6	SSR48; SSR578	SSR48; SSR578	C2_A15g62530; C2_A11g12060; C2_A11g18640; C2_A44g03180	C2_A15g62530; C2_A11g12060; C2_A11g18640; C2_A44g03180		T0507	T0507	
7	SSR52; SSR304; TAHINA-7-43; TAHINA-7-73	SSR52; TAHINA-7-43	C2_A12g26590; C2_A44g26680; C2_A11g17200; C2_A13g14770; C2_A13g15290; C2_A15g54310; C2_A15g56130	C2_A44g26680; C2_A11g17200; C2_A13g14770; C2_A13g14910; C2_A13g15290; C2_A15g54310; C2_A15g56130		T1651	Solyc07g049350	Solyc07g049350
8	SSR15; TAHINA-6-74; SSR63; SSRB105694	SSR15; SSRB105694	C2_A11g18480; C2_A15g47010	C2_A15g47010; C2_A14g12230; C2_A15g41350; C2_A11g64150; C2_A14g23840				
9	SSR73; SSR383; TAHINA-9-90; SSR599	SSR73; SSR383; TAHINA-9-90; SSR599	C2_A15g02740; C2_A11g07310	C2_A15g02740; C2_A11g07310				
10	SSRB102358; SSR248; SSR85; SSR223	SSR85; SSR223	C2_A15g60990; C2_A44g04930	C2_A14g04930			TG230; TG303; TG233	TG233
11	SSR136; SSR80; SSR46; TAHINA-11-61	SSR136	C2_A12g22570; C2_A15g20890; C2_A12g28490; C2_A15g59960	C2_A12g22570; C2_A15g20890; C2_A12g28490; C2_A15g59960				
12	TAHINA-12-12,5a; TAHINA-12-39	TAHINA-12-12,5a; TAHINA-12-39	C2_A13g25910; C2_A11g06550; C2_A13g24490; C2_A12g25740; C2_A11g48300; C2_A15g21170	C2_A13g25910; C2_A11g06550; C2_A12g25740; C2_A11g48300; C2_A15g21170		T0801	T0801	

## References

- Banno H, Ikeda Y, Niu QW, Chua NH: **Overexpression of Arabidopsis *ESR1* induces initiation of shoot regeneration.** *Plant Cell* 2001, 12: 2609-2618.
- Ben Amer IM, Korzun V, Worland AJ, Börner A: **Genetic mapping of QTLs controlling tissue-culture response on chromosome 2B of wheat (*Triticum aestivum* L.) in relation to major genes and RFLP markers.** *Theor Appl Genet* 1997, 94: 1047-1052.
- Benson EE: **Special symposium: In vitro plant recalcitrance: An introduction.** *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 2000, 36: 141-148.
- Bhatia P, Ashwath N, Senaratna T, David M: **Tissue culture studies of tomato (*Lycopersicon esculentum*).** *Plant Cell Tissue Organ Cult* 2004, 78: 1-21.
- Bielenberg DG, Wang Y, Li Z, Zhebentyayeva T, Fan S, Reighard GL, et al.: **Sequencing and annotation of the evergrowing locus in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] reveals a cluster of six MADS-box transcription factors as candidate genes for regulation of terminal bud formation.** *Tree Genet Genomes* 2008, 4(3): 495-507.
- Bolibok H, Rakoczy-Trojanowska M: **Genetic mapping of QTLs for tissue-culture response in plants.** *Euphytica* 2006, 149: 73-83.
- Chaerani R, Smulders MJ, van der Linden CG, Vosman B, Stam P, Voorrips RE: **QTL identification for early blight resistance (*Alternaria solani*) in a *Solanum lycopersicum* x *S. arcanum* cross.** *Theor Appl Genet* 2006, 114: 439-450.
- de Vicente MC, Tanksley SD: **QTL analysis of transgressive segregation in an interspecific tomato cross.** *Genetics* 1993, 134: 585-596.
- Doyle JJ, Doyle JL: **Isolation of plant DNA from fresh tissue.** *Focus* 1990, 12: 13-15.

- Engelmann F: **In vitro conservation of tropical plant germplasm.** Euphytica 1991, 57: 227-243.
- Eshed Y, Abu-Abied M, Saranga Y, Zamir D: ***Lycopersicon esculentum* lines containing small overlapping introgressions from *L. pennellii*.** Theor Appl Genet 1992, 83: 1027-1034.
- Faria RT, Destro D, Bessalho JC, Illg RD: **Introgression of in vitro regeneration capability of *Lycopersicon pimpinellifolium* Mill. into recalcitrant tomato cultivars.** Euphytica 2002, 124: 59-63.
- Faria RT, Illg RD: **Inheritance of in vitro plant regeneration ability in the tomato.** Braz J Genet 1996, 19: 113-116.
- Flores Berrios E, Gentzbittel L, Mokrani L, Alibert G, Sarrafi A: **Genetic control of early events in protoplast division and regeneration pathways in sunflower.** Theor Appl Genet 2000, 101: 606-612.
- Frary A, Earle ED: **An examination of factors affecting the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato.** Plant Cell Rep 1996, 16: 235-240.
- Frary A, Xu Y, Liu J, Mitchell S, Tedeschi E, Tanksley S: **Development of a set of PCR-based anchor markers encompassing the tomato genome and evaluation of their usefulness for genetics and breeding experiments.** Theor Appl Genet 2005, 111: 291-312.
- Fulton TM, Van der Hoeven R, Eannetta NT, Tanksley SD: **Identification, analysis and utilization of a conserved ortholog set markers for comparative genomics in Higher Plants.** Plant Cell 2002, 14: 1457-1467.

- Gisbert C, Arrillaga I, Roig LA, Moreno V: **Adquisition of a collection of *Lycopersicon pennellii* (Corr. D'Arcy) transgenic plants with *uidA* and *nptII* marker genes.** J Hortic Sci Biotechnol 1999, 74(1): 105-109.
- Hamza S, Chupeau Y: **Re-evaluation of conditions for plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation from tomato (*Lycopersicon esculentum*).** J Exp Bot 1993, 44: 1837-1845.
- Harada S, Fukuta S, Tanaka H, Ishiguro Y, Sato T: **Genetic analysis of the trait of sucrose accumulation in tomato fruit using molecular marker.** Breeding Sci 1995, 45: 429-434.
- Hemerly AS, Ferreira P, de Almeida Engler J, Van Montagu M, Engler G, Inze D: ***cdc2a* expression in *Arabidopsis* is linked with competence for cell division.** Plant Cell 1993, 5: 1711-1723.
- Ikeda Y, Banno H, Niu QW, Howell SH, Chua NH: **The *ENHANCER OF SHOOT REGENERATION 2* gene in *Arabidopsis* Regulates *CUP-SHAPED COTYLEDON 1* at the transcriptional level and controls cotyledon development.** Plant Cell Physiol 2006, 47: 1443-1456.
- Inoue T, Higuchi M, Hashimoto Y, Seki M, Kobayashi M, Kato T, Tabata S, Shinozaki K, Kakimoto T: **Identification of *CRE1* as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*.** Nature 2001, 409: 1060-1063.
- Komatsuda T, Annaka T, Oka S: **Genetic mapping of a quantitative trait locus (QTL) that enhances the shoot differentiation rate in *Hordeum vulgare* L.** Theor Appl Genet 1993, 86: 713-720.
- Koornneef M, Hanhart CJ, Martinelli L: **A genetic analysis of cell culture traits in tomato.** Theor Appl Genet 1987, 74: 633-641.

- Koornneef M, Bade J, Hanhart C, Horsman K, Schel J, Soppe W, Vekerk R, Zabel P: **Characterization and mapping of a gene controlling shoot regeneration in tomato.** *Plant J* 1993, 3: 131-141.
- Marchionni BE, Pratta GR, Zorzoli R: **Genetic analysis of the in vitro culture response in tomato.** *Plant Cell Tissue Organ Cult* 2007, 88: 233-239.
- Mase H, Hashiba M, Matsuo N, Banno H: **Expression patterns of Arabidopsis ERF VIII-b subgroup genes during in vitro shoot regeneration and effects of their overexpression on shoot regeneration efficiency.** *Plant Biotechnol* 2007, 24: 481-486.
- Molina RV, Nuez F: **Respuesta correlacionada de la capacidad de regeneración en distintos tipos de explante en *Cucumis melo*.** *Actas Horticultura* 1989, 3: 111-118.
- Molina RV, Nuez F: **Correlated response of in vitro regeneration capacity from different source of explants in *Cucumis melo*.** *Plant Cell Rep* 1995, 15: 129-132.
- Molina RV, Nuez F: **Sexual transmission of the in vitro regeneration capacity via caulogenesis of *Cucumis melo L.* in a medium with a high auxin/cytokinin ratio.** *Sci Hortic* 1997, 70: 237-241.
- Mueller LA, Solow TH, Taylor N, Skwarecki B, Buels R, Binns J, et al.: **The SOL Genomics Network: a comparative resource for Solanaceae biology and beyond.** *Plant Physiol* 2005, 138: 1310-1317.
- Murashige T, Skoog F: **A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures.** *Physiol Plant* 1962, 15: 473-497.
- Nishimura C, Ohashi Y, Sato S, Kato T, Tabata S, Ueguchi C: **Genetic analysis of Arabidopsis histidine kinase genes encoding cytokinin receptors reveals**



- their overlapping biological functions in the regulation of shoot and root growth in *Arabidopsis thaliana*.** Plant Cell 2004, 16: 1365-1377
- Peres LEP, Morgante PG, Vecchi C, Kraus JE, Sluys MAV: **Shoot regeneration capacity from roots and transgenic hairy roots of tomato cultivars and wild related species.** Plant Cell Tissue Organ Cult 2001, 65: 37-44.
- Prakash AP, Kumar PP: ***PkMADS1* is a novel MADS box gene regulating adventitious shoot induction and vegetative shoot development in *Paulownia kawakamii*.** Plant J 2002, 29: 141-151.
- Pratta G, Cánepa LN, Zorzoli R, Picardi LA: **Diallel analysis of in vitro culture traits in the genus *Lycopersicon*.** HortScience 2003, 38: 110-112.
- Rozen S, Skaletsky HJ: **Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers.** In Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Edited by Krawetz S, Misener S. Totowa, NJ: Humana Press; 2000: 365-386.
- Satoh H, Takashina T, Escalante A, Egashira H, Imanishi S: **Molecular markers mapped around the high shoot regeneration capacity gene *Rg-2* in *Lycopersicon chilense*.** Breed Sci 2000, 50(4): 251-256.
- Schiantarelli E, De La Pena A, Candela M: **Use of recombinant inbred lines (RILs) to identify, locate and map major genes and quantitative trait loci involved with in vitro regeneration ability in *Arabidopsis thaliana*.** Theor Appl Genet 2001, 102: 335-341.
- Schuelke M: **An economic method for the fluorescent labelling of PCR fragments.** Nature Biotechnology 2000, 18: 233-234.
- Shirasawa K, Asamizu E, Fukuoka H, Ohyama A, Sato S, Nakamura Y, Tabata S, Sasamoto S, Wada T, Kishida Y: **An interspecific linkage map of SSR and**

- intronic polymorphism markers in tomato.** Theor Appl Genet 2010, 121: 731-739.
- Skoog F, Miller CO: **Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures in vitro.** Symp Soc Exp Biol 1957, 11: 118-131.
- Sugiyama M: **Organogenesis in vitro.** Curr Opin Plant Biol 1999, 2:61-64.
- Taguchi-Shiobara F, Lin SY, Tanno K, Komatsuda T, Yano M, Sasaki T, Oka S: **Mapping quantitative trait loci associated with regeneration ability of seed callus in rice, *Oryza sativa* L.** Theor Appl Genet 1997, 95: 828-833.
- Takashina T, Suzuki T, Egashira H, Imanishi S: **New molecular markers linked with the high shoot regeneration capacity of the wild tomato species *Lycopersicon chilense*.** Breed Sci 1998, 48: 109-113.
- Torelli A, Soragni E, Bolchi A, Petrucco S: **New potential markers of in vitro tomato morphogenesis identified by mRNA differential display.** Plant Mol Biol 1996, 32: 891-900.
- Torelli A, Soragni E, Borinato M, Branca C: **The expression of *LESKI* morphogenetic marker along the tomato hypocotyl axis is linked to a position-dependent competence for shoot regeneration.** Plant Sci 2004a, 166(1): 179-190.
- Torelli A, Borinato M, Soragni E, Bolpagni R, Bottura C, Branca C: **The delay in hormonal treatment modulates the expression of *LESKI*, a gene encoding a putative serine-threonine kinase, marker of in vitro caulogenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.).** Plant Sci 2004b, 167(3): 607-620.

- Ueguchi C, Sato S, Kato T, Tabata S: **The AHK4 gene involved in the cytokinin-signalling pathway as a direct receptor molecule in *Arabidopsis thaliana*.** Plant and Cell Physiology 2001, 42: 751-755.
- Van Ooijen JW: **JoinMap 4, Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations.** Wageningen, Netherlands: Kyazma BV; 2006.
- Van Ooijen JW: **MapQTL ® 6, Software for the mapping of quantitative trait loci in experimental populations of diploid species.** Wageningen, Netherlands: Kyazma BV; 2009.
- Voorrips RE: **MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs.** J Hered 2002, 93(1): 77-78.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, et al.: **AFLP: a new technique for DNA fingerprinting.** Nucleic Acids Res 1995, 23(21): 4407-4414.
- Wijbrandi J, Vos JGM, Koornneef M: **Transfer of regeneration capacity from *Lycopersicon peruvianum* to *L. esculentum* by protoplast fusion.** Plant Cell Tissue Organ Cult 1988, 12: 193-196.
- Wu F, Mueller LA, Crouzillat D, Petiard V, Tanksley SD: **Combining Bioinformatics and Phylogenetics to Identify Large Sets of Single Copy, Orthologous Genes (COSII) for Comparative, Evolutionary and Systematics Studies: A Test Case in the Euasterid Plant Clade.** Genetics 2006, 174(3): 1407-1420.
- Zhang L, Wang S, Li H, Deng Q, Zheng A, Li S, Li P, Li Z, Wang J: **Effects of missing marker and segregation distortion on QTL mapping in F<sub>2</sub> populations.** Theor Appl Genet 2010, 121: 1071-1082.
- Zhang S, Lemaux PG: **Molecular analysis of in vitro shoot organogenesis.** Crit Rev Plant Sci 2004, 23: 325-335.



## **The influence of ethylene and ethylene modulators on shoot organogenesis in tomato**

Trujillo-Moya C, Gisbert C: **The influence of ethylene and ethylene modulators on shoot organogenesis in tomato.** Plant Cell, Tissue and Organ Culture 2012, 111:41-48, doi: 10.1007/s11240-012-0168-z.



**Abstract**

The influence of ethylene and ethylene modulators on the in vitro organogenesis of tomato was studied using a highly regenerating accession of the wild tomato *Solanum pennellii* and an F<sub>1</sub> plant resulting from a cross between *Solanum pennellii* and *Solanum lycopersicum* cv. An127, which is known to have a low regeneration frequency. Four ethylene-modulating compounds, each at four levels, were used, namely: cobalt chloride (CoCl<sub>2</sub>), which inhibits the production of ethylene; AgNO<sub>3</sub> (SN), which inhibits ethylene action; and Ethephon and the precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), which both promote ethylene synthesis. Leaf explants of each genotype were incubated on shoot induction medium supplemented with each of these compounds at 0, 10 or 15 days following bud induction. The results obtained in our assays indicate that ethylene has a significant influence on tomato organogenesis. Concentrations of ethylene lower than the optimum (according to genotype) at the beginning of the culture may decrease the percentage of explants with buds (B), produce a delay in their appearance, or indeed inhibit bud formation. This was observed in *S. pennellii* and the F<sub>1</sub> explants cultured on media with SN (5.8–58.0 μM) as well as in the F<sub>1</sub> explants cultured on medium with 21.0 μM CoCl<sub>2</sub>. The percentage of explants with shoots (R) and the mean number of shoots per explant with shoots (PR) also diminished in media that contained SN. Shoots isolated from these explants were less developed compared to those isolated from control explants. On the other hand, ethylene supplementation may contribute to enhancing shoot development. The number of isolable shoots from *S. pennellii* explants doubled in media with ACC (9.8–98.0 μM). Shoots isolated from explants treated with ethylene releasing compounds showed a higher number of nodes when ACC and Ethephon were added at 10 days (in F<sub>1</sub> explants) or at 15 days (in *S. pennellii*) after the beginning of culture. Thus, the

importance of studying not only the concentration but also the timing of the application of regulators when developing regeneration protocols has been made manifest. An excess of ethylene supplementation may produce an inhibitory effect, as was observed when using Ethephon (17.2–69.0  $\mu\text{M}$ ). These results show the involvement of ethylene in tomato organogenesis and lead us to believe that ethylene supplementation may contribute to enhancing regeneration and shoot development in tomato.

**Keywords** Organogenesis · ACC ·  $\text{AgNO}_3$  ·  $\text{CoCl}_2$  · Ethephon

#### **Abbreviation**

ACC:1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid

BM: Murashige and Skoog basal medium (1962)

$\text{CoCl}_2$ :Cobalt chloride

Ethephon: 2-chloroethanephosphonic acid

SN: Silver nitrate ( $\text{AgNO}_3$ )

SIM: Shoot induction medium

#### **Introduction**

The regeneration of in vitro-cultured explants is required for various in vitro culture techniques (transformation, protoplast fusion, etc.) and has been described for a large number of crops (Brown and Thorpe 1995). Even though many studies have been carried out in order to improve our understanding of the metabolic processes related to regeneration, the standardization of the conditions for in vitro plant regeneration is still an empirical process (Devi et al. 2008). Successful regeneration depends on the nutrient medium, the concentration and combination of growth regulators, the light and temperature regimes in the growth chamber and the genotype and explant type (Bhatia



et al. 2004, 2005). In addition to auxin and cytokinin, which take part in in vitro morphogenesis, there is considerable evidence that ethylene also plays an important role in this process (Reviewed Biddington 1992; Moshkov et al. 2008).

Ethylene is the only gaseous plant hormone and may be produced endogenously and/or as the consequence of explant isolation (Kumar et al. 1998; Moshkov et al. 2008). Moreover, exogenous auxin and cytokinin, which are used to induce shoots, have been shown to stimulate ethylene production by inducing (reviewed Tsuchisaka and Theologis 2004) or modifying (Vogel et al. 1998) specific biosynthetic enzymes. The manipulation of the ethylene levels in different in vitro systems has revealed that the hormone has the potential to both inhibit (Mohiuddin et al. 1997) or enhance (Dimasi-Theriou and Economou 1995) shoot organogenesis depending on the species, genotype, tissue, culture system and the presence of other plant growth regulators (Biddington 1992; Kumar et al. 1998; Moshkov et al. 2008; Dias et al. 2009; Ptak et al. 2010). In tomato (*Solanum lycopersicum* L.), organogenesis is the most common regeneration pathway and is strongly influenced by genotype, culture media and culture conditions (Bhatia et al. 2005). Even though regeneration in tomato has been a frequent subject of research due to the commercial value of the crop, little is known about the influence of ethylene on organogenesis. To the best of our knowledge, only two reports have focused on the effect of this hormone: Lima et al. (2009) reported that ethylene is essential for callus formation in Micro-Tom tomato root explants carrying the high-regeneration Rg-1 gene, and Osman and Khalafalla (2010) found that silver nitrate (SN) and cobalt chloride (CoCl<sub>2</sub>), both at a unique concentration of those experimentally tested, enhanced the number of shoots per explant in *S. lycopersicum* cv. Omdurman.

The aim of this study is to investigate the influence of ethylene releasing and inhibiting compounds on shoot organogenesis in tomato. For this purpose we tested four

ethylene-modulating compounds, each at four concentrations, namely  $\text{CoCl}_2$ , which inhibits the production of ethylene, SN, which inhibits ethylene action and Ethephon and the precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), which both promote ethylene synthesis. The effects of adding these compounds prior to or following bud induction (at 10 or 15 day) were also studied. The plant materials used in this work are well-characterized tomato genotypes that presented different organogenesis responses. The *S. pennellii* accession has a high regeneration potential (Gisbert et al. 1999). The  $F_1$  genotype is obtained by crossing this wild tomato accession with a tomato cultivar (cv. Anl27) that has very low regeneration capacity (Trujillo-Moya et al. 2011). These materials have been used for detecting QTLs related with the organogenic response (Trujillo-Moya et al. 2011). The presence of ethylene response factors was detected in 5 of the 6 QTLs identified.

#### **Materials and methods**

##### Plant material and culture conditions

Clones of the genotypes *S. pennellii* (accession PE-47) and an  $F_1$  plant (*S. lycopersicum* cv. Anl27  $\times$  *S. pennellii* PE-47) were cultured in vitro in tubes containing fresh basal medium (BM: Murashige and Skoog salts including vitamins, 1.5 % sucrose and 0.7 % plant agar). The plants were maintained in in vitro culture by transferring nodes every 3–4 weeks. Leaf explants (0.6–0.8  $\text{cm}^2$ ) were obtained from plants in order to carry out the experiments.

The pH of all the media was adjusted to 5.8 before sterilization at 121 °C for 20 min, and cultures were incubated in a growth chamber at 26 °C  $\pm$  2 °C under a 16 h photoperiod with cool white light provided by Sylvania cool white F37T8/CW fluorescent lamps (90  $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ ).

Culture of leaf explants in SIM or SIM supplemented with ethylene inhibitors or ethylene-releasing compounds

*S. pennellii* and F<sub>1</sub> leaf explants were obtained and cultured on SIM (Murashige and Skoog's salts (Murashige and Skoog 1962), 3 % sucrose, 0.7 % plant agar and 0.57  $\mu$ M Zeatin riboside), and on SIM supplemented with SN (at 5.8, 14.5, 29.0, 58.0  $\mu$ M), CoCl<sub>2</sub> (at 4.2, 10.5, 21.0, 42.0  $\mu$ M), ACC (at 9.8, 24.5, 49.0, 98.0  $\mu$ M) or Ethephon (at 6.9, 17.2, 34.5, 69.0  $\mu$ M). Explants were cultured on these media for 30 days and then transferred to BM for 20 days.

Zeatin riboside, SN, CoCl<sub>2</sub>, ACC and Ethephon were filtered (0.22  $\mu$ m Millipore filters) and then added to sterilized SIM medium. The media were plated in Petri dishes (90  $\times$  15 mm) with 30 ml of culture medium (plates used for the first 30 days of culture) or in 90  $\times$  25 mm plates, with 40 ml of medium per plate (used for the following 20 days of culture). For each genotype, five explants per plate and 4–5 repetitions per genotype and treatment were evaluated.

The following parameters were determined every 7 days until day 50 of culture: (a) frequency of explants with organogenic buds (B), (b) frequency of shoot regeneration (R) and (c) mean number of shoots per explant with shoots (PR).

Addition of ethylene inhibitors or ethylene-releasing compounds to SIM after bud induction

Ten or 15 days following initiation of culture, explants with organogenic buds were subcultured to SIM or SIM-supplemented media containing SN, CoCl<sub>2</sub>, ACC or Ethephon at 5.8, 4.2, 9.8 and 6.9  $\mu$ M, respectively (the lowest concentration of the assay explained above). Thirty days after initiating the experiment, all explants were

transferred to BM for 20 days. At the end of this period (50 days), B, R and PR were measured. About 16 shoots per treatment were isolated and cultured individually in tubes (14.8 cm length, 2.5 cm diameter, 15 ml medium) containing 25 ml of BM. Root length (cm), shoot length (cm), number of nodes and node size (mm) were measured 25 days after culture.

#### Statistical analysis

Data were subjected to a unifactorial analysis of variance (ANOVA) and the means for the different traits were subsequently separated by a Duncan test.

#### **Results and discussion**

Ethylene is a simple hydrocarbon (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) gas that affects growth, differentiation and senescence in plants in concentrations as low as 0.01 μM (Reid 1995). We studied the role of ethylene in tomato organogenesis by evaluating the effect of two ethylene-releasing compounds (ACC and Ethephon) and two ethylene inhibitors (SN and CoCl<sub>2</sub>) using two tomato genotypes which displayed different organogenic responses.

#### Effect on organogenesis of different doses of ethylene inhibitors or ethylene-releasing compounds

The organogenic response in leaf explants of the wild tomato *S. pennellii* and the F<sub>1</sub> (*S. lycopersicum* cv. Anl27 × *S. pennellii*) genotypes did not differ in SIM (control medium). Thus, the frequency of explants with organogenic buds (B) and the frequency of shoot regeneration (R) was 100 % in both cases (Table 1; chemical concentration = 0). The mean number of shoots per explant with shoots (PR) proved to be higher in *S. pennellii* than in F<sub>1</sub>, giving 5.05 and 3.40 shoots per explant,

**Table 1.** Effect of SN, CoCl<sub>2</sub>, ACC and Ethephon on in vitro regeneration of *S. pennellii* and an F<sub>1</sub> (*S. lycopersicum* cv. An127 x *S. pennellii*)

Genotype	Chemical Concentrations <sup>a</sup>	SN			CoCl <sub>2</sub>			ACC			Ethephon		
		B	R	PR	B	R	PR	B	R	PR	B	R	PR
<i>S. pennellii</i>	0	100 a	100 a	5.05 a	100 a	100 a	5.05 abc	100 a	100 a	5.05 bc	100 a	100 a	5.05 ab
	1	100 a	80 a	1.43 c	100 a	80 ab	6.35 a	79 ab	75 ab	10.74 a	78 a	66 bc	6.86 a
	2	84 b	24 b	1.20 c	100 a	80 ab	5.80 ab	84 ab	60 b	8.10 ab	48 b	32 d	2.50 bcd
	3	88 b	48 b	1.37 c	100 a	92 a	5.42 ab	75 ab	71 ab	10.04 a	28 b	20 d	1.67 cd
	4	80 b	36 b	0.96 c	96 ab	92 a	5.14 abc	68 b	60 b	10.15 a	20 b	12 d	1.00 d
F1	0	100 a	100 a	3.40 b	100 a	100 a	3.40 cd	100 a	100 a	3.40 c	100 a	100 a	3.40 abc
	1	0 c	0 c	0 d	100 a	96 a	2.75 d	90 ab	75 ab	3.41 c	80 a	76 b	3.09 bcd
	2	0 c	0 c	0 d	100 a	92 a	3.57 cd	78 ab	61 b	2.80 c	84 a	76 b	2.75 bcd
	3	0 c	0 c	0 d	88 c	68 b	3.17 d	80 ab	72 ab	4.28 c	44 b	36 cd	3.00 bcd
	4	0 c	0 c	0 d	90 ab	80 ab	4.05 bcd	70 b	50 b	4.17 c	16 b	8 d	2.40 cd

Percentage of explants with buds (B), percentage of explants with shoots (R) and number of shoots per explant with shoots (PR) at 50 days of culture: the first 30 days of culture in plates with SIM and SIM supplemented with SN, CoCl<sub>2</sub>, ACC or Ethephon and the following 20 days in plates with BM

<sup>a</sup>Chemical concentrations are in µM: 5.8 (1); 14.5 (2), 29.0 (3) and 58.0 (4) for SN; 4.2 (1), 10.5 (2), 21.0 (3) and 42.0 (4) for CoCl<sub>2</sub>; 9.8 (1), 24.5 (2), 49.0 (3) and 98.0 (4) for ACC and 6.9 (1), 17.2 (2), 34.5 (3), and 69.0 (4) for Ethephon. Means followed by different letters within columns are significantly different at P ≤ 0.05, Duncan test

---

respectively (Table 1). These results are in accordance with those previously obtained (Trujillo-Moya et al. 2011).

SN has been used in several studies in a range of concentrations from 0 to 100  $\mu\text{M}$  (Pua et al. 1996), and its addition to culture media has resulted in contradictory effects depending on the plant materials and experimental conditions (Biddington 1992; Moshkov et al. 2008). In our study, a reduction in B of about 20 % was observed in *S. pennellii* explants cultured on medium with SN concentrations higher than 14.5  $\mu\text{M}$  (Table 1). In these media, R and PR traits were also reduced, displaying a range of reduction between 20 and 64 % and 71–81 %, respectively (Table 1). Inhibition of bud induction in  $F_1$  explants was higher than in *S. pennellii*; no buds were induced in explants cultured on SN-containing media (Table 1). These results indicate that ethylene is necessary for organogenesis, as has been described in a variety of culture systems (Kumar et al. 1998). Our result is not in accordance with that reported by Osman and Khalafalla (2010) in the tomato cultivar Omdurman, which found a higher number of shoots per explant when explants were cultured on medium with SN at 29.0  $\mu\text{M}$  and  $\text{CoCl}_2$  at 12.6  $\mu\text{M}$ . In tomato, it has also been reported that ethylene is essential for callus formation (Lima et al. 2009). Callus initiation commonly appears before bud formation in certain tomato genotypes. Different results between tomato genotypes may be due to varying endogenous hormone concentrations. This may be a putative explanation for the drastic regeneration inhibition produced by SN in the  $F_1$  explants compared to that observed in *S. pennellii*; the wild species may have a higher endogenous ethylene concentration than the  $F_1$  genotype.

The addition of  $\text{CoCl}_2$ , an inhibitor of the ACC synthase, had no effect on the organogenic response (B, R and PR) of *S. pennellii* explants. However, a decrease in B and R (on average 11 and 28 %, respectively) was observed in media supplemented

---

with  $\text{CoCl}_2$  ( $>21.0 \mu\text{M}$ ) in  $F_1$ . This result is in accordance with those obtained when SN is added, although the differences are not as pronounced as in this case. This is most likely due to the fact that the range of  $\text{CoCl}_2$  concentrations used in our study was low for our genotypes. As occurred in medium with SN, the inhibitory effect was higher in  $F_1$  compared to *S. pennellii* for similar concentrations of inhibitor.

The addition of ACC at the highest concentration ( $98.0 \mu\text{M}$ ) diminished B and R in *S. pennellii* and  $F_1$  explants. However, PR increased (was doubled) in *S. pennellii* explants cultured on media supplemented with ACC, even at the highest concentration tested (Table 1). This result indicates that ethylene is clearly influencing the development of buds into shoots in *S. pennellii*. In the  $F_1$ , however, PR did not increase in these media, probably because both the number of induced buds was lower in  $F_1$  than in the *S. pennellii* explants and, putatively, in the  $F_1$  the endogenous ethylene concentration is lower than in *S. pennellii*. As occurred at the highest ACC concentration in this study, a scarce bud formation but enhanced bud development (higher PR) in media supplemented with ethylene has also been reported by other authors, e.g. Huxter et al. (1981). Ethylene production has also been described as influencing the development of somatic embryos in several works that have reported regeneration through the embryogenic pathway (Ptak et al. 2010; Lu et al. 2011).

The addition of Ethephon, which decomposes to release ethylene at physiological pH (Abeles et al. 1992), inhibited bud induction and/or the development of buds in *S. pennellii* and in the  $F_1$  at concentrations  $\leq 6.9 \mu\text{M}$  (Table 1). A lower PR than that of the control medium was also observed in *S. pennellii* in media with Ethephon ( $>34.5 \mu\text{M}$ ), whereas no differences for this parameter were observed in the  $F_1$  genotype (Table 1). The inhibition observed, mainly in *S. pennellii*, may be the product of toxic effects; the concentrations of Ethephon are quite possibly too high to

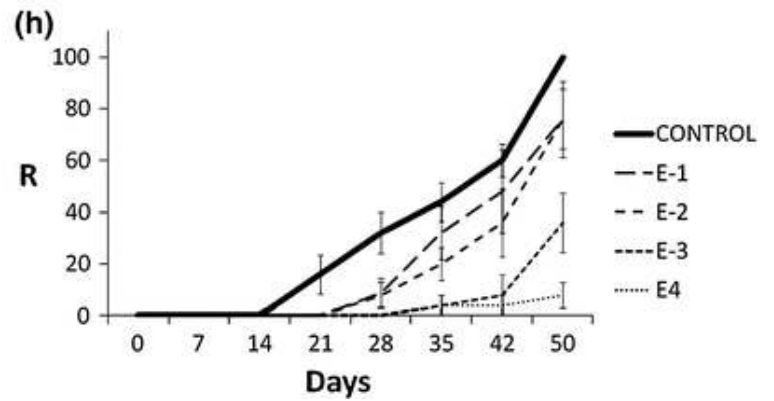
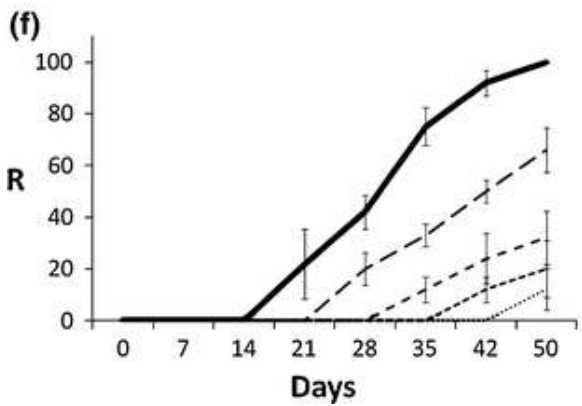
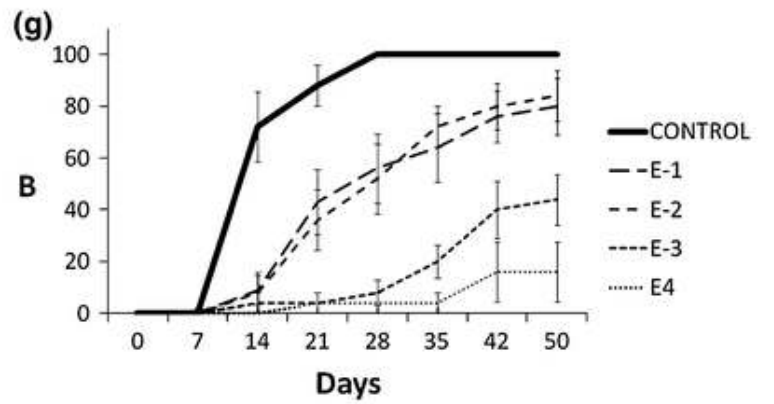
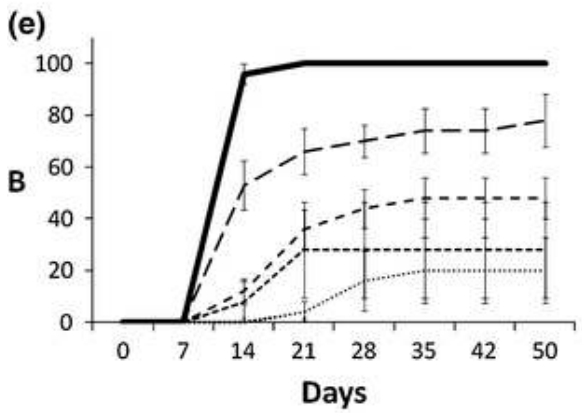
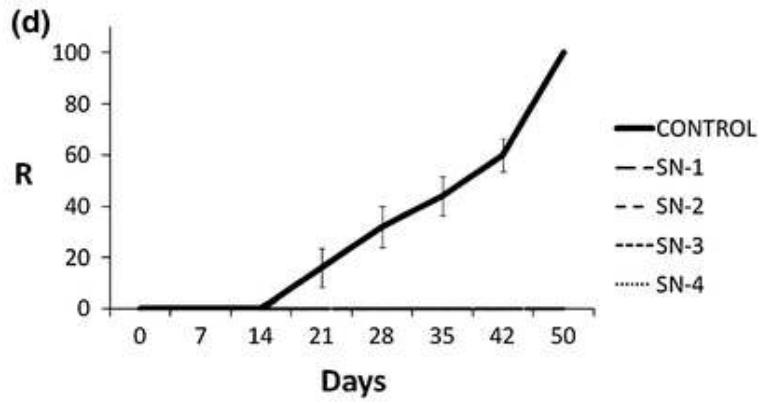
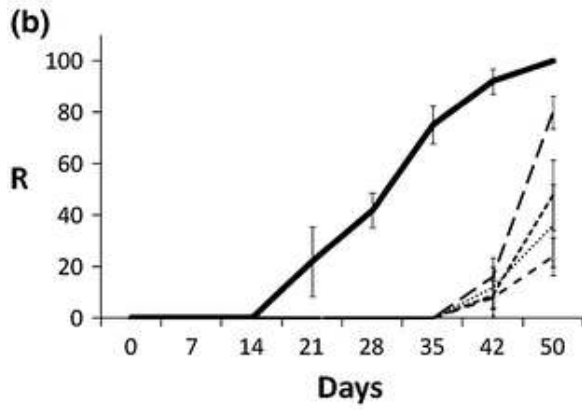
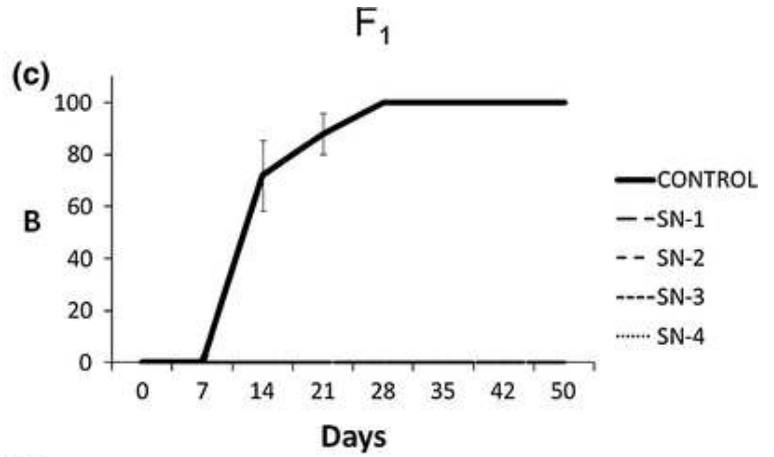
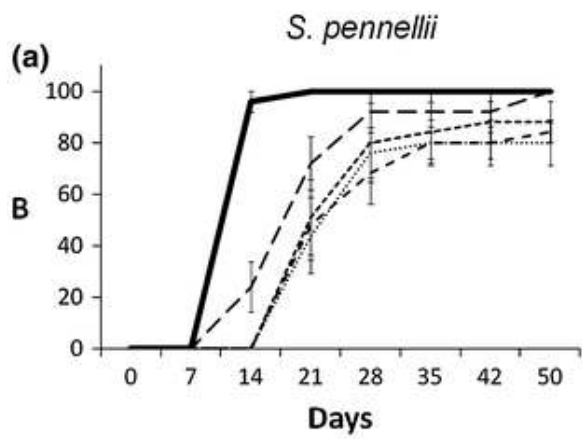
stimulate the development of buds. It has been reported that there is a critical ethylene concentration at which morphogenesis is affected; concentrations above or below this level are respectively inhibitory or ineffective (Huxter et al. 1981; Biddington 1992). The inhibition of shoot regeneration by adding Ethephon in a range of concentration from 1 to 10  $\mu$ M has also been reported (Chraibi et al. 1991).

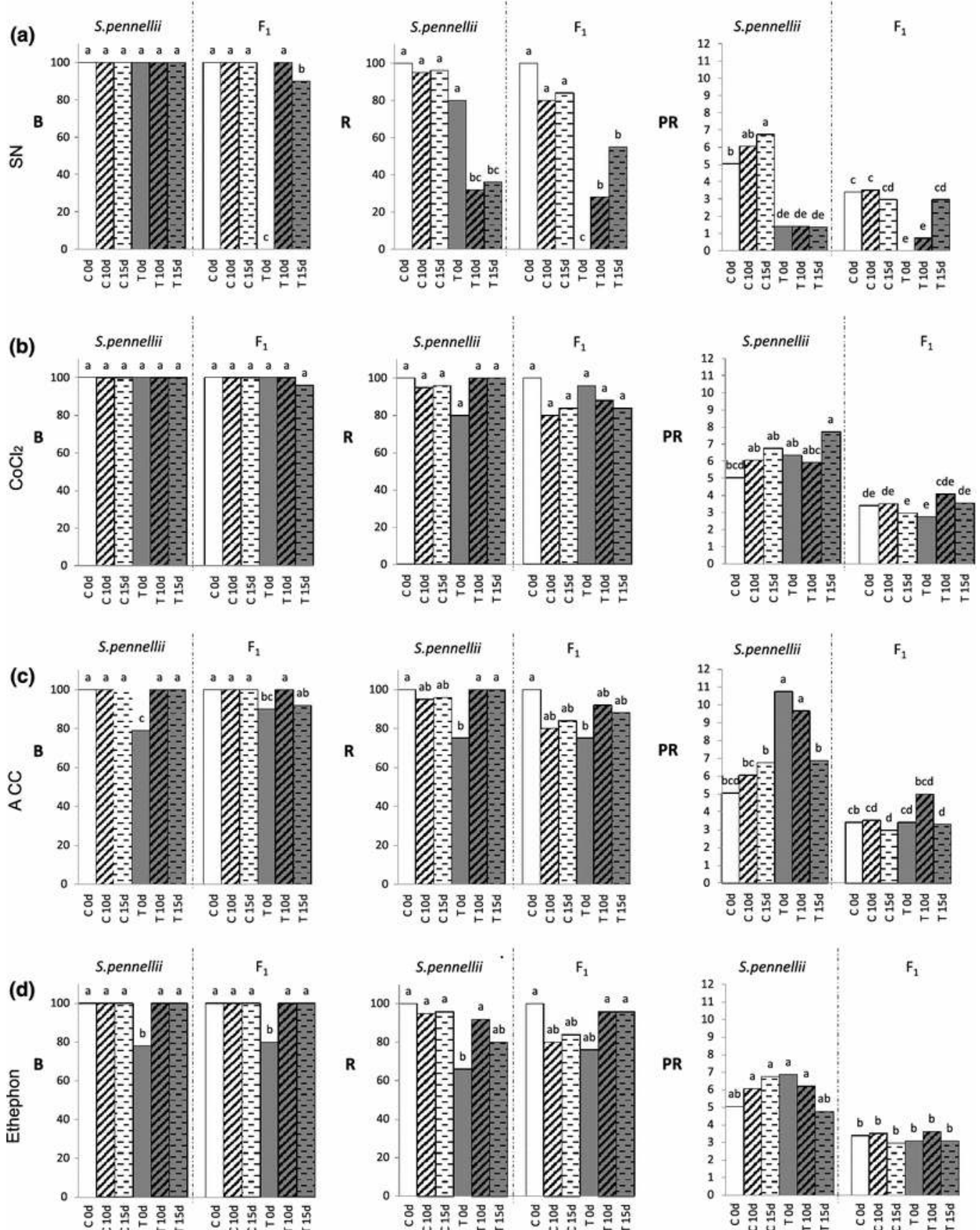
B and R were measured every 7 day (from day 0 to day 50). At Fig. 1 it is represented both traits for *S. pennellii* and F<sub>1</sub> explants cultured on control medium and media supplemented SN (a–d) or Ethephon (e–h). Even though B was 100 % for both genotypes in the control medium, the maximum percentage of explants with buds was only achieved in *S. pennellii* at 14 days of culture (Fig. 1a), whereas in F<sub>1</sub> this maximum occurred later, at 28 days (Fig. 1c). Differences were also observed in R, which had a value of 50 % at 28 day in *S. pennellii* (Fig. 1b) and at 42 day in the F<sub>1</sub> (Fig. 1d). When SN (Fig. 1a–d) was added, a total inhibition of B was produced in the F<sub>1</sub> genotype whereas a decrease and a delay in bud formation (B) and bud development (R) were produced in *S. pennellii* (for instance, R reached 50 % at 42 days). In the case of Ethephon, both B and R were reduced and delayed in both *S. pennellii* and the F<sub>1</sub> genotype (Fig. 1f and h). Both effects were increased with increasing the Ethephon concentrations.

#### Application of ethylene inhibitors or ethylene-releasing compounds following bud induction

The results of applying inhibitors or ethylene-releasing compounds after bud induction are presented in Fig. 2. Explants directly cultured on SIM (C0d) and explants cultured on SIM and transferred to SIM 10 days (C10d) or 15 days (C15d) after the initial culture were the controls in this experiment. No differences between controls were







**Figure 2.** Frequency of explants with organogenic buds (B), frequency of shoot regeneration (R) and mean number of shoots per explant with shoots (PR) of *S. pennellii* and F<sub>1</sub> explants after 50 days of culture. The first 30 days, explants were cultured on SIM (Controls) or SIM supplemented with SN (5.8 µM), CoCl<sub>2</sub> (4.2 µM), ACC (9.8 µM) or Ethephon (6.9 µM) and the following 20 days in plates with BM. Chemicals were added at 0 days (0d), 10 days (10d) or 15 days (15d) after initial culture. One C and one T before the day of treatment were assigned for controls (C0d, C10d, C15d) and treated explants (T0d, T10d, T15d), respectively.

observed except for those explants of *S. pennellii* transferred to fresh SIM 15 days after the beginning of culture, which showed a slight increase in PR (Fig. 2a).

The addition of SN at 10 or 15 days after initial culture reduced R in *S. pennellii*, which was not the case when SN was added at day 0. However, for this genotype, PR was inhibited in explants treated at 0, 10 or 15 days (Fig. 2a). In the case of the F<sub>1</sub> explants, the delay in the supplementation of the ethylene inhibitor SN, permitted the production of buds (B) and the development of some of these buds into shoots (R and PR). A higher percentage of plants was observed in the explants whose treatment occurred latest (at 15 day). These results demonstrate the importance of ethylene in tomato bud development.

The addition of CoCl<sub>2</sub> after bud induction did not modify the results obtained when it was added at the beginning (Fig. 2b). As was mentioned previously, the CoCl<sub>2</sub> concentrations used in our study may be low for the selected genotypes.

As was expected, the addition of ACC (Fig. 2c) or Ethephon (Fig. 2d) when buds were induced (T10d, T15d) produced no effect on B or R. In both cases, almost all the explants produced buds. The increase in PR observed in *S. pennellii* when ACC was applied at the beginning of the experiment (T0d) was also observed when it was applied 10 days later (T10d) but not at 15 days (T15d). This underlines the importance of studying not only the concentration but also the timing of application of regulators when developing regeneration protocols.

Shoots isolated from explants cultured on SIM and SIM supplemented with ethylene modulators were transferred to culture tubes with BM in order to observe their growth. After 25 days of culture, all plants were rooted and root length, shoot length, the number of nodes and node size were measured (Table 2). *Solanum pennellii* plants isolated from explants cultured on SIM showed a longer shoot length and higher number of nodes than F<sub>1</sub> plants isolated in this medium. Shoots of *S. pennellii* isolated from explants cultured on SN-containing medium showed a growth inhibition that was manifested in all of the measured traits, even when ethylene modulators were added after 10 or 15 days of culture. These results indicate that SN not only affects bud development into shoots but also subsequent shoot growth. Vitrification and malformation of shoots were also observed in some of these plants (data not shown). As expected, plants isolated from explants cultured on media with CoCl<sub>2</sub> did not differ from those isolated from explants cultured on control medium. With regards to those plants isolated from explants cultured on media with ethylene-releasing compounds, a higher number of nodes were produced in *S. pennellii* when ACC and Ethephon were added 15 days after the beginning of culture. In the case of F<sub>1</sub> explants, a similar effect was produced when these compounds were added at 10 days. Shoot and node length was also increased in the F<sub>1</sub> plants. These results indicate that the addition of ethylene-releasing compounds could be regarded as a putative strategy for improving the development of buds into shoots, which can prove to be difficult in some genotypes.

**Table 2.** Rooting and development of shoots (*S. pennellii* and F<sub>1</sub>) cultured for 25 days in tubes with BM medium

Shoot origin	Treatment	Chemicals added at day 0				Chemicals added at day 10				Chemicals added at day 15			
		Root Length (cm)	Shoot length (cm)	N° of nodes	Node length (mm)	Root Length (cm)	Shoot length (cm)	N° of nodes	Node length (mm)	Root Length (cm)	Shoot length (cm)	N° of nodes	Node length (mm)
<i>S. pennellii</i>	SIM	8.71 a	4.69 a	8.62 a	6.06 abc	9.61 a	4.42 a	9.50 a	6.22 cd	7.53 ab	3.82 abc	8.12 b	5.24 d
	SIM + SN	5.80 b	1.47 d	4.00 e	3.50 d	3.67 d	2.58 c	5.72 bcd	4.25 d	5.00 c	2.94 bcd	5.90 c	2.91 e
	SIM + CoCl <sub>2</sub>	7.56 ab	4.03 ab	8.12 a	5.54 bc	9.46 a	4.46 a	10.69 a	6.74 bc	8.18 a	3.74 abcd	8.25 b	5.30 d
	SIM + ACC	7.36 ab	3.42 abc	7.62 ab	5.50 bc	9.46 a	4.48 a	10.56 a	6.15 cd	9.74 a	3.90 ab	10.66 a	5.46 cd
	SIM + Ethephon	8.00 ab	3.64 abc	8.31 a	4.71 cd	8.48 ab	3.91 ab	9.37 a	5.87 cd	9.00 a	4.80 a	10.50 a	6.38 bcd
F <sub>1</sub>	SIM	7.30 ab	2.76 bcd	5.38 cde	7.29 ab	6.13 c	2.52 c	4.93 cd	5.68 cd	8.84 a	2.66 bcd	5.31 c	8.61 ab
	SIM + SN	–*	–	–	–	7.92 abc	2.94 bc	4.00 d	7.40 abc	5.52 bc	2.25 d	4.37 c	6.72 bcd
	SIM + CoCl <sub>2</sub>	7.22 ab	3.65 abc	5.57 cd	7.82 a	7.43 abc	3.35 bc	5.69 bcd	8.42 ab	7.83 a	2.35 cd	5.50 c	7.62 abc
	SIM + ACC	8.00 ab	2.45 cd	4.67 de	6.92 ab	7.72 abc	4.40 a	6.37 b	8.31 ab	7.90 a	2.58 bcd	5.43 c	9.09 a
	SIM + Ethephon	6.06 b	4.02 ab	6.62 bc	7.26 ab	6.40 bc	4.50 a	6.81 b	9.09 a	8.74 a	2.55 bcd	5.87 c	7.50 abcd

Shoots were isolated from explants after 30 days of culture in plates with SIM and SIM supplemented with 5.8 µM SN, 4.2 µM CoCl<sub>2</sub>, 9.8 µM ACC and 6.9 µM Ethephon and 20 days in plates with BM. Chemicals were added at the beginning of the experiment or at 10 or 15 days after culture on SIM medium

–\* No regeneration obtained. Means followed by different letters within columns are significantly different at  $P \leq 0.05$ , Duncan test

## **Conclusions**

These results confirm the importance of ethylene in tomato regeneration. Optimal concentrations of ethylene are important for bud induction, for the development of buds into shoots as well as in the subsequent growth of shoots isolated from treated explants. A decrease in ethylene had a negative effect on tomato regeneration which was manifested in low regeneration as well as in a delay in the organogenic response. On the other hand, ethylene supplementation may contribute to enhance shoot development. Therefore, ethylene supplementation could be tested to improve those protocols of regeneration where shoot isolation proves difficult. The importance of adjusting the concentration and timing of the application of inhibitors or ethylene-releasing compounds is made manifest in this study. Differences between genotypes with regard to the effects on organogenesis of different doses of ethylene inhibitors or ethylene-releasing compounds may be due to different endogenous ethylene concentrations as well as to the influence of different alleles involved in ethylene perception and response.

## **Acknowledgments**

Carlos Trujillo has a predoctoral fellowship from the Spanish 'Ministerio de Educación y Ciencia'. This work has been funded by Universitat Politècnica de València (PAID 05-10). The technical assistance of N. Palacios and the revision of the manuscript's English by J. Bergen are gratefully acknowledged.

## References

- Abeles FB, Morgan PW, Saltveit ME: **Ethylene in plant biology** 1992. Academic Press, San Diego
- Bhatia P, Ashwath N, Senaratna T, David M: **Tissue culture studies of tomato (*Lycopersicon esculentum*)**. Plant Cell Tiss Org Cult 2004, 78: 1-21.
- Bhatia P, Ashwath N, Midmore DJ: **Effects of genotype, explant orientation, and wounding on shoot regeneration in tomato**. In Vitro Cell Dev Biol-Plant 2005, 41: 457-464.
- Biddington NL: **The Influence of ethylene in plant-tissue culture**. Plant Growth Regul 1992, 11: 173-187.
- Brown DC, Thorpe TA: **Crop improvement through tissue culture**. World J Microbiol Biotechnol 1995, 11(4): 409-415.
- Chraibi KMB, Latche A, Roustan JP, Fallot J: **Stimulation of shoot regeneration from cotyledons of *Helianthus annuus* by the ethylene inhibitors, silver and cobalt**. Plant Cell Rep 1991, 10: 204-207.
- Devi R, Dhaliwal MS, Kaur A, Gosal SS: **Effect of growth regulators on in vitro morphogenic response of tomato**. Indian J Biotechnol 2008, 7: 526-530.
- Dias LLC, Santa-Catarina C, Ribeiro DM, Barros RS, Floh EIS, Otoni WC: **Ethylene and polyamine production patterns during in vitro shoot organogenesis of two passion fruit species as affected by polyamines and their inhibitor**. Plant Cell Tiss Org Cult 2009, 99: 199-208.
- Dimasi-Theriou K, Economou AS: **Ethylene enhances shoot formation in cultures of the peach rootstock GF-677 (*Prunus persica* × *P. amygdalus*)**. Plant Cell Rep 1995,15: 87-90.

- Gisbert C, Arrillaga I, Roig LA, Moreno V: **Adquisition of a collection of *Lycopersicon pennellii* (Corr. D'Arcy) transgenic plants with uidA and nptII marker genes.** J Hortic Sci Biotechnol 1999, 74: 105-109.
- Hughes KW: **In vitro ecology: exogenous factors affecting growth and morphogenesis in plant culture systems.** Environ Exp Bot 1981, 21: 281-288.
- Huxter TJ, Thorpe TA, Reid DM. **Shoot initiation in light- and darkgrown tobacco callus: the role of ethylene.** Physiol Plant 1981, 53: 319-326.
- Kumar PP, Lakshmanan P, Thorpe TA: **Regulation of morphogenesis in plant tissue culture by ethylene.** In Vitro Cell Dev Biol Plant 1998 34: 94-103.
- Lima JE, Benedito VA, Figueira A, Peres LEP: **Callus, shoot and hairy root formation in vitro as affected by the sensitivity to auxin and ethylene in tomato mutants.** Plant Cell Rep 2009, 28: 1169-1177.
- Lu J, Vahala J, Pappinen A: **Involvement of ethylene in somatic embryogenesis in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.).** Plant Cell Tiss Org Cult 2011, 107: 25-33.
- Mohiuddin AKM, Chowdhury MKU, Abdullah ZC, Napis S: **Influence of silver nitrate (ethylene inhibitor) on cucumber in vitro shoot regeneration.** Plant Cell Tiss Org Cult 1997, 51: 75-78.
- Moshkov IE, Novikova GV, Hall MA, George EF (2008) Plant Growth Regulators III: ethylene. In: George EF, Hall MA, Klerk G-JD (eds) Plant Propagation by Tissue Culture, vol 1. 3rd edn. Springer, The Netherlands, pp 239-248
- Murashige T, Skoog F: **A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures.** Physiol Plant 1962, 15: 473-497.
- Osman MG, Khalafalla MM: **Promotion of in vitro shoot formation from shoot tip of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Omdurman) by ethylene inhibitors.** Int J Curr Res 2010, 4: 82-86.



- Ptak A, El Tahchy A, Wyzgolik G, Henry M, Laurain-Mattar D: **Effects of ethylene on somatic embryogenesis and galantamine content in *Leucojum aestivum* L. cultures.** Plant Cell Tiss Org Cult 2010, 102: 61-67.
- Pua EC, Sim GE, Chi GL, Kong LF: **Synergistic effects of ethylene inhibitors and putrescine on shoot regeneration from hypocotyl explants of Chinese radish (*Raphanus sativus* L. var. longipinnatus Bailey) in vitro.** Plant Cell Rep 1996, 15: 685-690.
- Reid MS (1995) **Ethylene in plant growth, development and senescence.** In: Davies PJ (ed) Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology, 2nd edn. Kluwer Acad Publ, The Netherlands, pp 486–508
- Trujillo-Moya C, Gisbert C, Vilanova S, Nuez F: **Localization of QTLs for in vitro plant regeneration in tomato.** BMC Plant Biol 2011, 11: art.140.
- Tsuchisaka A, Theologis A: **Heterodimeric interactions among the 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase polypeptides encoded by the Arabidopsis gene family.** Proc Natl Acad Sci USA 2004, 101: 2275-2280.
- Vogel JP, Woeste KE, Theologis A, Kieber JJ: **Recessive and dominant mutations in the ethylene biosynthetic gene ACS5 of Arabidopsis confer cytokinin insensitivity and ethylene overproduction, respectively.** Proc Natl Acad Sci USA 1998, 95: 4766-4771.



## Leaf morphology and shoot regeneration of in vitro cultured explants from species of the *S. peruvianum* L. *sensu lato* complex

Carlos TRUJILLO-MOYA<sup>1</sup>, Rosa PEIRÓ and Carmina GISBERT<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV).

Universitat Politècnica de València, Camino de Vera, 14 46022 Valencia, Spain.

\*Corresponding author: [cgisbert@btc.upv.es](mailto:cgisbert@btc.upv.es)

**Enviado a:**

**TURKISH JOURNAL OF BOTANY (Reference number BOT-1305-16)**



**Abstract**

In this work, we have studied leaf morphology in vitro plants of species segregated from the *Solanum peruvianum* L. sensu lato complex, that is, in *Solanum arcanum*, *Solanum corneliomulleri*, *Solanum huaylasense* and *Solanum peruvianum* s.s. In these species, the regeneration ability from root and leaf explants cultured in vitro in two organogenic media (SIM-1 and SIM-2) was also evaluated in a total of 16 accessions. The analyzed species can be differentiated by number of leaflets or by leaflet dentate of the in vitro cultured plants and leaf area separated *S. arcanum* of the rest of species. Regarding regeneration, intraspecific and interspecific variability was observed. The accession LA-2185 of *S. arcanum* and the accessions ECU-106 and CH-20 of *S. peruvianum* s.s. can be considered low regenerating, whereas the rest of accessions had a good and high regeneration capacity. Despite the four assayed species are able to regenerate from root explants, leaf explants have been selected as more appropriated for in vitro regeneration. Better results were also obtained in the organogenic medium SIM-1 with respect to SIM-2. Interestingly, explants from leaves with high amount and more dentate leaflets had high regeneration.

**Key words:** organogenesis, *S. arcanum*, *S. corneliomulleri*, *S. huaylasense*, tomato.

**1. Introduction**

Wild tomatoes belong taxonomically to the genus *Solanum* section *Lycopersicon* (Mill.) Wettst. and include several species that represent a valuable germplasm to improve cultivated tomatoes. The most recent classification (Peralta et al., 2008) divided the section *Lycopersicon* into four groups: *Lycopersicon* group (*S. lycopersicum* L., *S. pimpinellifolium* L., *S. cheesmaniae* (L. Riley) Fosberg and *S. galapagense* S. Darwin

---

and Peralta), Neolycopersicon group (*S. pennellii* Correll), Eriopersicon group (*S. peruvianum* L., *S. corneliomulleri* J.F. Macbr, *S. huaylasense* Peralta, *S. habrochaites* S. Knapp and D.M. Spooner and *S. chilense* (Dunal) Reiche) and Arcanum group (*S. arcanum* Peralta, *S. chmielewskii* (C.M. Rick, Kesicki, Fobes and M. Holle) D.M. Spooner, G. J. Anderson and R.K. Jansen and *S. neorickii* D.M. Spooner, G.J. Anderson and R.K. Jansen). Previously, *S. arcanum*, *S. corneliomulleri*, *S. huaylasense* and *S. peruvianum* sensu stricto (s.s.) were included in the *S. peruvianum* sensu lato (s.l.) complex (Peralta et al., 2005).

Based on RFLP, SSR and AFLP data, the *S. peruvianum* (s.l.) complex is the most genetically variable in the genus and the most likely contribute genes not currently found in cultivated tomato (Miller and Tanksley, 1990; Alvarez et al., 2001; Spooner et al., 2005; Zuriaga et al., 2009). For instance, resistances to *Begomovirus* and *Meloidogyne* spp. were found in *S. peruvianum* (s.s.) and *S. corneliomulleri* (Pereira-Carvalho et al., 2010) and, resistances to *Alternaria solani* Sorauer (Chaerani et al., 2007), *A. tomatophila* Simmons (Foolad et al., 2007) and nematodes (Jablonska et al., 2007; Cortada, 2009) in *S. arcanum* and *S. huaylasense*. However, the use of the *S. peruvianum* gene pool has greatly limited due to incompatibility problems (Sacks et al., 1997; Bedinger et al., 2011). In order to solve this, in vitro culture techniques have been used for embryo rescue in crosses where embryos are formed but unable to develop. Actually, embryos that were developed to at least the heart-shaped stage have yielded seedlings via embryo culture (Smith, 1944; Cap et al., 1991) and callus culture has been used to obtain plants when embryos have not past the globular stage (Thomas and Pratt, 1981; Segeren et al., 1993). Protoplast fusion was also used in order to achieve hybrids between *S. peruvianum* and *S. lycopersicum* (Chen and Adachi, 1998; Kochevenko et al., 2000).

Regeneration from explants cultured in vitro is the starting point to apply most of in vitro techniques. Thus, plant regeneration protocols have been described in tomato plants (Peres et al., 2001, Faria et al., 2002, Bhatia et al., 2004) and, in the related species *S. peruvianum* (s.l.) (Koornneef et al., 1987), *S. hirsutum* (Stommel and Sinden, 1991), *S. pennellii* (Gisbert et al., 1999); *S. pimpinellifolium* (Pratta et al., 1997); *S. chilense* (Takashina et al., 1998) and *S. cheesmanii* (Arrillaga et al., 2001) from different type of explants (cotyledonary, leaves or roots). Plant regeneration via shoot organogenesis on decapitated seedlings was also studied in tomato plants and the related species *S. cheesmanii*, *S. chilense*, *S. chmielewskii*, *S. hirsutum*, *S. parviflorum*, *S. peruvianum* and *S. pimpinellifolium* (Steinitz et al., 2006). In these studies, a great influence of genotype as well as inter and intraspecific variability of regeneration have been described. In general, high regeneration was observed in the wild species and recalcitrance in some tomato cultivars (Bhatia et al., 2004) and in *S. pimpinellifolium* (Marchionni et al., 2007). The presence of a gene (*Rg-1*) which confers great regenerative capacity was described in *S. peruvianum* (s.l.) (Koornneef et al., 1993). Putative alleles of these genes were found in *S. chilense* (Satoh et al., 2000) and *S. pennellii* (Trujillo-Moya et al., 2011). Moreover, several QTLs for organogenic capacity were located in tomato (Trujillo-Moya et al., 2011), indicating that regeneration depends on several genes.

There is no information about in vitro regeneration in the four species segregated from *S. peruvianum* (s.l.) complex: *S. arcanum*, *S. huaylasense*, *S. corneliomulleri* and *S. peruvianum* (s.s.). Thus, the aim of this study is to test the organogenic ability in accessions of interest which belong to these four species. For this purpose, we will compare the organogenic capacity of two explants types in two organogenic inducing

culture media as well as the respective correlations with leaf morphology, which differ among these species.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant material and growth conditions

We studied 16 accessions of four species (*S. peruvianum* s.s., *S. corneliomulleri*, *S. arcanum* and *S. huaylasense*) that belong to the highly variable *S. peruvianum* s.l. complex (Table 1).

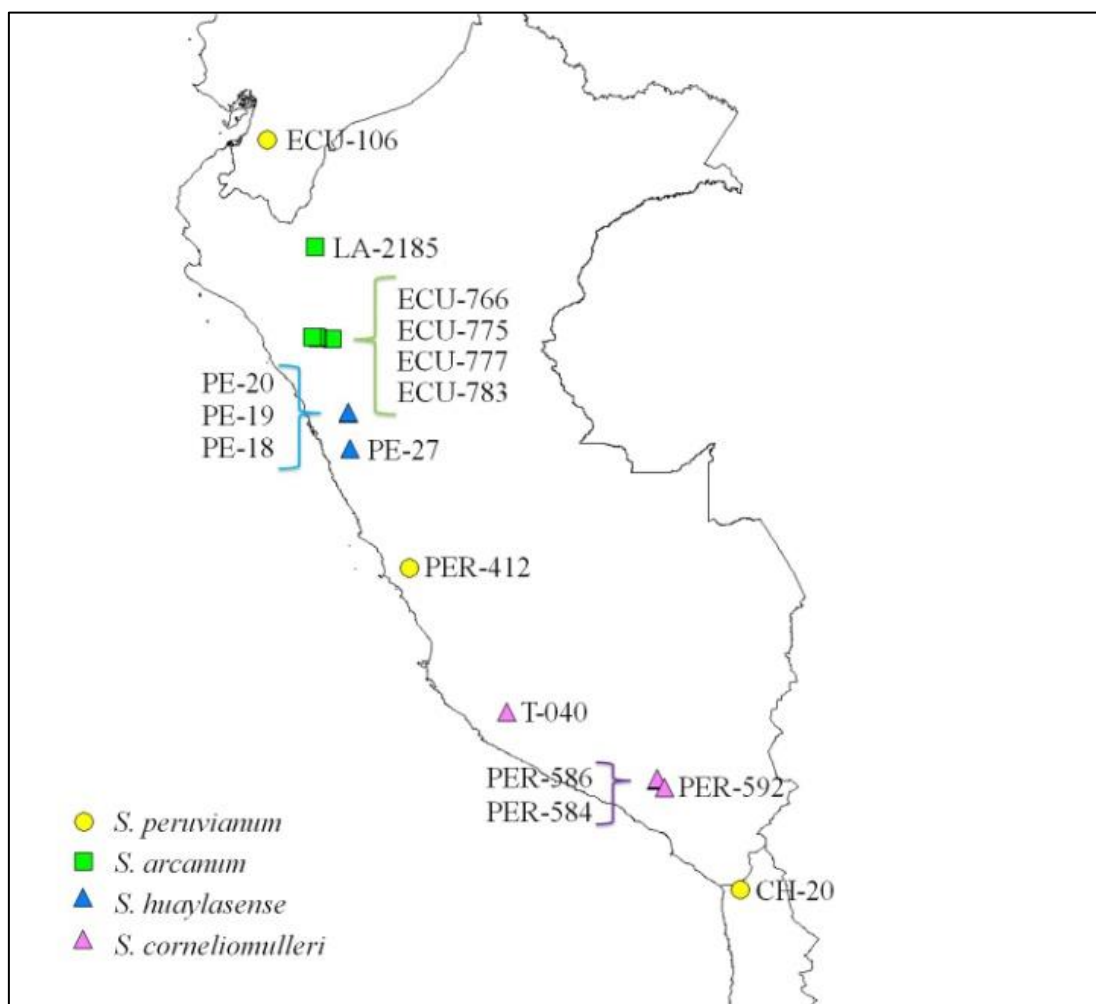
**Table 1.** List of the accessions used for the study of the regeneration capacity at *S. peruvianum* L. (s.l.) complex: (*S. huaylasense*, *S. corneliomulleri*, *S. arcanum* and *S. peruvianum* s.s.), including accessions identifiers, country, region, and geographic coordinates for the collection sites.

Accession code	Country	Region	Latitude	Longitude
<i>Solanum huaylasense</i>				
PE-18 <sup>a</sup>	PER	Ancash	0849-S	07752-W
PE-19 <sup>a</sup>	PER	Ancash	0848-S	07752-W
PE-20 <sup>a</sup>	PER	Ancash	0848-S	07752-W
PE-27	PER	Ancash	0932-S	07750-W
<i>Solanum corneliomulleri</i>				
PER-584	PER	Arequipa	161125-S	0713920-W
PER-586	PER	Arequipa	161017-S	0713918-W
PER-592	PER	Arequipa	162116-S	0712959-W
T-040 <sup>a</sup>	PER	Ayacucho	144916-S	0744035-W
<i>Solanum arcanum</i>				
ECU-777 <sup>a</sup>	PER	Cajamarca	071817-S	0782839-W
ECU-766	PER	Cajamarca	071735-S	0783426-W
ECU-775	PER	Cajamarca	071710-S	0783015-W
ECU-783 <sup>a</sup>	PER	Cajamarca	071947-S	0781102-W
LA-2185 <sup>a</sup>	PER	Amazonas	052900-S	0783100-W
<i>Solanum peruvianum</i>				
CH-20 <sup>a</sup>	CHL	Tarapacá	182415-S	0695843-W
ECU-106 <sup>a</sup>	ECU	El Oro	0319-S	07930-W
PER-412 <sup>a</sup>	PER	Lima	115555-S	0763747-W

<sup>a</sup> Accessions used by Zuriaga et al. (2009).



All these accessions were supplied by Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV, Universitat Politècnica de València, Spain). Ten of these accessions were classified by Zuriaga et al. (2009) using morphological and molecular data [*S. huaylasense* (PE-18, PE-19, PE-20), *S. corneliomulleri* (T-040), *S. arcanum* (ECU-777, ECU-783, LA-2185), and *S. peruvianum* (CH-20, ECU-106, PER-412)]. The other 6 accessions (*S. huaylasense* (PE-27), *S. corneliomulleri* (PER-584, PER-586, PER-592) and *S. arcanum* (ECU-766, ECU-775)] were classified just using the morphological data gathered *in situ*. Geographic areas of the collected accessions are shown in Figure 1.



**Figure 1.** Geographic locations of the accessions used in this work. From North to South Ecuador, Peru and Chile countries.

Seeds were sterilized by immersion in a solution of 25% commercial bleach (40 g/L active chlorine) for 10 min, being then washed twice with sterile deionized water for 5 min each and then sown in Petri dishes containing basal medium (BM: MS salts (Murashige and Skoog, 1962) including vitamins (DUCHEFA, The Netherlands), 1.5% sucrose and 7 g/L plant agar (DUCHEFA, The Netherlands)). The pHs of the media were adjusted to 5.8 before sterilization at 121 °C for 20 min. Cultures were incubated in a growth chamber at 26 °C ± 2 °C under a 16 h photoperiod with cool white light provided by Sylvania cool white F37T8/CW fluorescent lamps (90 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>).

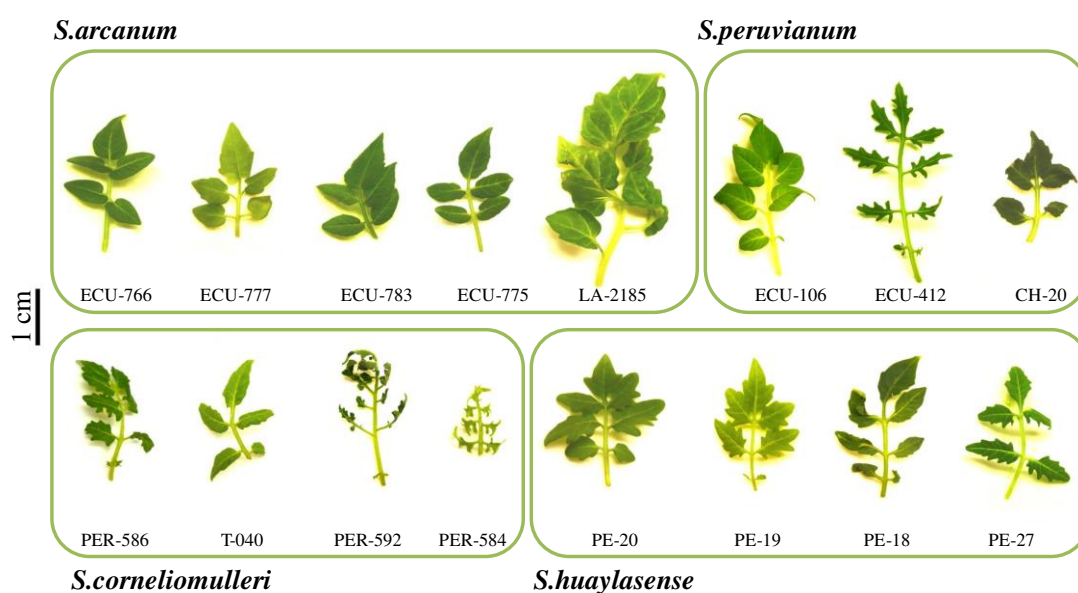
Plants were maintained *in vitro* in tubes with BM. Every 3-4 weeks, plants were transferred to fresh medium. For each genotype, a population of 12 to 34 plants were established and used in our assays.

#### **2.2. Evaluation of the regeneration capacity**

The evaluation was performed using root explants (0.5 cm length; not including apical meristem) and leaf disks (0.6-0.8 cm<sup>2</sup>) obtained from *in vitro* cultured plants at similar growing stage. In each accession, leaf disks were obtained from leaves at the 4<sup>th</sup> and 5<sup>th</sup> position from the apex and cutting the extreme of each leaflet (Figure 2).

Explants were cultured onto two shoot induction medium (SIM): SIM-1, containing MS salts including Nitch vitamins (DUCHEFA, The Netherlands), 3% sucrose, 7% plant agar and 0.5 mg/L zeatin riboside, and SIM-2, that is similar to SIM-1 but supplemented with 0.2 mg/L indole-3-acetic acid. Leaf disks were placed with the abaxial side in contact with the SIM. Growth regulators were sterilized by filtration and added to the sterile SIM. For each accession, five explants per plate (90 × 25 mm with 40 ml of medium per plate) and 10 repetitions per accession were evaluated. After 35 days of culture on SIM, the following variables were analyzed:

- Bud percentage (B): number of explants with buds  $\times$  100/total number of cultured explants.
- Regeneration percentage (R): number of cultures that differentiated into completely developed shoots  $\times$  100/total number of cultured explants.
- Productivity rate (PR): total number of completely developed shoots/total number of cultured explants that regenerated plants.
- Yield (Y): number of regenerated shoots/total number of cultured explants.



**Figure 2.** Leaf shape variability of *S. peruvianum* s.l. complex: (*S. arcanum*, *S. peruvianum* s.s., *S. corneliomulleri*, and *S. huaylasense*), including accessions identifiers. Photos obtained from in vitro cultured plants at a similar growth stage.

### 2.3 Evaluation of the leaf shape

The number of leaflets (LN) in the 4<sup>th</sup> and 5<sup>th</sup> leaves was counted for each genotype. Leaflet area (LA) of the distal leaflet in these leaves was calculated. An index for leaflet margin dentate (LD) was also assigned: from 1 (low margin dentate) to 5 (highly margin dentate). Duplicate measures were taken in five plants of each accession.

## 2.4 Experimental design and statistical analysis

Least squares data analyses were performed on the regeneration capacity traits with the fixed effects of the species (*S. arcanum*, *S. corneliomulleri*, *S. huaylasense* and *S. peruvianum* s.s.), the accession (16 levels and nested to the species effect), the medium (2 levels: SIM-1 and SIM-2) and the tissue (2 levels: leaf and root).

The leaf shape traits were analyzed with a mixed model that included a fixed effect of the species and accession (with the same levels described above) and a random effect of the measure.

Correlations among regeneration and leaf shape traits and within them were analyzed excluding the main effects.

## 3. Results

### 3.1. Leaf shape

Leaves with several leaflets, which differ in size and margin dentate, were observed in the accessions tested (Figure 2). There was a difference on LN among the four species (Table 2): *S. arcanum* showed the lowest LN (with a mean of around 5 leaflets) and *S. corneliomulleri* showed the highest LN (with a mean higher than 8 leaflets).

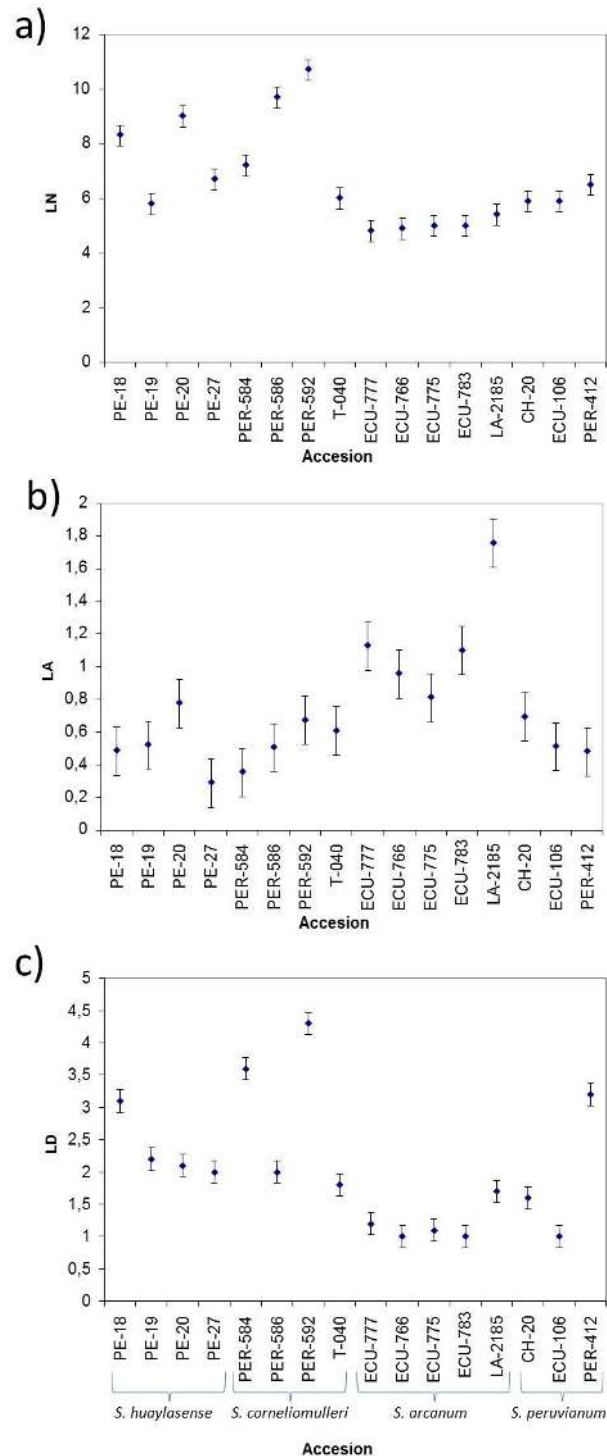
**Table 2.** Least square means ( $\pm$ S.E.) for leaf morphology traits for the *S. huaylasense*, *S. corneliomulleri*, *S. arcanum*, and *S. peruvianum* s.s. species. LN: Number of leaflets; LA: Leaflet area, LD: Leaflet margin dentate.

Factor	LN	LA (cm <sup>2</sup> )	LD (1-5)
<i>S. huaylasense</i>	7,45 $\pm$ 0,19 <sup>b</sup>	0,52 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>	2,35 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>
<i>S. corneliomulleri</i>	8,40 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>	0,53 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>	2,93 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>
<i>S. arcanum</i>	5,02 $\pm$ 0,17 <sup>d</sup>	1,15 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	1,20 $\pm$ 0,08 <sup>d</sup>
<i>S. peruvianum</i>	6,10 $\pm$ 0,22 <sup>c</sup>	0,56 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>	1,93 $\pm$ 0,10 <sup>c</sup>

Means within a column with different superscript differ ( $P < 0.05$ ) according to Duncan test.

Leaflet area did not differ among *S. corneliomulleri*, *S. peruvianum* and *S. huaylasense*.

These three species had lower LA than *S. arcanum*. Leaflet margin dentate showed the same pattern as LN: dentate increase successively in *S. arcanum*, *S. peruvianum*, *S. huaylasense* and *S. corneliomulleri* (Figure 2 and Table 2). Intraspecific variability is also showed for leaf morphology traits (Figure 3).



**Figure 3.** Means ( $\pm$ S.E.) for leaf morphology traits for accessions of the assayed *S. huaylasense*, *S. corneliomulleri*, *S. arcanum*, and *S. peruvianum* s.s. species. **A.** LN: Number of leaflets. **B.** LA: Leaflet area. **C.** LD: Leaflet margin dentate.

The accession PER-592 had the highest LN and LD whereas the accession LA-2185 had the highest LA. Moreover, differences among accessions in *S. huaylasense* and *S. corneliomulleri* have been found for LN. Intraspecific differences were also found for LA in *S. huaylasense* and *S. arcanum* species. Finally, differences among accessions in all the assayed species were found for LD.

There was a positive correlation between LN and LD (0.54; Table 3). However, there were negative correlations among these traits and LA (-0.22 and -0.29, respectively).

**Table 3.** Correlations coefficients between residuals estimated for leaf morphology traits: number of leaflets (LN), Leaflet margin dentate (LD) and Leaflet area (LA).

	LD	LA
LN	0.54*	-0.22*
LD		-0.29*

Different from zero \*P>0.05

### 3.2. Evaluation of the regeneration capacity

Intra and interspecific variability in the organogenesis response was obtained from in vitro cultured explants (Tables 4 and 5; Figure 4).

The percentage of explants with buds (B) was higher in *S. corneliomulleri* than in the other assayed species (Table 4). *S. arcanum* and *S. peruvianum* species showed the lowest B value. All the accessions were able to induce buds from leaf and root explants in both media (SIM-1 and SIM-2) except ECU-106 accession that only

regenerated from leaf segments (Table 5). LA-2185 (*S. arcanum*) and ECU-106 (*S. peruvianum* (s.s.)) accessions showed the lowest B (Figure 4 A). For this parameter no or low differences among accessions have been found in *S. corneliomulleri* and *S. huaylasense*, respectively.

**Table 4.** Least square means ( $\pm$  S.E.) for bud percentage (B), regeneration percentage (R), productivity rate (PR) and yield (Y) from in vitro cultured explants of *S. peruvianum* s.l. complex.

Factor	B	R	PR	Y
<b>Species</b>				
<i>S. huaylasense</i>	78,11 $\pm$ 3,19 <sup>b</sup>	46,70 $\pm$ 3,20 <sup>a</sup>	5,15 $\pm$ 0,48 <sup>a</sup>	3,86 $\pm$ 0,46 <sup>a</sup>
<i>S. corneliomulleri</i>	88,04 $\pm$ 3,24 <sup>a</sup>	51,69 $\pm$ 3,26 <sup>a</sup>	4,49 $\pm$ 0,46 <sup>a</sup>	3,03 $\pm$ 0,44 <sup>ab</sup>
<i>S. arcanum</i>	63,82 $\pm$ 2,95 <sup>c</sup>	35,15 $\pm$ 2,97 <sup>b</sup>	2,80 $\pm$ 0,57 <sup>b</sup>	1,67 $\pm$ 0,54 <sup>c</sup>
<i>S. peruvianum</i>	64,93 $\pm$ 3,87 <sup>c</sup>	42,23 $\pm$ 3,90 <sup>ab</sup>	2,46 $\pm$ 0,83 <sup>b</sup>	1,35 $\pm$ 0,78 <sup>bc</sup>
<b>Explant</b>				
Leaf	89,74 $\pm$ 2,37 <sup>a</sup>	64,51 $\pm$ 2,39 <sup>a</sup>	4,94 $\pm$ 0,35 <sup>a</sup>	4,20 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup>
Root	57,71 $\pm$ 2,29 <sup>b</sup>	23,37 $\pm$ 2,31 <sup>b</sup>	2,51 $\pm$ 0,46 <sup>b</sup>	0,74 $\pm$ 0,44 <sup>b</sup>
<b>Culture medium</b>				
SIM-1	80,12 $\pm$ 2,36 <sup>a</sup>	49,57 $\pm$ 2,38 <sup>a</sup>	3,84 $\pm$ 0,37 <sup>a</sup>	2,62 $\pm$ 0,34 <sup>a</sup>
SIM-2	67,33 $\pm$ 2,31 <sup>b</sup>	38,31 $\pm$ 2,32 <sup>b</sup>	3,61 $\pm$ 0,44 <sup>a</sup>	2,33 $\pm$ 0,41 <sup>a</sup>

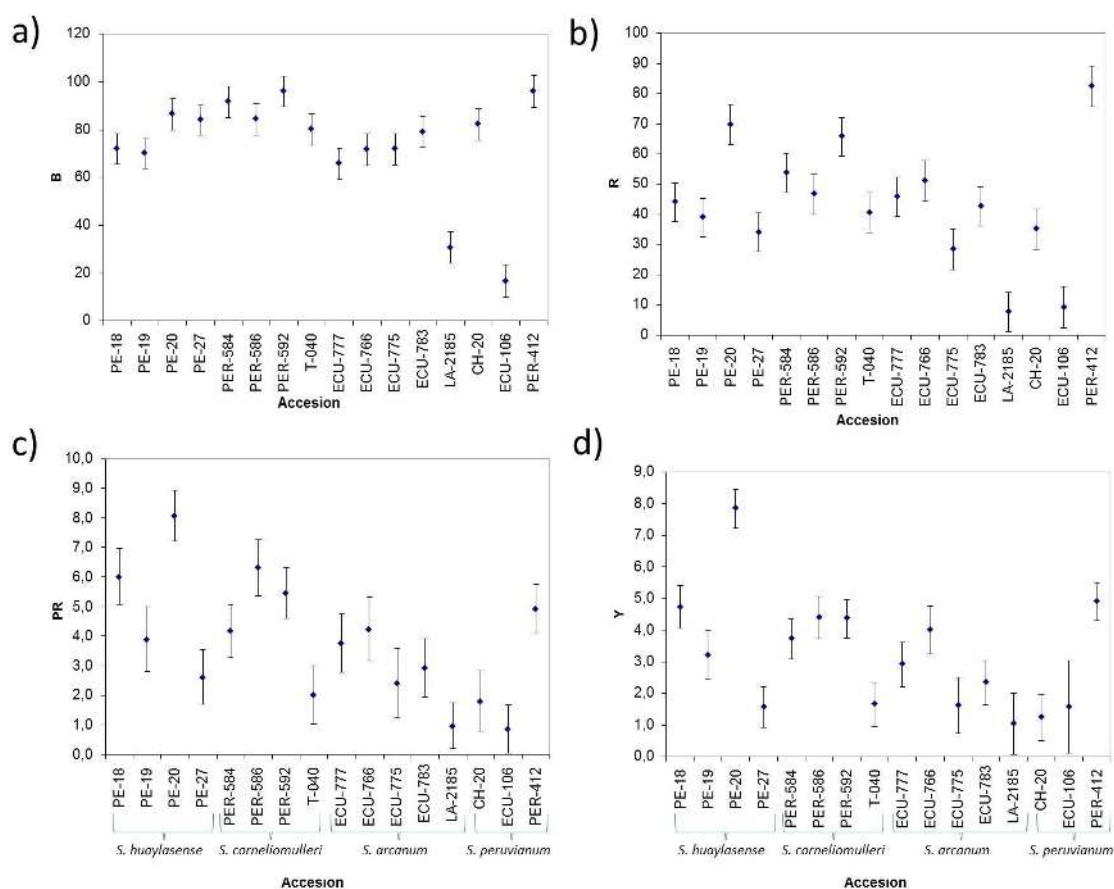
Means within a column with different superscript differ ( $P < 0.05$ ) according to Duncan test.

**Table 5.** Studied accession Means ( $\pm$  S.E.) for bud percentage (B), regeneration percentage (R), productivity rate (PR) from in vitro cultured explants (L: leaf; R: root) on different shoot induction media (SIM-1, SIM-2).

### III. Publicaciones

Species	Accession	Explant	Media	B	R	PR
<i>S. huaylasense</i>	PE-18	L	SIM-1	100.00 ± 0.00	96.00 ± 4.00	10.42 ± 1.38
			SIM-2	88.00 ± 12.00	56.00 ± 14.70	2.79 ± 0.70
		R	SIM-1	48.00 ± 16.25	8.00 ± 8.00	7.25 ± 3.73
			SIM-2	52.00 ± 21.54	16.00 ± 11.66	3.50 ± 1.55
	PE-19	L	SIM-1	100.00 ± 0.00	96.00 ± 4.00	6.21 ± 0.76
			SIM-2	100.00 ± 0.00	52.00 ± 16.25	5.69 ± 1.53
		R	SIM-1	40.00 ± 18.97	8.00 ± 8.00	2.00 ± 1.00
			SIM-2	40.00 ± 24.49	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	PE-20	L	SIM-1	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	10.10 ± 1.37
			SIM-2	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	14.70 ± 2.03
		R	SIM-1	72.00 ± 17.44	52.00 ± 19.60	3.50 ± 1.04
			SIM-2	72.00 ± 17.44	28.00 ± 13.56	4.29 ± 0.64
PE-27	L	SIM-1	100.00 ± 0.00	52.00 ± 10.20	3.77 ± 0.78	
		SIM-2	96.00 ± 4.00	36.00 ± 11.66	1.56 ± 0.24	
	R	SIM-1	80.00 ± 20.00	16.00 ± 9.80	4.17 ± 0.87	
		SIM-2	60.00 ± 18.97	32.00 ± 14.97	2.38 ± 0.50	
<i>S. comelionmulleri</i>	PER-584	L	SIM-1	100.00 ± 0.00	93.75 ± 6.25	8.07 ± 1.84
			SIM-2	100.00 ± 0.00	80.00 ± 14.58	4.50 ± 0.64
		R	SIM-1	100.00 ± 0.00	20.00 ± 10.95	4.40 ± 0.81
			SIM-2	64.00 ± 14.70	24.00 ± 7.48	1.67 ± 0.21
	PER-586	L	SIM-1	100.00 ± 0.00	81.25 ± 11.97	8.67 ± 2.22
			SIM-2	100.00 ± 0.00	75.00 ± 15.81	6.87 ± 1.04
		R	SIM-1	68.00 ± 18.55	12.00 ± 8.00	1.67 ± 0.33
			SIM-2	68.00 ± 20.59	20.00 ± 10.95	8.40 ± 2.25
	PER-592	L	SIM-1	100.00 ± 0.00	75.00 ± 0.00	6.47 ± 1.56
			SIM-2	100.00 ± 0.00	80.00 ± 9.35	6.69 ± 1.10
		R	SIM-1	100.00 ± 0.00	40.00 ± 20.98	4.00 ± 1.16
			SIM-2	84.00 ± 16.00	68.00 ± 18.55	3.44 ± 0.35
T-040	L	SIM-1	100.00 ± 0.00	68.75 ± 11.97	2.18 ± 0.46	
		SIM-2	100.00 ± 0.00	70.00 ± 20.00	3.50 ± 0.67	
	R	SIM-1	64.00 ± 19.39	16.00 ± 7.48	1.50 ± 0.50	
		SIM-2	48.00 ± 20.59	8.00 ± 4.90	2.00 ± 1.00	
<i>S. sarcantum</i>	ECU 777	L	SIM-1	92.00 ± 8.00	84.00 ± 7.48	5.11 ± 0.86
			SIM-2	80.00 ± 20.00	58.75 ± 21.25	5.73 ± 1.05
		R	SIM-1	68.00 ± 20.59	44.00 ± 18.33	2.09 ± 0.44
			SIM-2	20.00 ± 8.94	8.00 ± 4.90	1.50 ± 0.50
	ECU-766	L	SIM-1	100.00 ± 0.00	80.00 ± 11.55	3.56 ± 0.71
			SIM-2	100.00 ± 0.00	85.00 ± 9.57	8.82 ± 2.08
		R	SIM-1	48.00 ± 22.45	24.00 ± 16.00	3.67 ± 1.20
			SIM-2	36.00 ± 16.00	12.00 ± 4.89	6.00 ± 1.00
	ECU-775	L	SIM-1	95.00 ± 5.00	65.00 ± 12.58	2.77 ± 0.59
			SIM-2	76.00 ± 7.48	8.00 ± 8.00	6.00 ± 0.00
		R	SIM-1	75.00 ± 11.25	25.00 ± 18.93	1.80 ± 0.37
			SIM-2	44.00 ± 16.00	20.00 ± 20.00	1.60 ± 0.60
ECU-783	L	SIM-1	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	3.90 ± 0.59	
		SIM-2	76.00 ± 19.39	36.00 ± 19.39	3.33 ± 1.04	
	R	SIM-1	88.00 ± 8.00	33.00 ± 9.95	1.88 ± 0.40	
		SIM-2	52.00 ± 18.55	8.00 ± 4.90	3.50 ± 2.50	
LA-2185	L	SIM-1	60.00 ± 8.94	10.00 ± 5.77	1.00 ± 0.00	
		SIM-2	36.00 ± 13.27	4.00 ± 4.00	2.00 ± 0.00	
	R	SIM-1	24.00 ± 19.39	12.00 ± 12.00	1.33 ± 0.33	
		SIM-2	4.00 ± 4.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	
<i>S. peruvianum</i>	CH-20	L	SIM-1	100.00 ± 0.00	50.00 ± 17.32	3.60 ± 0.93
			SIM-2	100.00 ± 0.00	75.00 ± 19.36	2.07 ± 0.46
		R	SIM-1	76.00 ± 14.70	24.00 ± 11.66	2.00 ± 0.45
			SIM-2	52.00 ± 20.59	4.00 ± 4.00	1.00 ± 0.00
	ECU-106	L	SIM-1	65.00 ± 12.58	32.50 ± 11.09	2.00 ± 0.45
			SIM-2	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
		R	SIM-1	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
			SIM-2	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	PER-412	L	SIM-1	100.00 ± 0.00	88.00 ± 8.00	6.14 ± 1.45
			SIM-2	100.00 ± 0.00	93.75 ± 6.25	7.56 ± 1.19
		R	SIM-1	88.00 ± 12.00	88.00 ± 12.00	3.86 ± 0.70
			SIM-2	100.00 ± 0.00	60.00 ± 18.26	2.83 ± 0.46





**Figure 4.** Means ( $\pm$  S.E.) for regenerating traits in accessions of *S. huaylasense*, *S. corneliomulleri*, *S. arcanum* and *S. peruvianum* s.e. species. **A.** Bud percentage (B). **B.** regeneration percentage (R). **C.** Productivity rate (PR). **D.** Yield (Y).

The development of buds onto shoots was measured as R (regeneration percentage). *S. huaylasense* and *S. corneliomulleri* species showed similar R value, and both, showed higher R than *S. arcanum* (Table 4). Variability among accessions for this trait has been found in the four assayed species. The lowest R value (around 10%) were obtained in accessions LA-2185 and ECU-106 of *S. arcanum* and *S. peruvianum*, respectively as occurred for B (Figure 4 B). The accession PER-412 of *S. peruvianum* showed the highest R (85%) and, R values higher than 50%, were obtained in PE-20 and PER-592 of *S. huaylasense* and *S. corneliomulleri*, respectively.

For productivity rate (PR) intra and interspecific variability was also observed. For instance, *S. huaylasense* and *S. corneliomulleri* showed higher PR than *S. arcanum* and *S. peruvianum* (Table 4). Differences among accessions appeared in all species (Figure 4 C). For example, in *S. huaylasense*, PE-20 accession which had the highest PR differed from the other assayed accessions (PE-18, PE-19 and PE-27).

Plant regeneration per total explant considered as yield (Y), differed among species and accessions. *S. huaylasense* showed similar Y than *S. corneliomulleri* and both species showed higher Y value than *S. arcanum* (Table 4). The accession PE-20 of *S. huaylasense* showed the highest Y (Figure 4 D). Among the other three accessions of *S. huaylasense*, Y values decreased successively in PE-18, PE-19 and PE-27. In *S. corneliomulleri* similar Y values had been observed in the accessions collected in Arequipa region (PER-584, PER-586 and PER-592). These accessions showed higher Y than the accession collected in Ayacucho (TE-040). Although *S. peruvianum* species showed the lowest Y value, the accession PER-412, showed a Y value of 4 that is similar to the mean obtained in leaf explants (Table 4). Taking into account Y values, the most recalcitrant accessions were CH-20 and ECU-106 of *S. peruvianum*, the LA-2185 and ECU-775 accessions of *S. arcanum*, T-040 accession of *S. corneliomulleri* and the accession PE-27 of *S. huaylasense*.

Differences between root and leaf explants as well as between SIM media (Table 4) were also observed; the organogenesis response was higher in leaf explants than in roots in all analyzed traits (B, R, PR and Y) whereas SIM-1 showed higher B and R values than SIM-2.

Positive correlations among organogenic traits have been found except for B and PR, where no correlation has been obtained (Table 6). A high correlation (0.92) was observed between PR and Y.

Correlations among leaf morphology traits (LN, LA and LD) and organogenic traits (B, R, PR and Y) were also estimated (Table 7). There were positive correlations among LN and organogenic traits. Positive correlations were also found among LD and organogenic traits. However, negative correlations were found among LA and organogenic traits. All the correlations showed intermediate values.

**Table 6.** Correlations coefficients between residuals estimated for bud percentage (B), regeneration percentage (R), productivity rate (PR) and yield (Y) from in vitro cultured explants of *S. peruvianum* s.l. complex.

	R	PR	Y
B	0.67*	0.14	0.25*
R		0.40*	0.62*
PR			0.92*

Different from zero \*P>0.05.

**Table 7.** Correlations coefficients between residuals estimated for leaf morphology (number of leaflets (LN), Leaflet margin dentate (LD) and Leaflet area (LA)) and organogenesis response (Bud percentage (B); Regeneration percentage (R); Productivity rate (PR) and Yield (Y)).

	B	R	PR	Y
LN	0.47*	0.43*	0.53*	0.47*
LA	-0.36*	-0.35*	-0.32*	-0.29*
LD	0.51*	0.46*	0.37*	0.34*

Different from zero \*P>0.05

## 4. Discussion

### 4.1. Leaf shape

Several traits related with leaves are commonly used in taxonomy classification (Peralta et al., 2005). In our assay, interspecific and intraspecific variability is showed for leaf morphology and, the analyzed species, can be differentiated by LN or by LD. However, LA only separated *S. arcanum* of the rest of accessions despite LN and LD was used by

Peralta et al. (2005) for separating *S. huaylasense* from other species of the *S. peruvianum* s.l. complex. A putative explanation is that LA may differ depending on culture conditions (in vitro vs. field). Pubescence that is another trait used at the first steps of classification (Peralta et al., 2005), was not useful for differentiate species in plants cultured in vitro although differences were appreciated in greenhouse conditions (data not shown). Some of the accessions used in our work were analyzed at molecular level and *S. arcanum* was separated from the other species included in the *S. peruvianum* s.l. complex (Zuriaga et al., 2009) as occurred with LA in plants cultured in vitro.

Among *S. peruvianum* accessions, differences in LD were found whereas similar values were obtained for the other traits despite these accessions proceeded from different countries. LA and LD were similar in *S. arcanum* accessions collected at a similar zone (ECU-766; ECU-775, ECU-777 and ECU-783; Figure 1) whereas the accession LA-2185, collected further north, showed big and high LD and LA. In *S. huaylasense* differences in all leaf morphology traits were found despite accessions were collected in the same region. Similar results were obtained for *S. corneliomulleri* accessions.

#### **4.2. Evaluation of regeneration capacity**

Organogenesis was assayed in leaf and root explants cultured on SIM-1 and SIM-2. These explants were chosen because root segments are commonly used as explants for regeneration in *S. peruvianum* (Parker-Norton and Boll, 1954; Koornneef et al., 1993; Peres et al., 2001) whereas leaf explants are used for tomato plants (Kut and Evans, 1982; Ruf et al., 2001; Khoudi et al., 2009; Trujillo-Moya et al., 2011; Trujillo-Moya and Gisbert, 2012) and other related wild species (Gisbert et al., 1999; Arrillaga et al.,

2001). Respect shoot induction media, we used SIM-1 that is commonly used in our research group to induce organogenesis in tomato plants or *S. pennellii* (Trujillo-Moya et al., 2011; Trujillo-Moya and Gisbert, 2012) and SIM-2, which was similar to SIM-1 but also contains the auxin indole-3-acetic acid. The combination of auxin and cytokinin was reported as favorable for regeneration in some tomato accessions (Bhatia et al., 2004; Devi et al., 2008).

Taking into account the results observed in the regeneration traits used for quantifying the regeneration ability, we can conclude that SIM-1 was better than SIM-2 for B and R whereas similar results were obtained for PR and Y (Tables 4 and 5). Regeneration from roots was obtained in all tested accessions with the exception of ECU-106 of *S. peruvianum* (Table 5). Despite regeneration in *S. peruvianum* was reported from root explants (Parker-Norton and Boll, 1954; Koornneef et al., 1993; Peres et al., 2001), leaf explants had higher regeneration capacity (B, R, PR and Y) than roots in the assayed accessions (Table 4).

High yield of regeneration was obtained in *S. huaylasense* and *S. corneliomulleri* species as it is reported for other wild tomato species like *S. pennellii* (Trujillo-Moya et al., 2011; Trujillo-Moya and Gisbert, 2012) and *S. cheesmanii* (Arrillaga et al., 2001). However, lower values were obtained in *S. arcanum* and *S. peruvianum* species (Table 4). PR values in *S. peruvianum* s.s. were similar to the values reported by Steinitz et al. (2006) and lower than those obtained by Peres et al. (2001) in *S. peruvianum* var. *humifusum*. Despite high regeneration ability is described in the *S. peruvianum* s.l. complex, where the high regeneration gene *Rg-1* was found (Koornneef et al., 1993), we have classified as recalcitrant two of three *S. peruvianum* s.s. assayed accessions, concretely, ECU-106 and CH-20. In all the assayed species higher B than R were observed which indicate that not all the buds are able to develop onto plants. Lack of

bud development is commonly observed in explants of tomato and wild related species (Steinitz et al., 2006; Pratta et al., 2007).

Regarding *S. arcanum* accessions, more similar regeneration behavior was observed in accessions collected in a proximate area (ECU-777, ECU-766, ECU-775 and ECU-783) compared with the accession LA-2185 collected in another region (Figure 1 and Table 1). Similar results were also observed in *S. corneliomulleri* (PER-586 and PER-584). However, in *S. huaylasense*, accessions collected in the same region (PE-18, PE-19 and PE-20) showed differences for regeneration.

Correlations among leaf parameters (LN, LA, LD) showed a moderated correlation between LD and NL. For regeneration traits (B, R, PR, Y), a correlation between B and R was expected as buds are needed to develop plants. However, no relationship was obtained when comparing B and PR as not all the buds develop onto shoots. High correlations were obtained among R, PR and Y. This indicated that, in these accessions, the regeneration response is more uniform because a high number of explants with buds develop into plants. Finally, we have studied correlations between leaf and regeneration parameters. Results indicated that explants from leaves with high amount of leaflets had high regeneration rates. Similar relationship was observed with LD and regeneration traits whereas leaves with high area had low response. Cytokinin regulates flexible leaf patterning by dynamic interaction with additional hormones and transcription factors (Shani et al., 2010). As the organogenic response may be influenced by endogenous hormones, the observed results could be related with a high endogenous cytokinin concentration in small and more dentate leaf explants.

### **Conclusions**

In a whole, we have observed differences for leaf morphology and regeneration capacity among accessions of the four *Solanum* tested species; *S. arcanum*, *S. corneliomulleri*, *S. huaylasense* and *S. peruvianum* s.s. In plants cultured in vitro, the analyzed species can be differentiated by the number or the dentate shape of leaflets. However, leaf area only separated *S. arcanum* of the rest of species. Regarding regeneration, the LA-2185 accession of *S. arcanum* and the accessions ECU-106 and CH-20 of *S. peruvianum* s.s. can be considered as low regenerating whereas the rest of accessions had a good and high regeneration capacity. Despite the four assayed species are able to regenerate from root explants, leaf explants have been selected as more appropriated for in vitro regeneration. Better results were also obtained in the organogenic medium SIM-1 with respect to SIM-2. Interestingly, explants from leaves with high amount and more dentate leaflets had higher regeneration.

### **Acknowledgements**

C. Trujillo thanks the Spanish ‘Ministerio de Educación y Ciencia’ for a predoctoral fellowship. This work has been funded by Universitat Politècnica de València (PAID 05-10). The authors acknowledge the germplasm bank of the Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV) for supplying accessions.

### **References**

Alvarez AE, Van De Wiel CCM, Smulders MJM, Vosman B: **Use of microsatellites to evaluate genetic diversity and species relationships in the genus *Lycopersicon***. *Theor Appl Genet* 2001, 103: 1283-1292.

- Arrillaga I, Gisbert C, Sales E, Roig L, Moreno V: **In vitro plant regeneration and gene transfer on the wild tomato *Lycopersicon cheesmanii***. J Hort Sci Biotech 2001, 76: 413-418.
- Bhatia P, Ashwath N, Senaratna T, David M: **Tissue culture studies of tomato (*Lycopersicon esculentum*)**. Plant Cell Tiss Org Cult 2004, 78: 1-21.
- Bedinger PA, Chetelat R, McClure B, Moyle LC, Rose JKC, Stack S, van der Knaap E, Baek Y, Lopez-Casado G, Covey PA, Kumar A, Li W, Nunez R, Cruz-Garcia F, Royer S: **Interspecific reproductive barriers in the tomato clade: opportunities to decipher mechanisms of reproductive isolation**. Sex Plant Reprod 2011, 24: 171-187.
- Cap GB, Roberts PA, Thomason IJ, Murashige T: **Embryo Culture of *Lycopersicon esculentum* x *L. peruvianum* Hybrid Genotypes Possessing Heat-stable Resistance to *Meloidogyne incognita***. J Amer Soc Hort Sci 1991, 116(6): 1082-1088.
- Chaerani R, Smulders MJ, van der Linden CG, Vosman B, Stam P, Voorrips RE: **QTL identification for early blight resistance (*Alternaria solani*) in a *Solanum lycopersicum* x *S. arcanum* cross**. Theor Appl Genet 2007, 114: 439-450.
- Chen LZ, Adachi T: **Protoplast fusion between *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum*-complex: somatic embryogenesis, plant regeneration and morphology**. Plant Cell Rep 1998, 17: 508-514.
- Cortada L (2009). **Tomato rootstocks for the control of *Meloidogyne* spp.** PhD, Universitat Politècnica de Catalunya, Spain.
- Devi R, Dhaliwal MS, Kaur A, Gosal SS: **Effect of growth regulators on in vitro morphogenic response of tomato**. Indian J Biotech 2008, 7: 526-530.



- Faria RT, Destro D, Bespalhok JC, Illg RD: **Introgression of in vitro regeneration capability of *Lycopersicon pimpinellifolium* Mill. into recalcitrant tomato cultivars.** Euphytica 2002, 124: 59-63.
- Foolad MR, Merk HL, Ashrafi H: **Genetics, Genomics and breeding of late blight disease and early blight disease in tomato.** Crit Rev Plant Sci 2007, 27: 75-107.
- Gisbert C, Arrillaga I, Roig LA, Moreno V: **Acquisition of a collection of *Lycopersicon pennellii* (Corr. D'Arcy) transgenic plants with *uidA* and *nptII* marker genes.** J Hort Sci Biotech 1999, 74(1): 105-109.
- Jablonska B, Ammiraju JSS, Bhattarai K, Mantelin S, Martinez de Ilarduya O, Roberts PA, Kaloshian I: **The *Mi-9* Gene from *Solanum arcanum* conferring heat-stable resistance to root-knot nematodes is a homolog of *Mi-1*.** Plant Physiology 2007, 143: 1044-1054.
- Khoudi H, Nouri-Khemakhem, Gouiaa S, Masmoudi K: **Optimization of regeneration and transformation parameters in tomato and improvement of its salinity and drought tolerance.** African J Biotech 2009, 8(22): 6068-6076.
- Kochevenko A, Ratushnyak Y, Korneyeyev D, Stasik O, Porublyova L, Kochubey S, Suprunova T, Gleba Y: **Functional cybrid plants of *Lycopersicon peruvianum* var 'dentatum' with chloroplasts of *Lycopersicon esculentum*.** Plant Cell Rep 2000, 19: 588-597.
- Koornneef M, Hanhart CJ, Martinelli L: **A genetic analysis of cell culture traits in tomato.** Theor Appl Genet 1987, 74: 633-641.
- Koornneef M, Bade J, Hanhart C, Horsman K, Schel J, Soppe W, Vekerk R, Zabel P: **Characterization and mapping of a gene controlling shoot regeneration in tomato.** Plant J 1993, 3: 131-141.

- Kut SA, Evans DA: **Plant regeneration from cultured leaf explants of eight wild tomato species and two related Solanum species.** In *Vitro Cell Dev Biol* 1982, 8: 593-598.
- Marchionni BE, Pratta GR, Zorzoli R: **Genetic analysis of the in vitro culture response in tomato.** *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2007, 88: 233-239.
- Miller JC, Tanksley SD: **RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*.** *Theor Appl Genet* 1990, 80: 437-448.
- Murashige T, Skoog F: **A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures.** *Physiol Plant* 1962, 15: 473-497.
- Parker-Norton J, Boll WG: **Callus and shoot formation from tomato roots in vitro.** *Science* 1954, 119: 220-221.
- Peralta IE, Knapp S, Spooner DM: **New species of wild tomatoes (*Solanum* section *Lycopersicon*: Solanaceae) from Northern Peru.** *Syst Bot* 2005, 30(2): 424-434.
- Peralta IE, Spooner DM, Knapp S: **Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (*Solanum* sections *Lycopersicoides*, *Juglandifolia*, *Lycopersicon*; Solanaceae).** *Syst Bot Monogr* 2008, 84: 1-186.
- Pereira-Carvalho RC, Boiteux LS, Fonseca MEN, Díaz-Pendón JA, Moriones E, Fernández-Muñoz R, Charchar JM, Resende RO: **Multiple resistance to *Meloidogyne* spp. and to bipartite and monopartite *Begomovirus* spp. in wild *Solanum* (*Lycopersicon*) accessions.** *Plant Dis* 2010, 94(2): 179-185.
- Peres LEP, Morgante PG, Vecchi C, Kraus JE, Sluys MAV: **Shoot regeneration capacity from roots and transgenic hairy roots of tomato cultivars and wild related species.** *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2001, 65: 37-44.

- Pratta G, Zorzoli R, Picardi LA: **Intra and interspecific variability of in vitro culture response in *Lycopersicon* tomatoes.** Braz J Genet 1997, 20: 75-78.
- Ruf S, Hermann M, Berfr IJ, Carrer H, Bock R: **Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of foreign protein in fruit.** Nature Biotech 2001, 19: 870-875.
- Sacks EJ, Gerhardt LM, Gtaham EB, Jacobs J, Thorrup TA, Clair DA: **Variation among 41 genotypes of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) for crossability to *L. peruvianum* (L.) Mill.** Ann Bot 1997, 80: 469-477.
- Satoh H, Takashina T, Escalante A, Egashira H, Imanishi S: **Molecular markers mapped around the high shoot regeneration capacity gene *Rg-2* in *Lycopersicon chilense*.** Breed Sci 2000, 50(4): 251-256.
- Segeren MI, Sondahl MR, Siqueira WJ, Medina Filho HP, Nagai H, Lourencao AI: **Tomato breeding: 1. Embryo rescue of interspecific hybrids between *Lycopersicon esculentum* Mill. and *L. peruvianum* Mill.** Revista Brasileira de Genetica 1993, 16: 367-380.
- Shani E, Ben-Gera H, Shleizer-Burko S, Burko Y, Weiss D, Ori N: **Cytokinin regulates compound leaf development in tomato.** Plant Cell 2010, 22 (10): 3206-17.
- Smith PG: **Embryo culture of a tomato species hybrid.** Proc Amer Soc Hort Sci 1944, 44: 413-416.
- Spooner DM, Peralta IE, Knapp S: **Comparison of AFLPs with other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes [*Solanum* L. section *Lycopersicon* (Mill.) Wettst.].** Taxon 2005, 54: 43-61.

- Steinitz B, Amitay A, Gaba V, Tabib Y, Keller M, Levin I: **A simple plant regeneration ability assay in a range of *Lycopersicon* species.** Plant Cell Tiss Org Cult 2006, 84: 269-278.
- Stommel JR, Sinden SL: **Genotypic differences in shootforming capacity of cultured leaf explants of *Lycopersicon hirsutum*.** HortSci 1991, 26: 1317-1320.
- Takashina T, Suzuki T, Egashira H, Imanishi S: **New molecular markers linked with the high shoot regeneration capacity of the wild tomato species *Lycopersicon chilense*.** Breed Sci 1998, 48: 109-113.
- Thomas BR, Pratt D: **Efficient hybridization between *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum* via embryo cells.** Theor Appl Genet 1981, 59: 215-219.
- Trujillo-Moya C, Gisbert C, Vilanova S, Nuez F: **Localization of QTLs for in vitro plant regeneration in tomato.** BMC Plant Biol 2011, 11: 140.
- Trujillo-Moya C, Gisbert C: **The influence of ethylene and ethylene modulators on shoot organogenesis in tomato.** Plant Cell Tiss Org Cult 2012, 111: 41-48.
- Zuriaga E, Blanca J, Nuez F: **Classification and phylogenetic relationships in *Solanum* section *Lycopersicon* based on AFLP and two nuclear gene sequences.** Genet Resour Crop Evol 2009, 56: 663-678.

## **IV. DISCUSIÓN GENERAL**



La presente tesis se centra en el estudio de la capacidad organogénica en tomate y especies relacionadas para la mejora de este cultivo, así como en la localización de QTLs implicados y el estudio de la influencia del etileno en este proceso. En los tres trabajos presentados en este documento se muestra la complejidad de dicho carácter, que es heredable, tal como se muestra en otros trabajos realizados en tomate (Frankenberger *et al.* 1981; Koornneef *et al.* 1987). La influencia del genotipo y de los reguladores de crecimiento son dos de los factores más determinantes para conseguir regeneración de plantas a partir de explantes en cultivo *in vitro* (El-Farash 1993; Bhatia *et al.* 2004).

Durante la organogénesis *in vitro*, las células y tejidos vegetales pasan por tres estados del desarrollo experimentalmente distinguibles definidos como “competencia morfogénica”, “determinación del desarrollo” y “diferenciación morfológica” (Christianson y Warnick 1983, 1984, 1985; Hicks 1994; Lakshmanan *et al.* 1997; Sugiyama 1999). Con el fin de cuantificar la respuesta organogénica, en este trabajo se ha analizado la formación de yemas (B); el desarrollo de yemas en plantas (R); y número total de plantas producidas e individualizadas por explante (PR). Es importante diferenciar entre B y R pues hay yemas que no se desarrollan en tomate (Pratta *et al.* 1997; Steinitz *et al.* 2006).

Estas variables se han utilizado para estudiar la regeneración y detectar regiones cromosómicas que actúan en diferentes momentos de la organogénesis (Trujillo-Moya *et al.* 2011), estudiar el papel del etileno en la regeneración mediante la evaluación del efecto de inhibidores y liberadores de etileno en cada punto de la secuencia organogénica (Trujillo-Moya y Gisbert 2012) así como caracterizar la capacidad organogénica de material silvestre del complejo *S. peruvianum* (s.l.), desconocida hasta el momento.

En las últimas décadas se han realizado múltiples estudios con el fin de desvelar la genética de la regeneración en tomate, generando familias segregantes a partir de cruces entre tomate y accesiones de *S. peruvianum* (Koornneef *et al.* 1987; 1993), *S. pimpinellifolium* (Faria y Illg 1996) y *S. chilense* (Takashina *et al.* 1998; Satoh *et al.* 2000). Sin embargo, hasta la presente tesis, no se ha analizado la regeneración en tomate mediante el mapeo de QTLs que sí se ha realizado en diversas monocotiledóneas como arroz (Taguchi-Shiobara *et al.* 1997), trigo (Ben Amer *et al.* 1997) y maíz (Murigneux *et al.* 1994). El número de QTLs localizados en estas especies va desde 1 a 8.

En nuestro trabajo se han utilizado dos poblaciones de mapeo ( $F_2$  y  $BC_1$ ) desarrolladas por la Dra. Gisbert, a partir de una accesión parental silvestre de *S. pennellii* con alta capacidad de regeneración (PE-47), y un cultivar de tomate (cv. Anl27) seleccionado por su baja capacidad regenerativa en explantes cultivados *in vitro*. Se ha utilizado así por primera vez como parental de alta capacidad de regeneración una accesión de *S. pennellii*. Por otra parte, la regeneración se evaluó en explantes foliares y no en explantes de raíz, utilizados en los ensayos realizados en *S. peruvianum* (Koornneef *et al.* 1987; 1993) y *S. chilense* (Takashina *et al.* 1998; Satoh *et al.* 2000), ya que la respuesta en raíz para nuestros materiales era muy variable o errática.

El fenotipado realizado parece indicar dominancia completa para el carácter B, dominancia parcial para R y efectos aditivos en PR, lo que está de acuerdo con la bibliografía consultada, donde se ha descrito dominancia en mayor o menor grado, dependiendo del carácter estudiado (Ohki *et al.* 1978; Kut y Evans 1982; Adams y Quiros 1985; Tan *et al.* 1987; Wijbrandi *et al.* 1988; Faria y Illg 1996). La distancia genética entre parentales y las diferencias en las capacidades de regeneración han sido fundamentales en la obtención de las poblaciones segregantes derivadas y por ende de la



alta calidad de los mapas de ligamiento obtenidos. En total se han identificado seis QTL implicados en la regeneración por la vía organogénica en tomate, los cuales se han localizado en los cromosomas 1 (*SpRg-1*), 3 (*Rg-3*), 4 (*SpRg-4a*, *SpRg-4b*), 7 (*SpRg-7*) y 8 (*SIRg-8*). Cinco de los QTLs (*SpRg-1*, *Rg-3*, *SpRg-4a*, *SpRg-4b*, *SpRg-7*) proceden del tomate silvestre *S. pennellii* y uno (*SIRg-8*) procede de *S. lycopersicum*.

Como suele ocurrir en poblaciones derivadas de cruces entre tomate y especies silvestres, el genotipado de las poblaciones de mapeo ( $F_2$ ,  $BC_1$ ) muestran distorsión de la segregación mendeliana en los marcadores (Chaerani *et al.* 2007; Shirasawa *et al.* 2010). Esta distorsión de la segregación es mayor en  $F_2$  que en  $BC_1$ ; como consecuencia, el número de QTLs detectados en ambas poblaciones no es equivalente. *SpRg-7* es el único QTL que se ha detectado en ambas poblaciones lo que confirma la importancia de éste QTL, así como la necesidad de estudiar el retrocruce para reducir el efecto de la distorsión en la segregación y detectar los QTLs enmascarados en el análisis de la población  $F_2$  (Collard *et al.* 2005).

El porcentaje de varianza explicada por cada QTL va desde el 7,4% al 27%, lo que está de acuerdo con el rango más común (6-26%) registrado en el mapeo genético de QTL para la respuesta del cultivo de tejidos en las plantas (Bolibok y Rakoczy-Trojanowska 2006). De los QTLs detectados en el estudio, *SpRg-1* y *SpRg-7* son los que explican mayor porcentaje de variación fenotípica: *SpRg-1* es el mayor responsable de la respuesta morfogenética mientras que *SpRg-7* promueve el desarrollo de la yema hacia una planta completa. Por otra parte, los QTLs detectados en los cromosomas 8 (*SIRg-8*) y 4 (*SpRg-4a*, *SpRg-4b*) podrían contener genes que influyen en la formación de yemas y su desarrollo, respectivamente. Finalmente, el QTL *Rg-3* situado en la mitad del cromosoma 3, al estar ligado al gen de la invertasa ácida, se presenta como un alelo putativo del gen *Rg* detectado en *S. peruvianum* (*Rg-1*) por el grupo de Koornneef *et al.*

(1993) y en *S.chilense* (Rg-2) por Satoh *et al.* (2000); no obstante, sería necesario realizar una prueba de alelismo para confirmar que se tratan de tres alelos de un mismo gen.

Por otra parte, en nuestras poblaciones de mapeo se ha observado herencia transgresiva; algunos individuos muestran una producción de plantas regenerantes (PR) dos veces mayor que la del parental silvestre de *S. pennellii*. Esto sugiere una herencia poligénica del carácter así como la existencia de alelos que promueven, y otros que inhiben la regeneración *in vitro* (Bolibok y Rakoczy-Trojanowska 2006). La segregación transgresiva ya se ha descrito en otros trabajos en relación con el control genético de la regeneración (Komatsuda *et al.* 1993, Taguchi-Shiobara *et al.* 1997; Flores Berrios *et al.* 2000). Recientemente Arikita *et al.* (2013) mediante el estudio de la regeneración a partir líneas de introgresión (ILs) de *S. pennellii* en el fondo de tomate M82 (Eshed *et al.* 1992) han detectado regiones del genoma que podrían contener QTLs responsables de la regeneración. La utilización de estas líneas se descartó en nuestro estudio, debido a la alta capacidad de regeneración que observamos en los dos parentales. Sin embargo, a pesar de la similitud de la respuesta de los parentales, la herencia transgresiva ha permitido a Arikita *et al.* (2013) observar diferencias en la regeneración de las distintas ILs y han localizado 6 regiones cromosómicas implicadas en la regeneración, situadas en los cromosomas 3, 6, 7, 8, 9,10; siendo las regiones localizadas en el cromosoma 3, 7 y 8 las más importantes en el proceso organogénico. Resultados que coinciden con los obtenidos por nuestro grupo (Trujillo-Moya *et al.* 2011).

Puesto que el éxito de la regeneración en tomate depende, además del genotipo, de la combinación y concentración de reguladores de crecimiento utilizados para inducir la respuesta (El-Farash 1993; Bhatia *et al.* 2004). Además del papel de la auxina y

citoquinina en la morfogénesis *in vitro*, existen evidencias considerables acerca de la importancia de etileno en este proceso (Biddington 1992; Moshkov *et al.* 2008), pero los trabajos son muy escasos y con resultados dispares (Mohiuddin *et al.* 1997; Dimasi-Theriou and Economou 1995).

En la presente tesis se ha estudiado la influencia del etileno en la regeneración, utilizando la accesión PE-47 de *S. pennellii* y el híbrido (*S. lycopersicum* cv. Anl27 x *S. pennellii* PE-47) empleados en la detección y localización de QTLs. Este material previamente caracterizado permite estudiar el papel de etileno en genotipos con diferente respuesta: *S. pennellii* (PE-47) altamente regenerante y F<sub>1</sub> de respuesta intermedia.

Para modificar los niveles de etileno en cultivo *in vitro* se utilizaron dos compuestos liberadores de etileno (ACC y Ethephon) y dos inhibidores de etileno: AgNO<sub>3</sub>, que inhibe la acción del etileno; y CoCl<sub>2</sub>, que inhibe la producción de etileno. La aplicación de estos compuestos en diferentes dosis y momentos ha permitido, por un lado, detectar la concentración efectiva de cada compuesto y, por otro, identificar el momento de la secuencia organogénica en el que es vital un nivel de etileno adecuado (Trujillo-Moya y Gisbert 2012). La disminución de etileno tras la aplicación de AgNO<sub>3</sub>, tiene un efecto negativo sobre la regeneración ya que disminuye y retrasa la respuesta. Además, las plantas regenerantes obtenidas presentan un tamaño menor que los controles, pudiendo aparecer vitrificación y malformaciones. Estos resultados indican que el etileno es necesario para la organogénesis en tomate al igual que en otras especies (Kumar *et al.* 1998). Las diferencias observadas entre las plantas F<sub>1</sub> (inhibición total) y *S. pennellii* (disminución de la regeneración) pueden deberse a diferentes concentraciones de etileno endógeno, así como a la influencia de los diferentes alelos implicados en la percepción de etileno y la respuesta organogénica. Por otra parte, la

suplementación de etileno puede mejorar la regeneración. La adición de ACC a pesar de reducir B y consecuentemente R, provocó un aumento de PR. Así, el número de plantas regeneradas a partir de explantes de *S. pennellii* se duplicó en los medios con ACC respecto al medio control. Este resultado fue observado en tabaco (Huxter *et al.* 1981), e indica que el etileno influye claramente en la desarrollo de las yemas. En explantes de F<sub>1</sub>, el número de brotes inducidos fue menor que en *S. pennellii*, ya que, supuestamente en la F<sub>1</sub>, la concentración de etileno endógeno es menor. Si la aplicación de ACC se realiza tras la inducción de las yemas, puede obtenerse el mismo PR (número total de plantas regeneradas / número de explantes con planta) pero el rendimiento total es mayor ya que el número de explantes que regenera planta (R) es mayor. Este aumento se ha producido en *S. pennellii* y en el genotipo F<sub>1</sub> cuando la aplicación de ACC ha sido tras 10 días de la inducción, con un efecto mucho mayor en los explantes de *S. pennellii*. Este resultado indica que este compuesto podría ser utilizado para mejorar la regeneración en aquellos genotipos donde una vez formadas las yemas, el desarrollo de éstas hacia plantas sea el paso limitante. Por otra parte, las plantas regenerantes obtenidas muestran buen desarrollo, por lo que la suplementación de etileno no afecta al posterior crecimiento de las plantas regeneradas.

En nuestro estudio, las concentraciones de CoCl<sub>2</sub> utilizadas fueron muy bajas y no tuvieron efecto alguno en la regeneración. Sin embargo, se utilizaron concentraciones de Ethephon muy elevadas por lo que se observó un efecto tóxico e inhibitorio de la regeneración, ya descrito por Chraibi *et al.* (1991).

En definitiva, el estudio realizado en ésta tesis muestra la gran influencia que el etileno tiene en la organogénesis de tomate (Trujillo-Moya y Gisbert 2012). Una concentración óptima de etileno influye en la inducción de las yemas, el desarrollo de las mismas, así como en el crecimiento posterior de los brotes regenerados. Los ensayos

realizados muestran que la concentración y el momento de la aplicación de los modificadores del etileno son dos factores fundamentales a tener en cuenta para el éxito de la respuesta organogénica.

Las especies silvestres relacionadas con tomate tienen un papel fundamental en la mejora genética y en concreto, el complejo *S. peruvianum* s.l, es considerado una fuente de genes de interés. Los análisis de RFLP, SSR y AFLP muestra que este complejo es genéticamente muy variable y por tanto muy útil en la incorporación de nuevos alelos que no se encuentran actualmente en el tomate cultivado (Miller y Tanksley 1990; Álvarez *et al.* 2001; Spooner *et al.* 2005; Zuriaga *et al.* 2009). Sin embargo, las barreras de hibridación que existen entre estas especies y el tomate cultivado, (Sacks *et al.* 1997; Bedinger *et al.* 2010) dificultan su utilización en la mejora, y es necesario en muchas ocasiones el rescate de embriones (Smith 1944; Cap *et al.* 1991), o la fusión de protoplastos (Chen y Adachi 1998; Kochevenko *et al.* 2000). Diversos estudios realizados muestran una elevada capacidad organogénica en el complejo *S. peruvianum*, donde se mapeó el primer gen asociado a la regeneración, el gen *Rg-1* (Koornneef *et al.* 1993). Sin embargo, actualmente, de este complejo se han segregado cuatro especies: *S. arcanum*, *S. huaylasense*, *S. corneliomulleri* y *S. peruvianum* sensu stricto (Peralta *et al.* 2005) que pueden tener un papel fundamental en la mejora del tomate, sobre todo por sus resistencias a factores bióticos (Cortada 2009; Pereira-Carvalho *et al.* 2010) y cuya capacidad regenerativa se desconoce. Es por ello, que en la presente tesis se ha realizado una caracterización de la capacidad organogénica de las cuatro especies segregadas de *S. peruvianum* sensu lato: *S. arcanum*, *S. huaylasense*, *S. corneliomulleri* y *S. peruvianum* (s.s). Así mismo, se ha estudiado la morfología de las hojas de plantas cultivadas *in vitro*, y su relación con la capacidad organogénica.

Para realizar este trabajo se han utilizado 16 accesiones de las cuatro especies que forman *S. peruvianum* s.l y se ha comparado la capacidad organogénica de dos tipos de explantes: raíz, utilizada comúnmente para la regeneración en *S. peruvianum* s.l (Parker-Norton y Boll 1954; Koornneef *et al.* 1993; Peres *et al.* 2001), y hoja, utilizada en tomate (Kut y Evans 1982; Ruf *et al.* 2001; Khoudi *et al.* 2009; Trujillo-Moya *et al.* 2011; Trujillo-Moya y Gisbert 2012) y otras especies silvestres relacionadas (Gisbert *et al.* 1999; Arrillaga *et al.* 2001). Por otra parte, se han usado dos medios inductores de la organogénesis, uno de ellos suplementado solo con citoquinina (Zeatina Ribosido) y otro además con auxina (Ácido Indolacético), ya que la combinación de auxina y citoquinina puede favorecer la regeneración en algunas accesiones de tomate (Bhatia *et al.* 2004; Devi *et al.* 2008).

Como cabía esperar, en la respuesta organogénica se ha observado variabilidad intra e interespecífica, pero en términos generales todas las accesiones han sido capaces de inducir brotes a partir de explantes de raíz y hoja en ambos medios, siendo los explantes de hoja y el medio suplementado tan solo con citoquinina, los que mayor respuesta de regeneración han registrado. En general, las accesiones de *S. corneliomulleri* y *S. huaylasense* han mostrado una gran capacidad de regeneración, similar a otras especies de tomate silvestre como *S. pennellii* (Trujillo-Moya *et al.* 2011; Trujillo-Moya y Gisbert 2012) y *S. cheesmanii* (Arrillaga *et al.* 2001). Sin embargo, en *S. arcanum* y *S. peruvianum* s.s se han obtenido los valores de regeneración más bajos. Así pues, dentro del complejo Peruvianum se han descrito tres accesiones recalcitrantes: LA-2185 (*S. arcanum*), ECU-106 y CH-20 (*S. peruvianum* s.s). Los valores de PR (número total de plantas regeneradas / número de explantes regenerantes) obtenidos en *S. peruvianum* s.s fueron similares a los valores publicados en *S. peruvianum* s.l por Steinitz *et al.* (2006) y más bajos que los obtenidos en *S. peruvianum* var. *humifusum*

(Peres *et al.* 2001). Por otra parte, se observó en todas las especies ensayadas que no todos los brotes generados son capaces de desarrollarse en plantas, suceso que se ha observado en tomate y especies relacionadas (Steinitz *et al.* 2006 ; Pratta *et al.* 1997).

En la clasificación taxonómica de las especies del complejo *Peruvianum* se utilizan caracteres relacionados con las hojas (Peralta *et al.* 2005). En nuestro estudio se ha encontrado variabilidad inter e intraespecífica de la morfología de las hojas en las plantas cultivadas *in vitro*, pero a pesar de ello, las especies analizadas, se pueden diferenciar por el número de folíolos y su grado de dentado. Por otra parte, el área del folíolo distal (medido en la cuarta hoja) sólo permite separar a *S. arcanum* del resto de accesiones, resultados que guardan relación con los obtenidos a nivel molecular por Zuriaga *et al.* (2009), que utilizaron algunas de las entradas de este estudio. Por otra parte, el grado de pubescencia no ha sido útil como caracter para diferenciar las especies *in vitro*, aunque se apreciaron diferencias en condiciones de invernadero.

Las correlaciones entre la morfología de las hojas y los parámetros de regeneración indican que las accesiones de hojas con un mayor número de folíolos y mayor grado de dentado, tienen una mayor capacidad de regeneración. Sin embargo, las accesiones con mayor área del folíolo distal tienen una menor respuesta. Los resultados observados en este estudio podrían estar relacionados con una concentración endógena mayor de citoquinina en explantes más pequeños y dentados (Shani *et al.* 2010).

Con los trabajos realizados se ha conseguido avanzar en el conocimiento de la capacidad organogénica en tomate y especies relacionadas. La identificación de QTLs obtenidos representa un paso significativo hacia el objetivo de identificar qué genes están implicados en este proceso. También queda confirmada la importancia del etileno en la regeneración de explantes de tomate y su regulación, ya que, una variación de las concentraciones en los distintos momentos del proceso organogénico tiene

consecuencias en el mismo. El estudio con las especies silvestres derivadas del complejo *Peruvianum* ha mostrado que existe variabilidad en este complejo en cuanto a la capacidad de respuesta a la regeneración, habiéndose obtenido una respuesta mayor en aquellas accesiones que presentan un número mayor de folíolos dentados. Los medios utilizados para la regeneración pueden emplearse con las accesiones que han mostrado una alta respuesta para alcanzar otros objetivos que requieran de la regeneración de plantas *in vitro*.

### **Bibliografía Discusión General**

Adams TL, Quiros CF: **Somatic hybridization between *Lycopersicon peruvianum* and *L. pennellii*: regenerating ability and antibiotic resistance as selection systems.** Plant Sci 1985, 40: 209-219.

Alvarez AE, Van De Wiel CCM, Smulders MJM, Vosman B: **Use of microsatellites to evaluate genetic diversity and species relationships in the genus *Lycopersicon*.** Theor Appl Genet 2001, 103: 1283-1292.

Arikita FN, Azevedo MS, Scotton DC, Pinto MdS, Figueira A, Peres LEP: **Novel natural genetic variation controlling the competence to form adventitious roots and shoots from the tomato wild relative *Solanum pennellii*.** Plant Sci 2013, 199-200: 121-130.

Arrillaga I, Gisbert C, Sales E, Roig L, Moreno V: **In vitro plant regeneration and gene transfer on the wild tomato *Lycopersicon cheesmanii*.** J Hort Sci Biotech 2001, 76: 413-418.

Bedinger PA, Chetelat R, McClure B, Moyle LC, Rose JKC, Stack S, van der Knaap E, Baek Y, Lopez-Casado G, Covey PA, Kumar A, Li W, Nunez R, Cruz-Garcia F, Royer S: **Interspecific reproductive barriers in the tomato clade:**



- opportunities to decipher mechanisms of reproductive isolation.** Sex Plant Reprod 2011, 24: 171-187.
- Ben Amer IM, Korzun V, Worland AJ, Börner A: **Genetic mapping of QTLs controlling tissue-culture response on chromosome 2B of wheat (*Triticum aestivum* L.) in relation to major genes and RFLP markers.** Theor Appl Genet 1997, 94: 1047-1052.
- Bhatia P, Ashwath N, Senaratna T, David M: **Tissue culture studies of tomato (*Lycopersicon esculentum*).** Plant Cell Tissue Organ Cult 2004, 78: 1-21.
- Biddington NL: **The Influence of ethylene in plant-tissue culture.** Plant Growth Regul 1992, 11: 173-187.
- Bolibok H, Rakoczy-Trojanowska M: **Genetic mapping of QTLs for tissue-culture response in plants.** Euphytica 2006, 149: 73-83.
- Cap GB, Roberts PA, Thomason IJ, Murashige T: **Embryo Culture of *Lycopersicon esculentum* x *L. peruvianum* Hybrid Genotypes Possessing Heat-stable Resistance to *Meloidogyne incognita*.** J Amer Soc Hort Sci 1991, 116(6): 1082-1088.
- Collard BCY, Jahufer MZZ, Brouwer JB, Pang ECK: **An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts.** Euphytica 2005, 142: 169–196.
- Cortada L (2009). **Tomato rootstocks for the control of *Meloidogyne* spp.** PhD, Universitat Politècnica de Catalunya, Spain.
- Chaerani R, Smulders MJ, van der Linden CG, Vosman B, Stam P, Voorrips RE: **QTL identification for early blight resistance (*Alternaria solani*) in a *Solanum lycopersicum* x *S. arcanum* cross.** Theor Appl Genet 2007, 114: 439-50.

- Chen LZ, Adachi T: **Protoplast fusion between *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum*-complex: somatic embryogenesis, plant regeneration and morphology.** Plant Cell Rep 1998, 17: 508-514.
- Chraïbi KMB, Latche A, Roustan JP, Falloït J: **Stimulation of shoot regeneration from cotyledons of *Helianthus annuus* by the ethylene inhibitors, silver and cobalt.** Plant Cell Rep 1991, 10: 204-207.
- Christianson ML, Warnick DA: **Competence and determination in the process of in vitro shoot organogenesis.** Dev Biol 1983, 95: 288-293.
- Christianson ML, Warnick DA: **Phenocritical times in the process of in vitro shoot organogenesis.** Dev Biol 1984, 101: 382-390.
- Christianson ML, Warnick DA: **Temporal requirement for phytohormone balance in the control of organogenesis in vitro.** Dev Biol 1985, 112: 494-497.
- Devi R, Dhaliwal MS, Kaur A, Gosal SS: **Effect of growth regulators on in vitro morphogenic response of tomato.** Indian J Biotech 2008, 7: 526-530.
- Dimasi-Therïou K, Economou AS: **Ethylene enhances shoot formation in cultures of the peach rootstock GF-677 (*Prunus persica* X *P. amygdalus*).** Plant Cell Rep 1995, 15:87-90.
- El-Farash EM, Abdalla HI, Taghian AS, Ahmad MH: **Genotype, explant age and explant type as effecting callus and shoot regeneration in tomato.** Assiut J Agric Sci 1993, 24: 3-14.
- Eshed Y, Abu-Abïed M, Saranga Y, Zamir D: ***Lycopersicon esculentum* lines containing small overlapping introgressions from *L. pennellii*.** Theor Appl Genet 1992, 83: 1027-1034.
- Faria RT, Illg RD: **Inheritance of in vitro plant regeneration ability in the tomato.** Braz J Genet 1996, 19: 113-116.

- Flores Berrios E, Gentzbittel L, Mokrani L, Alibert G, Sarrafi A: **Genetic control of early events in protoplast division and regeneration pathways in sunflower.** Theor Appl Genet 2000, 101: 606-612.
- Frankenberger EA, Hasegawa PM, Tigchelaar EC: **Diallel analysis of shoot-forming capacity among selected tomato genotypes.** Z. Pflanzenphysiol 1981, 102: 233-242.
- Gisbert C, Arrillaga I, Roig LA, Moreno V: **Adquisition of a collection of *Lycopersicon pennellii* (Corr. D'Arcy) transgenic plants with uidA and nptII marker genes.** J Hortic Sci Biotechnol 1999, 74(1): 105-109.
- Hicks GS: **Shoot induction and organogenesis in vitro: A developmental perspective.** In Vitro Cell Dev Biol 1994, 30: 10-15.
- Huxter TJ, Thorpe TA, Reid DM. **Shoot initiation in light- and darkgrown tobacco callus: the role of ethylene.** Physiol Plant 1981, 53: 319-326.
- Khoudi H, Nouri-Khemakhem, Gouiaa S, Masmoudi K: **Optimization of regeneration and transformation parameters in tomato and improvement of its salinity and drought tolerance.** African J Biotech 2009, 8(22): 6068-6076.
- Kochevenko A, Ratushnyak Y, Korneyeyev D, Stasik O, Porublyova L, Kochubey S, Suprunova T, Gleba Y: **Functional cybrid plants of *Lycopersicon peruvianum* var 'dentatum' with chloroplasts of *Lycopersicon esculentum*.** Plant Cell Rep 2000, 19: 588-597.
- Komatsuda T, Annaka T, Oka S: **Genetic mapping of a quantitative trait locus (QTL) that enhances the shoot differentiation rate in *Hordeum vulgare* L.** Theor Appl Genet 1993, 86: 713-720.

- Koornneef M, Bade J, Hanhart C, Horsman K, Schel J, Soppe W, Vekerk R, Zabel P: **Characterization and mapping of a gene controlling shoot regeneration in tomato.** *Plant J* 1993, 3: 131-141.
- Koornneef M, Hanhart CJ, Martinelli L: **A genetic analysis of cell culture traits in tomato.** *Theor Appl Genet* 1987, 74: 633-641.
- Kumar PP, Lakshmanan P, Thorpe TA: **Regulation of morphogenesis in plant tissue culture by ethylene.** *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 1998 34: 94-103.
- Kut SA, Evans DA: **Plant regeneration from cultured leaf explants of eight wild tomato species and two related Solanum species.** *In Vitro Cell Dev Biol* 1982, 8: 593-598.
- Lakshmanan P, Ng SK, Loh CS, Gof CJ: **Auxin, cytokinin and ethylene differentially regulate specific developmental states associated with shoot bud morphogenesis in leaf tissues of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) cultured in vitro.** *Plant Cell Physiol* 1997, 38: 59-64.
- Miller JC, Tanksley SD: **RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*.** *Theor Appl Genet* 1990, 80: 437-448.
- Mohiuddin AKM, Chowdhury MKU, Abdullah ZC, Napis S: **Influence of silver nitrate (ethylene inhibitor) on cucumber in vitro shoot regeneration.** *Plant Cell Tiss Org Cult* 1997, 51: 75-78.
- Moshkov IE, Novikova GV, Hall MA, George EF (2008) **Plant Growth Regulators III: ethylene.** In: George EF, Hall MA, Klerk G-JD (eds) *Plant Propagation by Tissue Culture*, vol 1. 3rd edn. Springer, The Netherlands, pp 239-248.
- Murigneux A, Bentollila S, Hardy T, Baud S, Guitton C, Jullien H, Ben Tahar S, Freyssinet G, Beckert M: **Genotypic variation of quantitative trait loci controlling in vitro androgenesis in maize.** *Genome* 1994, 37: 970-976.

- Ohki S, Bigot C, Mousseau J: **Analysis of shootforming capacity in vitro in two lines of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and their hybrids.** Plant Cell Physiol 1978, 19: 27-42.
- Parker-Norton J, Boll WG: **Callus and shoot formation from tomato roots in vitro.** Science 1954. 119: 220-221.
- Peralta IE, Knapp S, Spooner DM: **New species of wild tomatoes (*Solanum* section *Lycopersicon*: Solanaceae) from Northern Peru.** Syst Bot 2005, 30(2): 424-434.
- Pereira-Carvalho RC, Boiteux LS, Fonseca MEN, Díaz-Pendón JA, Moriones E, Fernández-Muñoz R, Charchar JM, Resende RO: **Multiple resistance to *Meloidogyne* spp. and to bipartite and monopartite *Begomovirus* spp. in wild *Solanum* (*Lycopersicon*) accessions.** Plant Dis 2010, 94(2): 179-185.
- Peres LEP, Morgante PG, Vecchi C, Kraus JE, Sluys MAV: **Shoot regeneration capacity from roots and transgenic hairy roots of tomato cultivars and wild related species.** Plant Cell Tiss Organ Cult 2001, 65: 37-44.
- Pratta G, Zorzoli R, Picardi LA: **Intra and interspecific variability of in vitro culture response in *Lycopersicon* tomatoes.** Braz J Genet 1997, 20: 75-78.
- Ruf S, Hermann M, Berfr IJ, Carrer H, Bock R: **Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of foreign protein in fruit.** Nature Biotech 2001, 19: 870-875.
- Sacks EJ, Gerhardt LM, Gtaham EB, Jacobs J, Thorrup TA, Clair DA: **Variation among 41 genotypes of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) for crossability to *L. peruvianum* (L.) Mill.** Ann Bot 1997, 80: 469-477.

- Satoh H, Takashina T, Escalante A, Egashira H, Imanishi S: **Molecular markers mapped around the high shoot regeneration capacity gene *Rg-2* in *Lycopersicon chilense***. *Breed Sci* 2000, 50(4): 251-256.
- Shani E, Ben-Gera H, Shleizer-Burko S, Burko Y, Weiss D, Ori N: **Cytokinin regulates compound leaf development in tomato**. *Plant Cell* 2010, 22 (10): 3206-17.
- Shirasawa K, Asamizu E, Fukuoka H, Ohyama A, Sato S, Nakamura Y, Tabata S, Sasamoto S, Wada T, Kishida Y: **An interspecific linkage map of SSR and intronic polymorphism markers in tomato**. *Theor Appl Genet* 2010, 121: 731-739.
- Smith PG: **Embryo culture of a tomato species hybrid**. *Proc Amer Soc Hort Sci* 1944, 44: 413-416.
- Spooner DM, Peralta IE, Knapp S: **Comparison of AFLPs with other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes [*Solanum L.* section *Lycopersicon (Mill.) Wettst.*]**. *Taxon* 2005, 54: 43-61.
- Steinitz B, Amitay A, Gaba V, Tabib Y, Keller M, Levin I: **A simple plant regeneration-ability assay in a range of *Lycopersicon* species**. *Plant Cell Tiss Org Cult* 2006, 84: 269-278.
- Sugiyama M: **Organogenesis in vitro**. *Curr Opin Plant Biol* 1999, 2:61-64.
- Taguchi-Shiobara F, Lin SY, Tanno K, Komatsuda T, Yano M, Sasaki T, Oka S: **Mapping quantitative trait loci associated with regeneration ability of seed callus in rice**. *Oryza sativa L. Theor Appl Genet* 1997, 95: 828–833.
- Takashina T, Suzuki T, Egashira H, Imanishi S: **New molecular markers linked with the high shoot regeneration capacity of the wild tomato species *Lycopersicon chilense***. *Breed Sci* 1998, 48: 109-113.

Tan MMC, Colijn-Hooymans CM, Lindhout WH, Kool AJ: **A comparison of shoot regeneration from protoplasts and leaf discs of different genotypes of the cultivated tomato.** Theor Appl Genet 1987, 75: 105-108.

Trujillo-Moya C, Gisbert C, Vilanova S, Nuez F: **Localization of QTLs for in vitro plant regeneration in tomato.** BMC Plant Biology 2011, 11: 140.

Trujillo-Moya C, Gisbert C: **The influence of ethylene and ethylene modulators on shoot organogenesis in tomato.** Plant Cell, Tissue and Organ Culture 2012, 111: 41-48.

Wijbrandi J, Vos JGM, Koornneef M: **Transfer of regeneration capacity from *Lycopersicon peruvianum* to *L. esculentum* by protoplast fusion.** Plant Cell Tiss Org Cult 1988, 12: 193-196.

Zuriaga E, Blanca J, Nuez F: **Classification and phylogenetic relationships in *Solanum* section *Lycopersicon* based on AFLP and two nuclear gene sequences.** Genet Resour Crop Evol 2009, 56: 663-678.





## **V. CONCLUSIONES**



1. Los fenotipados y genotipados de las poblaciones de mapeo ( $F_2$ ,  $BC_1$ ) derivadas de un parental con alta capacidad de regeneración (*S. pennellii*) y un parental recalcitrante (*S. lycopersicum*) han permitido la identificación de seis QTLs implicados en la regeneración. Los QTLs se han localizado en los cromosomas 1 (*SpRg-1*), 3 (*Rg-3*), 4 (*SpRg-4a*; *SpRg-4b*), 7 (*SpRg-7*) y 8 (*SlRg-8*).

En este trabajo también hemos podido observar que:

- Cinco de los QTLs proceden del tomate silvestre (*S. pennellii*) y el QTL *SlRg-8* de *S. lycopersicum*.
- Los QTLs de más peso son *SpRg-1* y *SpRg-7*: *SpRg-1* como mayor responsable de la respuesta morfogénica y *SpRg-7* que influye en el desarrollo de la yema a planta. *SlRg-8*, *SpRg-4a* y *SpRg-4b* podrían contener genes que influyen en la formación de yemas y en su desarrollo, respectivamente.
- *Rg-3* se ha mapeado en el cromosoma 3, ligado al gen de la invertasa ácida y es, por tanto, un posible alelo del gen *Rg* (Regeneration gene) descrito en *S. peruvianum* (*Rg-1*) y posteriormente en *S. chilense* (*Rg-2*).
- El número de QTLs detectados en ambas poblaciones no es equivalente ya que en la población  $F_2$  únicamente se ha detectado *SpRg-7*, mientras que en  $BC_1$  se ha detectado éste y otros cinco QTLs. La distorsión de la segregación mendeliana de los marcadores, que ha sido mucho mayor en la  $F_2$  respecto a  $BC_1$ , podría explicar este resultado.
- La herencia transgresiva para el carácter PR, con valores superiores a los mostrados por la línea parental de alta capacidad regenerativa, sugiere herencia poligénica de la regeneración *in vitro*, así como la existencia de alelos que la promueven y otros que la inhiben.

- Dependiendo del carácter de regeneración estudiado, se ha observado dominancia en mayor o menor grado: dominancia completa para el carácter formación de yemas (B), dominancia parcial para el carácter formación de plantas (R) y efectos aditivos en la producción de plantas regeneradas por explante organogénico (PR).

2. Los ensayos realizados con inhibidores ( $\text{AgNO}_3$  y  $\text{CoCl}_2$ ) o compuestos que liberan etileno (ACC y Ethephon) nos llevan a la conclusión de que el etileno tiene una gran influencia en la organogénesis de tomate, influyendo en la inducción de las yemas y su desarrollo. Una disminución del etileno en la etapa de inducción disminuye y/o retrasa la regeneración, sin embargo una vez formadas las yemas un aporte de etileno promueve el desarrollo de éstas en plantas.

En este trabajo también hemos podido observar que:

- El desarrollo de las plantas regeneradas se ve influenciado por los tratamientos previamente efectuados durante el proceso organogénico, es decir, los compuestos utilizados y el momento de su aplicación.
- Los dos genotipos ensayados (*S.pennelli* y  $F_1$ ) no muestran una respuesta equivalente en cada uno de los tratamientos, probablemente debido a las diferentes concentraciones de etileno y otros reguladores endógenos, así como a la influencia de los distintos alelos implicados en la percepción de etileno y la respuesta organogénica.

3. Se ha encontrado variabilidad intra e interespecífica en la capacidad organogénica de las especies silvestres derivadas del complejo *S. peruvianum* sensu lato: *S. arcanum*, *S. corneliomulleri*, *S. huaylasense* y *S. peruvianum* sensu stricto. En *S. corneliomulleri* y *S. huaylasense* todas las accesiones ensayadas mostraron una elevada capacidad regenerativa. Sin embargo, en *S. arcanum* y *S. peruvianum* s.s encontramos accesiones que pueden considerarse recalcitrantes, en concreto, la accesión LA-2185 de *S. arcanum* y las accesiones ECU-106 y CH-20 de *S. peruvianum* s. s.

En este trabajo también hemos podido observar que:

- La capacidad de regeneración a partir de explantes de raíz es alta en las especies derivadas del complejo *S. peruvianum*. No obstante, los explantes de hoja cultivados en el medio suplementado tan solo con citoquinina son más adecuados para la regeneración de las especies ensayadas.
- El número de folíolos o el nivel de dentado de las hojas puede ser utilizado como carácter morfológico de identificación *in vitro* de las especies del complejo *S. peruvianum* s.l. También, la mayor área de los folíolos de *S. arcanum*, puede servir para diferenciar a esta especie del resto de especies de este complejo.
- Las accesiones cuyas hojas tienen mayor número de folíolos y mayor nivel de dentado han mostrado una mayor regeneración.