

**TESIS DOCTORAL**

**Ultraestructura de la epidermis  
del fruto de tomate  
(*Solanum Lycopersicum* L.)  
durante el desarrollo**

**Patricia Segado Haro**

Dirigida por Antonio Heredia Bayona  
y Eva María Domínguez Carmona

Programa de doctorado: Biología Celular y Molecular

**Facultad de Ciencias  
Universidad de Málaga**



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA



**Departamento de Biología Molecular y Bioquímica**

**Facultad de Ciencias**

**Universidad de Málaga**

**Tesis Doctoral**

**ULTRAESTRUCTURA DE LA EPIDERMIS DEL  
FRUTO DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.)  
DURANTE EL DESARROLLO**

Memoria presentada por la Licenciada en Biología


**Patricia Segado Haro** para optar al grado de Doctora,

Málaga, abril de 2017



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

AUTOR: Patricia Segado Haro

 <http://orcid.org/0000-0002-0531-8830>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): [riuma.uma.es](http://riuma.uma.es)





ANTONIO HEREDIA BAYONA, Catedrático del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga, y EVA MARÍA DOMÍNGUEZ CARMONA, Científica Contratada del IHSM, directores del trabajo realizado por la Licenciada en Biología PATRICIA SEGADO HARO,

CERTIFICAN: que la Memoria titulada **Ultraestructura de la epidermis del fruto de tomate (*Solanum Lycopersicum* L.) durante el desarrollo** que presenta la Licenciada **Patricia Segado Haro** para optar al grado de Doctora ha sido realizada bajo su dirección.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente documento en Málaga, a abril de 2017.

Fdo.: Antonio Heredia Bayona

Fdo.: Eva María Domínguez Carmona





**Departamento de Biología Molecular y Bioquímica**  
**Facultad de Ciencias**  
**Universidad de Málaga**

**Miguel Ángel Medina Torres**, Director del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga,

INFORMA QUE: la Tesis Doctoral titulada **Ultraestructura de la epidermis del fruto de tomate (*Solanum Lycopersicum L.*) durante el desarrollo** que presenta la Licenciada **Patricia Segado Haro** para optar al título de Doctora por la Universidad de Málaga ha sido realizada bajo la dirección de Antonio Heredia Bayona, Catedrático del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga, y Eva María Domínguez Carmona, Científica Contratada del IHSM.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firma el presente documento en Málaga, a abril de 2017.



Fdo: Miguel Ángel Medina Torres



Durante la realización de la tesis he disfrutado de una beca de Formación de Profesorado Universitario (FPU) entre los años 2012-2015.

El presente trabajo ha sido financiado parcialmente por los proyectos AGL2012-32613 y AGL2015-65246-R.

Parte de los resultados recogidos en esta Memoria de Tesis doctoral han sido incluidos en las siguientes publicaciones:

**Segado P, Domínguez E, Heredia A.** 2016. Ultrastructure of the epidermal cell wall and cuticle of tomato fruit (*Solanum lycopersicum* L.) during development. *Plant Physiol* 170:935-46.

**Segado P, Domínguez E, Heredia A.** 2016. Cutinisation of tomato fruit epidermis: Structural and morphological details. *Plant Signal Behav* 11(4): e1168558.



## Agradecimientos

Si bien es cierto que las circunstancias vividas en los últimos meses me han tentado en más de una ocasión a dejar estas páginas en blanco, no quería perder la oportunidad de dar las gracias a todas las personas que habéis estado a mi lado no solo en esta agónica etapa final, sino durante los 5 años que ha durado este trabajo, el cual es en cierto modo vuestro también.

Antonio, Eva, muchas gracias por todo lo que habéis hecho por mí desde el primer día que pisé el laboratorio. Con vuestra dedicación, apoyo, motivación y paciencia no solo habéis conseguido que esta tesis salga a flote, sino que me habéis ayudado a crecer como profesional y como persona. Ha sido una suerte y un lujo trabajar bajo vuestra dirección.

Francis, te has portado tan bien conmigo que te considero mi tercer director. Gracias por tu inmenso apoyo y los innumerables ratos de risas que han hecho que todos estos años hayan sido mucho más llevaderos. Gracias igualmente a Rafa, por tus animadas charlas, por defenderme, valorarme y por estar siempre dispuesto a ayudarme. Se acabó la tesis, ya te dejo que te jubiles.

Aunque pueda parecerlo no siempre he estado “forever alone”. Gracias a mis compañeros, Inma, Laura Rueda, Ale, Susana y Laura España por los buenos momentos vividos en el laboratorio. Me alegra enormemente que todos estemos alcanzando las metas que nos propusimos cuando estábamos juntos. A Javier Márquez, porque siempre viene bien tener a alguien a tu lado a quien puedas chincar con las derrotas del Real Madrid. Y a Pepa y a Chelo, por su compañía, su ánimo y su comprensión. También quiero agradecerles a mis compañeros de La Mayora, especialmente a Gloria, Reina y Ana, su inestimable ayuda y su esfuerzo en hacer que me sintiera como en casa.

Gracias a mis antiguos compañeros de Fisiología Animal, porque sin su apoyo y sus enseñanzas en mis primeros años en un laboratorio no sería posible este trabajo, especialmente a Jesús, por brindarme esa oportunidad, y a Pablo (“I Love you, I wanna love you tender”). Y a “las niñas” de Biología Celular, Mercedes, Alejandra, Raquel Mediterránea, Eli y Ángela, por adoptarme y hacerme sentir como una más, por toda vuestra comprensión y vuestro apoyo, ya sea en forma de palabras, gestos de cariño, cerveza o vino. Gracias a ti en especial, Atrapapelos, porque sin tu ayuda mi tortura se habría alargado aún más (algún día te devolveré tus anticuerpos...).

Gracias a Manoli y Salva, de Análisis de Imagen, y a Goyo, Adolfo y David, del servicio de Microscopía del SCAI, por vuestra desinteresada ayuda, por vuestro apoyo constante y por aguantarme tantísimas horas aunque alguna vez hayáis acabado encerrándome por pesada.

A Inma Ruz, porque gracias a ti estoy donde estoy ahora. Es una gran suerte poder contar con alguien como tú en estos momentos. Estoy segura de que en un futuro no muy lejano estaremos bebiéndonos unas cañas al solecito mientras nos reímos a carcajadas (ya como Doctoras) de los botones de aceptar.

A Claudia, Antonio Zea, M<sup>a</sup> José y a mi teniente Soraya, gracias por darme la fuerza física y mental necesaria para aguantar todos estos años de tesis. No sé qué habría sido de mí sin vosotros y vuestra capacidad para hacerme desconectar de todo.

A esos compañeros de la carrera que acabaron convirtiéndose en grandes amigos y que por suerte aún mantengo a mi lado a pesar del tiempo y la distancia. Agus, gracias por tu generosidad, por aportarme la serenidad que a mí me falta, por cuidarme y por alimentarme tan bien. Jose, qué te voy a decir que ya no sepas después de tantos años y tantas fotos, gracias por recorrer “five hundred miles” conmigo (y las que nos quedan). Laura, gracias por ser la persona en la que siempre he podido confiar (en ocasiones la única) a pesar de nuestros inicios (todos sabemos que eras tú, como Bella que eres, la que no saludaba). Carlos, ¡qué aburrida sería la vida si no pudiera meterme contigo! Gracias por sacarme siempre una sonrisa. Y a las corintias, Pi y Cande, por estar siempre ahí, ya sea para desahogarnos, cotillear, salir de fiesta o ver un programa chorra.

A mis amigos “de siempre”, sé que ninguno sabéis exactamente qué estoy haciendo (algo con unos tomates) pero aun así podría rellenar otras 200 páginas de agradecimientos por todo lo que me aportáis. Gracias por hacerme ver que hay vida después de la tesis.

Finalmente, mi más sincero agradecimiento a mi familia, y en especial a ti, mamá, por aguantar a tu torbellino, cuidarme, ayudarme, creer en mí y animarme a seguir adelante a pesar de las dificultades. No hay mayor motivación ni satisfacción que ver lo orgullosa que estás de mí. Gracias por tanto.







*A la primera persona*









# ÍNDICE







<b>Introducción general.....</b>	<b>5</b>
• La cutícula vegetal.....	7
<i>Morfología y estructura.....</i>	7
<i>Componentes de la cutícula.....</i>	9
<i>Funciones de la cutícula.....</i>	14
<i>Biofísica.....</i>	15
• Síntesis, modificación química y transporte de los monómeros de la cutina vegetal .....	18
• Síntesis de la cutina .....	23
<i>Existencia, localización y función de las aciltransferasas.....</i>	23
<i>Implicación de la cutina sintasa en la biosíntesis de cutina.....</i>	24
• Autoensamblaje molecular .....	27
• Bibliografía .....	32
<b>Objetivos.....</b>	<b>39</b>
<b>Capítulo 1: Ultraestructura de la pared celular de la epidermis y de la cutícula del fruto del tomate durante el desarrollo.....</b>	<b>43</b>
• Introducción.....	45
• Material y métodos.....	47
<i>Instalaciones.....</i>	47
<i>Material vegetal.....</i>	47
<i>Siembra y trasplante.....</i>	48
<i>Recolección de muestras.....</i>	48
<i>Fijación de las muestras.....</i>	50
<i>Inclusión de las muestras en resina LR White.....</i>	50
<i>Microscopía electrónica de transmisión (MET).....</i>	51
<i>Determinación del grosor de la cutícula y de la pared celular.....</i>	51
<i>Técnicas inmunohistoquímicas.....</i>	51
<i>Microscopía electrónica de barrido (MEB).....</i>	52
<i>Densidad de células epidérmicas.....</i>	53
• Resultados.....	54
<i>Ultraestructura de la epidermis durante el proceso de división celular.....</i>	55
<i>Ultraestructura de la epidermis durante la expansión celular.....</i>	62
<i>Inmunolocalización de los componentes de la pared celular más externa.....</i>	65
• Discusión.....	67
<i>Diferenciación tisular.....</i>	67
<i>Formación de la pared celular cutinizada.....</i>	69
<i>Formación de la pared celular no cutinizada.....</i>	73
• Bibliografía.....	77
<b>Capítulo 2: Identificación de mecanismos moleculares involucrados en la formación de la cutícula del fruto de tomate.....</b>	<b>83</b>
• Introducción.....	85
• Material y métodos .....	87
<i>Material vegetal e instalaciones.....</i>	87
<i>Fijación de las muestras.....</i>	87
<i>Inclusión de las muestras en resina LR White.....</i>	88
<i>Inclusión de las muestras en resina Unicryl.....</i>	88
<i>Obtención de cortes.....</i>	88
<i>Microscopía electrónica de transmisión (MET).....</i>	89
<i>Generación de anticuerpos anti-cutinsomas.....</i>	89
<i>Técnicas inmunohistoquímicas.....</i>	89
<i>Bioinformática.....</i>	90
<i>Extracción y purificación de ADN y ARN.....</i>	91
<i>Cuantificación de ADN y ARN.....</i>	92
<i>Síntesis de ADNc.....</i>	93
<i>RT-PCR cuantitativa a tiempo real.....</i>	93
• Resultados.....	95
<i>Inmunolocalización de la proteína CUS1.....</i>	96

<i>Immunolocalización de los cutinsomas</i> .....	99
<i>Otras observaciones microscópicas</i> .....	101
<i>Expresión de las proteínas CUS</i> .....	102
• <i>Discusión</i> .....	105
<i>Implicación de la aciltransferasa CUS1 en la formación de cutina</i> .....	105
<i>La cutina como resultado de un mecanismo de autoensamblaje emergente en los estadios iniciales del desarrollo</i> .....	107
• <i>Bibliografía</i> .....	111
<b>Capítulo 3: Estudio de la cutícula del fruto de tomate de las especies de la sección <i>Lycopersicon</i></b> .....	<b>115</b>
• <i>Introducción</i> .....	117
• <i>Material y métodos</i> .....	124
<i>Instalaciones</i> .....	124
<i>Material vegetal</i> .....	124
<i>Semilleros y cultivos</i> .....	128
<i>Recolección de muestras</i> .....	130
<i>Fijación de las muestras</i> .....	131
<i>Inclusión en resina Leica</i> .....	131
<i>Inclusión en resina LR White</i> .....	132
<i>Preparación de portas gelatinizados</i> .....	132
<i>Obtención de cortes</i> .....	133
<i>Tinción histológica con Sudán IV</i> .....	133
<i>Tinción histológica con hemisulfato de berberina</i> .....	133
<i>Determinación del grosor de la cutícula</i> .....	134
<i>Microscopía electrónica de transmisión (MET)</i> .....	134
<i>Microscopía electrónica de barrido (MEB)</i> .....	134
<i>Técnicas inmunohistoquímicas</i> .....	135
<i>Cuantificación de la autofluorescencia</i> .....	135
<i>Aislamiento de la cutícula</i> .....	136
<i>Determinación del peso específico de las cutículas aisladas</i> .....	137
<i>Determinación del porcentaje de ceras cuticulares</i> .....	137
<i>Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)/Reflectancia total atenuada (ATR)</i> .....	138
<i>Estadística</i> .....	138
• <i>Resultados</i> .....	139
<i>Crecimiento del fruto</i> .....	141
<i>Cantidad de cutícula</i> .....	143
<i>Cantidad de ceras cuticulares</i> .....	146
<i>Grosor de la cutícula</i> .....	148
<i>Estudio histológico</i> .....	150
<i>Immunolocalización de la proteína CUS1</i> .....	160
<i>Autofluorescencia de la cutícula</i> .....	162
<i>Caracterización de la cutícula mediante espectroscopia infrarroja</i> .....	169
• <i>Discusión</i> .....	175
• <i>Bibliografía</i> .....	188
<b>Conclusiones</b> .....	<b>197</b>
<b>Anexos</b> .....	<b>201</b>
• <i>Anexo I</i> .....	203
• <i>Anexo II</i> .....	213
• <i>Anexo III</i> .....	225
• <i>Anexo IV</i> .....	229



# INTRODUCCIÓN GENERAL





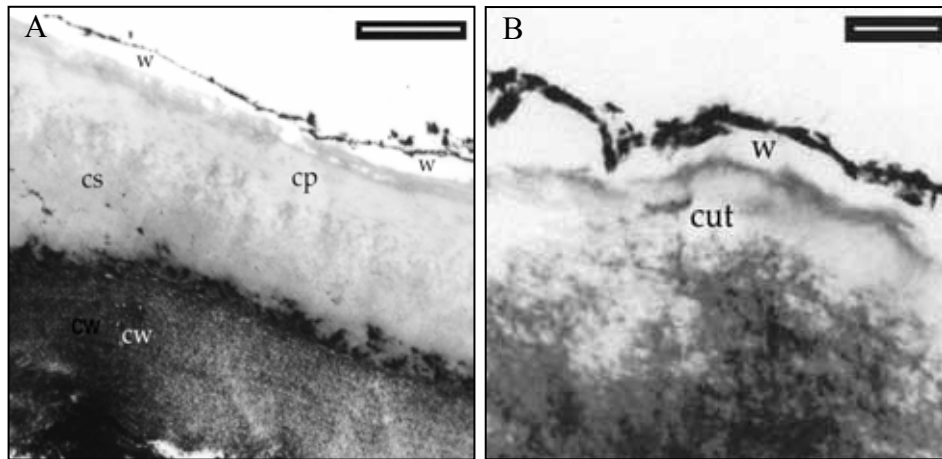
## LA CUTÍCULA VEGETAL

Uno de los principales logros de la evolución biológica a lo largo de millones de años ha sido desarrollar estructuras que sirven como aislamiento y protección a los organismos vivos frente al entorno circundante. En este sentido, las plantas superiores desarrollaron de una forma efectiva una estructura altamente protectora, aislante y de propiedades físicas y químicas singulares: la cutícula vegetal.

La presencia de una capa diferenciada que cubre el exterior de la superficie de las hojas y los frutos fue mencionada por primera vez por el botánico griego Theophrastus en el siglo IV a. C. Esta capa se consideró como la “piel” de los tejidos vegetales, de forma análoga a la piel de los animales. Sin embargo, la existencia de esta membrana no fue descrita en más profundidad hasta el año 1757 por el botánico francés Theodore Ludwig, que fue apoyado años más tarde por otros dos botánicos, De Saussure en 1762 y Hedwig en 1793 (Barthélemy, 1868). Esta película fue aislada por primera vez por Brongniart (1830, 1834) mediante la maceración de tejidos vegetales. Este autor describió la cutícula como una estructura no celular, continua, sin color y translúcida, adaptada a la superficie de las células epidérmicas, y le dio el nombre de *cuticule*. Tras el trabajo llevado a cabo por Brongniart, fueron muchos los investigadores que se interesaron por la cutícula vegetal, y muchos los esfuerzos y trabajos realizados para llegar a los conocimientos que hoy día se tienen sobre este complejo biopolímero, que han conducido a la utilización del término “cutícula” con el significado moderno de “membrana extracelular que recubre los órganos aéreos de las plantas” (Riederer, 2001).

### Morfología y estructura

La cutícula se encuentra localizada en la parte más externa de la pared celular de las células epidérmicas, constituyendo así una interfase entre la planta y el medio ambiente. Jeffree (2006) la describió como una capa fundamentalmente laminar en la podían diferenciarse a su vez una serie de capas, las cuales estaban definidas en función de su posición y composición química. Este autor distinguió diferentes regiones desde el interior hacia el exterior de la cutícula: la cutícula secundaria (o capa cuticular o cutinizada), la cutícula primaria (también llamada capa cuticularizada o cutícula propiamente dicha) con ceras embebidas (intracuticulares) y, por último, las ceras epicuticulares (Fig. I.1).



**Figura I.1:** Imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión que muestran dos regiones a distintos aumentos de un mismo corte transversal de la superficie de un fruto de uva (*Vitis vinifera* L.). **A:** Desde el interior (región inferior) hacia el exterior se aprecia la pared celular apical de las células epidérmicas (cw), en estrecho contacto con la capa más interna de la cutícula, la cutícula secundaria (cs) o capa cutinizada. Inmediatamente por encima aparece una región menos electrodensa correspondiente a la cutícula primaria con ceras embebidas (cp) y depositadas sobre esta se encuentran las ceras epicuticulares (w) formando una capa continua. Barra: 20  $\mu\text{m}$ . **B:** Detalle de la capa más externa de la cutícula donde se aprecian una primera capa de ceras epicuticulares (w) y la cutícula primaria (cut). Barra: 0.8  $\mu\text{m}$ . (García-Casado, 2001).

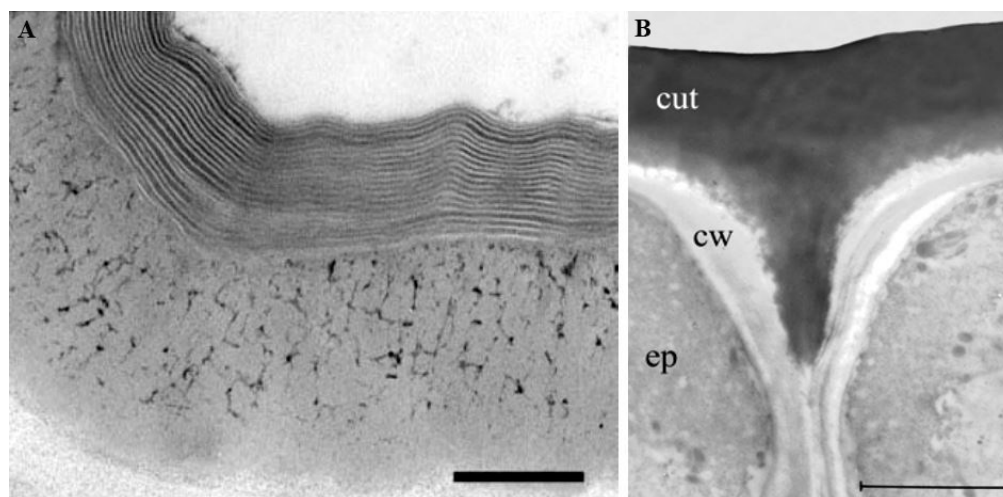
La primera manifestación morfológica de la cutícula consiste en una película osmiofílica y amorfa, de carácter electrodenso al microscopio electrónico, que presenta un grosor aproximado de 20 nm (Jeffree, 2006). Esta capa va sufriendo diferentes modificaciones a lo largo del desarrollo que conllevan un incremento de su grosor y una disminución de su densidad electrónica, generándose una cutícula de transición globular que evoluciona hasta transformarse, en mayor o menor medida, en una región polilaminada y/o reticulada. El ensamblaje de sus componentes con la parte externa de la pared celular primaria se produce seguidamente a su formación. El grado de transformación de esta capa es variable en cada especie vegetal, lo cual propicia la existencia de cutículas con distinta conformación y morfología microscópica.

En 1982, Holloway propuso una clasificación de las cutículas de las plantas en base a la taxonomía y a diversos estudios de su ultraestructura realizados mediante microscopía electrónica de transmisión (MET). Esta clasificación comprende seis grandes tipos morfológicos de membranas cuticulares, que se recogen en la Tabla I.1. La Figura I.2 ilustra mediante imágenes de MET dos ejemplos de cutículas encuadradas en esta clasificación, una de ellas correspondiente al Tipo 1 (Fig. I.2, A) y otra referida al Tipo 4 (Fig. I.2, B).



**Tabla I.1. Clasificación de las cutículas vegetales** (según Holloway, 1982).

Tipo	Descripción	Ejemplos
1	Región externa polilaminada, delineada con la región interna principalmente reticulada.	Hojas de <i>Clivia miniata</i> y <i>Agave americana</i> .
2	Región externa débilmente laminada fundida gradualmente con una región interna reticulada.	Hojas de <i>Hedera helix</i> y <i>Ficus elastica</i> .
3	Región externa amorfa y región interna principalmente reticulada.	Hojas de <i>Plantago major</i> , <i>Picea abies</i> , <i>Citrus limon</i> y <i>Quercus velutina</i> .
4	Todas las regiones reticuladas.	Hojas de <i>Hydrangea macrophylla</i> y frutos de <i>Solanum lycopersicum</i> .
5	Todas las regiones laminadas.	Hojas de <i>Beta vulgaris</i> y <i>Taraxacum officinale</i> .
6	Principalmente amorfa.	Hojas de <i>Potamogeton crispus</i> y <i>Brassica oleracea</i> var. <i>Gemmifera</i> .



**Figura I.2:** A: Imagen de MET de la cutícula *Iris germanica*, que se engloba dentro del Tipo 1 descrito en la Tabla I.1. En ella se distinguen una zona externa polilaminada y una zona interna reticulada. Barra: 0.2  $\mu\text{m}$  (Jeffree, 2006). B: Imagen de MET de la epidermis de un fruto de tomate cuya cutícula es de Tipo 4. Esta se manifiesta como una capa externa continua y electrodensa que rodea y penetra en la pared de la célula epidérmica. cut, cutícula; cw, pared celular; ep, célula epidérmica. Barra: 5  $\mu\text{m}$  (Domínguez *et al.*, 2011a).

### Componentes de la cutícula

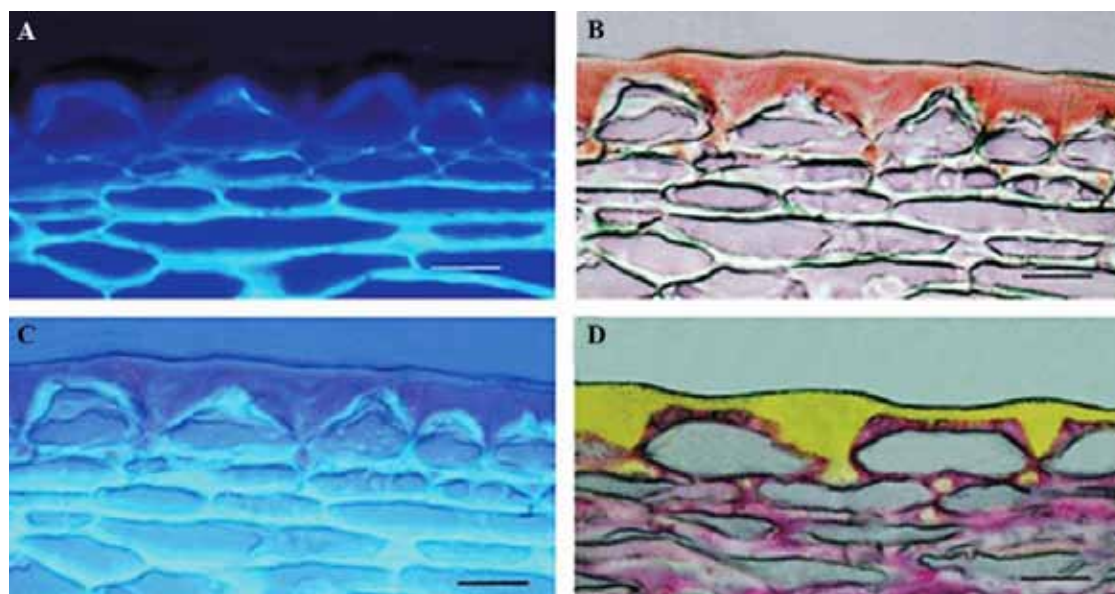
Los componentes que constituyen la cutícula vegetal pueden clasificarse en cutina, ceras y compuestos hidrolizables (Jeffree, 2006; Pollard *et al.*, 2008). En la Tabla I.2 se muestra la proporción de estos componentes en diferentes cutículas de hojas y frutos.

**Tabla I.2. Tanto por ciento de peso seco por unidad de área y cantidad de los distintos componentes de diferentes membranas cuticulares aisladas de frutos y hojas** (Riederer y Schönher, 1984). C.H., compuestos hidrolizables; fr, cutícula aislada de frutos; ad, cutícula aislada de la parte adaxial de la hoja; ab, cutícula aislada de la parte abaxial de la hoja.

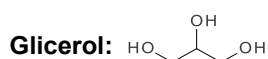
Especie	Cutícula ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Ceras (%)	Cutina (%)	C.H. (%)
<i>Capsicum annuum</i> (fr)	1971	10	61	29
<i>Lycopersicon esculentum</i> (fr)	2173	7	69	24
<i>Clivia miniata</i> (ad)	530	20	64	16
<i>Clivia miniata</i> (ab)	466	18	66	16
<i>Ficus elastica</i> (ad)	458	25	56	19
<i>Ficus elastica</i> (ab)	493	37	52	11
<i>Hedera helix</i> (ad)	450	19	60	21
<i>Hedera helix</i> (ab)	430	17	61	22
<i>Olea europaea</i> (ad)	836	29	50	21

Debido a la naturaleza de su composición y a su fuerte interacción con la pared celular subyacente, la cutícula puede considerarse como una pared celular cutinizada (Fig. I.3). El componente mayoritario de la cutícula vegetal aislada (entre un 40 y un 80% en peso) es la cutina, la cual está constituida por ácidos grasos hidroxilados primarios y secundarios de cadena larga, principalmente de 16 átomos de carbono, o de 18, o una mezcla de ambos, que se organizan formando una red polimérica compleja. La matriz de cutina se origina como consecuencia del entrecruzamiento de sus monómeros mediante enlaces tipo éster, concretamente entre los grupos hidroxilo primarios y secundarios y los grupos carboxilo (Baker *et al.*, 1962; Holloway, 1982). Este tipo de enlace le confiere especial resistencia a la degradación química convirtiéndolo en un material totalmente insoluble en disolventes orgánicos, aunque tras despolimerizarse mediante una hidrólisis alcalina, transesterificaciones u otros métodos análogos se obtiene una mezcla de monómeros y/o derivados, los cuales sí son solubles en dichos disolventes (Walton, 1990). Los miembros de la familia  $C_{16}$  que aparecen más frecuentemente en las cutículas vegetales son los ácidos 9,16- y 10,16-dihidroxihexadecanoico y el ácido 16-hidroxihexadecanoico. En algunos casos, el ácido 16-hidroxi-10-oxohexadecanoico y los ácidos 16-oxo-9 o 16-oxo-10-hidroxihexadecanoico son también monómeros constituyentes de la cutina. En cuanto a la familia  $C_{18}$ , los principales constituyentes son el ácido 18-hidroxi-9,10-epoxioctadecanoico y el ácido 9,10,18-trihidroxioctadecanoico junto con sus homólogos monoinsaturados (Fig. I.4). En algunas cutinas se ha descrito la presencia de otros monómeros tales como el

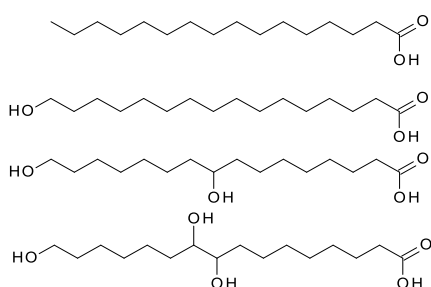
glicerol y el ácido thápsico (ácido 1,16-hexadecanodioico) (Graça *et al.*, 2002; Bonaventure *et al.*, 2004).



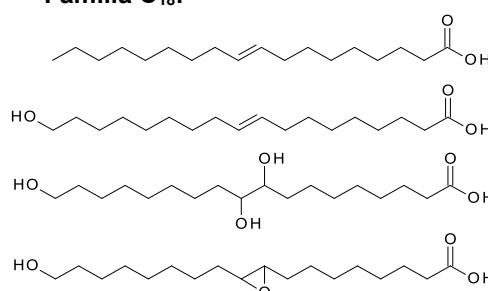
**Figura I.3:** Imágenes de microscopía óptica de cortes transversales de epidermis correspondientes a tomates verdes maduros (A-C) y a un tomate en el estadio rojo maduro (D). **A:** Visualización de los polisacáridos de la epidermis mediante el empleo del colorante calcoflúor. **B:** Misma sección de tejido teñida con Sudán IV que permite la visualizar la cutícula. **C:** La combinación de A y B muestra de estrecha asociación entre la cutícula y la pared celular. **D:** Visualización de las pectinas coloreadas con rojo de rutenio. La cutícula es fácilmente distinguirse gracias al contraste de color propiciado por la acumulación de flavonoides en el estadio de rojo maduro. Barra: 20  $\mu\text{m}$  (Domínguez *et al.*, 2011a).



**Familia C<sub>16</sub>:**



**Familia C<sub>18</sub>:**



**Figura I.4:** Principales monómeros presentes en las cutinas vegetales (Domínguez *et al.*, 2011a).

Los componentes más abundantes en la zona más externa de la cutícula son las ceras. Según puedan o no ser extraídas con elevado rendimiento y baja contaminación (usando disolventes orgánicos como cloroformo, metanol o mezclas de estos a temperatura ambiente), las ceras se clasifican en epicuticulares e intracuticulares, respectivamente. Desde un punto de vista químico, las ceras cuticulares son normalmente una mezcla de

diversos tipos de compuestos alifáticos. La cantidad y el tipo de los distintos componentes varían ampliamente de una especie vegetal a otra. Los principales constituyentes de las ceras cuticulares se muestran en la Tabla I.3.

**Tabla I.3. Principales componentes químicos de las ceras cuticulares (Hamilton, 1996).**

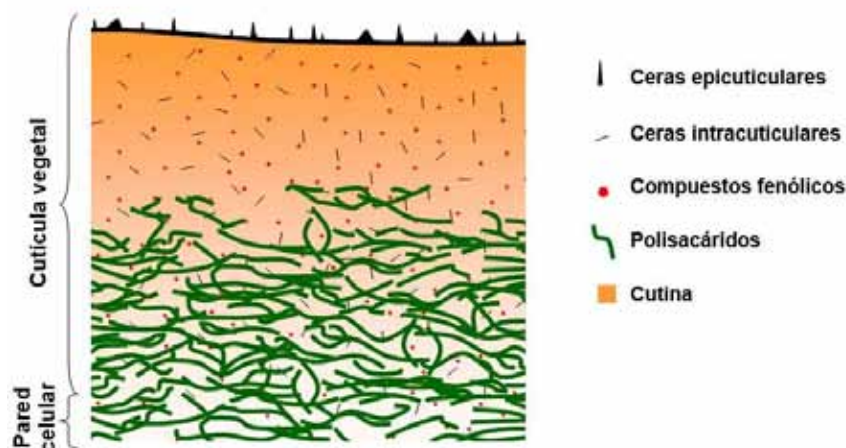
Componente	Estructura general	Rango	Compuestos mayoritarios	Especies
<b>Hidrocarburos</b>	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$	$\text{C}_{21}$ a $\text{C}_{35}$	$\text{C}_{29}$ , $\text{C}_{31}$	Casi todas
<b>Cetonas</b>	$\text{R}_1\text{COR}_2$	$\text{C}_{25}$ a $\text{C}_{33}$	$\text{C}_{29}$ , $\text{C}_{31}$	<i>Brassica</i> , <i>Rosaceae</i> , <i>Leptochloa digitata</i>
<b>Alcoholes secundarios</b>	$\text{R}_1\text{CH}(\text{OH})\text{R}_2$	$\text{C}_9$ a $\text{C}_{33}$	$\text{C}_{29}$ , $\text{C}_{31}$	<i>Pisum sativum</i> , <i>Brassica</i> , <i>Rosaceae</i> , <i>Malus</i>
<b><math>\beta</math>-dicetonas</b>	$\text{R}_1\text{COCH}_2\text{COR}_2$	$\text{C}_{27}$ a $\text{C}_{33}$	$\text{C}_{29}$ , $\text{C}_{31}$ , $\text{C}_{33}$	<i>Eucalyptus</i> , <i>Poa colenasia</i>
<b>Monoésteres</b>	$\text{R}_1\text{COOR}_2$	$\text{C}_{30}$ a $\text{C}_{60}$	$\text{C}_{44}$ , $\text{C}_{46}$ , $\text{C}_{48}$ , $\text{C}_{50}$	Casi todas
<b>Poliésteres</b>		Mr 800-1500		Gimnospermas
<b>Alcoholes primarios</b>	$\text{RCH}_2\text{OH}$	$\text{C}_{12}$ a $\text{C}_{36}$	$\text{C}_{26}$ , $\text{C}_{28}$	Casi todas
<b>Aldehídos</b>	$\text{RCHO}$	$\text{C}_{14}$ a $\text{C}_{34}$	$\text{C}_{26}$ , $\text{C}_{28}$ , $\text{C}_{30}$	<i>Vitis</i> , <i>Malus</i>
<b>Ácidos carboxílicos</b>	$\text{RCOOH}$	$\text{C}_{12}$ a $\text{C}_{36}$	$\text{C}_{24}$ , $\text{C}_{26}$ , $\text{C}_{28}$	Casi todas
<b>Terpenos y esteroides</b>			Ácidos ursólico y oleánico, betulina	<i>Vitis</i> , <i>Lycopersicon</i>

Los denominados compuestos hidrolizables, tales como fenoles o polisacáridos, son aquellos que se eliminan de las cutículas aisladas tras un reflujo a alta temperatura en medio fuertemente ácido. En diversas especies se han encontrado algunos taninos, ácidos fenólicos como los ácidos *p*- y *m*-cumárico y ferúlico, y flavonoides como la naringenina y la quercetina (Hunt y Baker, 1980). Además, en la cutícula de algunas gimnospermas se ha detectado una fracción similar a la lignina (Reina *et al.*, 2001). Desde un punto de vista electrodinámico, los compuestos fenólicos son los responsables de la capacidad de intercambio iónico de la cutícula. Por ello, este biopolímero puede describirse como una membrana eléctricamente asimétrica. En una solución acuosa electrolítica se establece un gradiente electrocinético a través de la cutícula aislada: mientras que la superficie externa permanece principalmente sin carga, la interna presenta una carga neta negativa descrita como potencial de membrana tipo Donnan asociado a fenoles y polisacáridos (Heredia y Benavente, 1991). Esta carga es una característica fisiológica muy importante que influye

en la absorción, la incorporación y el transporte de iones y moléculas cargadas y en la transpiración cuticular (Domínguez *et al.*, 2011a). La fracción polisacáridica está compuesta principalmente por celulosa, hemicelulosa y pectinas (López-Casado *et al.*, 2007).

Por último, en las cutículas de algunas especies puede encontrarse otro polímero lipídico, bien como una alternativa o en combinación con la cutina, denominado cután (Kolattukudy, 1996). Este material es completamente insoluble, difícilmente hidrolizable y se compone de derivados de ácidos grasos poliinsaturados unidos entre sí por enlaces tipo éter. Este tipo de enlace es el que proporciona al cután su elevada resistencia a la degradación química (Villena *et al.*, 1999). No obstante, algunos estudios más recientes han sugerido que este polímero presenta una estructura basada en amplios dominios aromáticos unidos por cadenas metilénicas de longitud variable y ésteres alifáticos de pocos átomos de carbono (Sachleben *et al.*, 2004; Deshmukh *et al.*, 2005). Desafortunadamente, se conoce poco sobre la distribución de cután entre las diferentes especies vegetales y las ventajas potenciales de una cutícula químicamente más resistente basada en este biopolímero.

La Figura I.5 muestra un esquema general de un corte transversal de la cutícula en el que se representa la disposición de los diferentes componentes cuticulares descritos anteriormente. Como puede observarse, la matriz polimérica de cutina actúa de soporte estructural para el resto. Tanto las ceras intracuticulares como los compuestos fenólicos se reparten homogéneamente por la cutícula, mientras que las ceras epicuticulares se encuentran en el exterior en forma más o menos cristalina, y los polisacáridos, derivados de la pared de las células epidérmicas, se estructuran en fibrillas en la parte inferior.



**Figura I.5:** Esquema de una sección transversal de la cutícula vegetal que representa sus diferentes componentes (Domínguez *et al.*, 2011a).

### Funciones de la cutícula

Como consecuencia de sus características físicas, químicas y morfológicas, la cutícula presenta una serie de funciones fisiológicas:

- Minimizar la pérdida de agua y solutos. La cutícula actúa como una eficaz barrera hidrofóbica que dificulta la evaporación y transpiración del agua (Kerstiens 1996; Riederer y Schreiber, 2001; Schreiber y Schönherr, 2009).
- Impedir la penetración de patógenos. La membrana cuticular se considera una barrera física que evita la entrada y el ataque de hongos y bacterias (Riederer y Müller, 2006).
- Proteger frente a daños mecánicos. Debido a sus propiedades mecánicas la cutícula es capaz de prevenir el daño que pudieran ocasionar fenómenos externos tales como la lluvia y el viento (Niklas, 1992).
- Reflejar la radiación ultravioleta. Las ceras cristalinas epicuticulares son capaces de reflejar, y así atenuar, la radiación ultravioleta que incide sobre los tejidos vegetales (Pfündel *et al.*, 2006).
- Participar en la correcta formación de los órganos en las primeras fases de desarrollo de planta. La cutícula impide la adhesión indiferenciada de las células epidérmicas de los órganos en formación (Lolle y Pruitt, 1999).
- Regular las respuestas del desarrollo de la planta. La cutícula acumula moléculas bioactivas que actúan como señales del desarrollo de la planta (Mariani y Wolters-Arts, 2000; Kolattukudy, 1996).



## Biofísica de la cutícula

La interacción con el agua tiene importantes consecuencias sobre el comportamiento de un material. El agua se comporta principalmente como un agente plastificador que se intercala entre las cadenas y los grupos funcionales, disminuyendo así la interacción entre estos y provocando que el material se vuelva menos rígido y más deformable, con características viscoelásticas. Se ha documentado que la cutícula aislada de frutos de tomate responde a la hidratación modificando sus propiedades mecánicas (Petracek y Bukovac, 1995). No obstante, la hidratación de una cutícula de fruto de tomate no es un proceso lineal sino que depende del grado de humedad relativa a la que esté expuesta (Luque *et al.*, 1995).

Desde la década de los 70, varios estudios han evaluado la permeabilidad y la difusión del agua y los solutos a través de la cutina y de la cutícula en una amplia variedad de plantas (Fernández y Eichert, 2009). En general, las cutículas estomáticas presentan una baja permeabilidad al agua, la cual es cientos de veces más baja que la de la pared celular de las plantas y permanece en un rango comparable al de otros polímeros sintéticos hidrofóbicos (Schreiber y Schönherr, 2009). La cutícula es permeable tanto a compuestos polares como no polares, donde las ceras juegan un papel clave en la reducción de la permeabilidad, especialmente las ceras epicuticulares, las cuales determinan la capacidad de la superficie para mojarse (Bukovac *et al.*, 1981). Se ha sugerido, aunque aún no se ha demostrado, que el transporte del agua ocurre a través de poros acuosos o canales, cuya presencia parece ser altamente dependiente de la humedad relativa del ambiente (Schreiber y Schönherr, 2009).

En relación al agrietado, una fisiopatía que se manifiesta como fracturas en la superficie de los frutos, Aloni *et al.* (1998) observaron diferencias en cuanto a las tasas de transpiración cuticular entre los cultivares susceptibles y los resistentes al mismo en distintas variedades de pimiento. Similares resultados se han postulado para el agrietado de cerezas, donde la morfología y la composición química de la región superior (ceras epicuticulares) determinarían la capacidad de la superficie para mojarse y la retención de moléculas acuosas, condicionando así la permeabilidad del agua a través de la cutícula y siendo un factor diferenciador de la susceptibilidad al agrietado (Domínguez *et al.*, 1999).



La temperatura está relacionada con las propiedades biofísicas de un polímero, pudiendo dar lugar a cambios en su estructura y en su perfil de hidratación. Los métodos más empleados para determinar cómo afecta la temperatura a la cutícula de las plantas evalúan el calor específico o capacidad calorífica, un parámetro termodinámico muy sensible a los cambios estructurales. La cutícula y la cutina presentan un calor específico significativamente más alto que otros polímeros (Casado y Heredia, 2001). Por ejemplo, el calor específico de la cutina oscila entre 2 y 2.5 J K<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup>, mientras que la celulosa, el principal componente de las paredes celulares de las plantas, tiene un calor específico de 1.5 J K<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> (Boraston, 2005). Aunque la cutícula contribuye en menor medida a la masa total de las hojas y los frutos, podría jugar un importante papel como termorregulador entre las plantas y el ambiente, especialmente en aquellas expuestas a temperaturas extremas.

Lenzian y Kerstiens (1991) indicaron que la existencia de un estado vítreo en la cutina dependería probablemente de la temperatura y del contenido de agua de la misma: en condiciones anhidras la cutícula es relativamente rígida, mientras que mojada tiene un aspecto más blando. Estos autores llevaron a cabo una estimación de la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) de la cutina de frutos de tomate a partir de un método teórico desarrollado por Hopfinger *et al.* (1988), llegando a la conclusión de que esta cutina debe tener una  $T_g$  comprendida entre -70° y -10°C. Más tarde, Luque y Heredia (1994, 1997) estudiaron las transiciones de fase que caracterizaban a las membranas cuticulares aisladas también de frutos de tomate. Estos autores observaron mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) que la cutícula presentaba una  $T_g$  en torno a los -30° C.

La cutícula puede servir como un soporte supramolecular estructural con capacidad mecánica para resistir fuerzas de deformación, principalmente de tensión, en órganos vegetales carentes de otras estructuras más resistentes, como en ciertos frutos globosos como el tomate, la uva y la cereza (Wiedemann y Neinhuis, 1998), así como en estructuras especializadas con requerimientos muy específicos de elasticidad, como es el caso de los movimientos tigmonásticos de los filamentos estaminales de las flores de *Cirsium horridulum* Michx (Marga *et al.*, 2001).

Las propiedades de un tejido dependen, entre otros factores, de su composición, así como de las relaciones moleculares que se establecen entre los diferentes componentes, siendo importante determinar si el tejido se considera una estructura de naturaleza

homogénea o si es un material compuesto donde los diferentes componentes se organizan de forma heterogénea. En este último caso las propiedades mecánicas del tejido dependerán tanto de la relación entre los diferentes componentes como de las propiedades de cada uno de ellos (Spatz *et al.*, 1999). Son varios los métodos que ofrecen una visión complementaria de las propiedades mecánicas de las cutículas vegetales en su conjunto. Los más utilizados son aquellos ensayos en los que se obtienen las clásicas curvas de esfuerzo-deformación o curvas de tracción, en las que se aplica una carga o tensión a una lámina de material y se estima el grado de deformación obtenido como respuesta del material. Las principales variables que condicionan estos ensayos son, además de las propiedades del material, el tiempo de aplicación de la carga, la temperatura, la humedad o el grado de hidratación del material. El comportamiento reológico y biomecánico de la cutícula puede describirse como viscoelástico, o lo que es lo mismo, la relación entre el esfuerzo y la deformación es dependiente del tiempo (Niklas, 1992), con un componente elástico para pequeñas deformaciones. En algunas especies, las curvas esfuerzo-deformación muestran dos fases con diferentes pendientes: una primera fase elástica que muestra un comportamiento lineal, y una segunda fase viscoelástica y no lineal (Matas *et al.*, 2005).

La mayoría de los análisis biomecánicos se han realizado con cutículas de fruto de tomate. En ellos se ha comprobado que la compleja composición de la cutícula repercute en sus propiedades biomecánicas (Domínguez *et al.*, 2011b). Petracek y Bukovac (1995) observaron una disminución del esfuerzo de fractura y una intensificación de su comportamiento plástico después de retirar las ceras. Las ceras pues restringirían la movilidad de la matriz de cutina; dicho de otro modo, estos componentes actuarían incrementando la rigidez de la cutícula. Por otro lado, se ha demostrado que los polisacáridos son los responsables del comportamiento elástico lineal de la cutícula y de su elevado módulo elástico, mientras que la cutina presenta un módulo elástico bajo (López-Casado *et al.*, 2007). La presencia de material polisacáridico fundamentalmente en la parte interna de la cutícula le confiere a esta una menor extensibilidad que la que presenta la superficie externa cubierta de ceras epicuticulares (Wilson y Sterling, 1976). Por último, los flavonoides contribuyen a la fase elástica, reforzando la acción de la fracción polisacáridica e incrementando la rigidez de la cutícula, es decir, juegan un papel similar al ya sugerido para las ceras (Domínguez *et al.*, 2009). Dicha contribución también se ha

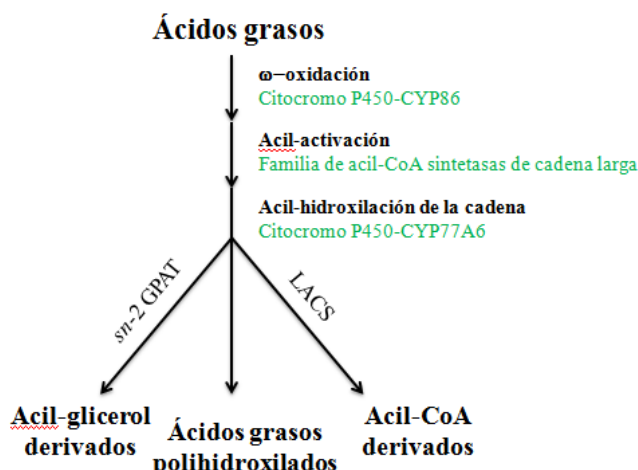


observado en experimentos con frutos de tomate mutantes en los que la cutícula carece del flavonoide naringenina chalcona, en los cuales la fase elástica en la correspondiente curva esfuerzo-deformación se reduce de forma significativa (Adato *et al.*, 2009).

## **SÍNTESIS, MODIFICACIÓN QUÍMICA Y TRANSPORTE DE LOS MONÓMEROS DE LA CUTINA VEGETAL**

Como se ha comentado anteriormente, la cutícula está implicada en diversas funciones fisiológicas de gran relevancia en los organismos vegetales. Debido a ello, son numerosos los trabajos enfocados en el estudio de este complejo biopolímero, muchos de los cuales están centrados en el análisis de su composición y su estructura.

La síntesis de los monómeros de cutina viene siendo documentada desde la década de los 70. Esta tiene lugar en los plástidos de las células epidérmicas (Kolattukudy, 2001, 2002) y procede por dos procesos principales: la transformación química de los ácidos grasos en el retículo endoplasmático, y el transporte de estos precursores modificados a la pared celular más externa, donde tiene lugar la polimerización. Varios trabajos realizados en *Arabidopsis thaliana* L. han permitido establecer un orden secuencial de algunas de las reacciones que integran estos procesos. En el caso de los monómeros de la familia C<sub>16</sub>, parte de esta secuencia comprendería la adición de un grupo hidroxilo a la posición  $\omega$  (Xiao *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2007; Molina *et al.*, 2008), la activación debida al CoA (Bessire *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2009; Weng *et al.*, 2010) y la subsecuente adición de los hidroxilos secundarios a la cadena del ácido graso (Li y Beisson *et al.*, 2009) (Fig. I.6). La ruta de reacciones correspondiente a los monómeros de la familia C<sub>18</sub> incluiría una epoxidación adicional (Li y Beisson, 2009). No obstante, el orden en el que ocurren estas reacciones no es definitivo y podría variar en función de la especie. Asimismo, se desconoce si la activación de los monómeros es o no anterior a su transporte.



**Figura I.6:** Representación esquemática de la modificación de los ácidos grasos en el retículo endoplasmático (Domínguez *et al.*, 2015).

La  $\omega$ -hidroxilación es catalizada por una  $\omega$ -hidroxilasa perteneciente a la subfamilia CYP86 del citocromo P450, mientras que la hidroxilación en el interior de la cadena de ácido graso es codificada por miembros de la subfamilia CYP77 (Li y Beisson, 2009). Las aciltransferasas que sintetizan el acil-CoA son codificadas por la familia LACS (*Long chain Acyl- CoA Synthetases*), de la que se han descrito nueve miembros en *Arabidopsis*. De ellos, LACS1 y LACS2 parecen ser responsables de la biosíntesis de los monómeros de cutina  $C_{16}$  (Yeasts y Rose, 2013). Para la formación del derivado acil-glicerol se requiere una aciltransferasa intracelular adicional: la glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT). Recientemente se ha demostrado que las plantas poseen una única subfamilia de GPATs constituida por enzimas que presentan actividad *sn-2* glicerol fosfatasa-aciltransferasa, produciendo ésteres de 2-monoacilglicerol (Yang *et al.*, 2010). Aunque la secuencia específica de reacciones enzimáticas intracelulares requiere una caracterización adicional de la especificidad de cada enzima por su sustrato, el análisis en *Arabidopsis* de GPATs bifuncionales indica que existe una fuerte preferencia por la acil-CoA  $\omega$ -hidroxilación, sugiriendo que la reacción de hidroxilación precede a la transferencia del glicerol (Yang *et al.*, 2012). De igual manera, parece ser que el producto final de esta ruta de reacciones es el 2-monoacilgliceril éster. En el caso de la cutina compuesta por ácidos 10,16-dihidroxihexadecanoicos, el precursor es el 2-mono(10,16)-dihidroxihexadecanoil glicerol (2-MHG) (Yeasts y Rose, 2013). Además, se han identificado diversas enzimas involucradas en la incorporación de compuestos fenólicos a distintos complejos moleculares (Molina y Kosma, 2014). Otras enzimas como HOTHEAD y BODYGUARD

también se han relacionado con la biosíntesis o con la deposición de la cutina (Kurdyukov *et al.*, 2006a y 2006b; Jakobson *et al.*, 2016).

Tras la modificación de los precursores de cutina estos deben ser exportados del retículo endoplasmático y trasladados a la membrana cuticular naciente a través de la membrana plasmática. Por tanto, en el transporte de los monómeros pueden distinguirse dos fases: una intracelular (desde el retículo endoplasmático hasta la membrana plasmática) y una extracelular (desde el exterior de la membrana plasmática hacia la cara externa de la pared celular). El hecho de que el citoplasma sea principalmente acuoso y que la pared celular sea hidrofílica y se encuentre hidratada supone un obstáculo a la hora de establecer la relación entre los monómeros, principalmente hidrofóbicos, y las potenciales vías de transporte intra y extracelulares. Es interesante constatar que el transporte de monómeros de cutina hacia el exterior de la célula epidérmica constituye un importante flujo de carbono, en forma de cadenas acilo, de más del 60% del total de los ácidos grasos que son sintetizados en las células epidérmicas (Suh *et al.*, 2005).

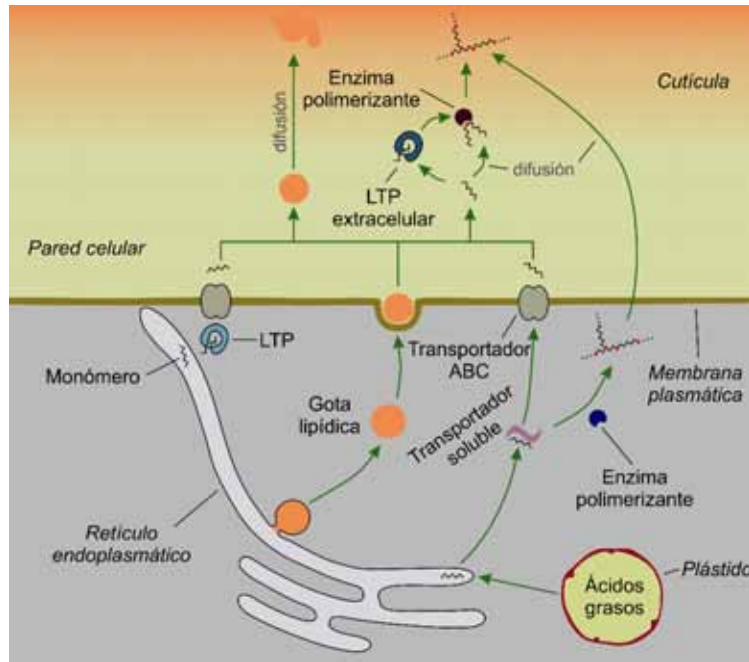
El desplazamiento de los monómeros de cutina desde el retículo endoplasmático hacia la membrana podría ocurrir a través de una vía de transporte no vesicular. Este mecanismo estaría mediado por proteínas transportadoras de lípidos (LTPs) e implicaría la existencia de sitios de contacto entre los dos sistemas de membranas (Samuels y McFarlane, 2012). No obstante, aún no han sido identificadas con exactitud las especies moleculares que son transportadas (monómeros, monómeros activados de CoA o acil-glicerol derivados y oligómeros, acompañados o no de enzimas de polimerización). En el caso de los precursores 2-MHG, la fracción de glicerol les aporta la polaridad suficiente para poder ser transportados hacia el exterior celular sin la participación de otras moléculas que les faciliten el paso a través de la membrana plasmática y la pared celular (Yeasts y Rose, 2013). Otro posible mecanismo de transporte implicaría la exocitosis de vesículas o gotas oleofílicas o lipídicas, permitiendo así el transporte masivo de monómeros.

Los precursores de cutina atraviesan la membrana plasmática con la ayuda de distintos tipos de transportadores. Entre ellos se encuentran algunos miembros de la subfamilia de transportadores ABCG (*ATP-binding cassette G*) que están implicados en el transporte de lípidos y de otras moléculas hidrofóbicas (Bessire *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2011). Los transportadores ABC constituyen una de las familias de proteínas más amplias que han

sido identificadas en los organismos. En concreto, el genoma de las plantas codifica para más de 100 transportadores ABC, aunque la totalidad de ellos no ha sido analizada funcionalmente. Estos transportadores actúan tanto como exportadores como por importadores y su acción está mediada por la hidrólisis de ATP. Están constituidos por dos dominios transmembrana hidrofóbicos, los cuales forman un poro a través de la bicapa lipídica, y dos dominios citosólicos, conocidos como sitios de unión a nucleótidos. Los transportadores ABC están involucrados en diversos procesos, entre los que se encuentran la detoxificación, el transporte de compuestos conjugados, la respuesta al estrés abiótico y a los patógenos, la nutrición vegetal o el crecimiento y el desarrollo de los órganos. No solo se encuentran en la membrana plasmática sino que, dependiendo de la función que realicen y el tipo de sustrato que transporten, pueden localizarse en la membrana vacuolar, la del retículo endoplasmático o la de los plastos. En *Arabidopsis* se ha descrito que los miembros 12, 13 y 32 de la familia de transportadores ABCG están implicados en el transporte y la deposición de los precursores lipídicos cuticulares en las células epidérmicas para la formación tanto de la capa interna de la cutícula como para la deposición de los precursores de las ceras. La realización de *knock-outs* para los genes que codifican estos transportadores ha posibilitado el análisis funcional de los mismos (especificidad de sustrato, especies químicas transportadas, etc). Estos mutantes muestran anomalías en la capa cuticular debido a la deficiencia de ciertos componentes y a la consecuente alteración de sus propiedades (Kang *et al.*, 2011).

El transporte extracelular a través de la pared celular podría ocurrir por la difusión simple de monómeros, oligómeros o gotas lipídicas, o bien por un mecanismo de difusión facilitada mediado por LTPs extracelulares (Pollard *et al.*, 2008). Este transporte extracelular conlleva a la deposición de los componentes que más tarde conformarán la cutina en la parte más externa de la pared celular epidérmica. Se han identificado varios factores de transcripción implicados en la regulación de la síntesis de la cutina, entre los que se encuentran SHINE1/WAX INDUCER1, presente en *Arabidopsis* (Broun *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2013) y SHINE3 y CUTIN DEFICIENT, localizados en tomate (Isaacson *et al.*, 2009; Nadakuduti *et al.*, 2012; Kimbara *et al.*, 2013). Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos exactos a través de los cuales tiene lugar esta regulación.

En la Figura I.7 se esquematizan los distintos tipos de transporte intracelular mencionados, así como los posibles mecanismos de transporte extracelular.



**Figura I.7:** Vías de transporte de los monómeros de cutina hacia el exterior de la pared celular y a través de la misma. Adaptado de Pollard *et al.*, 2008 y Domínguez *et al.*, 2015.

Recientemente, se ha descrito un modelo según el cual el transporte a través de la pared celular de los compuestos celulares excretados se produciría como consecuencia de sucesivos ciclos de contracción y de expansión del protoplasto (Paiva, 2016). Así, el material acumulado en el espacio periplasmático se liberaría hacia el exterior y traspasaría tanto la pared celular más externa como la cutícula. Por un lado, los productos de secreción serían transportados hacia la membrana plasmática por medio de vesículas procedentes del retículo endoplasmático o del aparato de Golgi. La fusión de las membranas vacuolares con el plasmalema liberaría el contenido de las vesículas hacia el espacio periplasmático. Al mismo tiempo, el material que se encuentra en el citosol o que procede de los plástidos, el cual suele ser de naturaleza lipídica, se depositaría en el periplasma como consecuencia de la fusión de pequeñas gotas con la membrana plasmática. De igual manera, la vacuola que ocupa gran parte del volumen celular se expandiría hasta que el tonoplasto y el plasmalema entraran en contacto y se produjese la exocitosis de nuevo material hacia dicho espacio periplasmático. Los diversos productos de secreción acumulados en esta zona de forma ininterrumpida ejercerían una fuerza sobre el protoplasto que provocaría su compresión. El continuado incremento de la presión daría lugar a la ruptura de algunos plasmodesmos, permitiendo así el movimiento del protoplasto y causando la expansión masiva del espacio periplasmático y la consecuente liberación de todo el material hacia la pared celular más externa. Por tanto, este mecanismo facilitaría que secreciones de

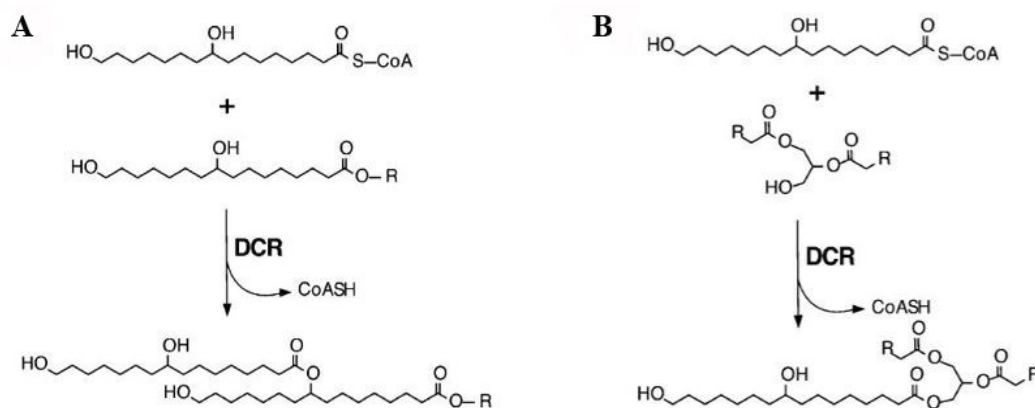


naturaleza hidrofóbica se transportaran a través de la pared celular hidrofílica y alcanzasen la cutícula.

## SÍNTESIS DE LA CUTINA

### Existencia, localización y función de las aciltransferasas

En 1974, Croteau y Kolattukudy demostraron la existencia de una cutina transacilasa en *Vicia faba* que emplea ácidos grasos polihidroxilados activados por CoA para acilar los grupos hidroxilo libres presentes en los oligómeros de cutina y en la cutina naciente. Esta proteína, por tanto, tendría una función polimerizante de la cutina. Más recientemente se ha identificado otra aciltransferasa en los pétalos de *Arabidopsis*, DCR (DEFECTIVE IN CUTICULAR RIDGES), que parece estar implicada en la incorporación del monómero ácido 10, 16-dihidroxihexadecanoico al entrecruzado de cutina. DCR podría llevar a cabo una oligomerización parcial de los monómeros de cutina (Fig. I.8, A), tanto en especies donde la cutina presenta una disposición lineal como en aquellas donde su estructura es ramificada (Panikashvili *et al.*, 2009, Molina y Kosma, 2014). De forma alternativa, Rani *et al.* (2010) han postulado que codifica una diacilglicerol aciltransferasa soluble (Fig. I.8, B).

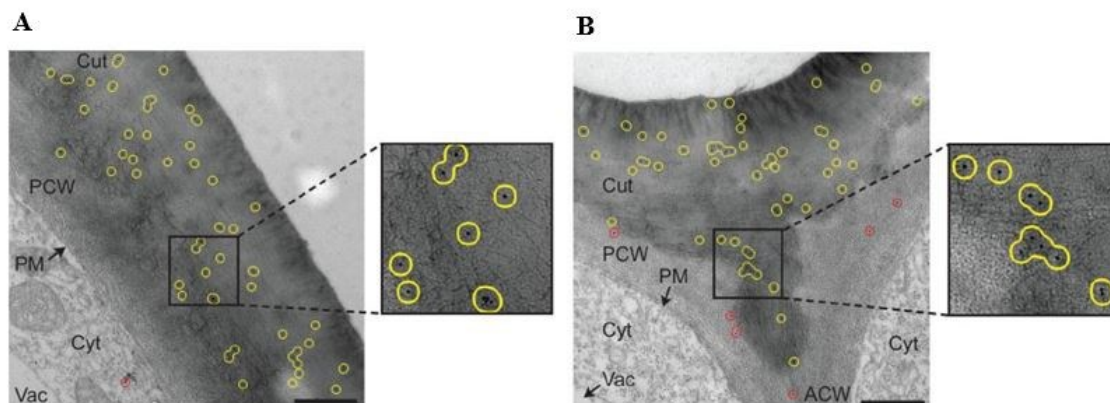


**Figura I.8:** Posibles mecanismos de biosíntesis de cutina en los que estaría implicada la enzima DCR. **A:** Oligomerización de los monómeros de cutina antes de ser exportados al apoplasto. DCR cataliza la esterificación del dihidroxidecanoato al grupo hidroxilo secundario de una molécula secundaria o de un oligómero usando el acil-CoA derivado como acil donador. También es posible su esterificación al hidroxilo  $\omega$ -terminal (Panikashvili *et al.*, 2009). **B:** Transferencia de un dihidroxihexadecanoil-CoA a un grupo hidroxilo libre de un diacilglicerol para formar un triacilglicerol, el cual puede ser un monómero activado para la síntesis de cutina (Rani *et al.*, 2010). Ambos mecanismos sugieren actividades muy diferentes para la DCR. En el primer caso, DCR lleva a cabo la polimerización de los monómeros de cutina hasta formar los oligómeros, mientras que en el segundo caso DCR está implicada en la activación de monómeros. Esquema adaptado de Molina y Kosma, 2014.



## Implicación de la cutina sintasa en la biosíntesis de cutina

En el caso del fruto de tomate, se ha documentado que la polimerización de la cutina ocurre por la transesterificación de los precursores en forma de hidroxiaclgliceroles. Esta reacción está catalizada por CD1 (*Cutin Deficient 1*), una lipasa/hidrolasa con un motivo GDSL. Se han descrito posibles genes ortólogos en *Arabidopsis thaliana* y en *Physcomitrella patens* (Yeats *et al.*, 2012, 2014) que junto con CD1 constituye un clado de cutina sintasas (CUS) englobado en la superfamilia GDSL. Las CUS se encuentran muy conservadas y actúan como poliéster sintasas con una leve actividad hidrolítica. CD1 se localiza en la cutícula, y de forma mucho menos abundante, en las paredes celulares de células periclinales y anticlinales (Fig. I.9). Este patrón de localización sugiere que esta proteína interviene en los momentos finales de la ruta de biosíntesis de la cutina (Yeats *et al.*, 2012).

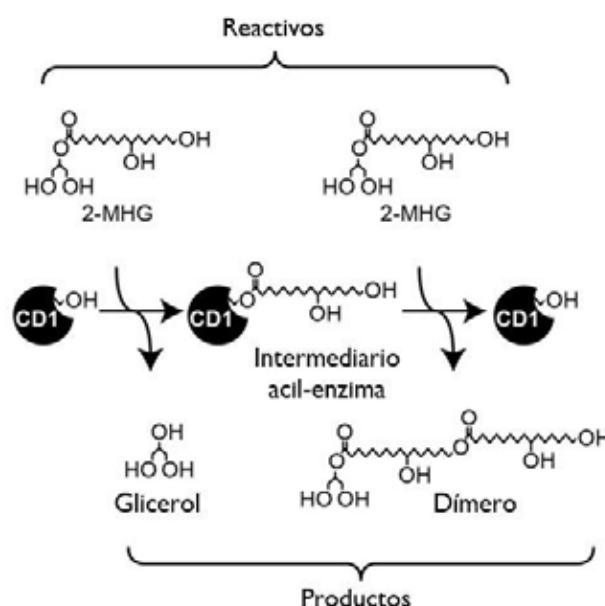


**Figura I.9:** Inmunolocalización de CD1 mediante MET en cortes transversales de frutos de tomate de 15 días de desarrollo. **A:** Disposición de CD1 en la cutícula y en la pared periclinal de una célula epidérmica. **B:** Distribución de la proteína en la cutícula y en la pared anticlinal entre dos células epidérmicas adyacentes. Barra: 0.5  $\mu$ m. Los círculos amarillos engloban partículas de oro presentes en la cutícula, mientras que los círculos rojos rodean aquellas que se encuentran en otra localización. Los recuadros de menor tamaño muestran áreas ampliadas 2.5x. Cut, cutícula; ACW, pared celular anticlinal; PCW, pared celular periclinal; PM, membrana plasmática; Cyt, citoplasma; Vac, vacuola. (Yeats *et al.*, 2012).

Al igual que otras aciltransferasas de la superfamilia  $\alpha/\beta$ -hidrolasa, CD1 parece actuar mediante un mecanismo de reacción Bi-Bi Ping-Pong (Jiang *et al.*, 2011). En primer lugar, CD1 reaccionaría con una molécula de 2-MHG, formándose un intermediario acil-enzima y liberándose una molécula de glicerol. En un segundo paso, el intermediario acil-enzima volvería a reaccionar con una molécula de 2-MHG, generándose así un producto dimérico (Fig. I.10). En el transcurso de estas reacciones se formarían oligómeros progresivamente más largos que actuarían como sustratos al mismo tiempo que la enzima recibiría un grupo acilo adicional en cada ciclo derivado del 2-MHG. Mediante este mecanismo, diferentes

monómeros de cutina podrían integrarse en el polímero *in vivo* a partir de sus respectivos ésteres de glicerol (Yeats *et al.*, 2014).

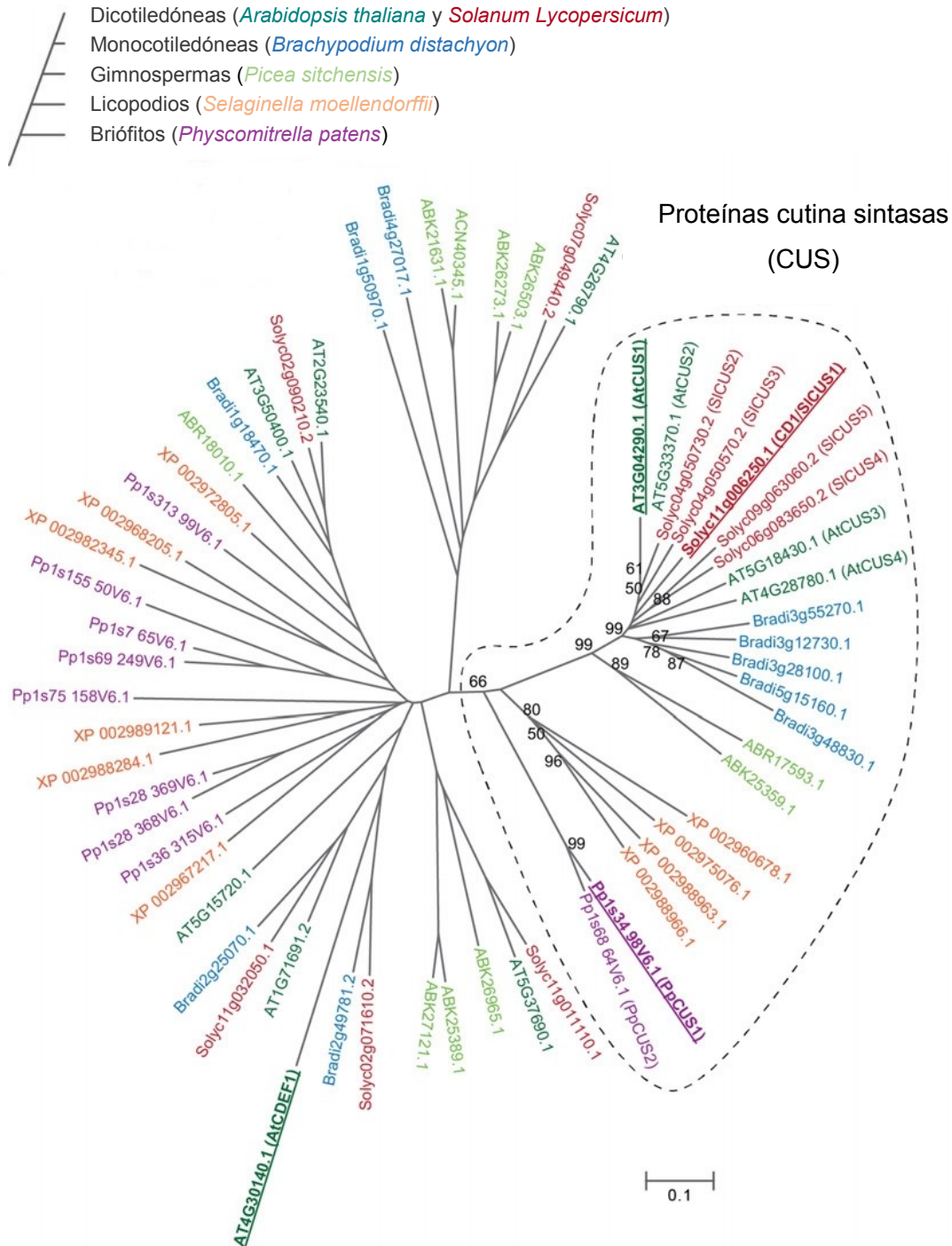
Por otra parte, se ha descrito que la actividad óptima de CD1 se alcanza a valores ácidos de pH (en torno a pH 5) mientras que a pH 7 presenta una actividad mínima. Esta circunstancia podría explicar por qué no se produce una polimerización prematura en el ambiente neutro del retículo endoplasmático, orgánulo donde tiene lugar la biosíntesis de los monómeros de cutina (Yeats *et al.*, 2014).



**Figura I.10:** Esquema de las reacciones que conducen a la formación de un dímero de 10, 16-dihidroxihexadecanoico a partir de dos moléculas de 2-mono-(10,16-dihidroxi) glicerol (2-MHG). El dímero actuaría como sustrato en etapas posteriores, generándose de esta manera productos de mayor magnitud (Yeats *et al.*, 2014).

Como se ha comentado, CD1 es una de las numerosas proteínas englobadas en la superfamilia de proteínas vegetales que contienen el dominio GDSSL. A fin de identificar proteínas homólogas y posibles genes ortólogos Yeats *et al.* elaboraron alineamientos múltiples de secuencias de los genomas de *Arabidopsis thaliana*, *Solanum lycopersicum*, *Brachypodium distachyon*, *Selaginella moellendorffii* y *Physcomitrella patens*, así como de una colección de unigenes derivados de secuencias dianas expresadas en *Picea sitchensis*. Gracias a ello, se ha elaborado un árbol de distancias mediante el método *neighbor-joining* (Fig. I.11), en el cual puede distinguirse un clado de proteínas cutina sintasas en las plantas espermatofitas. En el caso de las angiospermas analizadas en este estudio (*A. thaliana*, *S. lycopersicum* y *B. distachyon*), la familia CUS constaría de cuatro o cinco genes estrechamente relacionados. Aunque con un porcentaje de identidad de secuencias algo

menor, también fue posible identificar un clado en el que estarían incluidas especies no espermatofitas (*S. Moellendorffii* y *P. patens*). Todo ello sugiere que esta posible familia de proteínas cutina sintasas está fuertemente conservada en las plantas terrestres (Yeats *et al.*, 2014).



**Figura I.11:** Árbol filogenético de las secuencias relacionadas con CD1 en especies de embriófitos representativas. La filogenia de las especies consideradas se muestra de forma esquemática en la parte superior. Los genes están coloreados por especies (Yeats *et al.* 2014).

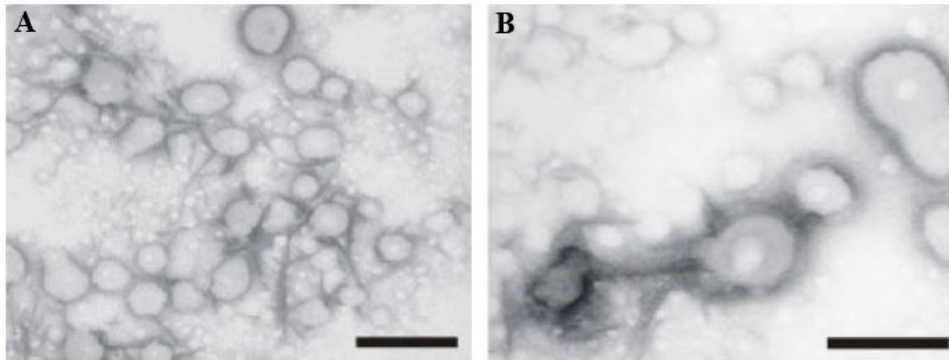
De forma análoga y casi simultánea, Girard *et al.* (2012) identificaron esta misma proteína refiriéndose a ella como GDSL1, una enzima perteneciente a la familia esterasa/hidrolasa GDSL que igualmente se expresaba en la epidermis del fruto de tomate. Estos autores demostraron que el silenciamiento de *GDSL1* conlleva una reducción de la cantidad de monómeros de cutina y del número de enlaces tipo éster que se establecen en la matriz polimérica. Como consecuencia de ello aparecen nanoporos en el interior de la cutícula y disminuye del grosor de la misma.

A pesar de que la identificación de la cutina sintasa supone un paso muy importante para comprender el proceso mediante el cual se sintetiza la cutina vegetal aún quedan cuestiones por esclarecer. Algunas de ellas se fundamentan en el hecho de que esta enzima parece estar capacitada únicamente para sintetizar oligómeros lineales. La naturaleza parcialmente entrecruzada de la matriz de cutina implica que los grupos hidroxilos secundarios de algunos monómeros se encuentran esterificados, por lo que debe existir un mecanismo adicional que permita la formación de estos entrecruzamientos. Cabe pensar, por tanto, en la posible implicación de otros miembros de la familia GDSL que llevarían a cabo estas esterificaciones de los grupos hidroxilo secundarios, o bien de otro tipo de moléculas aceptoras o de monómeros que actuarían como donadores. De igual manera, se desconoce el mecanismo exacto mediante el cual se transportan tanto los monómeros 2-MHG como la cutina sintasa desde el citosol hasta la parte externa de la pared celular donde se estructura la cutina.

## **AUTO-ENSAMBLAJE MOLECULAR**

Debido a la presencia de grupos hidroxilos secundarios adicionales a lo largo de la cadena hidrofóbica, los monómeros de cutina son moléculas de ácidos grasos peculiares que no pueden ser clasificadas como lípidos anfifílicos. Se ha demostrado que estos monómeros tienen la capacidad de auto-ensamblarse de forma espontánea en una superficie plana polar, generando así estructuras interdigitadas (Benítez *et al.*, 2007). Dicho autoensamblaje es previo a la esterificación química entre los monómeros, razón por la cual este mecanismo ha sido propuesto como una posible vía para la formación del biopolímero de cutina (Benítez *et al.*, 2007). Esta hipótesis ha sido secundada por Heredia-Guerrero *et al.* (2008) mediante la generación de vesículas polidispersas de tamaños variables (entre 50-200 nm) a partir de diferentes monómeros de cutina en disolución

acuosa. Estas nanopartículas, denominadas *cutinsomas*, presentan un núcleo interno denso rodeado por una capa externa de 2-4 nm de grosor constituida por membranas interdigitadas (Fig. I.12).



**Figura I.12:** **A:** Imagen de MET donde se observan vesículas polidispersas formadas a partir de una solución de ácido 9,10,16-trihidroxihexadecanoico (también llamado ácido aleurítico) teñidas con acetato de uranilo. Barra: 0.25  $\mu\text{m}$ . **B:** Imagen de MET donde se muestra la fusión de dos de estas vesículas. Barra: 0.2  $\mu\text{m}$ . Tomado de Heredia-Guerrero *et al.* (2008).

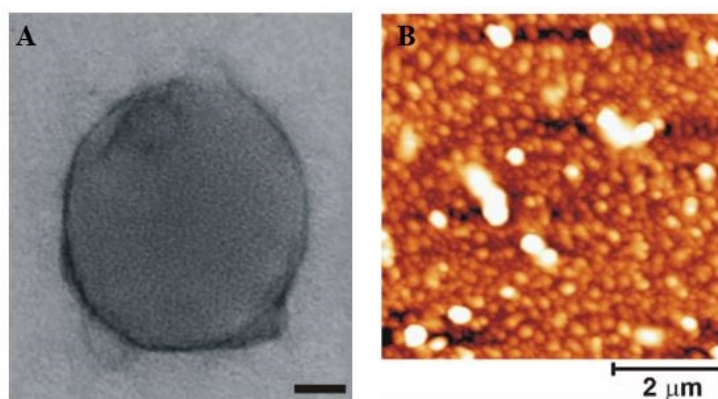
La característica más relevante de estos *cutinsomas* es su capacidad de polimerizar espontáneamente en condiciones ambientales, generándose estructuras fibrilares y precipitados amorfos tipo cutina (Heredia *et al.*, 2009). La formación de estas vesículas tiene lugar cuando el pH del medio alcanza un valor cercano al del  $\text{pK}_a$  de los ácidos grasos polihidroxilados. Bajo esta circunstancia, los monómeros se acumulan hasta generar mediante su auto-ensamblaje partículas y nanogotas, de cuyo interior son excluidas prácticamente la totalidad de las moléculas de agua hasta quedar retenidos en él únicamente algunos protones. En un paso posterior, se generan oligómeros cortos unidos mediante enlaces éster que originan un núcleo hidrofóbico. Las moléculas de agua que son expelidas hacia el medio acuoso se consideran la fuerza conductora de estas interacciones supramoleculares (Heredia-Guerrero *et al.*, 2008; Domínguez *et al.*, 2010). Estas nanopartículas presentan una alta capacidad de agregación y pueden dar lugar a estructuras de mayor tamaño (Heredia *et al.*, 2009). Se han propuesto mecanismos de auto-ensamblaje similares que estarían implicados en la formación de otros biopolímeros presentes en las plantas, como la lignina (Achyuthan *et al.*, 2010), la esporopolenina (Osthoff y Wiermann, 1987) y el cután (Villena *et al.*, 1999).

Recientemente se ha descrito la formación de *cutinsomas* *in vitro* a partir de una solución de ácido aleurítico, pectinas y una mezcla de monómeros de cutina presentes en el fruto de tomate (Guzman-Puyol *et al.*, 2015). Mediante MET fue posible distinguir en ellos



un núcleo lipídico rodeado de una capa pectínica (Fig. I.13, A). Las pectinas podrían facilitar la generación de este sistema, ya que constituyen una interfase entre el núcleo lipídico y el ambiente acuoso en el cual se forma la nanopartícula. Estos resultados sugieren que los polisacáridos constituyentes de la pared celular, además de proveer un soporte mecánico, podrían jugar un papel significativo durante la biosíntesis de cutina mediante su participación activa en la formación de *cutinsomas* (Guzman-Puyol *et al.*, 2015).

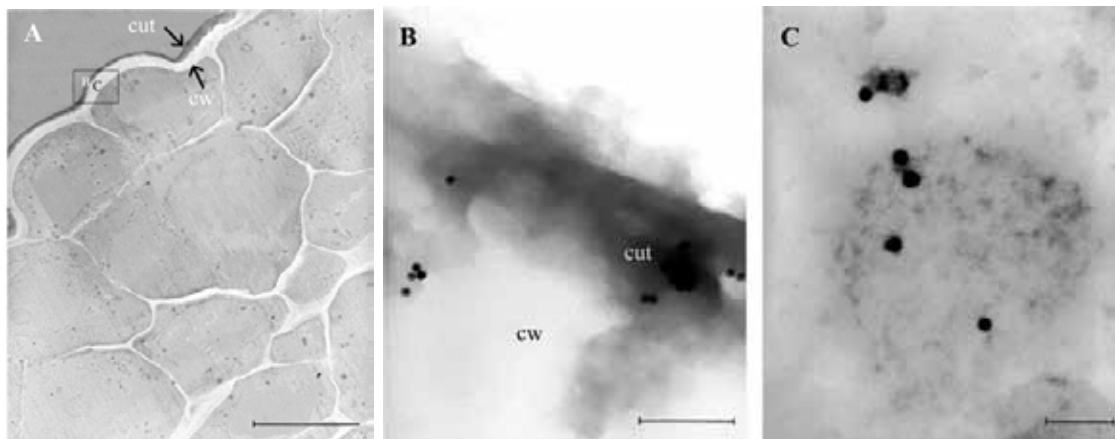
La acumulación de *cutinsomas* en la parte externa de la pared celular durante las etapas iniciales de la formación de la cutina podría producir la fusión vesicular y el consiguiente desarrollo del biopolímero. A fin de profundizar sobre este posible mecanismo de síntesis se ha estudiado la superficie externa de frutos de tomate de 5 días de desarrollo mediante microscopía de fuerzas atómicas (MFA). En este estadio temprano del desarrollo la cutina se muestra como una estructura altamente auto-organizada, en la que se aprecian agrupaciones con formas globulares y de diversos tamaños (Fig. I.13, B). Asimismo, pueden distinguirse en su interior zonas con poros y espacios en forma de canal (Heredia-Guerrero *et al.*, 2008), las cuales no se encuentran en las cutinas aisladas de frutos más maduros, que presentan estructuras continuas de tipo fibrilar (Benítez *et al.*, 2005).



**Figura I.13:** **A:** Imagen de MET de una nanopartícula formada por una mezcla de los ácidos 9,16-dihidroxi y 16-hidroxihexadecanoico, obtenidos tras la despolimerización selectiva de la cutina aislada del fruto de tomate. Barra: 20 nm. **B:** Imagen de MFA de la topografía de la cutina aislada del fruto de tomate (Heredia-Guerrero *et al.*, 2008).

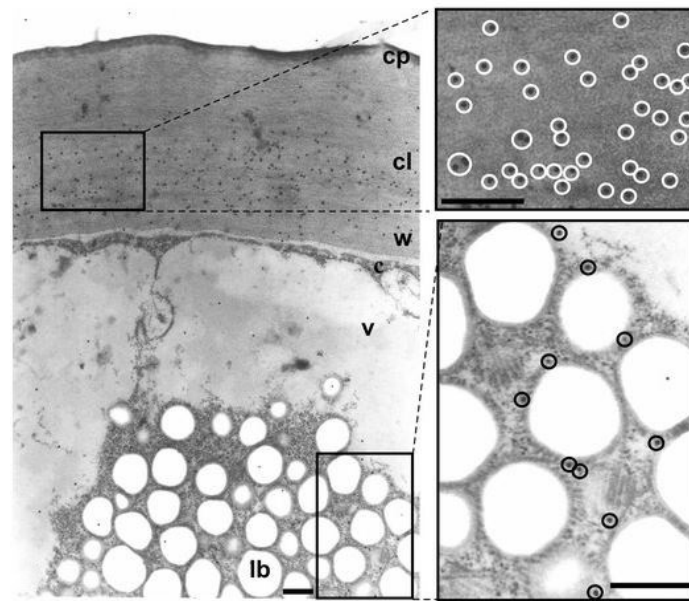
El mecanismo de polimerización propuesto en el trabajo de Heredia-Guerrero *et al.* (2008) no incluye la intervención de una proteína, lo que se traduciría en la ausencia de control génico en las últimas etapas de la síntesis de cutina. A pesar de ello, dicho mecanismo podría explicar cómo son transportados los monómeros hasta el lugar de

formación de la cutina. Los *cutinsomas* podrían constituir una vía de transporte vesicular que tendría lugar a través de la pared celular más externa de las células epidérmicas hacia la interfase célula-aire. Esta hipótesis estaría reforzada por los numerosos estudios sobre la morfología cuticular de diferentes especies vegetales realizados mediante técnicas de microscopía electrónica descritos en páginas anteriores del presente trabajo, en los cuales se pone de manifiesto la existencia de glóbulos nanoscópicos y osmiofílicos en el exterior de la pared celular durante el desarrollo de la cutícula.



**Figura I.14:** imágenes de MET correspondientes a cortes transversales del pericarpio de frutos de tomate de 5 días de desarrollo. **A:** Imagen a baja resolución donde se visualiza la procutícula, una capa externa electrodensa, ondulada y de grosor variable, y las paredes celulares de las células epidérmicas y de las capas subyacentes, que corresponden a las zonas electroclaras. El recuadro indica la localización de las imágenes de la derecha. Barra: 10  $\mu$ m. **B:** Imagen de alta resolución donde se muestra el marcaje de los *cutinsomas* en distintas zonas de la procutícula. Barra: 200 nm. **C:** Vesícula de una célula epidérmica con marcaje en su interior. Barra: 100 nm. cut: procutícula; cw: pared celular (Domínguez *et al.*, 2010).

Igualmente, se ha detectado la presencia de *cutinsomas* en la epidermis de frutos de tomate inmaduros mediante técnicas de inmunolocalización (Domínguez *et al.*, 2010) (Fig. I.14). Asimismo, se han llevado a cabo estudios similares en la epidermis de ovario de *Ornithogalum umbellatum* (Kwiatkowska *et al.*, 2014), en los que se ha sugerido la participación en la síntesis de la cutícula de los *cutinsomas* y de unas estructuras llamadas lipotubuloides. Los lipotubuloides son dominios citosólicos especiales localizados en las proximidades de la membrana plasmática de las células epidérmicas que parecen estar implicados en la síntesis lipídica y en la formación de los *cutinsomas*. La detección de estas vesículas en la parte externa de la pared celular y en la cutina naciente, así como en los lipotubuloides, en el citoplasma y cerca del plasmalema de las células epidérmicas, sugiere que los *cutinsomas* podrían formarse en los lipotubuloides y abandonarían estos dominios posteriormente para atravesar la pared celular más externa de la epidermis hasta llegar finalmente a la cutícula (Fig. I.15).



**Figura I.15:** Imagen de MET de un corte transversal de la epidermis del ovario de *Ornithogalum umbellatum* en la que se distinguen la capa cuticular y el lipotubuloide marcados con anticuerpos anti-cutinsomas. A la derecha se muestran zonas de la imagen a mayor resolución en la que se resalta con círculos el marcaje. cp, cutícula propia; cl, capa cuticular; w, pared celular; c, citoplasma; v, vacuola; lb, cuerpos lipídicos. Barra: 0.5  $\mu\text{m}$  (Kwiatkowska *et al.*, 2014).



## BIBLIOGRAFÍA

**Achyuthan KE, Achyuthan AM, Adams PD, Dirk SM, Harper JC, Simmons BA, Singh AK.** 2010. Supramolecular self-assembled chaos: polyphenolic lignin's barrier to cost-effective lignocellulosic biofuels. *Molecules* 15: 8641-8688.

**Adato A, Mandel T, Mintz-Oron S, Venger I, Levy D, Yativ M, Domínguez E, Wang Z, De Vos RCH, Jetter R, Schreiber L, Heredia A, Rogachev I, Aharoni A.** 2009. Fruit surface flavonoid accumulation in tomato is controlled by a SLMYB12-regulated transcriptional network. *PLoS Genet* 5: e1000777.

**Aloni B, Karni L, Rylski I, Cohen Y, Lee Y, Fuchs M, Moreshet S, Yao C.** 1998. Cuticular cracking in pepper fruit. I. Effects of night temperature and humidity. *Hortic Sci Biotechnol* 73(6): 743-749.

**Baker EA, Batt RF, Roberts MF, Martin JT.** 1962. Studies on plant cuticle: progress report. In: Report of the Agricultural and Horticultural Research Station. University of Bristol, Reino Unido, pp: 114-123.

**Barthélemy A.** 1868. *Ann Sci Nat Bot* 9: 287.

**Benítez JJ, Heredia-Guerrero JA, Heredia A.** 2007. Self-assembly of carboxylic acids and hydroxyl derivatives on mica. A qualitative AFM study. *J Phys Chem* 111: 9465-9470.

**Benítez JJ, Matas AJ, Heredia A.** 2005. Molecular characterization of the plant biopolyester cutin by AFM and spectroscopic techniques. *J Struct Biol* 147: 179-184.

**Bessire M, Borel S, Fabre G, Carraça L, Efremova N, Yephremov A, Cao Y, Jetter R, Jacquat AC, Métraux JP, Nawrath C.** 2011. A member of the PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE family of ATP binding cassette transporters is required for the formation of a functional cuticle in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23: 1958-1970.

**Bessire M, Chassot C, Jacquat AC, Humphry M, Borel S, Petétot JM, Métraux JP, Nawrath C.** 2007. A permeable cuticle in *Arabidopsis* leads to a strong resistance to *Botrytis cinerea*. *Embo J* 26: 2158-2168.

**Bonaventure G, Beisson F, Ohlrogge J, Pollard M.** 2004. Analysis of the aliphatic monomer composition of polyesters associated with *Arabidopsis* epidermis: occurrence of octadeca-*cis*-6, *cis*-9-diene-1,18-dioato as the major component. *Plant J* 40: 920-930.

**Boraston AB.** 2005. The interaction of carbohydrate-binding modules with insoluble non-crystalline cellulose is enthalpically driven. *Biochem J* 385: 479-484.

**Brongniart AT.** 1830. *Ann Sci nat Bot* 1<sup>st</sup>. Ser. 21: 420.

**Brongniart AT.** 1834. *Ann Sci nat Bot* 2<sup>nd</sup>. Ser. 1: 65.



**Broun P, Poindexter P, Osborne E, Jiang CZ, Riechmann JL.** 2004. WIN1, a transcriptional activator of epidermal wax accumulation in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 4706-4711.

**Bukovac MJ, Rasmussen HP, Shull VE.** 1981. The cuticle: surface structure and function. In: Johari O, ed, Scanning Electron Microscopy III. SEM International AMF O'Hare, Chicago, USA, pp: 213-223.

**Casado CG, Heredia A.** 2001. Specific heat determination of plant barrier lipophilic components: biological implications. *BBA –Biomembranes* 1511(2): 291-296.

**Chen G, Komatsuda T, Ma JF, Nawrath C, Pourkheirandish M, Tagiri A, Hu YG, Sameri M, Li X, Zhao X, Liu Y, Li C, Ma X, Wang A, Nair S, Wang N, Miyao A, Sakuma S, Yamaji N, Zheng X, Nevo E.** 2011. An ATP-binding cassette subfamily G full transporter is essential for the retention of leaf water in both wild barley and rice. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 12354-12359.

**Croteau R, Kolattukudy PE.** 1974. Biosynthesis of hydroxyfatty acid polymers. Enzymatic synthesis of cutin from monomer acids by cell-free preparations from the epidermis of *Vicia faba* leaves. *Biochemistry* 13: 3193-3202.

**Deshmukh AP, Simpson AJ, Hadad CM, Hatcher PG.** 2005. Insights into the structure of cutin and cutan from *Agave americana* leaf cuticle using HRMAS NMR spectroscopy. *Org Geochem* 36: 1072-1085.

**Domínguez E, Cuartero J, Heredia A.** 2011b. An overview on plant cuticle biomechanics. *Plant Sci* 181(2): 77–84.

**Domínguez E, España L, López-Casado G, Cuartero J, Heredia A.** 2009. Biomechanics of isolated tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit cuticles during ripening: the role of flavonoids. *Funct Plant Biol* 36: 613–620.

**Domínguez E, Heredia-Guerrero JA, Benitez JJ, Heredia A.** 2010. Self-assembly of supramolecular lipid nanoparticles in the formation of plant biopolyester cutin. *Mol Biosyst* 6: 948-950.

**Domínguez E, Heredia-Guerrero JA, Heredia A.** 2011a. The biophysical design of plant cuticles: an overview. *New Phytol* 189: 938-949.

**Domínguez E, Heredia-Guerrero JA, Heredia A.** 2015. Plant cutin genesis: unanswered questions. *Trends Plant Sci* 20: 551–558.

**Fernández V, Eichert T.** 2009. Uptake of hydrophilic solutes through plant leaves: current state of knowledge and perspectives of foliar fertilization. *CRC Crit Rev Plant Sci* 28: 36–68.

**García-Casado C, Heredia A.** 2001. Ultrastructure of the cuticle during growth of the grape berry (*Vitis vinifera*). *Physiol Plant* 111: 220-224.

**Girard AL, Mounet F, Lemaire-Chamley M, Gaillard C, Elmorjani K, Vivancos J, Runavot JL, Quemener B, Petit J, Germain V, Rothan C, Marion D, Bakan B.** 2012. Tomato GDSL1 is required for cutin deposition in the fruit cuticle. *Plant Cell* 24: 3119–3134

**Glover BJ.** 2000. Differentiation in plant epidermal cells. *J Exp Bot* 51: 497–505.

**Graça J, Schreiber L, Rodrigues J, Pereira H.** 2002. Glycerol and glyceryl esters of  $\omega$ -hydroxyacids in cutins. *Phytochemistry* 61: 205-215.

**Guzman-Puyol S, Benítez JJ, Domínguez E, Bayer IS, Cingolani R, Athanassiou A, Heredia A, Heredia-Guerrero JA.** 2015. Pectin-Lipid Self-Assembly: Influence on the Formation of Polyhydroxy Fatty Acids Nanoparticles. *PloS one* 10 (4): e0124639.

**Hamilton RJ.** 1996. Waxes: chemistry molecular biology and functions. The Oily Press, Dundee, UK.

**Heredia A, Benavente J.** 1991. A study of membrane-potential across isolated fruit cuticles for NaCl and CaCl<sub>2</sub> solutions. *Biochim Biophys Acta* 1062: 239–244.

**Heredia-Guerrero JA, Benítez JA, Heredia A.** 2008. Self-assembled polyhydroxy fatty acids vesicles: a mechanism for plant cutin synthesis. *BioEssays* 30: 273-277.

**Heredia-Guerrero JA, San-Miguel MA, Sansom MSP, Heredia A, Benítez JJ.** 2009. Chemical reactions in 2D: self-assembly and self-esterification of 9(10),16-dihydroxypalmitic acid on mica surface. *Langmuir* 25: 6869–6874.

**Holloway PJ.** 1982. Structure and histochemistry of plant cuticular membranes: an overview. In: Cutler DF, Alvin KL, Price CE, eds, *The plant cuticle*. Academic Press, London, UK, pp: 1-32.

**Hopfinger AJ, Koehler MG, Pearlstein RA.** 1988. Molecular modeling of polymers. IV. Estimation of glass transition temperatures. *J Polym Sci B Polym Phys* 26: 2007-2028.

**Hunt GM, Baker EA.** 1980. Phenolic constituents of tomato fruit cuticles. *Phytochemistry* 19(5): 1415-1419.

**Isaacson T, Kosma DK, Matas AJ, Buda GJ, He Y, Yu B, Pravitasari A, Batteas JD, Stark RE, Jenks MA, Rose JK.** 2009. Cutin deficiency in the tomato fruit cuticle consistently affects resistance to microbial infection and biomechanical properties, but not transpirational water loss. *Plant J* 60: 363-377.

**Jakobson L, Lindgren LO, Verdier G, Laanemets K, Brosché M, Beisson F, Kollist H.** 2016. Bodyguard is required for the biosynthesis of cutin in Arabidopsis. *New Phytol* 211(2): 614-626.

**Jeffree CE.** 1996. Structure and ontogeny of plant cuticles. In: Kerstiens G, ed, *Plant Cuticles: an Integrated Functional Approach*. BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford, UK, pp: 33–82.

- Jeffree CH.** 2006. The fine structure of the plant cuticle. In: Riederer M, Müller C, eds, *Biology of the plant cuticle*. Blackwell Publishing, Oxford, UK, pp: 11-125.
- Jiang Y, Morley KL, Schrag JD, Kazlauskas RJ.** 2011. Different active-site loop orientation in serine hydrolases versus acyltransferases. *ChemBioChem* 12: 768–776.
- Kang J, Jiyoung P, Choi H, Burla B, Kretzschmar T, Lee Y, Martinoia E.** 2011. Plant ABC Transporters. *Arabidopsis Book*.
- Kerstiens G.** 1996. Cuticular water permeability and its physiological significance. *J Exp Bot* 47: 1813-1832.
- Kimbara J, Yoshida M, Ito H, Kitagawa M, Takada W, Hayashi K, Shibutani Y, Kusano M, Okazaki Y, Nakabayashi R, Mori T, Saito K, Ariizumi T, Ezura H.** 2013. Inhibition of *CUTIN DEFICIENT 2* causes defects in cuticle function and structure and metabolite changes in tomato fruit. *Plant Cell Physiol* 54: 1535-1548.
- Kolattukudy PE.** 1996. Biosynthetic pathways of cutin and waxes, and their sensitivity to environmental stresses. In: Kerstiens G, ed, *Plant cuticles: an integrated functional approach*. BIOS Scientific Publishers, Oxford, UK, pp: 83-108.
- Kolattukudy PE.** 2001. Polyesters in higher plants. *Adv Biochem Eng Biot* 71:1–49.
- Kolattukudy PE.** 2002. Cutin from plants. In: Steinbüchel A, ed, *Biopolymers*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Germany, pp: 1-40.
- Kurdyukov S, Faust A, Nawrath C, Bär S, Voisin D, Efremova N, Franke R, Schreiber L, Saedler H, Mëtraux JP, Yephremov A.** 2006a. The epidermis-specific extracellular BODYGUARD controls cuticle development and morphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18: 321-339.
- Kurdyukov S, Faust A, Trenkamp S, Bär S, Franke R, Efremova N, Tietjen K, Schreiber L, Saedler H, Yephremov A.** 2006b. Genetic and biochemical evidence for involvement of *HOTHEAD* in the biosynthesis of long-chain  $\alpha$ -, $\omega$ -dicarboxylic fatty acids and formation of extracellular matrix. *Planta* 224: 315-329.
- Kwiatkowska, M, Wojtczak A, Popłońska K, Polit JT, Stepieński D, Domínguez E, Heredia A.** 2014. Cutinsomes and lipotubuloids appear to participate in cuticle formation in *Ornithogalum umbellatum* ovary epidermis: EM-immunogold research. *Protoplasma* 251: 1151-1161.
- Lendzian KJ, Kerstiens G.** 1991. Sorption and transport of gases and vapors in plant cuticles. *Rev Environ Contam Toxicol* 121: 65-128.

**Li Y, Beisson F, Koo AJK, Molina I, Pollard M, Ohlrogge J.** 2007. Identification of acyltransferases required for cutin biosynthesis and production of cutin with suberin-like monomers. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 18339-18344.

**Li Y, Beisson F.** 2009. The biosynthesis of cutin and suberin as an alternative source of enzymes for the production of bio-based chemicals and materials. *Biochimie* 91, 685-691.

**Lolle SJ, Pruitt RE.** 1999. Epidermal cell interactions: a case for local talk. *Trends Plant Sci* 4: 14-20.

**López-Casado G, Matas AJ, Domínguez E, Cuartero J, Heredia A.** 2007. Biomechanics of isolated tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit cuticles: the role of the cutin matrix and polysaccharides. *J Exp Bot* 58: 3875-3883.

**Lu C, Xin Z, Ren Z, Miquel M, Browse J.** 2009. An enzyme regulating triacylglycerol composition is encoded by the *RODI* gene of *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 18837-18842.

**Luque P, Bruque S, Heredia A.** 1995. Water permeability of isolated cuticular membranes: a structural analysis. *Arch Biochem Biophys* 317(2): 417-422.

**Luque P, Heredia A.** 1997. The glassy state in isolated cuticles: differential scanning calorimetry of tomato fruit cuticular membranes. *Plant Physiol Bioch* 35(3): 251-256.

**Marga F, Pesacreta TC, Hasenstein KH.** 2001. Biochemical analysis of elastic and rigid cuticles of *Cirsium horridulum*. *Planta* 213(6): 841-848.

**Mariani C, Wolters-Arts M.** 2000. Complex Waxes. *Plant Cell* 12: 1795-1798.

**Matas AJ, Lopez-Casado G, Cuartero J, Heredia A.** 2005. Relative humidity and temperature modify the mechanical properties of isolated tomato fruit cuticles. *Am J Bot* 92: 462-468.

**Molina I, Kosma D.** 2014. Role of HXXXD-motif/BAHD acyltransferases in the biosynthesis of extracellular lipids. *Plant Cell Rep* 10.1007/s00299-014-1721-5.

**Molina I, Ohlrogge JB, Pollard M.** 2008. Deposition and localization of lipid polyester in developing seeds of *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 53: 437-449.

**Nadakuduti SS, Pollard M, Kosma Dk, Allen C Jr, Ohlrogge JB, Barry CS.** 2012. Pleiotropic phenotypes of the *sticky peel* mutant provide new insight into the role of *CUTIN DEFICIENT2* in epidermal cell function in tomato. *Plant Physiol* 159: 945-960.

**Niklas KJ.** 1992. *Plant biomechanics*. University of Chicago Press, Chicago, Illinois, USA.

**Osthoff KS, Wiermann R.** 1987. Phenols as integrated compounds of sporopollenin from *Pinus* pollen. *J Plant Physiol* 131: 5-15.

- Panikashvili D, Shi JX, Schreiber L, Aharoni A.** 2009. The Arabidopsis *DCR* encoding a soluble BAHD acyltransferase is required for cutin polyester formation and seed hydration properties. *Plant Physiol* 151: 1773-1789.
- Petracek PD, Bukovac MJ.** 1995. Rheological properties of enzymatically isolated tomato fruit cuticle. *Plant Physiol* 109: 675-679.
- Pfündel EE, Agati G, Cerovic ZG.** 2006. Optical properties of plant surfaces. In: Riederer M, Müller C, eds, *Biology of the plant cuticle*. Blackwell Publishing, Oxford, UK, pp: 216-249.
- Pollard M, Beisson F, Li Y, Ohlrogge JB.** 2008. Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends Plant Sci* 13: 236–246.
- Rani SH, Krishna TH, Saha S, Negi AS, Rajasekharan R.** 2010. Defective in cuticular ridges (*DCR*) of *Arabidopsis thaliana*, a gene associated with surface cutin formation, encodes a soluble diacylglycerol acyltransferase. *J Biol Chem* 285: 38337-38347.
- Reina JJ, Domínguez E, Heredia A.** 2001. Water sorption-desorption in conifer cuticles: the role of lignin. *Physiol Plant* 112: 372-378.
- Riederer M, Müller C.** 2006. *Biology of the Plant Cuticle*. Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Riederer M, Schönherr J.** 1984. Accumulation and transport of (2,4-dichlorophenoxy) acetic acid in plant cuticles : I. Sorption in the cuticular membrane and its components. *Ecotoxicol Environ Saf* 8(3): 236-247.
- Riederer M, Schreiber L.** 2001. Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticles. *J Exp Bot* 52: 2023-2032.
- Sachleben JR, Chefetz B, Deshmukh A, Hatcher PG.** 2004. Solid-state NMR characterization of pyrene - cuticular matter interactions. *Environ Sci Technol* 28: 4369-4376.
- Samuels L, McFarlane HE.** 2012. Plant cell wall secretion and lipid traffic at membrane contact sites of the cell cortex. *Protoplasma* 249: 19-23.
- Schreiber L, Schönherr J.** 2009. *Water and solute permeability of plant cuticles: measurement and data analysis*. Springer Verlag, Berlin, Germany.
- Shi JX, Adato A, Alkan N, He Y, Lashbrooke J, Matas AJ, Meir S, Malistsky S, Isaacson T, Prusky D, Leshkowitz D, Schreiber L, Granell AR, Widemann E, Grausem B, Pinot F, Rose JK, Rogachev I, Rothan C, Aharoni A.** 2013. The tomato SISHINE3 transcription factor regulates fruit cuticle formation and epidermal patterning. *New Phytol* 197: 468-480.

**Spatz HC, Kohler L, Niklas KJ.** 1999. Mechanical behaviour of plant tissues: Composite materials or structures? *J Exp Biol* 202(23): 3269-3272.

**Suh MC, Samuels AL, Jetter R, Kinst L, Pollard M, Ohlrogge J, Beisson F.** 2005. Cuticular lipid composition, surface structure, and gene expression in *Arabidopsis* stem epidermis. *Plant Physiol* 139: 1649-1665.

**Villena JF, Domínguez E, Stewart D, Heredia A.** 1999. Characterization and biosynthesis of non-degradable polymers in plant cuticles. *Planta* 208: 181-187.

**Walton TJ.** 1990. Waxes, cutin and suberin. *Methods Plant Biochem* 4: 105-158.

**Weng H, Molina I, Shockey J, Browse J.** 2010. Organ fusion and defective cuticle function in a *lacs1 lacs2* double mutant of *Arabidopsis*. *Planta* 231: 1089-1100.

**Wiedemann P, Neinhuis C.** 1998. Biomechanics of isolated plant cuticles. *Bot Acta* 111(1): 28-34.

**Wilson LA, Sterling C.** 1976. Studies on the cuticle of tomato fruit. I. Fine structure of the cuticle. *Z Pflanzenphysiol* 77: 359-371.

**Xiao F, Goodwin SM, Xiao Y, Sun Z, Baker D, Tang X, Jenks MA, Zhou JM.** 2004. *Arabidopsis* *CYP86A2* represses *Pseudomonas syringae* type III genes and is required for cuticle development. *Embo J* 23: 2903-2913.

**Yang W, Pollard M, Li-Beisson Y, Beisson F, Feig M, Ohlrogge J.** 2010. A distinct type of glycerol-3-phosphate acyltransferase with sn-2 preference and phosphatase activity producing 2-monoacylglycerol. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 12040-12045.

**Yang W, Simpson JP, Li-Beisson Y, Beisson F, Feig M, Ohlrogge J.** 2012. A land-plant-specific glycerol-3-phosphate acyltransferase family in *Arabidopsis*: substrate specificity, sn-2 preference, and evolution. *Plant Physiol* 160: 638-652.

**Yeats TH, Huang W, Chatterjee S, Viart HM, Clausen MH, Stark RE, Rose JK.** 2014. Tomato Cutin Deficient (CD1) and putative orthologs comprise an ancient family of cutin synthase-like (CUS) proteins that are conserved among land plants. *Plant Journal* 77: 667-675.

**Yeats TH, Martin LB, Viart HM, Isaacson T, He Y, Zhao L, Matas AJ, Buda GJ, Domozych DS, Clausen MH, Rose JKC.** 2012. The identification of cutin synthase: formation of the plant polyester cutin. *Nat Chem Biol* 8: 609-611.

**Yeats TH, Rose JKC.** 2013. The formation and function of plant cuticles. *Plant Physiol* 163: 5-20.



# OBJETIVOS







Considerando, como se ha puesto de manifiesto en los antecedentes previamente reseñados, que la epidermis y cutícula del fruto de tomate constituyen un modelo experimental del que se dispone una notable información sobre sus características y propiedades biofísicas, su morfología y composición y sobre su importancia agronómica, la presente tesis pretende ampliar el conocimiento actual sobre dicho modelo vegetal investigando tres objetivos principales:

1. Estudiar detalladamente a nivel ultraestructural durante el desarrollo del fruto, mediante microscopía electrónica de transmisión, el proceso de formación de la cutícula a la vez que el de la pared celular más externa de las células epidérmicas.

2. En base al anterior estudio, utilizando técnicas inmunohistológicas, profundizar en la ocurrencia, características y potencial cooperatividad o sinergia de dos posibles mecanismos de la génesis de la pared celular cutinizada: a través de la participación de una proteína específica de síntesis de cutina y a partir de un proceso de autoensamblaje molecular.

3. Estudiar la variabilidad natural para diferentes características anatómicas, ópticas, ultraestructurales y de composición de la cutícula en las distintas especies silvestres de tomate que conforman la sección *Lycopersicon*.



# **CAPÍTULO 1**

## **ULTRAESTRUCTURA DE LA PARED CELULAR DE LA EPIDERMIS Y DE LA CUTÍCULA DEL FRUTO DEL TOMATE DURANTE EL DESARROLLO**



## INTRODUCCIÓN

La epidermis es el tejido que recubre todos los órganos de las plantas. Está compuesta por células unidas firmemente entre ellas a través de unas paredes celulares de mayor grosor, distribuidas en una o varias capas. Estas muestran características y propiedades físicas y químicas específicas que les confieren la resistencia necesaria tanto para mantener la integridad de la planta como para controlar su crecimiento (Kutschera y Niklas, 2007; Savaldi-Goldstein *et al.*, 2007; Javelle *et al.*, 2011). El grosor de la pared de las células epidérmicas no solo difiere con respecto a las células del resto de los tejidos internos, sino que también existe una asimetría entre las paredes celulares que conforman la epidermis (Glover, 2000). Así, la pared celular más externa, siendo esta la estructura que soporta la mayor parte de la tensión producida por el crecimiento de los tejidos internos, es considerablemente más gruesa que las paredes anticlinales y periclinales internas (Glover, 2000; Kutschera, 2008). Esta asimetría se ve reforzada a nivel químico y estructural por la deposición en la región más externa de la capa rica en lípidos que constituye la cutícula. Por ello, la cutícula puede ser considerada como una modificación de la pared celular epidérmica o bien una parte constitutiva de la misma, dado que está presente desde la embriogénesis (Javelle *et al.*, 2011). Además, debido a esta profunda asociación e interacción entre la cutícula y la pared celular, ambas presentan propiedades y funciones que son complementarias (Thompson, 2001).

Debido a su importancia económica, el fruto del tomate ha sido profundamente estudiado tanto a nivel de la cutícula como de la pared celular. Ello ha permitido recabar una gran cantidad de información relevante sobre sus propiedades biofísicas (Bargel *et al.*, 2006; Domínguez *et al.*, 2011), fisiológicas (Baker *et al.*, 1982; Domínguez *et al.*, 2008) y biomecánicas (Lunn *et al.*, 2013), así como ahondar en el conocimiento sobre los cambios fisiológicos que ocurren durante el crecimiento y la maduración del fruto (Seymour *et al.*, 2013).

Los estudios realizados hasta el momento sobre la ultraestructura de la pared celular en frutos describen cambios significativos que acontecen durante el periodo de maduración. Sin embargo, todavía no se conoce cuáles son las modificaciones que ocurren a nivel de la cutícula y de la pared celular de las células epidérmicas a lo largo del crecimiento, al igual que se desconoce con exactitud qué papel ejerce la pared celular más externa durante el

mismo (Fry, 2004; Jeffree, 2006). Todo ello infiere la importancia de investigar en detalle la distribución de los distintos componentes de ambas, cutícula y pared celular, y las posibles interacciones que puedan tener lugar entre ellas durante el desarrollo.

A pesar del importante papel que juegan tanto la epidermis como la cutícula en el crecimiento de las plantas y en la interacción de estos organismos con el medio ambiente, los estudios enfocados en los cambios estructurales que se producen en ellas durante su desarrollo son muy escasos. El presente capítulo tiene como objetivo principal estudiar detalladamente la génesis y el desarrollo de la cutícula del fruto de tomate. En este sentido, dicho objetivo de esta investigación puede ser considerado doble: describir los cambios ultraestructurales que se producen a nivel de la cutícula y de la pared de las células epidérmicas durante del desarrollo del fruto de tomate y correlacionar la información ya existente sobre la composición química y las características biofísicas de ambas estructuras supramoleculares.



## MATERIAL Y MÉTODOS

### Instalaciones

Tanto los ensayos de campo como los muestreos se realizaron en las instalaciones de la Estación Experimental “La Mayora”, perteneciente al Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea (IHSM), situado en el término municipal de Algarrobo (Málaga), al sudeste de España. El invernadero donde se llevaron a cabo los ensayos es de tipo multitúnel y presenta unas dimensiones de 60 m de largo por 24 m de ancho, las cuales permiten ejercer un mayor control sobre los factores ambientales. Está dotado con una cámara de entrada provista de una doble puerta, así como de un ventilador para crear una sobrepresión que impulse el aire hacia la calle con objeto de evitar en la medida de lo posible el contacto del material vegetal con cualquier tipo de plagas. Asimismo, posee una apertura cenital y ventanas laterales a lo largo de las dos bandas longitudinales protegidas por mallas anti-trips de 10 x 16 hilos cm<sup>2</sup>, y una cubierta de polietileno de larga duración con un espesor de 200 µm (Fig. 1.1).



**Figura 1.1:** Invernadero tipo multitúnel de la Estación Experimental “La Mayora” donde se llevaron a cabo los ensayos de campo.

### Material vegetal

El material vegetal seleccionado para llevar a cabo los diferentes ensayos del presente capítulo es *Solanum lycopersicum* L. Cascada, un híbrido de porte indeterminado con planta de entrenudos medios y follaje oscuro. Produce ramilletes divididos en racimos



simples donde los frutos están organizados a ambos lados del raquis. Estos frutos son redondos, muy ligeramente aplastados, con hombros de color verde suave que desaparecen en la madurez, quedando de color uniforme rojo brillante. Los frutos son de sabor dulce, muy jugosos y muy tolerantes al agrietado tanto en condiciones de otoño-invierno como de primavera-verano. Su dureza permite una recolección en estado óptimo de madurez, tanto en frutos sueltos como en ramilletes. El cáliz es de tamaño medio y permanece verde, al igual que el raquis del ramillete, después de alcanzar la maduración. Este híbrido está orientado a la recolección en frutos sueltos aunque a veces se dedique también a la recolección por racimos.

### **Siembra y transplante**

En primer lugar, las semillas de Cascada fueron sometidas a un tratamiento con una solución de hipoclorito sódico al 2-5% (p/v) durante media hora, tras la cual recibieron 3 lavados con agua destilada. Posteriormente, dichas semillas se dispusieron en placas de Petri con papel de filtro humedecido y se almacenaron en oscuridad a una temperatura de 25°C. Una vez germinadas, se sembraron en bandejas de polietileno de 54 alvéolos rellenas con una mezcla de sustrato hortícola y fibra de coco, al cual se le aportó vermiculita para mejorar la aireación del sustrato. Las bandejas se mantuvieron en un invernadero de vidrio, en el cual se regaron cada dos días hasta el momento del trasplante el cual tuvo lugar cuando las plantas tuvieron 3 hojas verdaderas. El marco de plantación fue de 0.5 m entre plantas y 1.5 m entre filas. Se cultivaron 30 plantas dispuestas en 3 bloques de 10 plantas cada uno. Las plantas se podaron a 2 tallos y se entutoraron con una rafia atada a la base del tallo, enrollada a lo largo del mismo y sujeta por arriba a líneas de alambre. Este alambre se sujetó a la estructura del invernadero a una altura de 2 m. Para favorecer el cuajado del fruto las flores se vibraron 2 veces por semana. Las plantas se abonaron una vez por semana con la solución propuesta por Cánovas (1995) para el cultivo del tomate.

### **Recolección de muestras**

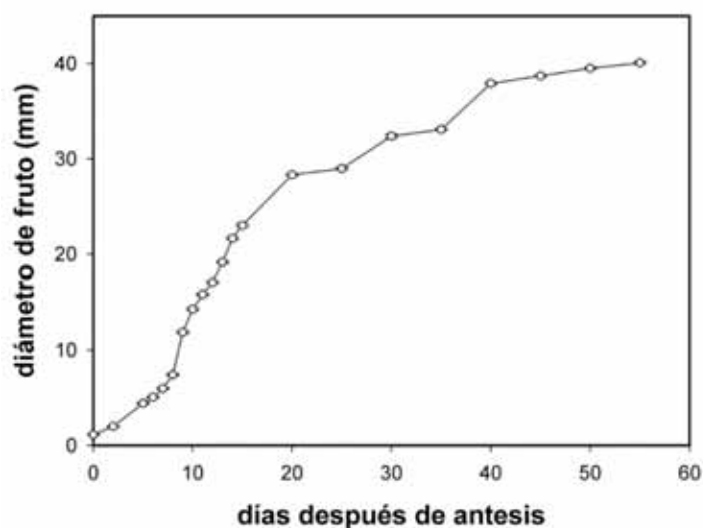
Los ensayos descritos en el presente capítulo fueron realizados durante el año 2012 en la campaña de primavera-verano. En concreto, el periodo de cosecha se extendió desde principios de mayo hasta mediados de julio. Se procedió al marcaje de un gran número de flores y se llevó a cabo una recolección pormenorizada de frutos procedentes de diferentes

plantas. Dichos frutos se encontraban en estadios concretos del desarrollo en el momento de su recolección, que abarcaban desde la formación del ovario hasta los 55 días después de la antesis (dda), momento en el que ocurre la maduración de los mismos (Fig. 1.2).



**Figura 1.2:** Fotografía de frutos de Cascada en los diferentes estadios de desarrollo estudiados en este trabajo. Los números indican los días transcurridos desde la antesis. El 0 hace referencia al momento en el que tiene lugar la antesis. Barra: 1 cm.

De forma paralela a la recolección de los frutos se realizó un seguimiento de su diámetro con la ayuda de un calibrador. Así, se reunieron las medidas de un mínimo de 100 frutos correspondientes a cada estadio de desarrollo, las cuales han sido reflejadas en la Figura 1.3.



**Figura 1.3:** Diámetro (mm) de los frutos Cascada durante el desarrollo. Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar.

## **Fijación de las muestras**

Se obtuvieron pequeños fragmentos de pericarpio procedentes de la zona ecuatorial de frutos de cada uno de los estadios de desarrollo mencionados con anterioridad para su inmediata fijación por inmersión. Aquellas muestras que iban a ser posteriormente analizadas por microscopía electrónica de barrido fueron sumergidas en glutaraldehído al 2.5% en PBS pH 7.2 durante 24 h a 4°C. Las muestras destinadas a ser estudiadas mediante microscopía electrónica de transmisión fueron tratadas con paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0.1 M pH 7.4 durante 24 h a 4°C y postfijadas con tetraóxido de osmio (OsO<sub>4</sub>) al 1% en agua destilada durante 1 h.

## **Inclusión de las muestras en resina LR White**

Una vez fijados, los fragmentos de pericarpio fueron embebidos en resina LR White siguiendo los pasos descritos a continuación:

- **Deshidratación:** tras lavar las muestras en tampón y posteriormente en agua, estas fueron deshidratadas mediante su sumersión en diluciones seriadas de etanol al 50% (15 min), 70% (15 min), 90% (10 min) y 100% (10 min).
- **Preinfiltración:** para favorecer el contacto entre la muestra y la resina se realizó un paso previo a la infiltración consistente en someter a los tejidos a una mezcla de resina y etanol 100% en una proporción 1:1 durante 24 h.
- **Infiltración:** la inclusión en la resina comprendió dos pasos, el primero de 2 h y el segundo de 1 h. Las muestras se mantuvieron en un rotor durante ese tiempo a fin de favorecer su infiltración en los tejidos
- **Polimerización:** los fragmentos fueron traspasados al interior de cápsulas BEEM<sup>®</sup>, cubiertos con resina y almacenados a 65°C durante 48 h.

Una vez que las muestras fueron incluidas se realizaron cortes ultrafinos transversales de un grosor aproximado de 50 nm con un ultramicrotomo Reichert-Jung modelo Ultracut-E (Reichert Technologies, Viena, Austria) mediante el empleo de cuchillas de vidrio. Los cortes obtenidos fueron recogidos y almacenados en rejillas de níquel para su posterior análisis.

## Microscopía electrónica de transmisión (MET)

La observación y el análisis de los cortes ultrafinos se efectuaron a través de un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1400 (Akishima, Tokio, Japón) acoplado a un captador de imágenes de 11 megapíxeles. El software usado para la captura de las imágenes fue Digital Micrograph™ (Gatan).

## Determinación del grosor de la cutícula y de la pared celular

Las medidas del grosor de la cutícula y de la pared celular fueron obtenidas mediante el procesamiento de imágenes de MET a través de un programa de captura y análisis de imagen (Visilog v. 6.3; Noesis, Crolles, Francia). Para cada estadio de desarrollo se analizaron un total de 30 imágenes. Dichas medidas fueron tomadas en la región central comprendida entre dos invaginaciones cuticulares, ya que esta zona es la menos variable. Los datos se expresaron como la media  $\pm$  error estándar.

## Técnicas inmunohistoquímicas

Parte de los cortes ultrafinos de pericarpo fueron destinados al estudio de la estructura de la pared celular mediante técnicas de inmunomarcaje.

Por un lado, los cortes fueron tratados previamente con peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) al 10% durante 15 min con objeto de eliminar el  $OsO_4$ , ya que este podría provocar que los anticuerpos utilizados en estas técnicas no reconocieran a su antígeno correspondiente. Pasado ese tiempo, se realizaron lavados de 10 min con agua destilada y con tampón fosfato salino (PBS) 0.01M pH 7.4 (Kwiatkowska *et al.*, 2013).

Para analizar la ultralocalización de las pectinas se emplearon dos anticuerpos diferentes que se caracterizan por su capacidad para unirse de forma específica al homogalacturonano: el LM19, que se une a sus dominios no esterificados, y el LM20, que reconoce aquellos dominios metil-esterificados ([www.plantprobes.net](http://www.plantprobes.net)). En ambos casos el protocolo a seguir fue similar. Tras los lavados con tampón se realizó un bloqueo de los sitios de unión inespecíficos de los anticuerpos al tejido. Para ello, las muestras se pusieron en contacto con pequeñas gotas de BSA (Albúmina de suero bovino, del inglés *Bovine serum albumin*) al 3% en PBS durante 1 h. Pasado ese tiempo, los cortes se incubaron en

una dilución 1:10 de LM19 o de LM20 en tampón PBS durante 1.5 h., o únicamente en PBS durante ese tiempo para la realización de los controles negativos. Tras una serie de tres lavados en tampón PBS, las rejillas se incubaron en una dilución 1:50 con anticuerpos anti-IgG de rata generados en cabra que llevaban acopladas partículas de oro coloidal de 15 nm de diámetro (Aurion, Wageningen, The Netherlands). Trascorrida 1 h, los cortes se lavaron nuevamente con PBS y con agua y se tiñeron con una solución de acetato de uranilo al 4% durante 15 min. Finalmente, las muestras volvieron a lavarse cuidadosamente con agua destilada. Todos estos pasos se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

En el caso de la celulosa el anticuerpo empleado fue CBM3a ([www.plantprobes.net](http://www.plantprobes.net)) que se une de forma específica a celulosa cristalina (Blake *et al.* 2006). Tras el paso de incubación con BSA descrito anteriormente, las muestras se incubaron en una dilución 1:100 de este anticuerpo en tampón PBS con 0.1% de BSA durante 1 h. Posteriormente, se utilizó una dilución 1:100 de un anticuerpo monoclonal anti-His de ratón desarrollado en cabra (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en PBS durante 1.5 h. Igualmente, se realizaron controles negativos con tampón PBS sin anticuerpo primario. Tras tres lavados con PBS se realizó la incubación con una dilución 1:50 de anticuerpos anti-IgG de ratón generados en cabra con partículas de oro coloidal de 15 nm (Aurion, Wageningen, The Netherlands). Para la tinción de los cortes se llevaron a cabo los mismos pasos descritos anteriormente.

La densidad de marcaje, expresada como número de partículas de oro por unidad de área ( $\mu\text{m}^2$ ), fue estimada mediante el empleo de un programa de captura y análisis de imagen (Visilog v. 6.3; Noesis, Crolles, Francia). Para cada estadio de desarrollo se analizaron un total de 30 imágenes de MET correspondientes a 3 réplicas biológicas. Los datos se expresaron como la media  $\pm$  error estándar.

### **Microscopía electrónica de barrido (MEB)**

Primeramente, el material ya fijado se deshidrató mediante su sumersión en una serie de diluciones de etanol al 50%, 70%, 80%, 90% (2 pases de 30 min en cada una de las diluciones) y 100% (2 pases de 1 h). Una vez deshidratadas, las muestras se sometieron a secado por punto crítico y por último se recubrieron con una capa de oro coloidal que proporciona propiedades conductoras a los tejidos. Finalmente, la superficie de los frutos

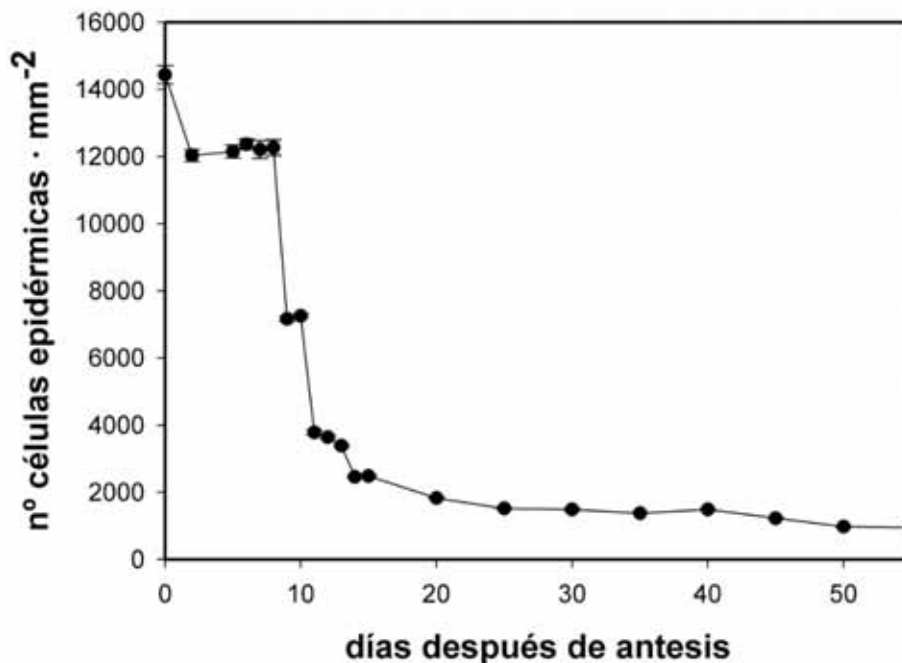
fue examinada con un microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-840, Japón) acoplado a un sistema de adquisición digital de imágenes.

### **Densidad de células epidérmicas**

A partir de las imágenes obtenidas con el microscopio electrónico de barrido se realizaron conteos del número de células epidérmicas de los frutos por unidad de superficie ( $\text{mm}^2$ ). En concreto, por cada muestra biológica se tomaron 5 imágenes de distintos campos microscópicos, proceso que se repitió para cada una de las 3 réplicas biológicas procedentes de plantas diferentes. El análisis de las fotografías obtenidas fue realizado con el programa ImageJ (National Institutes of Health, Maryland, USA).

## RESULTADOS

El análisis del conjunto de imágenes tomadas mediante SEM permitió registrar los cambios en el número de células epidérmicas por unidad de superficie que tienen lugar durante el crecimiento del fruto. De esta manera, se ha podido determinar en qué estadios del desarrollo acontecen las dos fases de crecimiento que pueden distinguirse en cualquier órgano vegetal: la división y la expansión celular. Los resultados obtenidos mostraron que, en el caso del fruto del tomate Cascada, la etapa de división celular se corresponde de forma aproximada con los primeros 10 dda. Así pues, la expansión celular ocurre a partir de los 11 dda. Además, se pudo constatar que el número de células por unidad de superficie no se mantiene constante durante el periodo de división celular. Una vez que el fruto se establece, la densidad celular disminuye a los 2 dda y permanece estable hasta los 8 dda. Cuando alcanza los 9 dda se produce una caída significativa en los valores de este parámetro, suceso que vuelve a tener lugar a los 11 dda. A partir de ese momento decrece lentamente hasta alcanzar un mínimo al finalizar el desarrollo del fruto, en el estadio de rojo maduro. También cabe destacar la existencia de un periodo de transición entre los 9 y 10 dda en el cual se producen de forma combinada las fases de división y expansión celular (Fig. 1.4).



**Figura 1.4:** Número de células epidérmicas por unidad de superficie ( $\text{mm}^2$ ) durante el crecimiento del fruto de Cascada. Los datos están expresados como la media  $\pm$  error estándar.

## Ultraestructura de la epidermis durante el periodo de división celular

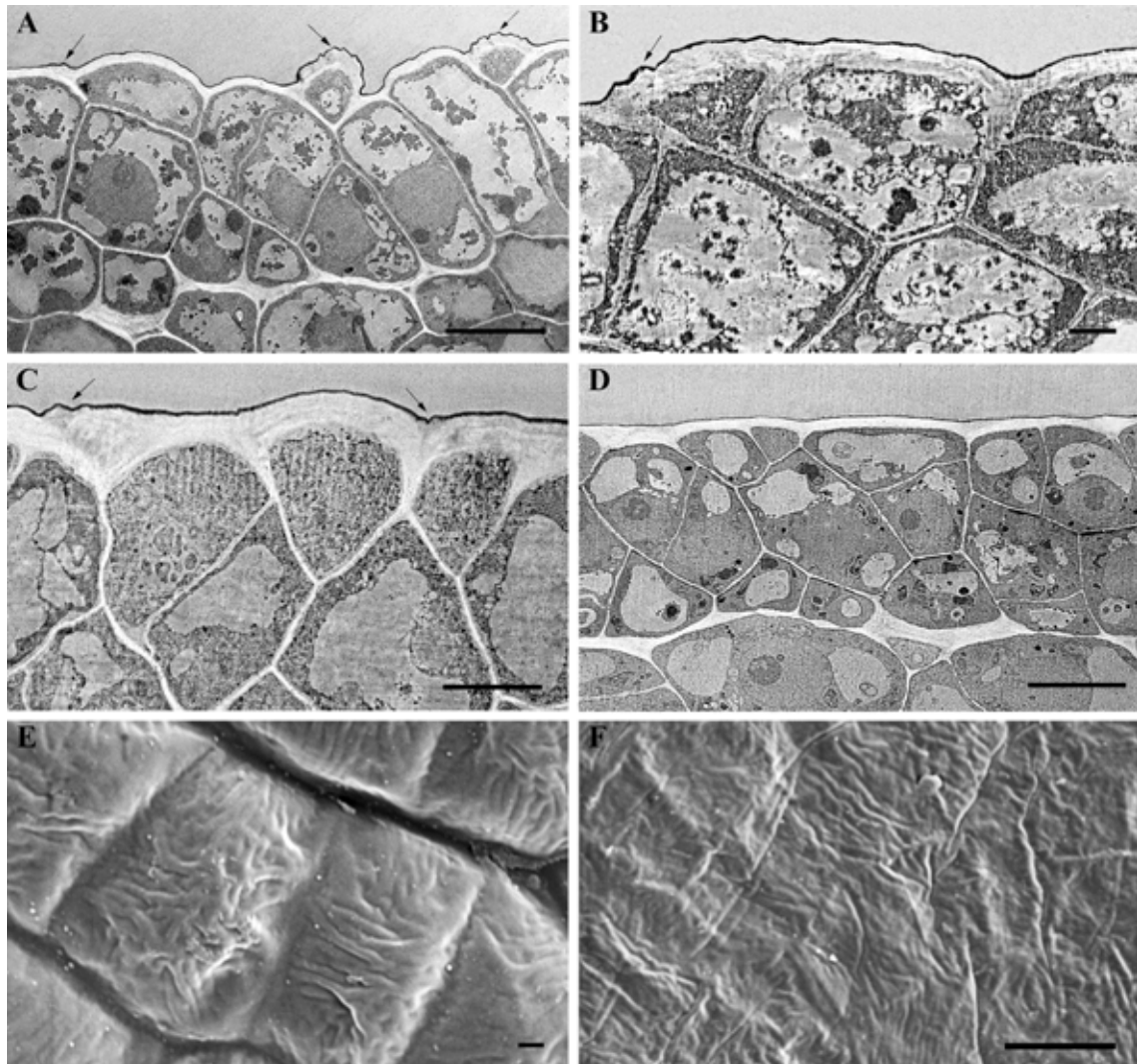
En este apartado se recogen los resultados obtenidos acerca de la ultraestructura de la epidermis durante el periodo de división celular. Mediante el estudio de las imágenes de MET tomadas de forma minuciosa a lo largo del desarrollo del fruto ha sido posible establecer cuáles son las modificaciones morfológicas y estructurales que tienen lugar en el tejido epidérmico durante los diferentes estadios de crecimiento.

La Figura 1.5 muestra imágenes de microscopía electrónica de la epidermis de frutos en estadios comprendidos entre los 6 primeros días de desarrollo. Durante la antesis es posible observar células de diversos tamaños y con perfiles irregulares. Dicho de otro modo, en el ovario las células de la epidermis se mantienen indiferenciadas. Además, no están distribuidas en un mismo plano, sino que algunas de ellas sobresalen por encima de la superficie del fruto. Sin embargo, la pared celular más externa ya presenta un grosor mayor que el de las paredes radiales o internas a pesar de que las células protodermales todavía no se han diferenciado como células epidérmicas (Fig. 1.5, A). A los 2 dda la superficie del fruto comienza a aplanarse y se inicia la diferenciación del tejido parenquimático, aunque las 2-3 capas celulares más externas continúan desorganizadas e indiferenciadas, pudiendo observarse en ellas diferentes tamaños y morfologías: cúbicas, triangulares o esféricas. (Figs. 1.5, B y 1.6). Estas características continúan manifestándose hasta los 6 dda (Fig. 1.5, C y D).

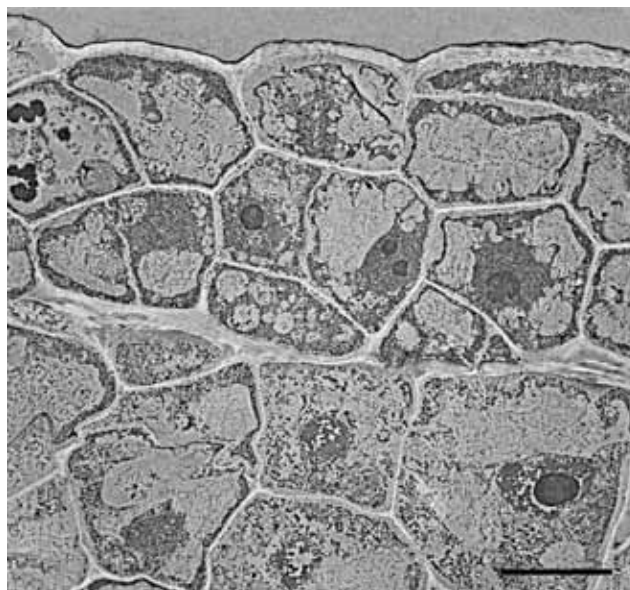
Desde el instante en el que se ha formado el fruto ya es posible observar una capa electrodensa y muy fina que descansa sobre las paredes celulares más externas de las células protodermales: la cutícula. En ese momento también hacen su aparición las llamadas crestas cuticulares, que pueden detectarse tanto en la superficie de los frutos como en cortes transversales del pericarpo (ver flechas en la Fig. 1.5, A-C). Estas no se deben a un incremento local del material cuticular sino que son una manifestación de irregularidades de la pared celular más externa, ya que el grosor de la cutícula no se ve alterado en dichas áreas. Durante la antesis se distribuyen a lo largo de toda la superficie externa (Fig. 1.5, A) mientras que en periodos posteriores se localizan únicamente en regiones cercanas a las paredes anticlinales (ver flechas en Fig. 1.5, B y C). Cuando el fruto alcanza los 5-6 dda (Fig. 1.5, C y D) las arrugas comienzan a ser cada vez menos numerosas hasta que la superficie de la pared celular más externa queda completamente



lisa una vez sobrepasado el estadio de 6 dda. Además, tal y como se puede advertir en las imágenes de MEB (Fig. 1.5, E y F), estos pliegues no presentan una orientación determinada sino que se distribuyen aleatoriamente. En ellas también se pone de manifiesto el aplanamiento de la superficie durante este intervalo de tiempo; durante la antesis las células epidérmicas muestran una curvatura evidente, mientras que a los 5 dda esta peculiaridad desaparece y solo se observan las arrugas ya mencionadas.

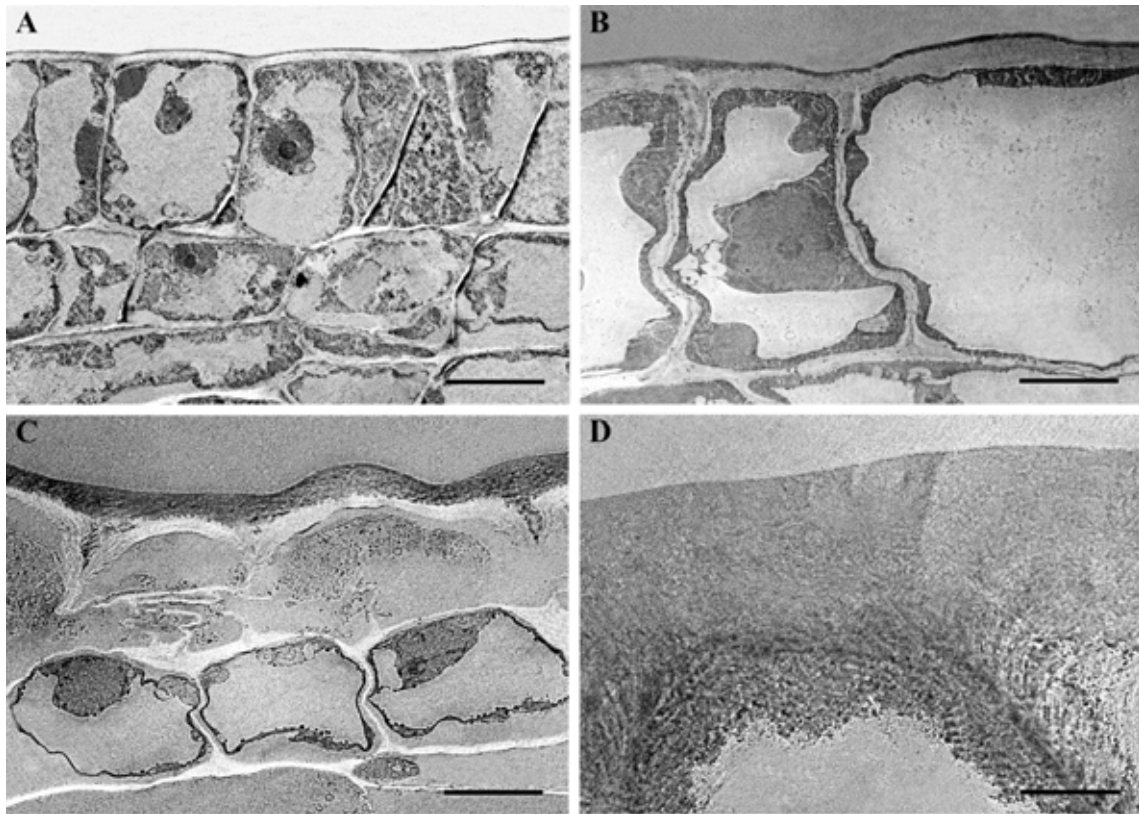


**Figura 1.5:** Imágenes de microscopía electrónica de la epidermis de frutos de tomate Cascada durante los 6 primeros días de crecimiento. A-D: MET; E y F: MEB. **A:** Ovario, barra: 10  $\mu\text{m}$ . **B:** 2 dda, barra: 2  $\mu\text{m}$ . **C:** 5 dda, barra: 5  $\mu\text{m}$ . **D:** 6 dda, barra: 10  $\mu\text{m}$ . **E:** ovario, barra: 1  $\mu\text{m}$ , 10kV. **F:** 5 dda, barra: 8  $\mu\text{m}$ , 10kV. Las flechas indican la presencia de pliegues.



**Figura 1.6:** Imagen de MET correspondiente al pericarpo de un fruto de Cascada de 2 dda. Barra: 10  $\mu\text{m}$ .

La diferenciación de la epidermis y la hipodermis sucede conjuntamente durante un periodo de tiempo muy concreto, entre los 7 y 8 dda. Asimismo, las células incrementan de forma notable su tamaño en estos estadios con respecto a las que están presentes en los estadios iniciales (Fig. 1.7, A). A nivel de la cutícula, los cambios más significativos comienzan a partir de los 8 dda. Durante el transcurso de tan solo dos días (9 y 10 dda) se produce un dramático incremento de la deposición de material cuticular, lo que se traduce en un considerable engrosamiento de esta capa (Fig. 1.7, B y C). Este acúmulo de material cuticular no se produce únicamente sobre la pared celular más externa de las células epidérmicas, sino que durante estos estadios se inicia además la impregnación cuticular de las paredes celulares radiales, dando lugar a las denominadas invaginaciones (Fig. 1.7, C). Este destacado aumento de la cantidad de material cuticular observado a los 10 dda también es tangible en los días posteriores, de tal modo que en tan solo 5 días (a los 15 dda) la cutícula ya ha doblado su grosor (Fig. 1.7, D).

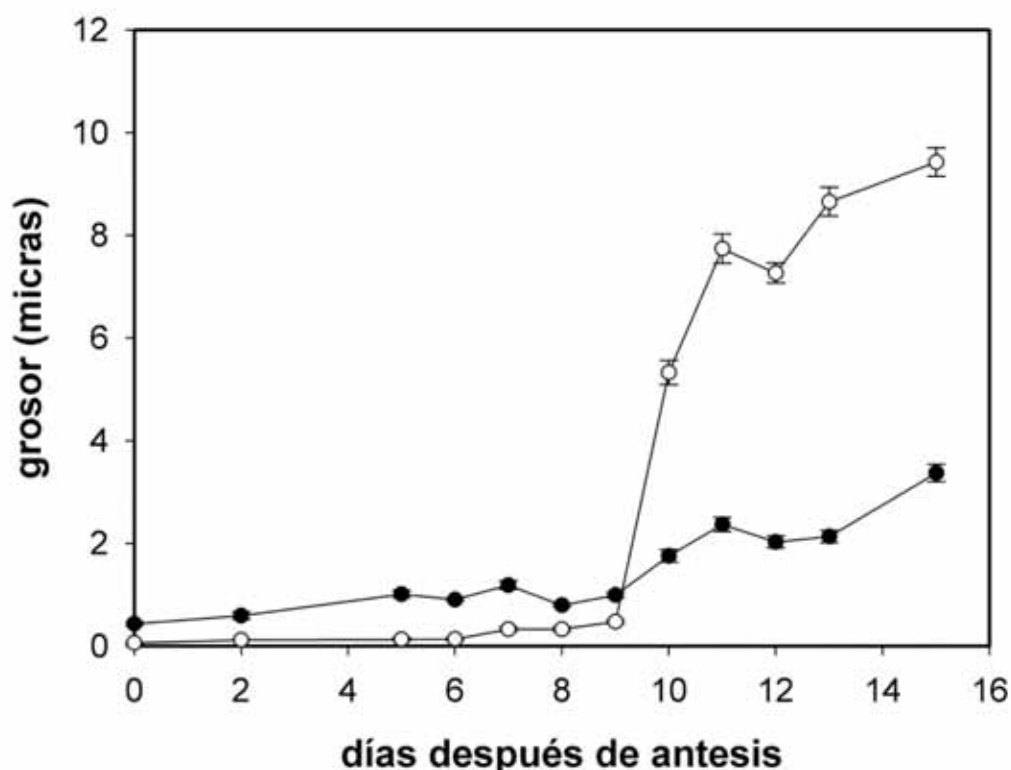


**Figura 1.7:** Imágenes de MET de cortes transversales del pericarpio de frutos de Cascada. **A:** 8 dda, barra: 10  $\mu\text{m}$ . **B:** 9 dda, barra: 5  $\mu\text{m}$ . **C:** 10 dda, barra: 10  $\mu\text{m}$ . **D:** 15 dda, barra: 5  $\mu\text{m}$ .

En la Figura 1.8 se representan los valores medios de grosor tanto de la cutícula (definiéndose esta como una pared celular cutinizada), como de la pared celular más externa que presenta el fruto de tomate Cascada durante los estadios iniciales del desarrollo, desde la antesis hasta los primeros 15 días. Por un lado, el grosor de la cutícula aumenta de forma paulatina durante los 9 días iniciales, siendo este de 60 nm en el momento de la antesis y llegando a los 480 nm a los 9 dda. La repentina intensificación de la deposición del material cuticular que ocurre desde los 9 a los 10 dda anteriormente mencionada provoca un cambio de escala nanométrica a micrométrica; concretamente, a los 10 dda el grosor de la cutícula alcanza las 5.3  $\mu\text{m}$ . Esta tendencia de la cutícula a incrementar su espesor prosigue hasta alcanzar un valor medio de 9.4  $\mu\text{m}$  a los 15 dda. Con respecto a la pared celular subyacente, esta refleja un patrón similar al descrito en el caso de la cutícula: un leve incremento del grosor en el periodo abarcado entre la antesis y los 9 dda, seguido de un notable aumento en los estadios posteriores, entre los 10 y 15 dda. Es interesante remarcar que el grosor de la pared celular más externa es significativamente más elevado que el de la cutícula en el transcurso de los primeros 9 días de crecimiento, llegando a ser hasta 7 veces mayor en el periodo comprendido desde la antesis hasta los 6



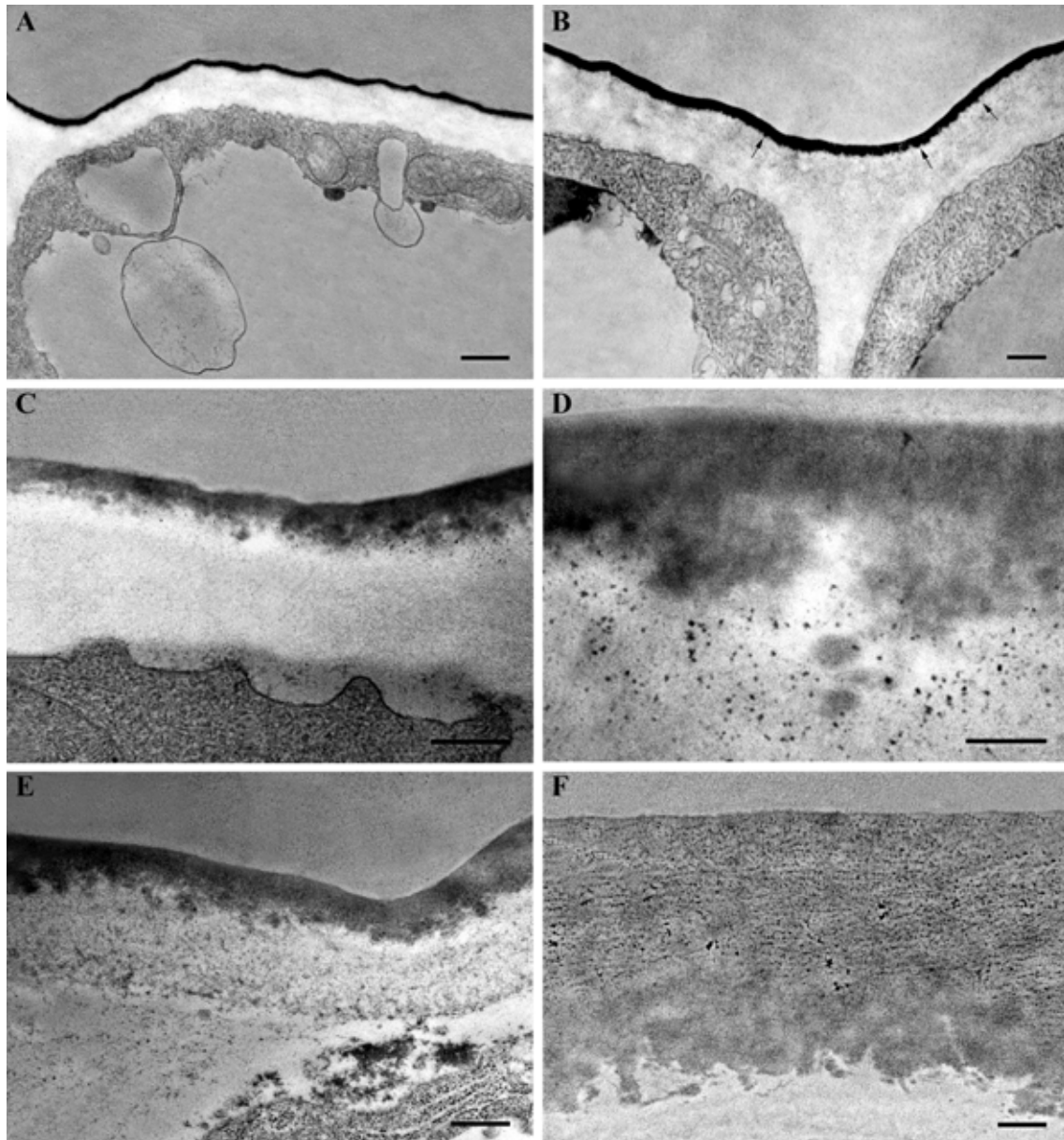
dda, mientras que a partir de los 10 dda esta tendencia se revierte y es la cutícula la estructura que presenta un mayor espesor.



**Figura 1.8:** Evolución del grosor de la cutícula y la pared celular más externa durante los estadios iniciales del crecimiento de los frutos Cascada. Los círculos blancos corresponden al grosor de la cutícula y los círculos negros al de la pared. Los datos están expresados como la media  $\pm$  error estándar.

En la Figura 1.9 se recopilan otras imágenes de mayor resolución de la cutícula tomadas mediante MET a lo largo del periodo de división celular. Como se ha comentado anteriormente, la cutícula ya está presente en el momento de la antesis, manifestándose como una capa muy delgada de carácter electrodenso que se distribuye uniformemente a lo largo de la superficie del fruto (Fig. 1.9, A). A los 2 dda ya es posible apreciar una morfología globular en la cara interna de esta capa (ver flechas en la Fig. 1.9, B) aunque en su conjunto todavía conserva una apariencia homogénea en lo relativo a su electrodensidad. Conforme prosigue el desarrollo del fruto, la naturaleza globular del lado interno de la cutícula se torna aún más evidente debido a la entrada en escena de unas partículas nanoscópicas, polidispersas e igualmente electrodensas. Estas pequeñas gotas se asemejan a vesículas, y se distribuyen arbitrariamente en la región de la pared celular más externa que se encuentra en contacto con la cutícula. Como consecuencia, la cutícula pierde en gran medida su homogeneidad durante el periodo comprendido entre los 5 y los 9 dda (Fig.1.9, C-E). Una vez que el fruto alcanza el estadio de 10 dda es posible discernir

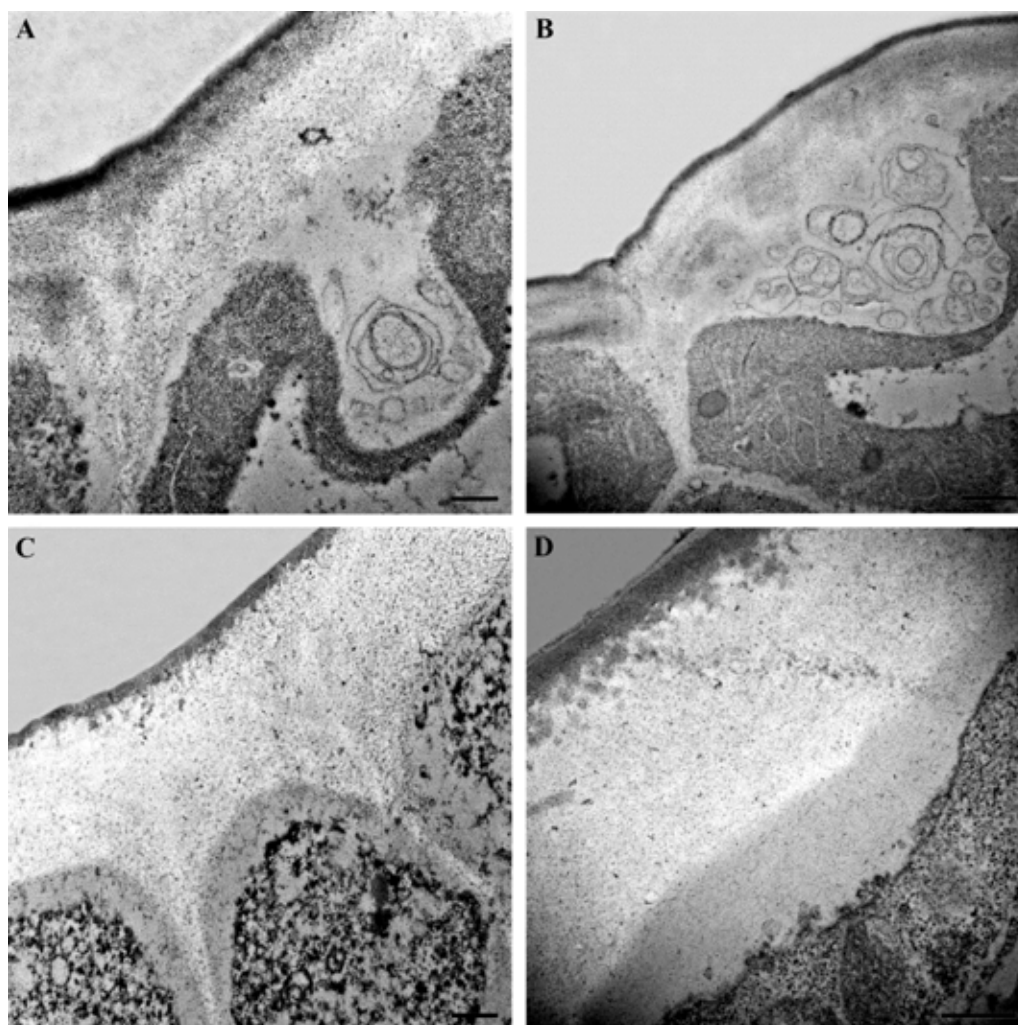
dos regiones a lo largo del espesor de la cutícula: la parte media-alta tiene un aspecto reticular, mientras que la zona más interna todavía mantiene un aspecto globular (Fig. 1.9, F).



**Figura 1.9:** Imágenes a alta magnificación de la epidermis de los frutos Cascada durante el periodo de división celular. **A:** Ovario, barra: 500 nm. **B:** 2 dda, barra: 200 nm. **C:** 7 dda, barra: 500 nm. **D:** 7 dda, barra: 200 nm. **E:** 9 dda, barra: 500 nm; **F:** 10 dda, barra: 500 nm. Las flechas señalan la localización de estructuras globulares.

Este cambio en la morfología fina de la cutícula podría ser consecuencia de ciertas peculiaridades que han sido observadas tanto en la propia cutícula como en la fracción no cutinizada de la pared celular más externa. Estas son más abundantes entre los 7 y los 9 dda, pero aparecen durante todo el periodo de división celular. En la Figura 1.10 se

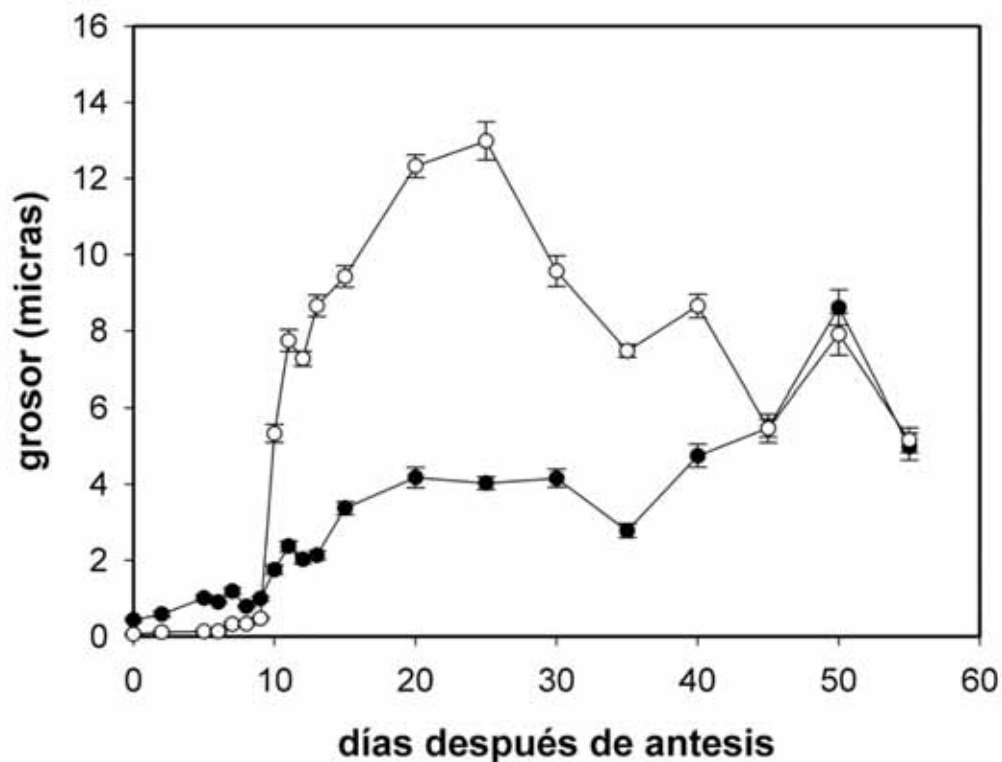
recogen imágenes de MET de la epidermis de frutos de Cascada donde se distinguen esas singularidades. En estos estadios se ha detectado la existencia de dominios citoplasmáticos que se encuentran en estrecho contacto con la pared celular más externa. Asimismo, se ha comprobado que la membrana plasmática adquiere un perfil muy ondulado y desorganizado en aquellas regiones donde se localizan estos dominios. En ellos, además, es posible detectar dichas estructuras globulares de naturaleza electrodensa y de tamaño variable mencionadas anteriormente, muchas de las cuales se localizan en la zona más externa de la pared celular, muy próximas a la cara interna de la cutícula (Fig. 1.10, C y D). A las mencionadas estructuras vesiculares se suma la presencia de un conjunto de sistemas membranosos que parecen contener material de naturaleza fibrilar o granular en su interior (Fig. 1.10, A y B).



**Figura 1.10:** Imágenes de MET de cortes transversales de la epidermis de frutos Cascada en estadios iniciales del desarrollo en las que se muestra la presencia de estructuras globulares electrodensas y de sistemas membranosos de contenido granular o fibrilar. **A y B:** 7 dda, barra: 0.5  $\mu\text{m}$ . **C:** 8 dda, barra: 1  $\mu\text{m}$ . **D:** 9 dda, barra: 0.5  $\mu\text{m}$ .

### Ultraestructura de la epidermis durante la expansión celular

Tras la fase de división celular tiene lugar el periodo de expansión celular, durante el cual tanto la cutícula como la pared celular más externa sufren menores modificaciones. Entre dichos cambios se encuentra por una parte el aumento del grosor cuticular que llega a alcanzar un máximo en torno a los 25 dda. Una vez alcanzado ese valor, la tendencia revierte y se produce una disminución del espesor durante los últimos días del desarrollo y la maduración del fruto (Fig. 1.11). En cuanto al grosor de la pared celular más externa, no se observaron cambios significativos en los estadios comprendidos entre los 15 y los 40 dda. Sin embargo, y al igual que ocurre con el grosor cuticular, aumenta en los estadios finales del desarrollo y en la maduración, aunque en este último periodo el incremento es menos acusado. Cabe destacar que ambas estructuras alcanzan valores similares alrededor de los 45 dda, circunstancia que persiste hasta el final de la maduración. Por último, en ambos casos se observó un crecimiento transitorio a los 50 dda (Fig. 1.11).

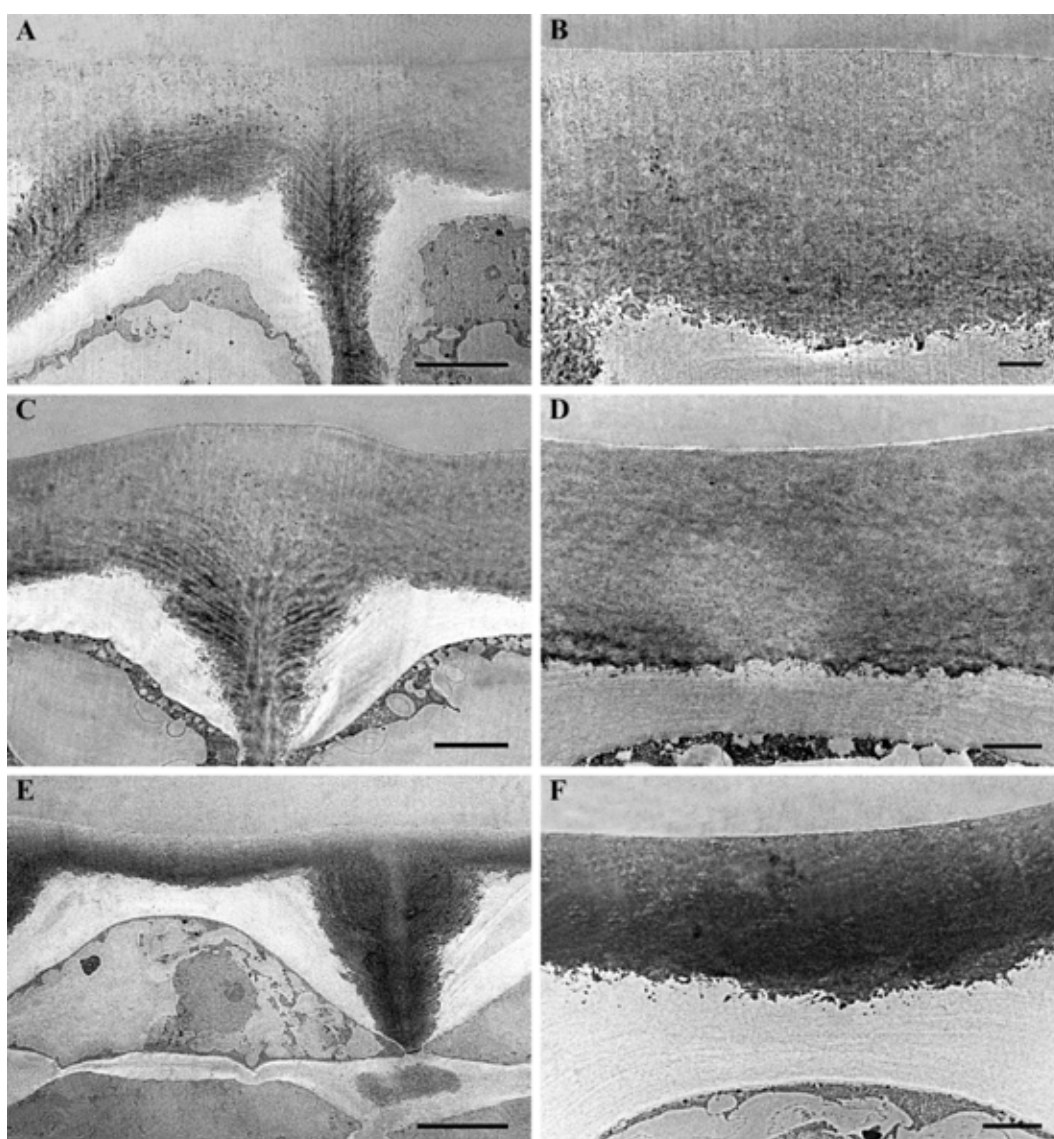


**Figura 1.11:** Cambios en el grosor de la cutícula y la pared celular más externa a lo largo del crecimiento y la maduración del fruto de Cascada. Los círculos blancos corresponden a la cutícula y los círculos negros a la pared. Los datos están expresados como la media  $\pm$  error estándar.

La Figura 1.12 muestra imágenes de MET de cortes transversales de la epidermis de frutos correspondientes a estadios de crecimiento más avanzados. Una de las características



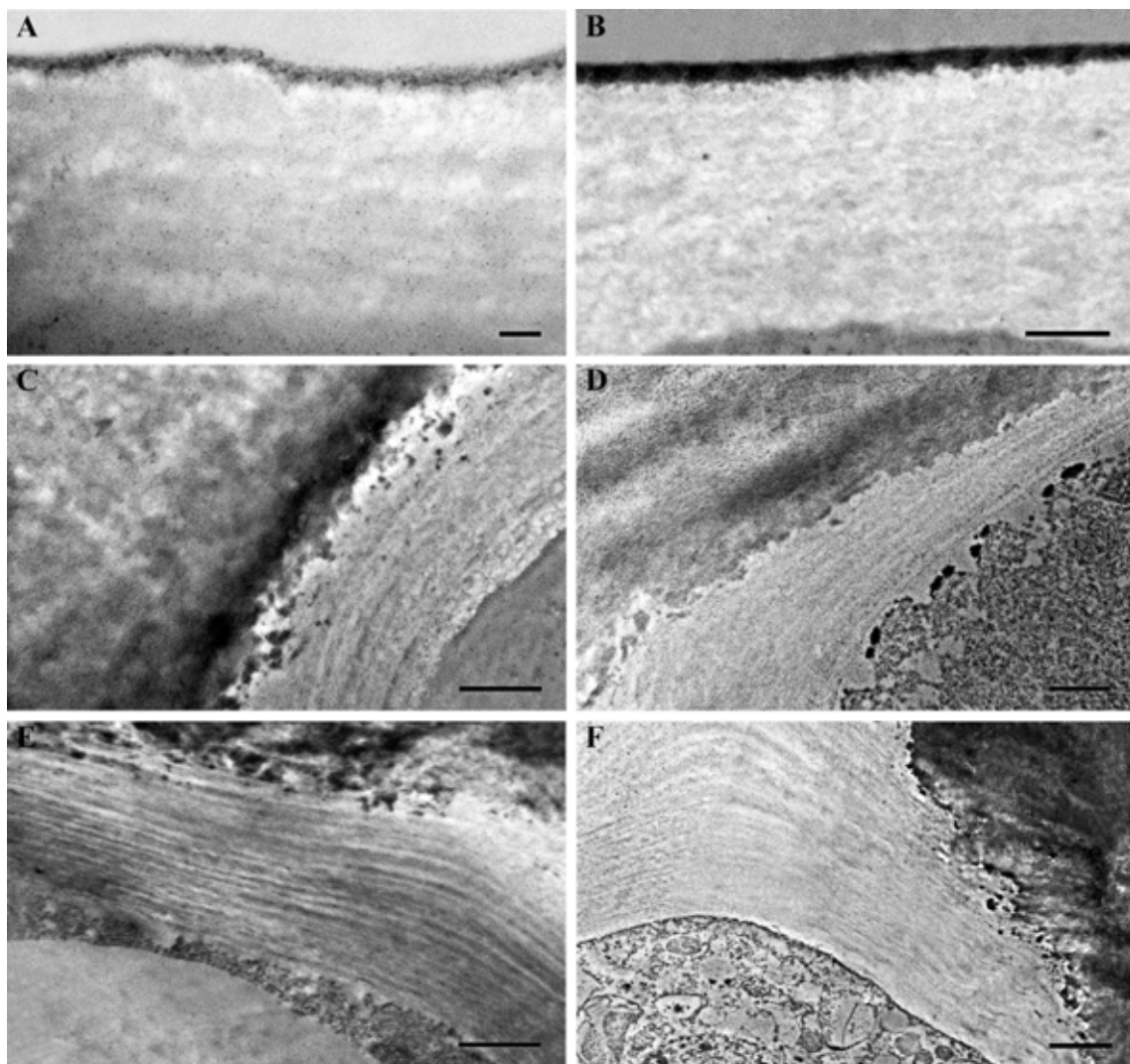
más reseñables de este periodo es el gran desarrollo de las invaginaciones de la cutícula, que se puede apreciar a partir de los 20 dda (Fig. 1.12, A). La deposición del material cuticular en las paredes periclinales y anticlinales de la epidermis se produce de manera continuada hasta que el fruto alcanza el estadio rojo maduro (Fig. 1.12, C-E). Además, en aquellas imágenes que fueron tomadas a mayores aumentos se puede distinguir a la cutícula como una cubierta electrodensa y homogénea en cuyo interior no existen capas con diferente comportamiento osmiofílico (Fig. 1.12, B, D y F). La naturaleza globular de la superficie interna de la cutícula observada en estadios anteriores está muy disminuida durante el periodo de expansión celular, a pesar de que la deposición de material cuticular prosigue a lo largo del mismo.



**Figura 1.12:** Imágenes de MET de cortes transversales de la epidermis de frutos de Cascada durante los periodos de expansión celular y de maduración. **A:** 20 dda, barra: 10  $\mu\text{m}$ . **B:** 20 dda, barra: 2  $\mu\text{m}$ . **C:** 35 dda, barra: 10  $\mu\text{m}$ . **D:** 35 dda, barra: 2  $\mu\text{m}$ . **E:** 55 dda, barra: 10  $\mu\text{m}$ . **F:** 55 dda, barra: 2  $\mu\text{m}$ .



La pared celular más externa también sufre modificaciones en su ultraestructura, marcadas por las fases de división y de expansión celular. En los estadios tempranos del desarrollo (correspondientes al periodo de división) muestra una apariencia amorfa y electroclara en su mayor parte, y por tanto claramente distinguible de la cutícula, de naturaleza electrodensa (Fig. 1.13, A). Cuando el fruto alcanza los 5 dda se aprecia cómo la pared adquiere un aspecto reticulado (Fig. 1.13, B). Esta característica se mantiene hasta los 10 dda, estadio en el que la pared comienza a organizarse en multicapas (Fig. 1.13, C). Esta disposición en la cual se alternan capas paralelas de diferente electrodensidad permanece en los días sucesivos hasta que el fruto alcanza la maduración (Fig. 1.13, D-F).



**Figura 1.13:** Ultraestructura de la pared celular más externa de la epidermis de los frutos de tomate Cascada. **A:** 2 dda, barra: 0.2  $\mu\text{m}$ . **B:** 5 dda, barra: 0.5  $\mu\text{m}$ . **C:** 10 dda, barra: 1  $\mu\text{m}$ . **D:** 14 dda, barra: 1  $\mu\text{m}$ . **E:** 30 dda, barra: 1  $\mu\text{m}$ . **F:** 50 dda, barra: 2  $\mu\text{m}$ .

### Inmunolocalización de los componentes de la pared celular más externa

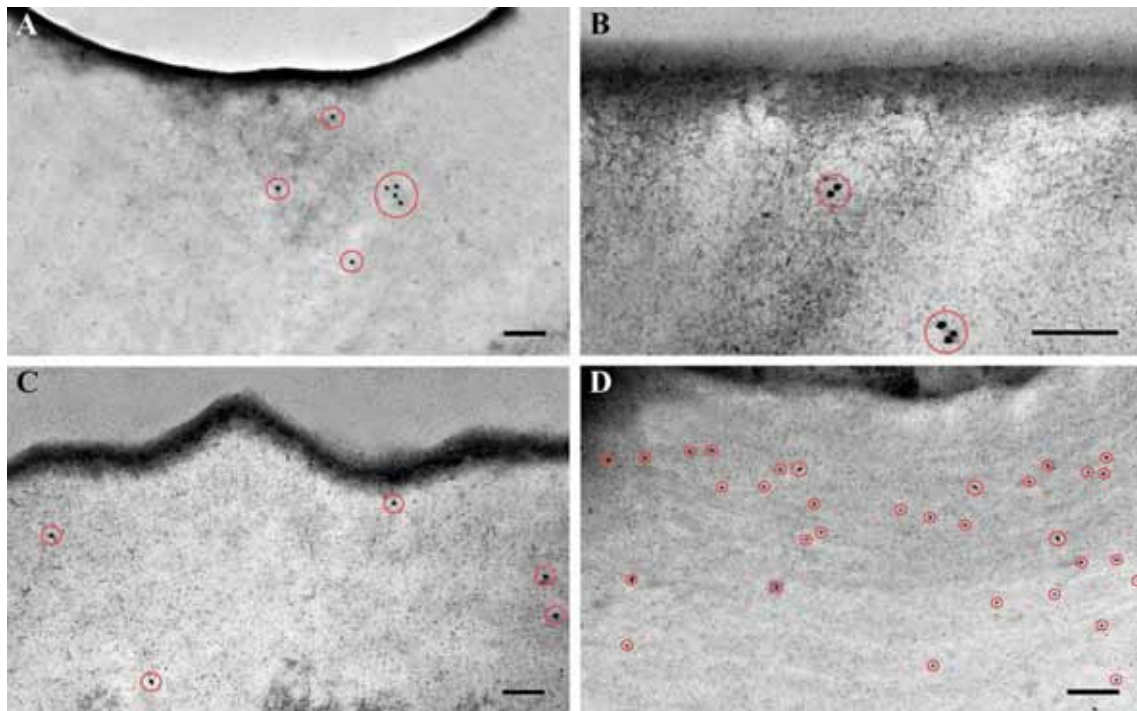
Los cambios en la composición de la pared celular más externa fueron analizados mediante el uso de anticuerpos capaces de interactuar específicamente con epítopos presentes en las estructuras de la celulosa y las pectinas, tanto las metil-esterificadas como las no esterificadas.

**Tabla 1.1. Densidad de marcaje de la celulosa y de las pectinas en la pared celular más externa durante el desarrollo del fruto de tomate Cascada.** Los datos están expresados como la media del número de partículas de oro por  $\mu\text{m}^2 \pm$  error estándar. Los controles negativos sin anticuerpos primarios mostraron una densidad de marcaje  $< 0.3$ . dda: días después de antesis. (-): No hay marcaje o partículas de oro muy dispersas.

Estadio (dda)	Pectinas no esterificadas	Pectinas esterificadas	Celulosa cristalina
ovario	$2.7 \pm 0.4$	$3.9 \pm 0.3$	$3.9 \pm 0.4$
2	$2.7 \pm 0.1$	$3.0 \pm 0.4$	$1.3 \pm 0.1$
5	$2.7 \pm 0.7$	$4.1 \pm 0.3$	$2.7 \pm 0.3$
7	$2.9 \pm 0.4$	$3.6 \pm 0.2$	$3.1 \pm 0.2$
9	-	$3.5 \pm 0.3$	$3.2 \pm 0.4$
10	-	$3.4 \pm 0.2$	$3.7 \pm 0.3$
15	-	-	$3.1 \pm 0.3$
20	-	-	$4.5 \pm 0.3$
25	-	-	$5.5 \pm 0.5$
35	-	-	$5.5 \pm 0.8$
45	-	$2.4 \pm 0.1$	-
55	-	$2.2 \pm 0.3$	-

En la Tabla 1.1 se resumen los valores de la densidad de marcaje de estos anticuerpos en dicha localización a lo largo del desarrollo del fruto. Los diferentes componentes mostraron un patrón de localización variable durante el transcurso de los distintos estadios analizados. Por una parte, no se detectó la presencia de las pectinas no esterificadas durante la fase de expansión celular ni durante el periodo de maduración. Su marcaje quedó restringido únicamente a los primeros estadios de desarrollo, concretamente desde el momento de la formación del fruto hasta los 7 dda (Fig. 1.14, A; Tabla 1.1). En cambio, las existencias de las pectinas esterificadas no solo quedó patente en los primeros estadios de desarrollo (desde el ovario hasta los 10 dda) (Fig. 1.14, B; Tabla 1.1) sino también más adelante, durante la maduración, aunque la densidad de marcaje fue menor en este último periodo. En cuanto a la celulosa cristalina, se observaron partículas de oro a lo largo de todo el crecimiento del fruto pero no durante la maduración del mismo (Fig. 1.14, C y D; Tabla 1.1). Este no se restringe a ningún área específica de la pared celular más externa, sino que la celulosa se encuentra distribuida a lo largo de la misma de forma uniforme. Por

último, cabe destacar la ausencia de marcaje en el interior de la cutícula en todos los estadios analizados.



**Figura 1.14:** Inmunolocalización de los componentes de la pared celular en cortes transversales de epidermis de frutos de tomate Cascada. **A:** Pectinas no esterificadas a los 7 dda. **B:** pectinas esterificadas presentes en el estadio de 5 dda. **C y D:** celulosa cristalina en el ovario y a los 35 dda, respectivamente. Las partículas de oro están rodeadas por círculos rojos. Barra: 200 nm.

## DISCUSIÓN

De acuerdo con la nomenclatura estándar clásica, que prevalece en la actualidad, la cutícula de las plantas estaría constituida por dos capas bien diferenciadas: la cutícula propia (*cuticle proper*), que es aquella región más externa que ya se manifiesta en los estadios iniciales de desarrollo, y la capa cuticular subyacente (*cuticle layer*), la cual aparece con posterioridad como consecuencia de la impregnación de cutina que sufre una parte de la pared celular más externa (Jeffree, 2006). Así, la cutícula propia, más electrodensa, está compuesta principalmente de cutina, mientras que la capa cuticular contiene además polisacáridos derivados de la pared (Jeffree, 2006). En esta tesis se ha omitido esta nomenclatura en base a diversas razones. Tal y como demuestran las imágenes de MET mostradas con anterioridad, en la cutícula del fruto de tomate no se distinguen regiones con diferente electrodensidad, sino que esta se manifiesta como una capa osmiofílica más o menos homogénea. Además, en contra de lo que ocurre en otras especies, como es el caso de *Agave americana* L., *Picea abies* (L) H. karst. y otras (Jeffree, 2006), no se ha detectado una delimitación clara en el interior de la cutícula que permita diferenciar entre una zona rica en fibrillas y otra carente de ellas. En este sentido, las técnicas de localización mediante anticuerpos de los componentes de la pared celular realizadas en este trabajo no fueron efectivas para el caso de la cutícula. La ausencia de marcaje en esta estructura podría ser debida a que su naturaleza principalmente lipídica obstaculice el reconocimiento de los epítomos (Marcus *et al.*, 2008). Por todo ello, en este capítulo se distinguen dos regiones en la pared celular más externa en base a la presencia o ausencia de material osmiofílico de naturaleza lipídica: la cutícula (o pared celular cutinizada) y la pared celular más externa (o pared celular no cutinizada).

### Diferenciación tisular

En el breve periodo de tiempo comprendido entre la antesis y los dos días siguientes a la misma ya ha tenido lugar la fecundación y el fruto comienza a cuajarse. Es por ello que el fruto de tomate Cascada incrementa su tamaño de forma significativa durante este periodo, de manera que casi llega a duplicarse. Este notable cambio en su envergadura viene acompañado de diversas modificaciones morfológicas y estructurales de la epidermis que han quedado reflejadas en los numerosos cortes transversales obtenidos a partir del conjunto de muestras de pericarpo. El tejido parenquimático comienza a diferenciarse a los

2 dda, durante el cual las células incrementan su tamaño y al mismo tiempo empiezan a organizarse, distribuyéndose en capas. Sin embargo, las tres primeras capas, que son aquellas que más tarde constituirán la epidermis y el colénquima, permanecen todavía indiferenciadas. La diferenciación de ambos tejidos no da comienzo hasta los 7 dda, previamente al inicio del periodo de expansión celular. Pero a pesar de que la disposición de las células epidérmicas en forma de capas (lo cual se considera la característica principal de este tejido) no tiene lugar hasta ese momento, en la pared celular más externa del ovario es posible distinguir una región muy fina y electrodensa localizada en la zona que está en contacto directo con el exterior que ya se encuentra cutinizada.

El desarrollo de los órganos de los organismos vegetales viene determinado por unos patrones de crecimiento específicos, tanto espaciales como temporales (Anastasiou y Lenhard, 2007). Este crecimiento es producto de dos procesos integrados: la división y la expansión celular. Mientras que la primera fase ocurre principalmente en los estadios tempranos del desarrollo, la expansión celular es el fenómeno responsable de la mayor parte del crecimiento de los órganos, y tiene lugar principalmente tras la finalización del periodo de división celular. En el caso de los tomates tipo cereza, la transición entre estas dos fases ocurre alrededor de los 11-14 dda (Bertin *et al.*, 2007; España *et al.*, 2014). Se han identificado varios factores de transcripción implicados en la regulación de ambos procesos (Anastasiou y Lenhard, 2007). Más recientemente se ha estudiado la relación de la cutícula con el momento en el que tiene lugar la transición entre la división y la expansión celular, que ha sido constatada por los cambios de sus propiedades mecánicas que acontecen durante la misma (España *et al.*, 2014). Los resultados obtenidos en el presente capítulo muestran una correlación temporal entre diversas modificaciones bioquímicas y morfológicas que ocurren a nivel de la pared celular más externa y la transición de los dos procesos que causan el crecimiento del fruto. En aquellos estadios en los que tiene lugar la división celular, la pared celular más externa es una pared con una mínima cutinización compuesta en su mayor parte por pectinas, tanto esterificadas como no esterificadas. Sin embargo, en la transición al periodo de expansión celular se produce un notable incremento del grosor de dicha pared debido a la creciente acumulación de material cuticular. Asimismo, las pectinas localizadas en la región de la pared celular que permanece sin cutinizar fueron detectadas muy débilmente durante esta fase. Una vez que el fruto alcanza los estadios correspondientes a la etapa de expansión celular, la cutícula



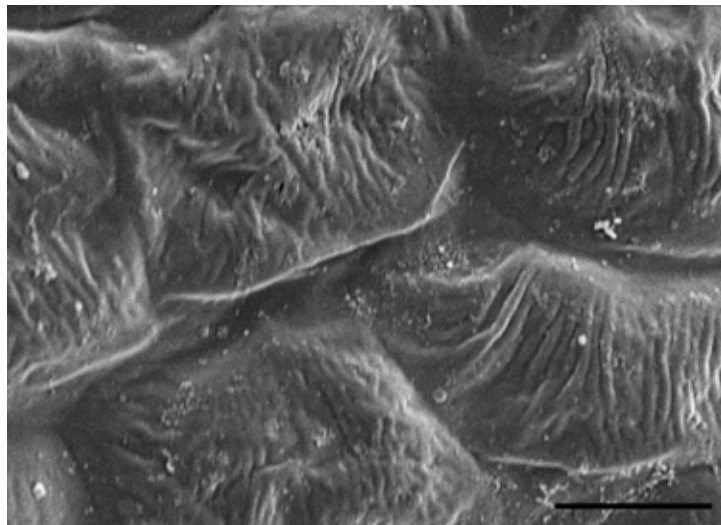
representa el 60-75% del grosor de la pared celular más externa. Fujino e Itoh (1998) también observaron un incremento significativo en el grosor de la pared celular más externa de los tallos de guisante que tenía lugar durante la transición entre la división y la expansión. En el caso de los frutos de Cascada la cutícula incrementa 4 veces su grosor durante la expansión celular, mientras que el grosor de la pared celular más externa de las células en elongación solo es 2.5 veces mayor que el de la pared de las células que se encuentran en periodo de división. Recientemente, se han estudiado las propiedades biomecánicas de la cutícula en base a los cambios en la proporción de cutina/polisacáridos presente en ella. Así, se ha constatado que la cantidad relativa de estos componentes influye en la deformación viscoelástica de la cutícula y por ende en el crecimiento (España *et al.*, 2014). Por ello, sería de especial interés investigar si estos cambios que se han observado en el grosor de la cutícula y de la pared durante la transición entre la división y la expansión celular podrían jugar un papel similar en relación a sus propiedades biomecánicas.

### **Formación de la pared celular cutinizada**

El análisis de las imágenes de MEB tomadas a la superficie de los frutos Cascada durante su desarrollo permitió confirmar la presencia en determinados estadios de un gran número de arrugas sin una orientación clara. Estas son fácilmente distinguibles durante la antesis y van desapareciendo de forma progresiva a lo largo de los primeros 5 días del crecimiento del fruto. Estos pliegues cuticulares también han sido detectados en los frutos de *Vitis vinifera* L. (Considine y Knox, 1979; Casado y Heredia, 2001), y en las hojas de *Aesculus hippocastanum* L. (Martin y Juniper, 1970), *Syringa vulgaris* L. (Holloway, 1971) y *Acer pseudoplatanus* L. (Wilson, 1984), entre otras especies. Sin embargo, la evolución de estas arrugas solo ha sido caracterizada en frutos de uva y de manzana, en los que se observó un aplanamiento de su superficie conforme más avanzando era el estadio de desarrollo estudiado (Casado y Heredia, 2001; Bringe, 2007). De acuerdo con Rosenquist y Morrison (1988), estas arrugas representan material cuticular acumulado que se esparce posteriormente durante el abrupto crecimiento que tiene lugar en los primeros días de desarrollo. Sin embargo, los numerosos cortes transversales de la epidermis de los frutos que han sido analizados en el presente trabajo muestran que esas arrugas no están compuestas únicamente de material cuticular, sino que son el resultado de una

irregularidad en el contorno de la pared celular más externa que queda reflejada en la cutícula adyacente.

A pesar de que este tipo de arrugas se han encontrado en diversas especies y estructuras, su función aún no ha sido clarificada. Según Jeffree (1996), su presencia puede suponer un incremento de la superficie, llegando a duplicarla e incluso a triplicarla. Sin embargo, en determinados casos se sospecha que podrían jugar un papel diferente, como por ejemplo en la superficie de los pétalos bien desarrollados (Jeffree, 2006; Li-Beisson *et al.*, 2009). En Cascada, el hecho de que comienzan a desaparecer una vez iniciado el crecimiento del fruto hasta alcanzar los 6 dda, cuando la superficie es completamente plana a pesar de que el tamaño del fruto solo es del 10% con respecto al tamaño final, sumado a la certeza de que estas arrugas ya están presentes antes de la antesis (Fig. 1.15) sugiere que su rol podría estar relacionado con la apariencia irregular de la superficie de la protodermis del ovario.



**Figura 1.15:** Imagen de MEB de la superficie del ovario Cascada 2 días antes de la antesis. Barra: 5  $\mu\text{m}$ .

Además de estos pliegues superficiales, durante los primeros instantes del crecimiento del fruto se han observado diversos cambios a nivel cuticular. En antesis la cutícula se muestra como una capa electrodensa muy delgada pero bien definida. Tan solo dos días más tarde, su grosor se incrementa de forma notable hasta llegar a duplicarse pero continúa manifestándose como una fina lámina, aunque en este estadio ya es posible discernir el aspecto globular de su cara interna. A partir de ese instante y hasta los 9 dda la cutícula va aumentando su grosor moderadamente, al tiempo que la apariencia globular de la parte interna se torna más patente. De acuerdo con los estudios basados en la ultraestructura

cuticular realizados hasta el momento, esta fina capa presente hasta los 9 dda podría considerarse como la procutícula, la cual se define como un estadio de desarrollo temprano de la cutícula en el cual está compuesta únicamente por cutina y que se encuentra sustentada por una capa de naturaleza pectínica en su mayor parte que se comporta como un polianión (Jeffree, 2006). La procutícula ha sido identificada solamente en unas pocas especies (ver referencias en Jeffree, 2006), siendo esta la primera vez que se describe en frutos de tomate.

Es de destacar que en los estadios correspondientes al periodo de división celular se ha detectado la presencia de dominios citoplasmáticos que se encuentran en estrecho contacto con la pared celular más externa. En ellos existen estructuras globulares electrodensas de diversos tamaños localizadas en su mayoría en la parte superior de la pared, próximas a la cara interna de la procutícula. Estas nanoestructuras han sido previamente observadas en otros organismos vegetales como *Eucalyptus* sp., *Clivia miniata*, *Utricularia sandersonii* o *Hakea suaveolens*, en los cuales se localizan en la zona de la pared celular más cercana a la procutícula, así como en la superficie más externa de la membrana plasmática (Frey-Wyssling y Mühlethaler, 1965; Hallam, 1970; Heide-Jørgensen, 1978, 1991; Jeffree, 2006). Dicha ubicación hace entrever una posible migración de los glóbulos desde la célula epidérmica a la procutícula. A pesar de que estos autores los consideraron como los precursores de la procutícula, su contenido (lipídico, proteico y/o polisacárido) así como su origen a día de hoy se desconocen. Estas estructuras podrían actuar como vesículas cargadas de material lipídico que, tras su migración a través de la pared celular, liberarían su contenido a la cutícula creciente. Así, la forma irregular de la cara interna de la procutícula sería una consecuencia de la acumulación progresiva y el ensamblaje de dominios de cutina que habrían sido previamente transportados por estas nanoestructuras. En este sentido, se ha sugerido que la acumulación y la fusión de estas nanogotas o nanopartículas en la parte más externa de la pared celular de las células epidérmicas podría funcionar como un posible mecanismo para la formación de la procutícula (Heredia-Guerrero *et al.*, 2008; Domínguez *et al.*, 2010; D'Angeli *et al.*, 2013; Kwiatkowska *et al.*, 2014).

Asimismo, se han descrito otro tipo de dominios citoplasmáticos singulares en el ovario de *Ornithogalum umbellatum* llamados lipotubuloides, en los cuales abundan cuerpos lipídicos, mitocondrias y membranas de retículo endoplasmático (Kwiatkowska *et al.*,



2014). La síntesis de material lipídico en el interior de los lipotubuloides ha sido demostrada, razón por la cual se han postulado como posibles regiones donde tiene lugar la síntesis de monómeros de cutina. Los ácidos grasos han sido propuestos recientemente como reguladores del crecimiento de los órganos vegetales durante el periodo de división celular (Anastasiou y Lenhard, 2007). Igualmente, se ha recalcado la importancia del material lipídico extracelular en la señalización de este proceso (Kamata *et al.*, 2013).

Los dominios citoplasmáticos y estructuras globulares observados en este trabajo no habían sido descritos a día de hoy ni en la epidermis ni en la cutícula del fruto de tomate. El hecho de que su cutícula sea de aspecto reticulado y de naturaleza amorfa, muy distinta a la cutícula polilaminada de las especies en las cuales se han descrito previamente estas singularidades, podría indicar la existencia de una vía común en la síntesis de esta capa que tendría lugar durante los estadios iniciales de su desarrollo. Por tanto, se propone necesario un análisis más profundo de estas micro- y nanoestructuras que permitiera clarificar tanto su naturaleza como su función.

Durante el periodo de expansión celular (comprendido según los resultados obtenidos desde aproximadamente los 11 dda hasta el estadio rojo maduro), la cutícula sufre pocos cambios en su apariencia y en su ultraestructura. Es por ello que se podría afirmar que el armazón principal de la cutícula ya ha sido construido previamente a esta fase, ya que los únicos cambios observables durante la misma son, por un lado, un mayor desarrollo de las invaginaciones entre las células epidérmicas adyacentes, y por otra parte, un engrosamiento de la cutícula, probablemente debido a la reorganización de la matriz lipídica, ya que es importante constatar que la cantidad de cutina se mantiene invariable durante este periodo (Domínguez *et al.*, 2008).

A lo largo del presente trabajo se han descrito dos cambios remarcables en cuanto al grosor de la cutícula a lo largo de su desarrollo. Este oscila dentro de una escala nanométrica durante los primeros 9 días transcurridos desde el momento de la antesis, mientras que a los 10 dda la cutícula incrementa hasta 11 veces su espesor como consecuencia de un crecimiento abrupto, alcanzando así valores comprendidos dentro de una escala micrométrica. Esta fluctuación del grosor de la cutícula fue descrita previamente en el mismo cultivar mediante el uso de técnicas de microscopía convencional y el empleo de tinciones específicas. En este caso, el material cuticular acumulado provocó

que esta capa cuadruplicara su grosor (Domínguez *et al.*, 2008). En este punto cabe recalcar que a pesar de que los valores medios de grosor recogidos en este trabajo son similares a los descritos por Domínguez *et al.* (2008) existe una discrepancia significativa con respecto al estadio correspondiente a los 10 dda. En concreto, estos valores medios son más elevados, lo cual podría deberse a que el osmio es más sensible a las bajas cantidades de material lipídico que el Sudán IV, colorante utilizado por dichos autores. Además, hay que tener presente que la resolución de una técnica de microscopía electrónica es 100 veces mayor que una de microscopía óptica convencional. Posteriormente, el grosor cuticular continúa incrementándose hasta los 25 dda, y finalmente disminuye durante el periodo de maduración del fruto. Al contrario de lo que cabría esperar, esta disminución del espesor de la cutícula no viene acompañada de una pérdida de material cuticular (Domínguez *et al.*, 2008), lo cual sugiere que durante esta fase podría existir un reordenamiento de sus componentes que diese lugar a tal descenso.

### **Formación de la pared celular no cutinizada**

La pared celular polisacarídica de las células epidérmicas sirve como un almacén para la deposición y el desarrollo de la cutícula. Es además una estructura supramolecular dinámica que sufre continuos cambios durante el crecimiento del fruto de tomate. Entre dichas modificaciones se encuentra un incremento significativo en el grosor de la pared celular más externa a lo largo de todo su desarrollo, aunque este aumento es mucho menos acusado en comparación con el que tiene lugar en el caso de la cutícula. Dicha variación es más notable en la fase de división celular, durante la cual aumenta 4 veces su espesor en un breve intervalo de tiempo. Más tarde, este incremento continúa aunque de una manera más moderada hasta que el fruto alcanza los 20 dda. A partir de ese momento no sufre nuevas variaciones en su grosor hasta el periodo de maduración, en el cual se incrementa levemente, fenómeno que ha sido descrito previamente en otras especies (Redgwell *et al.*, 1997).

Salvo excepciones (Jeffrey, 2006), la mayoría de los estudios centrados en el desarrollo de la cutícula no han ido acompañados de un análisis de la pared celular subyacente. A pesar de que se considera una pared celular con características singulares existe muy poca información sobre los cambios que se producen a este nivel durante el desarrollo. En los tallos de *Pisum sativum* L. se ha comprobado que esta pared contiene una cantidad de

celulosa mayor que la que se localiza en las paredes primarias típicas (Bret-Harte y Talbott, 1993). Por otro lado, el aislamiento de la fracción polisacáridica de cutículas pertenecientes a frutos de tomate maduros puso de manifiesto que la celulosa, la hemicelulosa y las pectinas (los principales componentes de la pared celular) contribuyen de forma equimolecular a la composición de la misma (López-Casado *et al.*, 2007). Más recientemente, se ha puesto en evidencia la localización de la celulosa y de las pectinas en cutículas aisladas de hojas de *Eucalyptus* L'Hér., *Populus* L., y *Pyrus* L. mediante su marcaje inmunoenzimático (Guzmán *et al.*, 2014). El empleo de anticuerpos específicos durante el desarrollo del presente trabajo ha permitido esbozar un escenario molecular de diferentes componentes de la pared celular (la celulosa cristalina y las pectinas, tanto las esterificadas como las no esterificadas). La celulosa cristalina está presente en la pared celular más externa a lo largo de todo el desarrollo, exceptuando la fase de maduración, lo que concuerda con los resultados obtenidos tras varios análisis bioquímicos de las paredes celulares que también han sido realizados en frutos de tomate (Lunn *et al.*, 2013). La existencia de pectinas no esterificadas en dicha pared queda restringida exclusivamente a los primeros estadios de desarrollo, los cuales corresponden al periodo de división celular. En cambio, las pectinas esterificadas, las cuales constituyen la mayor parte de los polisacáridos que conforman la matriz gelatinosa de las paredes celulares (Burton *et al.*, 2010), no solo están presentes durante este periodo de división, sino también durante la maduración. La escasa detección de este tipo de pectinas durante el periodo de expansión celular podría deberse a una disminución de la cantidad de estas moléculas, pero también cabría la posibilidad de que se produzca un enmascaramiento de aquellos epítomos a los que deberían haberse unido los anticuerpos utilizados en los experimentos que dieron lugar a estos resultados (Marcus *et al.*, 2008).

Se han descrito diversos estudios que sugieren una posible implicación de las pectinas metilesterificadas en el crecimiento de la pared celular. Por un lado, diversos análisis inmunocitoquímicos realizados en células de raíz han mostrado que aquellas células en división contienen niveles más bajos de las pectinas que no se encuentran esterificadas, mientras que en el caso de las pectinas esterificadas no existen diferencias entre las células que están dividiéndose con respecto a las que no lo están (Dolan *et al.*, 1997). Igualmente, las pectinas no esterificadas son detectadas en menor medida en las paredes de las células epidérmicas en elongación que en las células que permanecen invariables (Fujino e Itoh,

1998). Esta disminución de los niveles de las pectinas no esterificadas ha sido descrita en diversas ocasiones (Derbyshire *et al.*, 2007; Guénin *et al.*, 2011), aunque en algún caso también se ha observado el comportamiento opuesto (Pelletier *et al.*, 2010). Por otra parte, se ha sugerido que la distribución local de los polisacáridos de la pared celular (principalmente de las pectinas) podría jugar un papel relevante en las propiedades fisicoquímicas de la misma (Levesque-Tremblay *et al.*, 2015). En algunas ocasiones se ha encontrado una distribución transversal heterogénea de las pectinas esterificadas y no esterificadas a lo largo de la pared celular más externa. Esta heterogeneidad reside en la localización de las pectinas no esterificadas en la parte externa y en la mayor abundancia de las pectinas esterificadas en la zona interna (Jauneau *et al.*, 1997; Fujino e Ito, 1998). Sin embargo, los resultados obtenidos en esta tesis no muestran ningún patrón de distribución de los distintos componentes de la pared celular analizados.

Además de las modificaciones referidas a sus componentes, la pared celular más externa también sufre un cambio ultraestructural relevante que tiene lugar durante el periodo de expansión celular: la aparición de múltiples capas paralelas dispuestas de forma helicoidal (Fig. 1.13). Según Kutschera (2008) estas capas podrían estar compuestas de microfibrillas de celulosa. La ordenación paralela de las microfibrillas podría ser el resultado de un preciso mecanismo de auto-ensamblaje (Rey, 2010).

Las diversas modificaciones que suceden a nivel de la pared celular de los frutos durante la maduración ha sido ampliamente analizada en una gran cantidad de estudios (Brummell, 2006). En el caso del fruto de tomate estos cambios implican por un lado una disminución de la cantidad de celulosa, al mismo tiempo que se incrementa la de las pectinas no esterificadas (Roy *et al.*, 1992; Steele *et al.*, 1997; Lunn *et al.*, 2013). Sin embargo, estos trabajos se llevaron a cabo en las paredes celulares del tejido parenquimático y no en la pared celular más externa. Los resultados recogidos en esta tesis sugieren un comportamiento ligeramente diferente en el caso de dicha pared: durante la maduración del fruto de Cascada se produce una disminución de la cantidad de celulosa cristalina y un aumento de la de las pectinas que se encuentran esterificadas.

A modo de resumen, los resultados aquí expuestos indican que la pared celular más externa es una estructura altamente dinámica que sufre modificaciones significativas durante los primeros estadios del desarrollo del fruto de tomate. Se ha constatado la



existencia de una profunda coordinación e interconexión entre el poliéster de cutina y la matriz polisacáridica, las dos estructuras supramoleculares que componen la pared celular más externa. Es por ello que sería de especial interés investigar cuáles son los mecanismos y las señales moleculares que están implicados en este desarrollo tan meticulosamente sincronizado.

A la vista de los resultados obtenidos, la cutícula y la epidermis de las plantas deberían ser estudiadas en su conjunto. En este sentido, el análisis de mutantes podría considerarse como una excelente vía para profundizar en el conocimiento de las interacciones que se producen entre ambas, así como para ahondar en el papel que juegan los diversos genes cuticulares descritos en la actualidad.

Debido a la gran implicación de la epidermis en el desarrollo del fruto, así como en su calidad, los resultados aquí recogidos podrían ser valiosos en investigaciones futuras que tengan como finalidad la creación de nuevas variedades comerciales con unas características determinadas. Por último, los resultados descritos en este capítulo demuestran la importancia de los primeros estadios del desarrollo del fruto en la deposición y la estructuración de la cutina. Por ello, este periodo de tiempo debería tenerse en especial consideración a la hora de profundizar sobre los diferentes mecanismos de síntesis de este biopolímero.



## BIBLIOGRAFÍA

- Anastasiou E, Lenhard M.** 2007. Growing up to one's standard. *Curr Opin Plant Biol* 10: 63–69.
- Baker EA, Bukovac MJ, Hunt GM.** 1982. Composition of tomato fruit cuticle as related to fruit growth and development. In: DF Cutler, KL Alvin, CE Price, eds, *The Plant Cuticle*. Academic Press, London, UK, pp: 33–44.
- Bargel H, Koch K, Cerman Z, Neinhuis C.** 2006. Structure–function relationships of the plant cuticle and cuticular waxes—a smart material? *Funct Plant Biol* 33: 893–910.
- Becker T, Knoche M.** 2012. Deposition, strain, and microcracking of the cuticle in the developing ‘Riesling’ grape berries. *Vitis* 51: 1–6.
- Beisson F, Li-Beisson Y, Pollard M.** 2012. Solving the puzzles of cutin and suberin polymer biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol* 15: 329–337.
- Bertin N, Lecomte A, Brunel B, Fishman S, Génard M.** 2007. A model describing cell polyploidization in tissues of growing fruit as related to cessation of cell proliferation. *J Exp Bot* 58: 1903–1913.
- Blake AW, McCartney L, Flint JE, Bolam DN, Boraston AB, Gilbert HJ, Knox JP.** 2006. Understanding the biological rationale for the diversity of cellulose-directed carbohydrate-binding modules in prokaryotic enzymes. *J Biol Chem* 281: 29321–29329.
- Bret-Harte MS, Talbott LD.** 1993. Changes in composition of the outer epidermal cell wall of pea stems during auxin-induced growth. *Planta* 190: 369–378.
- Bringe K.** 2007. Surface Characteristics of *Malus domestica* Borkh. Leaves and Fruits as Influenced by Ontogenesis and Environmental Factors. Cuvillier Verlag, Göttingen, Germany.
- Brummell DA.** 2006. Cell wall disassembly in ripening fruit. *Funct Plant Biol* 33: 103–119.
- Burton RA, Gidley MJ, Fincher GB.** 2010. Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. *Nat Chem Biol* 6: 724–732.
- Cánovas F.** 1995. Manejo del cultivo sin suelo. In: Nuez F, ed, *El Cultivo del Tomate*. Mundi Prensa, Madrid, Spain, pp: 227–254.
- Casado CG, Heredia A.** 2001. Ultrastructure of the cuticle during growth of the grape berry (*Vitis vinifera*). *Physiol Plant* 111: 220–224.
- Considine JA, Knox RB.** 1979. Development and histochemistry of the cells, cell walls, and cuticle of the dermal system of fruit of the grape, *Vitis vinifera* L. *Protoplasma* 99: 347–365.



**D'Angeli S, Falasca G, Matteucci M, Altamura MM.** 2013. Cold perception and gene expression differ in *Olea europaea* seed coat and embryo during drupe cold acclimation. *New Phytol* 197: 123–138.

**Derbyshire P, McCann MC, Roberts K.** 2007. Restricted cell elongation in *Arabidopsis* hypocotyls is associated with a reduced average pectin esterification level. *BMC Plant Biol* 7: 31.

**Dolan L, Linstead P, Roberts K.** 1997. Developmental regulation of pectic polysaccharides in the root meristem of *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 48: 713–720.

**Domínguez E, Heredia-Guerrero JA, Benítez JJ, Heredia A.** 2010. Selfassembly of supramolecular lipid nanoparticles in the formation of plant biopolyester cutin. *Mol Biosyst* 6: 948–950.

**Domínguez E, Heredia-Guerrero JA, Heredia A.** 2011. The biophysical design of plant cuticles: an overview. *New Phytol* 189: 938–949.

**Domínguez E, Heredia-Guerrero JA, Heredia A.** 2015. Plant cutin genesis: unanswered questions. *Trends Plant Sci* 20: 551–558.

**Domínguez E, López-Casado G, Cuartero J, Heredia A.** 2008. Development of fruit cuticle in cherry tomato (*Solanum lycopersicum*). *Funct Plant Biol* 35: 403–411.

**España L, Heredia-Guerrero JA, Segado P, Benítez JJ, Heredia A, Domínguez E.** 2014. Biomechanical properties of tomato fruit cuticle during development are modulated by changes in the relative amount of their components. *New Phytol* 202: 790–802.

**Frey-Wyssling A, Mühlenthaler A.** 1965. *Ultrastructural Plant Cytology*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

**Fry SC.** 2004. Primary cell wall metabolism: tracking the careers of wall polymers in living plant cells. *New Phytol* 161: 641–675.

**Fujino T, Itoh T.** 1998. Changes in pectin structure during epidermal cell elongation in pea (*Pisum sativum*) and its implications for cell wall architecture. *Plant Cell Physiol* 39: 1315–1323.

**Girard AL, Mounet F, Lemaire-Chamley M, Gaillard C, Elmorjani K, Vivancos J, Runavot JL, Quemener B, Petit J, Germain V, Rothan C, Marion D, Bakan B.** 2012. Tomato GDSSL1 is required for cutin deposition in the fruit cuticle. *Plant Cell* 24: 3119–3134 .

**Glover BJ.** 2000. Differentiation in plant epidermal cells. *J Exp Bot* 51: 497–505.

**Guénin S, Mareck A, Rayon C, Lamour R, Assoumou Ndong Y, Domon JM, Sénéchal F, Fournet F, Jamet E, Canut H, Percoco G, Mouille G, Rolland A, Rustérucchi C, Guerineau F, Van Wuytswinkel O, Gillet F, Driouich A, Lerouge P, Gutierrez L, Pelloux J.** 2011. Identification of pectin methylesterase 3 as

a basic pectin methylesterase isoform involved in adventitious rooting in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* 192: 114–126.

**Guzmán P, Fernández V, García ML, Khayet M, Fernández A, Gil L.** 2014. Localization of polysaccharides in isolated and intact cuticles of eucalypt, poplar and pear leaves by enzyme-gold labelling. *Plant Physiol Biochem* 76: 1–6.

**Hallam ND.** 1970. Leaf wax fine structure and ontogeny in *Eucalyptus* demonstrated by means of a specialized fixation technique. *J Microsc* 92: 137–144.

**Heide-Jørgensen HS.** 1978. The xeromorphic leaves of *Hakea suaveolens* R. Br. II. Structure of epidermal cells, cuticle development and ectodesmata. *Bot Tidsskr* 72: 227–244.

**Heide-Jørgensen HS.** 1991. Cuticle development and ultrastructure: evidence for a procuticle of high osmium affinity. *Planta* 183: 511–519.

**Heredia A.** 2003. Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer. *Biochim Biophys Acta* 1620: 1–7.

**Heredia-Guerrero JA, Benítez JJ, Heredia A.** 2008. Self-assembled polyhydroxy fatty acids vesicles: a mechanism for plant cutin synthesis. *BioEssays* 30: 273–277.

**Holloway PJ.** 1971. The chemical and physical characteristics of leaf surfaces. In: Preece TF, Dickinson CH, eds, *The Ecology of Leaf Surface Micro-Organisms*. Academic Press, London, UK, pp: 39–53.

**Holloway PJ.** 1982. Structure and histochemistry of plant cuticular membranes: an overview. In: Cutler DF, Alvin KL, Price CE, eds, *The Plant Cuticle*. Academic Press, London, UK, pp: 1–32.

**Hunt GM, Baker EA.** 1980. Phenolic constituents of tomato fruit cuticle. *Phytochemistry* 19: 1415–1419.

**Jauneau A, Quentin M, Driouich A.** 1997. Micro-heterogeneity of pectins and calcium distribution in the epidermal and cortical parenchyma cell walls of flax hypocotyl. *Protoplasma* 198: 9–19.

**Javelle M, Vernoud V, Rogowsky PM, Ingram GC.** 2011. Epidermis: the formation and functions of a fundamental plant tissue. *New Phytol* 189: 17–39.

**Jeffree CE.** 1996. Structure and ontogeny of plant cuticles. In: Kerstiens G, ed, *Plant Cuticles: an Integrated Functional Approach*. BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford, UK, pp: 33–82.

**Jeffree CE.** 2006. The fine structure of the plant cuticle. In: Riederer M, Müller C, eds, *Biology of the Plant Cuticle*. Blackwell Publishing, Oxford, UK, pp: 11–125.

**Kamata N, Okada H, Komeda Y, Takahashi T.** 2013. Mutations in epidermis-specific HD-ZIP IV genes affect floral organ identity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 75: 430–440.



**Kutschera U.** 2008. The growing outer epidermal wall: design and physiological role of a composite structure. *Ann Bot (Lond)* 101: 615–621.

**Kutschera U, Niklas KJ.** 2007. The epidermal-growth-control theory of stem elongation: an old and a new perspective. *J Plant Physiol* 164: 1395–1409.

**Kwiatkowska M, Polit JT, Popłońska K, Stępiński D, Wojtczak A.** 2013. Immunogold method evidences that kinesin and myosin bind to and couple microtubules and actin filaments in lipotubuloids of *Ornithogalum umbellatum* ovary epidermis. *Acta Physiol Plant* 35: 1967–1977.

**Kwiatkowska M, Wojtczak A, Popłońska K, Polit JT, Stępiński D, Domínguez E, Heredia A.** 2014. Cutinsomes and lipotubuloids appear to participate in cuticle formation in *Ornithogalum umbellatum* ovary epidermis: EM-immunogold research. *Protoplasma* 251: 1151–1161.

**Lara I, Belge B, Goulao LF.** 2014. The fruit cuticle as a modulator of postharvest quality. *Postharvest Biol Technol* 87: 103–112.

**Levesque-Tremblay G, Pelloux J, Braybrook SA, Müller K.** 2015. Tuning of pectin methylesterification: consequences for cell wall biomechanics and development. *Planta* 242: 791–811.

**Li-Beisson Y, Pollard M, Sauveplane V, Pinot F, Ohlrogge J, Beisson F.** 2009. Nanoridges that characterize the surface morphology of flowers require the synthesis of cutin polyester. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 22008–22013.

**López-Casado G, Matas AJ, Domínguez E, Cuartero J, Heredia A.** 2007. Biomechanics of isolated tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit cuticles: the role of the cutin matrix and polysaccharides. *J Exp Bot* 58: 3875–3883.

**Lunn D, Phan TD, Tucker GA, Lycett GW.** 2013. Cell wall composition of tomato fruit changes during development and inhibition of vesicle trafficking is associated with reduced pectin levels and reduced softening. *Plant Physiol Biochem* 66: 91–97.

**Marcus SE, Verhertbruggen Y, Hervé C, Ordaz-Ortiz JJ, Farkas V, Pedersen HL, Willats WG, Knox JP.** 2008. Pectic homogalacturonan masks abundant sets of xyloglucan epitopes in plant cell walls. *BMC Plant Biol* 8: 60.

**Martin JT, Juniper BE.** 1970. *The Cuticles of Plants*. Edward Arnold, Edinburgh, UK.

**Martin LBB, Rose JKC.** 2014. There's more than one way to skin a fruit: formation and functions of fruit cuticles. *J Exp Bot* 65: 4639–4651.

**Pelletier S, Van Orden J, Wolf S, Vissenberg K, Delacourt J, Ndong YA, Pelloux J, Bischoff V, Urbain A, Mouille G, Lemonnier G, Renou JP, Höfte H.** 2010. A role for pectin de-methylesterification in a

developmentally regulated growth acceleration in dark-grown *Arabidopsis* hypocotyls. *New Phytol* 188: 726–739.

**Pollard M, Beisson F, Li Y, Ohlrogge JB.** 2008. Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends Plant Sci* 13: 236–246.

**Redgwell RJ, MacRae E, Hallett I, Fischer M, Perry J, Harker R.** 1997. In vivo and in vitro swelling of cell walls during fruit ripening. *Planta* 203: 162–173.

**Rey AD.** 2010. Liquid crystal models of biological materials and processes. *Soft Matter* 6: 3402–3429.

**Riederer M, Müller C.** 2006. *Biology of the Plant Cuticle*. Blackwell Publishing, Oxford, UK.

**Riederer M, Schönherr J.** 1988. Development of plant cuticles: fine structure and cutin composition of *Clivia miniata* Reg. leaves. *Planta* 174: 127–138.

**Rosenquist JK, Morrison JC.** 1988. The development of the cuticle and epicuticular wax of the grape berry. *Vitis* 27: 63–70.

**Roy S, Vian B, Roland JC.** 1992. Immunocytochemical study of the deesterification patterns during cell-wall autolysis in the ripening of cherry tomato. *Plant Physiol Biochem* 30: 139–146.

**Samuels L, Kunst L, Jetter R.** 2008. Sealing plant surfaces: cuticular wax formation by epidermal cells. *Annu Rev Plant Biol* 59: 683–707.

**Savaldi-Goldstein S, Peto C, Chory J.** 2007. The epidermis both drives and restricts plant shoot growth. *Nature* 446: 199–202.

**Seymour GB, Østergaard L, Chapman NH, Knapp S, Martin C.** 2013. Fruit development and ripening. *Annu Rev Plant Biol* 64: 219–241.

**Steele NM, McCann MC, Roberts K.** 1997. Pectin modification in cell walls of ripening tomatoes occurs in distinct domains. *Plant Physiol* 114: 373–381.

**Thompson DS.** 2001. Extensiometric determination of the rheological properties of the epidermis of growing tomato fruit. *J Exp Bot* 52: 1291–1301.

**Van de Vooren J, Welles GWH, Hayman G.** 1986. Glasshouse crop production. In: *The Tomato Crop*, eds, Atherton and Rudich, Chapman & Hall, New York, pp: 581–623.

**Wilson J.** 1984. Microscopic features of wind damage to leaves of *Acer pseudoplatanus* L. *Ann Bot (Lond)* 53: 73–82.

**Yeats TH, Martin LB, Viart HM, Isaacson T, He Y, Zhao L, Matas AJ, Buda GJ, Domozych DS, Clausen MH, Rose JKC.** 2012. The identification of cutin synthase: formation of the plant polyester cutin. *Nat Chem Biol* 8: 609–611.

**Yeats TH, Rose JKC.** 2013. The formation and function of plant cuticles. *Plant Physiol* 163: 5–20.



## **CAPÍTULO 2**

# **IDENTIFICACIÓN DE MECANISMOS MOLECULARES INVOLUCRADOS EN LA FORMACIÓN DE LA CUTÍCULA DEL FRUTO DE TOMATE**



## INTRODUCCIÓN

Como se ha indicado detalladamente en la Introducción de la presente tesis, a lo largo de los últimos años ha cobrado gran interés el estudio de la identificación de los mecanismos responsables de la síntesis de la cutina, así como de las vías de transporte de sus monómeros hacia el exterior (Domínguez *et al.*, 2015). En la actualidad se han propuesto dos hipótesis que tratan de esclarecer cómo se produce la síntesis y la deposición de la cutina en el fruto del tomate. Una de ellas describe la existencia de una proteína lipasa/hidrolasa con un motivo GDSL (CUS1) que se localiza en la región cutinizada de la pared celular más externa. Esta enzima actuaría como una aciltransferasa, entrecruzando los monómeros de cutina activados (Girard *et al.*, 2012; Yeats *et al.*, 2012; Philippe *et al.*, 2016). Además, se han identificado posibles ortólogos de CUS1 en otras especies, lo que sugiere que la formación de cutina tiene lugar por un mecanismo conservado en diversos grupos de plantas terrestres (Yeats *et al.*, 2014). Asimismo, se han descrito cuatro parálogos de CUS1 en tomate, aunque aún no se ha precisado su papel en la síntesis de la matriz de cutina (Yeats *et al.*, 2014).

Por otra parte, se ha postulado que la cutina podría ser el resultado final de un proceso de autoensamblaje molecular emergente (Heredia-Guerrero *et al.*, 2008, 2010; Heredia *et al.*, 2009; Domínguez *et al.*, 2015). Esta hipótesis está sustentada por la demostrada capacidad de los monómeros de cutina de autoensamblarse y polimerizar parcialmente *in vitro*, dando lugar a unas nanoestructuras lipídicas especiales denominadas *cutinsomas*. Estas partículas podrían ser transportadas de forma pasiva hacia la parte más externa de la pared celular de la célula epidérmica, donde se acumularían y se fusionarían hasta formar la procutícula o cutícula temprana (Heredia-Guerrero *et al.*, 2008). Los *cutinsomas* han sido detectados en la epidermis y en la cutícula naciente del fruto de tomate inmaduro mediante el uso de anticuerpos específicos (Domínguez *et al.*, 2010) así como en el ovario de *Ornithogalum umbellatum* L. (Kwiatkowska *et al.*, 2014), lo que refuerza su posible papel en el desarrollo de la cutícula, interviniendo en sus estadios iniciales.

En los últimos años, el fruto de tomate se ha convertido en un modelo ampliamente utilizado para el estudio de diversos aspectos de la cutícula. Ello es debido en buena parte a que presenta una cutícula fácilmente extraíble y manejable, pero quizás su característica más reseñable radica en su composición, ya que su cutina está constituida por

polihidroxiácidos grasos  $C_{16}$ , los cuales están presentes en las cutículas de numerosas especies vegetales. En base a ello se han descrito cuáles son los estadios en los que se produce la máxima deposición de material cuticular y el mayor incremento del grosor de la cutícula del fruto de tomate (Domínguez *et al.*, 2008). Igualmente, se han descrito los cambios que acontecen durante el desarrollo de su pared celular más externa (ver capítulo 1). Por tanto, la epidermis del fruto puede considerarse un escenario apropiado para el estudio de cada una de las hipótesis postuladas, para así determinar de qué modo contribuye cada mecanismo de síntesis en la deposición de la cutina en la pared celular más externa y en el desarrollo de la cutícula definitiva. Este constituye el objetivo principal de este capítulo.



## MATERIAL Y MÉTODOS

### Material vegetal e instalaciones

Los diferentes experimentos que se engloban en el presente capítulo se llevaron a cabo en plantas de *Solanum lycopersicum* L. Cascada, las cuales cultivadas durante la campaña de primavera-verano del año 2013. Los ensayos de campo se realizaron en las instalaciones de la Estación Experimental La Mayora, perteneciente al Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea (IHSM), situado en el término municipal de Algarrobo (Málaga), al sudeste de España. Previamente, las semillas fueron cultivadas en un invernadero específico cuyo diseño minimiza la entrada de insectos. Una vez que alcanzaron el estadio de crecimiento con tres hojas verdaderas, se transplantaron al suelo en un invernadero de plástico donde fueron distribuidas al azar en tres bloques, conteniendo 10 plantas cada bloque. El espacio entre las distintas hileras fue de 1.5 m, y de 0.5 m dentro de cada hilera. Las plantas se regaron con una solución nutritiva (Cánovas, 1995) y, con objeto de mantenerlas erguidas, se sostuvieron con cuerdas y se podaron a un solo tallo. Posteriormente, se realizó el marcaje de un gran número de flores en antesis y, por último, se procedió a la recolección pormenorizada de un gran número de frutos correspondientes a estadios concretos, que abarcan desde la formación del ovario hasta los 55 días después de la antesis (dda).

### Fijación de las muestras

De forma previa a la inclusión de las muestras se obtuvieron pequeños fragmentos procedentes de la zona ecuatorial del pericarpo de los frutos para su fijación por inmersión. De cada uno de los estadios de desarrollo a analizar se reunieron 3 trozos de pericarpo procedentes de diferentes frutos. Inmediatamente después de su obtención se sumergieron en paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0.1 M pH 7.4 y se almacenaron a 4°C durante un 24 h. Otro conjunto de muestras fue procesado de igual manera, y transcurrido ese tiempo, se lavaron en el mismo tampón y se realizó sobre ellos una segunda fijación mediante su inmersión en tetróxido de osmio ( $\text{OsO}_4$ ) al 1% en agua destilada durante 1 h.



### **Inclusión de las muestras en resina LR White**

- **Deshidratación:** tras lavar en tampón y posteriormente en agua las muestras fijadas con paraformaldehído y OsO<sub>4</sub>, estas fueron deshidratadas sumergiéndolas en diluciones seriadas de etanol al 50% (15 min), 70% (15 min), 90% (10 min) y 100% (10 min).
- **Preinfiltración:** para favorecer el contacto entre la muestra y la resina se realizó un paso previo a la infiltración que consistió en someter a los tejidos a una mezcla de resina y etanol 100% en una proporción 1:1 durante 24 h.
- **Infiltración:** la inclusión en la resina comprendió dos pasos, el primero de 2 h de duración y el segundo de 1 h. Para favorecer su infiltración en los tejidos, las muestras se mantuvieron en un rotor a lo largo del proceso.
- **Polimerización:** los fragmentos fueron traspasados al interior de cápsulas BEEM<sup>®</sup>, cubiertos con resina y almacenados a 65°C durante 48 h.

### **Inclusión en resina Unicryl**

- **Deshidratación:** las muestras fijadas únicamente con paraformaldehído fueron lavadas previamente en tampón fosfato (3 pasos de 10 min) y posteriormente en agua. Tras los lavados, fueron deshidratadas sumergiéndolas en diluciones seriadas de etanol al 70%, 90% y 100% (3 pasos de 10 min para cada dilución).
- **Infiltración:** la inclusión en la resina se realizó en tres pasos, los dos primeros de 1 h de duración y un último paso en el cual las muestras se mantuvieron en resina toda la noche. Los fragmentos se mantuvieron en un rotor para promover su infiltración en los tejidos.
- **Polimerización:** las muestras fueron traspasadas al interior de cápsulas BEEM<sup>®</sup>, donde se cubrieron de nuevo con resina. La polimerización se realizó a 4°C con dos lámparas de UV (360 nm) de 8 W cada una, situadas a una distancia de 15 cm de las cápsulas, durante 2 días.

### **Obtención de cortes**

Una vez que las muestras fueron incluidas se realizaron cortes ultrafinos transversales de un grosor aproximado de 50 nm. Para ello se emplearon cuchillas de vidrio y un

ultramicrotomo Reichert-Jung modelo Ultracut-E (Reichert Technologies, Viena, Austria). Los cortes obtenidos fueron recogidos y almacenados en rejillas de níquel para su posterior análisis.

### **Microscopía electrónica de transmisión (MET)**

La observación y el análisis de los cortes ultrafinos se realizaron a través de un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1400 (Akishima, Tokio, Japón) acoplado a un captador de imágenes de 11 megapíxeles, a una aceleración de voltaje de 80 kV. El software usado para la captura de las imágenes fue Digital Micrograph™ (Gatan).

### **Generación de anticuerpos anti-*cutinsomas***

La obtención de estos anticuerpos ha sido descrita en Domínguez *et al.* (2010). Brevemente, se inmunizaron intraperitonealmente dos ratones hembras BALB/c con 50  $\mu$ L de una dispersión de *cutinsomas* emulsificada con el mismo volumen adyuvante completo de Freund (Sigma Aldrich, España). Las siguientes inmunizaciones se administraron 2 y 4 semanas después en adyuvante incompleto de Freund. Las respuestas de los animales fueron evaluadas por ELISA (acrónimo del inglés *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*, esto es, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas), usando el suero obtenido 10 días después de cada inmunización.

### **Técnicas inmunohistoquímicas**

En primer lugar, aquellos cortes fijados con OsO<sub>4</sub> fueron tratados con peróxido de hidrógeno al 10% durante 15 min con objeto de eliminar el mismo, ya que este podría enmascarar el reconocimiento del antígeno por su correspondiente anticuerpo. Transcurrido ese tiempo, se lavaron con agua destilada y más tarde en tampón fosfato salino (PBS) 0.01M pH 7.4 (Kwiatkowska *et al.*, 2013). Tras los lavados se realizó un bloqueo de los sitios de unión inespecíficos de los anticuerpos al tejido. Para ello, las muestras se pusieron en contacto con pequeñas gotas de BSA (Albúmina de suero bovino, del inglés *Bovine serum albumin*) al 3% en PBS. Transcurrida 1 h, los cortes se incubaron bien en una dilución 1:300 en tampón PBS en el caso de los anticuerpos anti-CUS1, los cuales fueron amablemente cedidos por la Dra. Bénédicte Bakan, del Institut National de la Recherche Agronomique (Nantes, Francia), o en una dilución 1:50 para los anticuerpos

anti-*cutinsomas*. Simultáneamente, se realizaron controles negativos sin el anticuerpo primario correspondiente, poniendo los cortes en contacto únicamente con la solución diluyente. Después de 1.5 h se realizó una serie de tres lavados en tampón PBS tras la cual las rejillas se pusieron en contacto una dilución 1:50 de los anticuerpos secundarios durante 1 h. Para detectar la proteína CUS1 se emplearon anticuerpos anti-IgG de conejo generados en cabra acoplados a partículas de oro coloidal de 10 nm de diámetro, mientras que en el caso de los *cutinsomas* se utilizaron anticuerpos anti-IgG de ratón generados en cabra, con partículas de oro coloidal de 25 nm de diámetro (Aurion, Wageningen, Países Bajos). A continuación, los cortes se lavaron con PBS y con agua y se tiñeron con una solución de acetato de uranilo al 4% durante 15 min. Finalmente, las muestras volvieron a lavarse cuidadosamente con agua destilada. Todos estos pasos se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

La densidad de marcaje, expresada como número de partículas de oro por unidad de área ( $\mu\text{m}^2$ ), fue estimada mediante un programa de captura y análisis de imagen (Visilog v. 6.3; Noesis, Crolles, Francia). Para cada estadio de desarrollo se analizaron un total de 30 micrografías correspondientes a 3 réplicas biológicas. Los datos se expresaron como la media  $\pm$  error estándar.

## Bioinformática

Las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de los diferentes genes y proteínas CUS analizados en este capítulo fueron obtenidas de la base de datos *Sol Genomics Network* (SGN, <http://solgenomics.net/>), en la cual se encuentra recogido el genoma completo de *Solanum Lycopersicum* L. Una vez reunidas se alinearon por medio del programa ClustalX 2.0 (Larkin *et al.*, 2007). El alineamiento de las secuencias aminoacídicas de los distintos miembros de familia CUS se muestra en la Figura 2.1. Los posibles marcos abiertos de lectura se identificaron con la herramienta ORF Finder, mientras que la comparación entre pares de secuencias aminoacídicas se llevó a cabo a través de la herramienta BLAST 2 Seq, ambas proporcionadas por el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, USA). Por otra parte se realizó el diseño de cebadores con el programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) (Rozen y Skaletsky, 1999), los cuales fueron comparados con el genoma completo del tomate mediante la herramienta In Silico PCR (<http://solgenomics.net/>).



manteniendo en todo momento las condiciones de congelación. Una vez homogeneizado, el material se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior procesamiento. Este procedimiento se llevó a cabo por triplicado para cada uno de los estadios.

La extracción de ADN se realizó con DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El aislamiento de ARN se llevó a cabo por dos procedimientos alternativos en base al estadio de desarrollo. Las muestras fueron tratadas con el kit RNeasy Plant (Qiagen, USA) en el caso de los frutos de estadios iniciales, mientras que para los estadios de 25 dda en adelante se utilizó Trizol<sup>®</sup> (Life Technologies, USA). En estos últimos el número de células por cantidad de tejido es menor que en los frutos de estadios iniciales debido a que las células del epicarpo son de un tamaño mayor. Esta circunstancia podría causar que la cantidad de ARN extraída sea más baja, razón por la cual se utilizó una metodología diferente que permitiera manejar una cantidad de tejido superior a la que permite el Kit RNeasy Plant. El ARN obtenido mediante el protocolo con Trizol<sup>®</sup> genera impurezas, por lo que fue necesario utilizar el kit Nucleospin RNA-clean up (Macherey-Nagel, Alemania) para eliminarlas. Con independencia del protocolo de extracción utilizado, las muestras se sometieron a un tratamiento con RNase-free DNase (Qiagen, USA) con objeto de eliminar el ADN genómico.

### **Cuantificación de ADN y ARN**

Para cuantificar tanto el ADN como el ARN extraído se determinó la absorbancia de luz UV a 260nm ( $A_{260}$ ) de cada una de las muestras en un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, España). De esta manera, se estimó la concentración del ácido nucleico y al mismo tiempo se recogieron los datos espectrales completos con objeto de evaluar su pureza y determinar la posible existencia de determinados contaminantes mediante el análisis de las proporciones  $A_{260}/A_{280}$  y  $A_{260}/A_{230}$ . La primera arroja información sobre la presencia de proteínas o de fenol, y su valor se situó entre 1.7 y 1.9, que el caso del ADN, y en torno a 2 en el caso del ARN. La segunda es indicativa de la aparición de contaminantes como el EDTA, los carbohidratos o igualmente de fenol, y osciló entre 1.8 y 2.2. Tras la cuantificación y el análisis de la pureza se procedió a valorar la eficiencia del ácido nucleico extraído mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) en tampón TAE 1X.





## Síntesis de ADNc

La síntesis de ADN complementario (ADNc) se llevó a cabo a partir del ARN total extraído, empleando el kit Super Script III First-Strand Synthesis Super Mix for qRT-PCR (Invitrogen, USA) según el protocolo descrito por el fabricante. El ADNc resultante se alícuotó y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Por cada estadio de desarrollo del fruto se realizaron un total de 3 réplicas biológicas.

## RT-PCR cuantitativa a tiempo real

El análisis de la expresión génica de los distintos miembros de la familia CUS en el pericarpo del fruto de tomate se llevó a cabo mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real por medio de un termociclador Bio-Rad C1000 acoplado a un sistema de detección CFX96™ Real-Time PCR (Bio-Rad, USA). Para ello se empleó el kit SsoAdvanced™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, USA) en base a las instrucciones del fabricante, para un volumen final de reacción de  $20\ \mu\text{L}$  con una concentración  $0.125\ \mu\text{M}$  de cebadores y  $25\ \text{ng}$  ADNc por reacción. Las reacciones de amplificación se efectuaron en placas de 96 pocillos (Applied Biosystems, USA) bajo las siguientes condiciones: un ciclo inicial de 3 min a  $95^{\circ}\text{C}$ , seguido por 40 ciclos de 15 s a  $95^{\circ}\text{C}$ , 15 s a  $58^{\circ}\text{C}$  y 20 s a  $72^{\circ}\text{C}$ , y un ciclo final de 10 s a  $95^{\circ}\text{C}$ . Por cada estadio de desarrollo y cada uno de los genes CUS se analizaron un total de 3 réplicas biológicas. Con objeto de normalizar las muestras se emplearon 3 genes endógenos recomendados por Expósito-Rodríguez *et al.* (2008) para el análisis de la expresión génica en frutos de tomate: *CAC* (Solyc08g006960), *EXPRESSED* (Solyc07g025390) y *SAND* (Solyc03g115810). La cantidad relativa de los transcritos (RQ) de los diferentes genes CUS se determinó por el método  $\Delta\text{Ct}$  considerando la eficiencia de los cebadores (Pfaffl, 2001) e incluyendo los genes endógenos (Vandesompele *et al.*, 2002). La eficiencia de los cebadores se calculó mediante curvas de calibración con un  $R^2 > 0.99$  y un error  $\leq 0.05$ , las cuales fueron elaboradas a partir de diluciones seriadas cuyo rango de concentración abarcaba 3 órdenes de magnitud (Bustin *et al.*, 2009). Los cebadores usados para la amplificación y sus correspondientes eficiencias se muestran en la Tabla 2.1.

**Tabla 2.1. Secuencias de cebadores usados para el análisis de expresión génica de los miembros de la familia CUS mediante PCR cuantitativa a tiempo real.** Para cada una se indica la longitud en pares de bases (pb) del amplicón generado y la eficiencia de amplificación. <sup>1</sup> Girard *et al.* (2012), <sup>2</sup> este trabajo, <sup>3</sup> Expósito-Rodríguez *et al.* (2008).

<b>Símbolo gen</b>	<b>Locus gen</b>	<b>Secuencia de cebadores sentido y antisentido (5'-3')</b>	<b>Longitud (pb)</b>	<b>Eficiencia</b>
<i>CUS 1</i>	Solyc11g006250 <sup>1</sup>	GCAACACTTCATGTTGTGCTACTT CAATATCACACTCCACCCTACAAA	110	0.928
<i>CUS 2</i>	Solyc04g050730 <sup>2</sup>	ATCCACCAAACGCATATTCATTT CACAAAATGCAAGCACTAAAAGT	115	0.952
<i>CUS 3</i>	Solyc04g050570 <sup>2</sup>	TCACACCAAACATATACACACA AGAATGAATGAACTAGGTGGTGT	81	0.912
<i>CUS 4</i>	Solyc06g083650 <sup>2</sup>	ACCTCGTGCTTTCTTTGTGT AGGTGGAGAATCTGCCCTTG	91	1.002
<i>CUS 5</i>	Solyc09g063060 <sup>2</sup>	ACATGTACTCTCAGGGGATCA ACGTAAAACATGACAATCCGGA	88	0.999
<i>CAC</i>	Solyc08g006960 <sup>3</sup>	CCTCCGTTGTGATGTAACCTGG ATTGGTGGAAAGTAACATCATCG	173	0.918
<i>EXP</i>	Solyc07g025390 <sup>3</sup>	GCTAAGAACGCTGGACCTAATG TGGGTGTGCCTTTCTGAATG	183	0.957
<i>SAND</i>	Solyc03g115810 <sup>3</sup>	TTGCTTGGAGGAACAGACG GCAAACAGAACCCTGAATC	164	0.944



## RESULTADOS

Tal y como se ha comentado en el capítulo 1 de esta tesis, en la pared celular más externa pueden distinguirse dos zonas bien definidas: una región no cutinizada, correspondiente a la parte polisacáridica de la pared, y una región cutinizada, más externa, rica en material lipídico. A fin de determinar en estas regiones la presencia y la localización tanto de los *cutinsomas* como de la proteína CUS1 se realizaron diversos ensayos de inmunolocalización sobre cortes de epidermis de frutos de tomate de un amplio abanico de estadios de desarrollo, desde el ovario hasta el estadio de rojo maduro. Una vez concluidos se procedió al análisis de la densidad de marcaje de los distintos anticuerpos, cuyos valores medios se recogen en la Tabla 2.2. Estos datos permitieron, por un lado, confirmar la presencia tanto de los *cutinsomas* como de la CUS1 en la epidermis de los frutos de tomate. Asimismo, en ambos casos se constató la ausencia de marcaje en las capas celulares localizadas por debajo de la epidermis. La enzima CUS1 fue detectada a lo largo de los primeros 20 días de desarrollo del fruto. Una vez alcanzado ese estadio, la densidad de marcaje disminuye de manera significativa hasta ser prácticamente nula entre el periodo comprendido entre los 30 dda y la maduración. En los estadios iniciales del desarrollo también se registró la presencia de los *cutinsomas*, pero en su caso el marcaje quedó restringido únicamente a los estadios comprendidos entre el ovario y los 10 dda, ambos inclusive. Cabe destacar que el valor máximo en la densidad de marcaje se alcanzó de forma casi simultánea en ambos casos, abarcando un espacio de tiempo muy limitado comprendido desde los 7 dda, momento en el cual se produjo el pico de densidad de CUS1, hasta los 9 dda, en el que tuvo lugar el de los *cutinsomas*.



**Tabla 2.2. Densidad de marcaje de CUS1 y de cutinsomas durante el desarrollo del fruto de tomate.** Los datos están expresados como la media del número de partículas de oro por  $\mu\text{m}^2 \pm$  error estándar. dda, días después de antesis. (-), no hay marcaje o las partículas de oro se encuentran muy dispersas. Los controles sin anticuerpos primarios mostraron una densidad de marcaje  $< 0.15$ .

Estadio (dda)	CUS1	Cutinsomas
ovario	4.03 $\pm$ 0.28	1.17 $\pm$ 0.11
2	3.24 $\pm$ 0.32	0.93 $\pm$ 0.09
5	3.70 $\pm$ 0.23	0.78 $\pm$ 0.10
7	5.25 $\pm$ 0.31	0.76 $\pm$ 0.07
9	3.84 $\pm$ 0.31	1.95 $\pm$ 0.11
10	2.98 $\pm$ 0.20	0.26 $\pm$ 0.04
15	3.21 $\pm$ 0.21	-
20	2.37 $\pm$ 0.16	-
25	0.68 $\pm$ 0.05	-
35	-	-
45	-	-
55	-	-

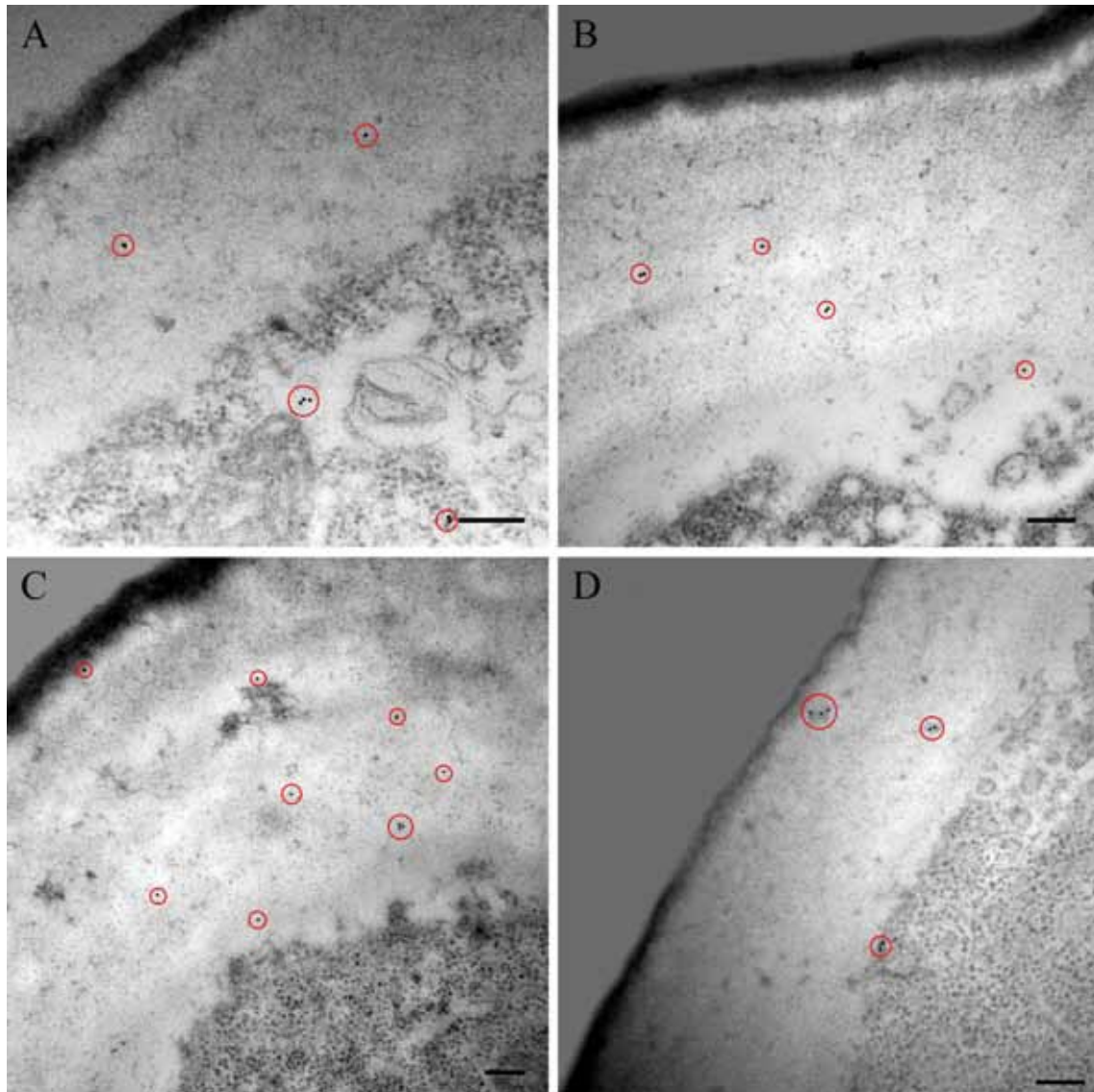
### Immunolocalización de la proteína CUS1

Los ensayos de inmunolocalización de CUS1 no solo revelaron diferencias temporales a lo largo del desarrollo sino que también se observaron cambios espaciales significativos, pudiendo distinguirse distintas localizaciones de la proteína en función del estadio en el que se encuentre el fruto. Así, en los estadios tempranos del crecimiento de este órgano, más concretamente desde la antesis a los 6 dda, CUS1 se ubica exclusivamente en el interior de las células epidérmicas y en aquella zona de la pared celular más externa que no está cutinizada (Fig. 2.2, A-D). 7 dda podría considerarse como un estadio de transición en el que además de situarse en dichas regiones también está presente en la cutícula (Fig. 2.3, A). Sin embargo, la enzima abandona el interior celular a partir de los 8 dda, aunque sigue encontrándose tanto en la región cutinizada de la pared celular más externa como en la no cutinizada (Fig. 2.3, B-C). Una vez que el fruto alcanza los 10 días de desarrollo y hasta el estadio de 25 dda la proteína se localiza únicamente en la zona cutinizada (Fig. 2.3, D).

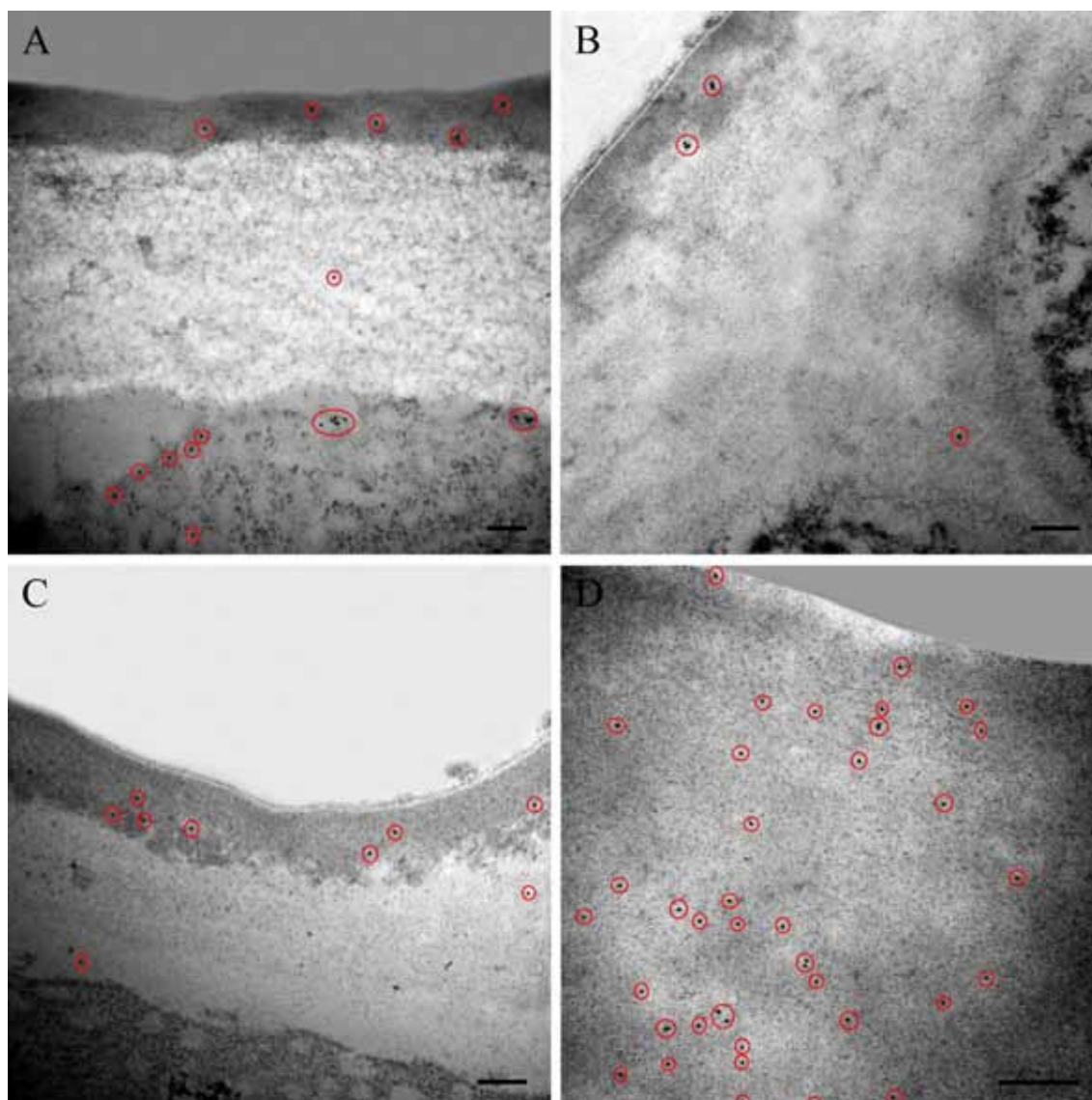
Asimismo, la ausencia de un patrón de distribución uniforme queda patente en las imágenes recogidas en las Figuras 2.2 y 2.3. Por un lado, en aquellos estadios en los que la proteína está presente en el interior de las células epidérmicas se puede observar que su localización queda restringida a la parte más apical de la célula, en estrecha proximidad con la membrana plasmática y la pared celular más externa (Figs. 2.2, A y D y 2.3, A). En aquellos frutos en los que la proteína se detecta en la región cutinizada y en la no

cutinizada las partículas de oro se encuentran en su mayor parte cerca de la parte interna de la cutícula (Fig. 2.3, A-C). Sin embargo, en estadios posteriores, donde CUS1 se distribuye únicamente por la cutícula, no es posible distinguir regiones con una mayor o menor densidad de marcaje, ya que se dispone de forma indistinta a lo largo de la misma (Fig. 2.3, D).

En las Figuras 2.2 y 2.3, A-C se puede distinguir la procutícula, una capa delgada, electrodensa y de naturaleza uniforme. Como ya se comentó en el capítulo 1, la cara interna de esta procutícula no es homogénea sino que presenta una naturaleza globular debido al acúmulo de gotas electrodensas de tamaño variable (Figs. 2.2, C y D y 2.3, A-C). Los diversos ensayos de inmunolocalización constataron que CUS1 no se localiza en el interior de estas gotas osmiofílicas, aunque cabe destacar que en determinados casos las partículas de oro se encontraron en estrecha proximidad con esos glóbulos, tal y como muestra la Figura 2.2, D. La morfología irregular de la cara interna de la cutícula desaparece a los 10 dda, estadio que coincide con el momento en el que CUS1 sufre un cambio en su distribución y se localiza únicamente en esta capa (Fig. 2.3, D).



**Figura 2.2:** Inmunolocalización de la proteína CUS1 en cortes transversales de la epidermis de frutos de tomate Cascada durante los primeros seis días de crecimiento. **A:** Ovario. **B:** 2 dda. **C:** 5 dda. **D:** 6 dda. Las partículas de oro se marcan con círculos rojos. Barra: 0.2  $\mu$ m. dda: días después de antesis.



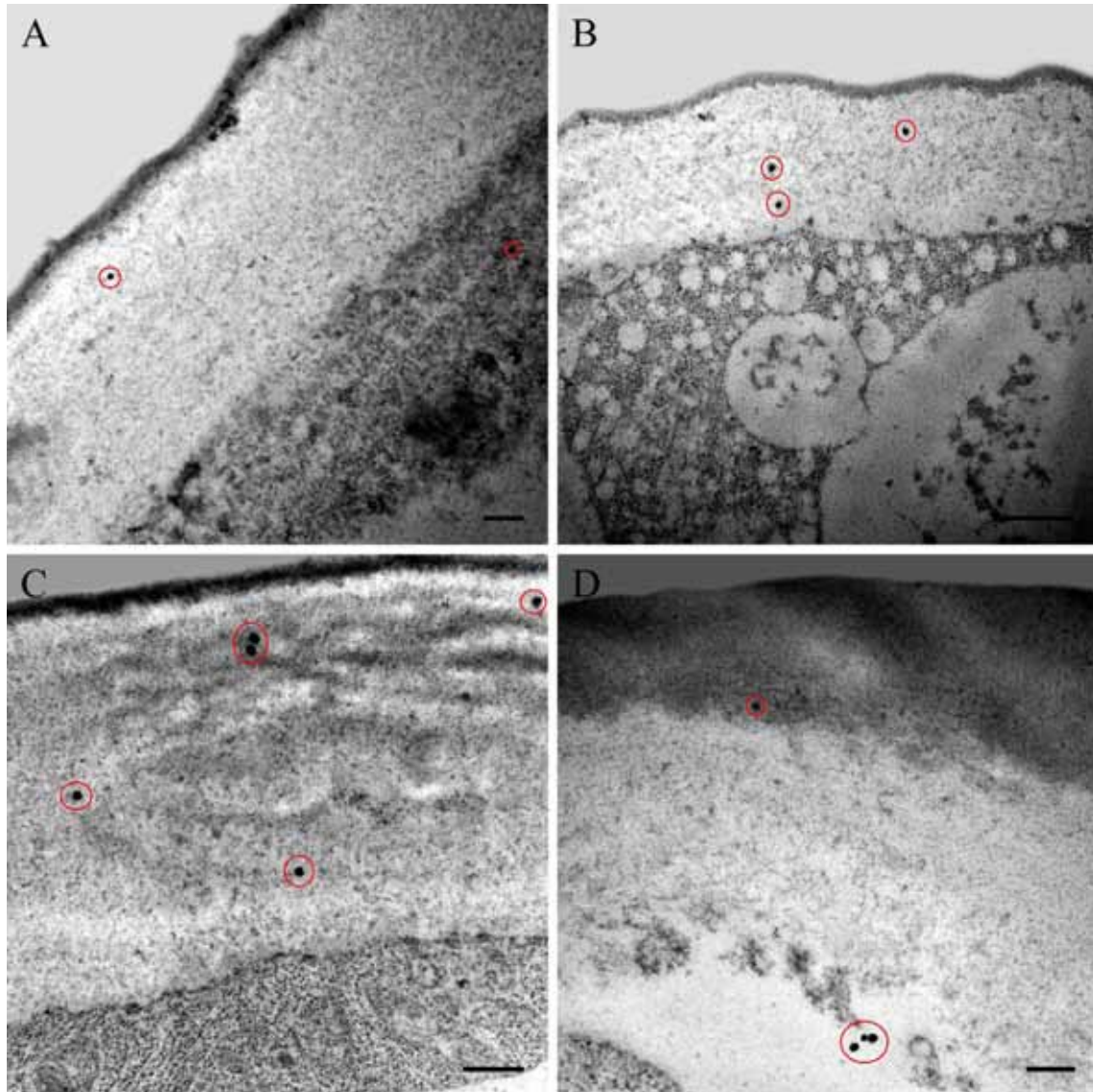
**Figura 2.3:** Inmunolocalización de la proteína CUS1 en cortes transversales de la epidermis de frutos de tomate Cascada. **A:** 7 dda, barra: 0.2  $\mu\text{m}$ . **B:** 8 dda, barra: 0.2  $\mu\text{m}$ . **C:** 9 dda, barra: 0.2  $\mu\text{m}$ . **D:** 10 dda, barra: 0.5  $\mu\text{m}$ . Las partículas de oro se muestran rodeadas por círculos rojos. dda, días después de antesis.

### Inmunolocalización de los *cutinsomas*

A diferencia de lo observado en los distintos ensayos de inmunolocalización realizados para la proteína CUS1, el marcaje de los *cutinsomas* mediante anticuerpos específicos no reveló ninguna modificación destacable a lo largo del desarrollo en lo referente a su localización en el pericarpo del fruto. Estas nanopartículas se encuentran en la región más externa del interior de las células epidérmicas, próximas a la membrana plasmática, así como en la región no cutinizada de la pared celular más externa (Fig. 2.4, A-D). Esta distribución se mantiene desde el momento de la antesis hasta los 10 días de desarrollo del fruto y solo de forma excepcional se encontraron partículas de oro en el interior de la



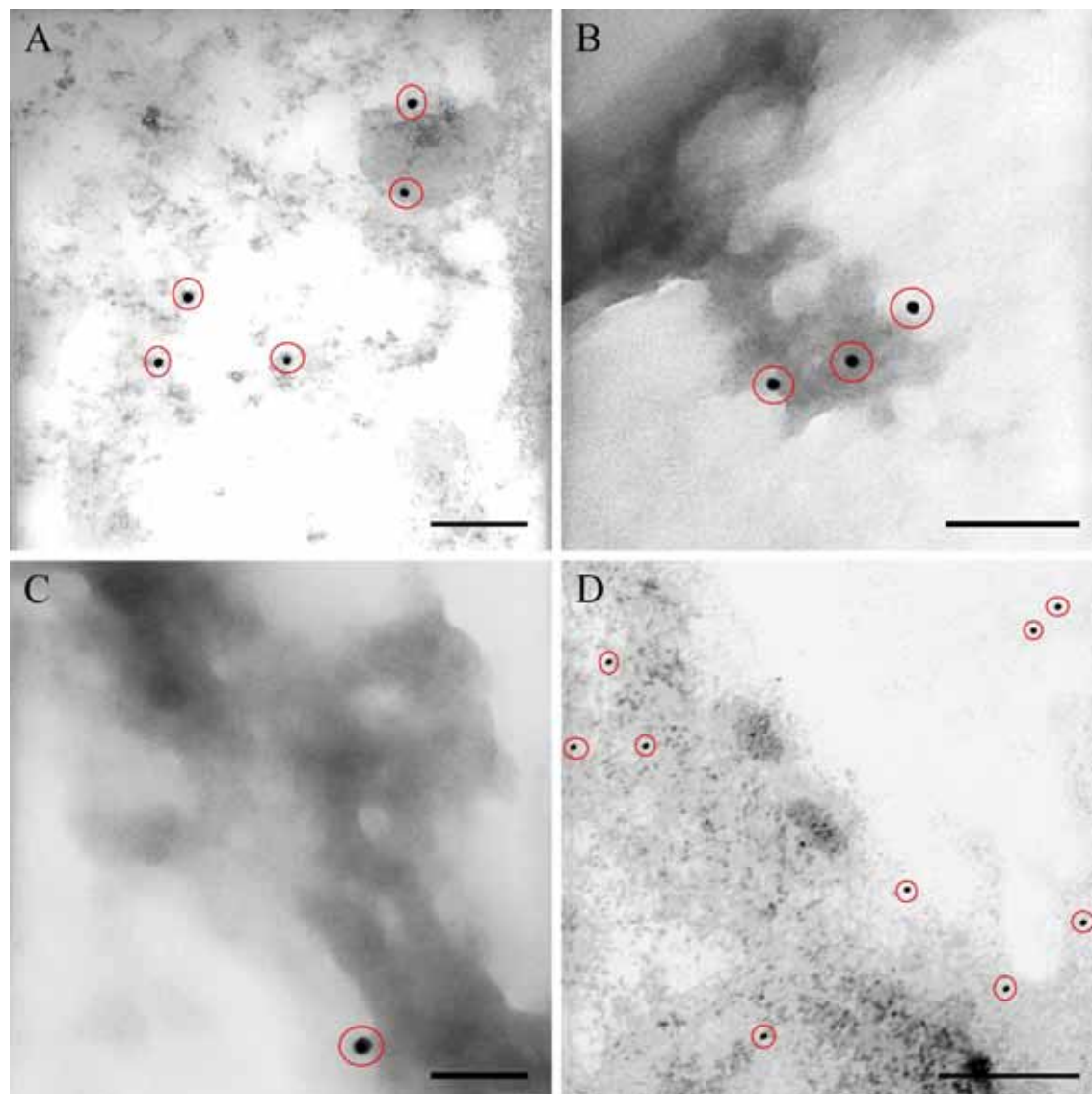
procutícula. En estos casos, el marcaje quedó restringido a la parte más interna de esta capa, cerca de la región no cutinizada (Fig. 2.4, D).



**Figura 2.4:** Inmunolocalización de *cutinsomas* en cortes transversales de la epidermis de frutos de tomate Cascada. **A:** Ovario, barra 0.2  $\mu\text{m}$ . **B:** 2 dda, barra: 0.5  $\mu\text{m}$ . **C:** 7 dda, barra: 0.5  $\mu\text{m}$ . **D:** 9 dda, barra: 0.2  $\mu\text{m}$ . Las partículas de oro se marcan con círculos rojos. dda: días después de anthesis.

Adicionalmente, se tomó una serie de imágenes de MET a mayor resolución con el objetivo de constatar la presencia de los *cutinsomas* en aquellos frutos que no habían sido tratados con  $\text{OsO}_4$  (Fig. 2.5). En estas imágenes se puede observar que la superficie interna de la procutícula presenta una estructura amorfa en la cual se agrupan un gran número de glóbulos electrodensos que están en estrecho contacto con esta capa, aunque también pueden distinguirse en sus proximidades (Fig. 2.5, A-C). En estas regiones de la pared celular más externa donde se acumula material electrodenso fue posible detectar marcaje de los *cutinsomas* (Fig. 2.5, A-C). Por último, la Figura 2.5, D muestra una imagen de alta 100

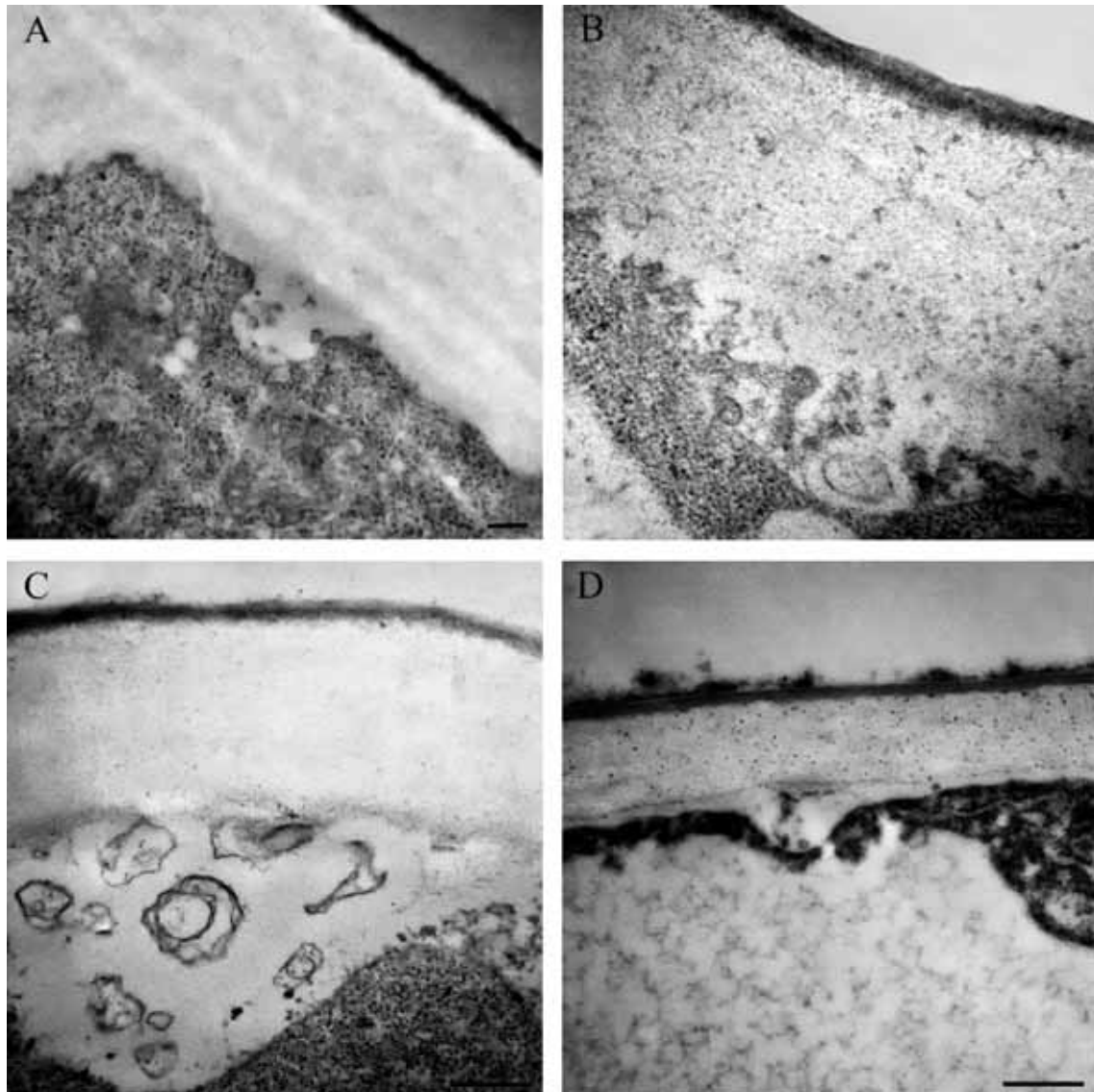
resolución donde se acumulan partículas de oro tanto en el interior como en el exterior de una célula epidérmica, distribuyéndose por la cara interna de la región no cutinizada de la pared celular más externa.



**Figura 2.5:** Imágenes a alta magnificación de la epidermis de frutos de tomate Cascada de 5 días de desarrollo en las que se muestra la inmunolocalización de los *cutinsomas*. **A-B:** Barra: 0.2  $\mu\text{m}$ . **C:** barra: 100 nm. **D:** barra: 500 nm. Los círculos rojos enmarcan las partículas de oro.

### Otras observaciones microscópicas

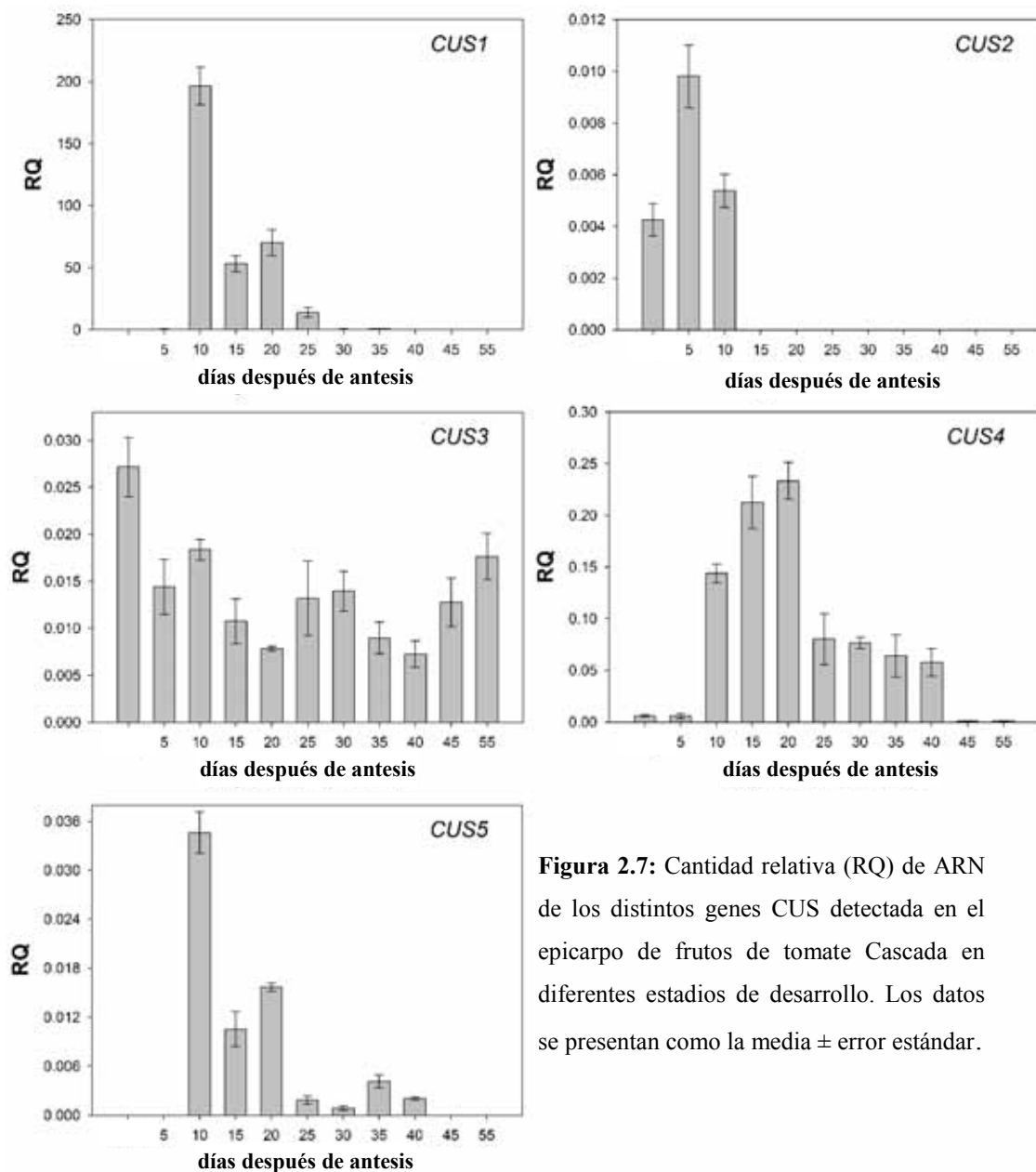
Es importante constatar que en un elevado número de células epidérmicas se ha observado que durante el periodo comprendido entre los 6-8 dda la membrana plasmática adquiere un aspecto sinusoidal por la región apical. Al mismo tiempo, aparecen vesículas o acúmulos de material electrodensos rodeados por el plasmalema y que parecen migrar hacia la pared celular más externa (Fig. 2.6).



**Figura 2.6:** Imágenes de MET correspondientes a la región apical de diversas células epidérmicas de frutos de tomate Cascade. En ellas se muestra la ondulación de la membrana plasmática en aquellas zonas donde se acumulan vesículas o material electrodensó en el espacio periplasmático. **A:** 6 dda, barra: 0.2  $\mu\text{m}$ . **B:** 7 dda, barra: 0.2  $\mu\text{m}$ . **C:** 7 dda, barra: 0.5  $\mu\text{m}$ . **D:** 8 dda, barra: 0.5  $\mu\text{m}$ . dda: días después de antesis.

### Expresión de las proteínas CUS

Como se ha indicado en la introducción de este capítulo, la proteína CUS1 se engloba dentro de una familia génica que en el caso del tomate está comprendida por 5 miembros (Yeats *et al.*, 2014). La comparación de las secuencias aminoacídicas correspondientes a estos 5 miembros de la familia CUS dio como resultado un porcentaje de identidad del 50.7%. Aunque CUS2 y CUS3 son los genes que muestran una mayor identidad con respecto a CUS1 (76% y 74%, respectivamente), el número de residuos de CUS4 y CUS5 idénticos a CUS1 también resultó ser muy elevado (69% y 67%, respectivamente).



**Figura 2.7:** Cantidad relativa (RQ) de ARN de los distintos genes CUS detectada en el epicarpo de frutos de tomate Cascada en diferentes estadios de desarrollo. Los datos se presentan como la media  $\pm$  error estándar.

Una vez comparadas sus secuencias aminoacídicas se analizaron los niveles de expresión de los miembros de la familia CUS en la epidermis del fruto de tomate a lo largo del desarrollo. Los resultados obtenidos se muestran en las gráficas de la Figura 2.7. Por un lado, estos resultados indican que la totalidad de los genes que componen la familia CUS se expresan en la epidermis del fruto de tomate, siendo CUS1 el que alcanza, con gran diferencia con respecto al resto, el mayor nivel de expresión. En el caso de CUS1, el máximo de expresión se alcanza a los 10 dda. A partir de ese estadio, su expresión disminuye hasta alcanzar un mínimo a los 25 dda, ya que en el intervalo comprendido entre los 30 dda y el estadio de maduración prácticamente no se registró expresión de este gen.



En cuanto a CUS2, solo se observó expresión en los primeros estadios de desarrollo, concretamente desde el momento de la anthesis hasta los 10 dda. En cambio, tanto CUS3 como CUS4 se expresan a lo largo del desarrollo en la totalidad de los estadios analizados, produciéndose un pico de expresión de CUS4 entre los 10 y los 20 dda. Por último, se observó que CUS5 se expresa únicamente desde los 10 dda hasta que comienza la maduración del fruto.



## DISCUSIÓN

### Implicación de la aciltransferasa CUS1 en la formación de cutina

CUS1 es una lipasa/hidrolasa con un dominio GDSL de la que se ha descrito su participación en la síntesis del biopolímero de cutina (Girard *et al.*, 2012; Yeats *et al.*, 2012). Su implicación directa en la deposición del material cutínico fue puesta de manifiesto por primera vez con la caracterización fenotípica de *cutin deficient 1(cd1)*, una mutación que conlleva una disminución significativa en la cantidad de cutina del fruto de tomate maduro (Isaacson *et al.*, 2009). CUS1 se expresa en el pericarpo y, tal y como han revelado diferentes ensayos de inmunolocalización de la proteína, presenta una localización extracelular, mayoritariamente por la región cutinizada de la pared celular más externa (Girard *et al.*, 2012; Yeats *et al.*, 2012). Además de expresarse en este tejido, se encuentra en las hojas, y en menor grado, en las flores y en los tallos de tomate (Yeats *et al.*, 2012).

Los resultados que se recogen en este capítulo muestran una fuerte correlación entre la expresión génica de CUS1 y su inmunolocalización. Dados los niveles de expresión tan bajos que los restantes miembros de la familia CUS muestran en el tejido epidérmico, se ha obviado la posibilidad de que los anticuerpos utilizados pudieran reconocer los epítomos de las otras proteínas CUS a consecuencia de la alta similitud entre sus secuencias. Por otra parte, se ha observado que los niveles de expresión de CUS1 durante la antesis y a los 5 dda son bajos a pesar de que los ensayos inmunológicos revelan que en esos estadios del desarrollo la proteína se localiza en el interior celular. Esta discrepancia podría ser debida a un factor de dilución derivado del método de extracción del RNA empleado. A diferencia de los restantes, los frutos correspondientes a estos estadios no pudieron ser pelados debido a su tamaño tan reducido, con lo que la extracción tuvo que realizarse a partir del fruto entero. Por otro lado, el pico de expresión observado entre los 10 y los 20 días de desarrollo coincide con el momento en el que la proteína comienza a localizarse en su escenario molecular natural: la cutícula en crecimiento. Estos resultados concuerdan con el incremento tan pronunciado de la cantidad de cutícula registrado durante este periodo por Domínguez *et al.* (2008). En este punto cabe recordar que las pectinas de naturaleza ácida se hallan en la pared celular más externa durante el periodo comprendido entre la antesis y los 7 primeros días de desarrollo del fruto (como se describió en el capítulo 1). El



momento en el que CUS1 comienza a ubicarse en la región cutinizada coincide por tanto con el estadio en el que las pectinas ácidas son menos abundantes. Sin embargo, se ha descrito que la actividad óptima de CUS1 se alcanza a un valor de pH en torno a 5 (Yeats *et al.*, 2014). Por ello, sería necesaria una investigación más profunda sobre este aspecto que permita clarificar cómo afecta este descenso de la cantidad de las pectinas no esterificadas al pH del apoplasto, o más concretamente, al pH de la cutícula en crecimiento.

La expresión de CUS1 se reduce notablemente a los 25 dda hasta llegar a ser prácticamente nula a partir de los 30 dda. Sin embargo, se ha visto que el crecimiento del fruto del tomate continúa hasta el estadio de rojo maduro (Domínguez *et al.*, 2012) y que además, la cantidad de cutícula del mismo no disminuye durante los estadios finales del desarrollo, sino que permanece invariable e incluso puede llegar a aumentar (Domínguez *et al.*, 2008; España *et al.*, 2014). Asimismo, tal y como se corroboró en el capítulo anterior, aproximadamente el 50% de la expansión de la superficie del fruto ocurre desde los 25 dda hasta el estadio final de desarrollo, lo cual hace pensar que en ese periodo se produce una deposición lipídica adicional. Por lo tanto, cabe inferir en la existencia de otro mecanismo, o muy probablemente, en la implicación de otra enzima u enzimas, en la deposición de cutina durante los estadios finales del desarrollo del fruto. Esta idea se reafirma con los resultados obtenidos previamente por Isaacson *et al.* (2009) en los tomates *cd1*, en los cuales la deposición de cutina permanece invariable desde el estadio verde inmaduro hasta el rojo maduro.

Los ácidos grasos polihidroxiados que componen la cutina del fruto del tomate conforman un polímero fuertemente entrecruzado debido a la participación tanto de los hidroxilos primarios como de los secundarios (Domínguez *et al.*, 2015). Sin embargo, se han descrito estudios *in vitro* de la actividad de CUS1 en los que se señala que la cutícula es el resultado de una polimerización lineal en la que la esterificación solo se produce entre la “cabeza” y la “cola” de los ácidos grasos constituyentes de la cutina (Yeats *et al.*, 2014). Recientemente, se ha constatado que en la cutina de frutos en las que existe una regulación negativa de CUS1 se produce una disminución en la proporción relativa de los hidroxilos secundarios esterificados al mismo tiempo que se incrementa la esterificación de los hidroxilos primarios (Philippe *et al.*, 2016). Estos resultados sugieren que la proteína CUS1 podría estar implicada en el entrecruzamiento de la matriz de cutina, aunque cabría

la posibilidad de que se viera afectada la expresión de una o varias enzimas que serían las responsables de esos cambios (Philippe *et al.*, 2016). Los cuatro genes CUS adicionales identificados en tomate (Yeats *et al.*, 2014), que presentan un porcentaje de identidad en sus proteínas del 51% y la totalidad de los aminoácidos catalíticos conservados, podrían estar implicados en la deposición de cutina en los estadios finales del desarrollo; o bien, al igual que CUS1, podrían ser responsables del entrecruzamiento de los monómeros. No obstante, ninguno de estos cuatro genes se expresa de forma específica en dichos estadios, aunque cabe destacar que CUS2, CUS4 y CUS5 muestran un patrón de expresión similar a CUS1.

### **La cutina como resultado de un mecanismo de autoensamblaje emergente en los estadios iniciales del desarrollo**

Los diversos estudios que se han realizado hasta la fecha enfocados en la cutinización de la pared celular más externa describen de manera sistemática en diferentes especies la presencia de glóbulos electrodensos de tamaño variable en los estadios iniciales del desarrollo que parecen migrar desde esta pared hacia la procutícula naciente, la cual presenta un contorno irregular (ver Jeffree, 2006 y las referencias allí recogidas). Estas estructuras globulares han sido propuestas como precursores de la procutina, en las que se sintetiza o bien se ensambla la cutina (Frey-Wyssling y Mühlethaler, 1965; Hallam, 1970; Heide-Jørgensen, 1978, 1991; Jeffree, 2006). Igualmente, se han encontrado glóbulos osmiofílicos similares en la interfase entre la membrana plasmática y la pared celular más externa tras un tratamiento con auxina, hormona inductora del crecimiento (Kutschera *et al.*, 1987).

Los *cutinsomas* son partículas lipídicas formadas tras el autoensamblaje y la polimerización parcial de monómeros de cutina. Su presencia tanto en la epidermis como en la pared celular más externa de algunas especies ha sido constatada mediante el uso de anticuerpos capaces de reconocer específicamente estas estructuras (Domínguez *et al.*, 2010; Kwiatkowska *et al.*, 2014). Más recientemente, se ha descrito su posible papel en la deposición de la cutícula del fruto de *Olea europea* L. (D'Angeli *et al.*, 2013, 2016). Sin embargo, la implicación de dichas partículas en la síntesis y la deposición de cutina aún no ha sido abordada de manera generalizada.

En el caso del fruto de tomate, los *cutinsomas* se localizan tanto en las células epidérmicas como en la pared celular más externa durante un periodo de tiempo muy concreto, desde el ovario hasta los 10 dda. Al contrario de lo observado en los ensayos de inmunolocalización de CUS1 estas partículas ya están presentes en el ovario, dispuestas en el límite entre la zona cutinizada y la no cutinizada de la pared celular más externa, lo que sugiere una participación activa en la formación de la procutícula del mismo. En cambio, estas nanopartículas no se ubican en el interior de la cutina bien desarrollada, ni tampoco presentan un patrón de distribución diferente en función del estadio de desarrollo en el que se encuentre el fruto. Aquellas que se localizan en el interior de las células epidérmicas lo hacen siempre en las proximidades de la membrana plasmática, o bien en la región del citoplasma contigua a la pared celular más externa. Los *cutinsomas* también han sido identificados en las células epidérmicas del ovario de *O.umbellatum*, donde se distribuyen en unos dominios citoplasmáticos específicos llamados lipotubuloides (Kwiatkowska, 2004; Kwiatkowska *et al*, 2014). Recientemente, se ha descrito que estos dominios podrían actuar como metabolones integrados funcional y estructuralmente en los que tiene lugar la síntesis lipídica (Kwiatkowska *et al.*, 2015). Además, se ha visto que la formación de los *cutinsomas* se ve favorecida por un ambiente ácido (Heredia-Guerrero *et al.*, 2008). Por ello, sería de especial interés para futuras investigaciones analizar cómo influye el pH del citoplasma, localización celular en la que tiene lugar la formación de estas partículas.

El periodo en el cual los *cutinsomas* fueron detectados en el pericarpo del fruto se corresponde con la fase en la cual se desarrolla la procutícula, es decir, la etapa de división celular. Cabe recordar, como se describió en el capítulo 1, que en dicha etapa la pared celular más externa es rica en pectinas ácidas. La presencia de estas pectinas ácidas en la región no cutinizada de la pared durante los primeros 7 días de desarrollo del fruto podría facilitar la estabilización química de los *cutinsomas in vivo*, induciendo la agregación en cadenas ramificadas y la condensación de los monómeros de cutina, tal y como ocurre *in vitro* (Guzman-Puyol *et al.*, 2015).

Asimismo, durante la etapa de división celular fue posible observar el acúmulo de vesículas o material electrodensito en el espacio periplasmático de la región apical de las células epidérmicas del fruto, especialmente entre los 6-8 dda. Al mismo tiempo la membrana plasmática adquiere una apariencia sinusoidal en aquellas regiones donde se agrupan vesículas. Todo ello sugiere que en estas células podría estar sucediéndose un

mecanismo de transporte similar al descrito por Paiva (2016), mediante el cual los productos de secreción se acumularían en el espacio periplasmático y se liberarían hacia la pared celular más externa y la cutícula tras repetidos ciclos de contracción y expansión celular. Esta vía podría facilitar el transporte de los constituyentes de la cutina, de naturaleza lipídica y por tanto hidrofóbica, desde el interior celular hacia la región cutinizada de la pared celular más externa.

Los resultados obtenidos en este capítulo contribuyen a describir un complejo escenario sobre la síntesis y deposición de cutina. La deposición de cutina en los estadios iniciales de desarrollo parece estar mediada por dos mecanismos. En un primer momento, el autoensamblaje y la polimerización de los monómeros de cutina actúan como una fuerza motriz que posibilita la formación de una estructura supramolecular primaria, la procutícula. Más tarde, ocurre una deposición masiva de cutina en la que se produce la esterificación química de los monómeros o de los oligómeros lineales por mediación de la proteína CUS1. Existe un corto pero significativo periodo de tiempo, entre los 7 y los 10 días de desarrollo del fruto, en el que los dos mecanismos actúan conjuntamente. En el transcurso de estos días, además, sucede una serie de cambios coordinados a nivel de la pared celular más externa, tal y como se describió en el capítulo 1. En base a todo ello, sería interesante investigar la naturaleza de la interacción entre ambos mecanismos en este lapso de tiempo, que podría ser sinérgica o bien cooperativa, así como su relación con los eventos que ocurren en las células epidérmicas. En este sentido, Isaacson *et al.* (2009) han indicado que la cantidad de cutina de los tomates *cd1* en comparación con los silvestres es significativamente menor en el estadio verde inmaduro. La caracterización de la cutícula de estos mutantes durante el periodo en el que dichos mecanismos actúan simultáneamente podría proporcionar información relevante que permita dilucidar la naturaleza de la interacción entre ambos.

Los *cutinsomas* no solo estarían implicados en la formación de la cutina temprana sino que también podrían participar en el transporte vesicular establecido entre la célula epidérmica y la región más externa de su pared celular apical. En los últimos años, el transporte vesicular hacia la superficie celular de macromoléculas constituyentes de la pared celular parcialmente sintetizadas se ha establecido como una vía de investigación de especial interés (Casadevall *et al.*, 2009; Toyooka *et al.*, 2009). Cabe destacar que a día de hoy se desconoce el mecanismo exacto por el cual la proteína CUS1 es transportada desde

las células epidérmicas hacia la región cutinizada de la pared celular más externa. Se ha sugerido que el cambio en la localización de esta enzima podría estar facilitado por las LTPs, o bien podría estar mediado por vesículas (Domínguez *et al.*, 2015). Por tanto, los *cutinsomas* podrían constituir una vía de transporte de CUS1 o de cualquier otra enzima implicada en el desarrollo de la cutícula. Sin embargo, las diferencias temporales y espaciales entre estas nanopartículas y CUS1 denotan lo contrario, por lo que sería necesario ahondar en el análisis de esta cuestión. Una investigación más detallada sobre la naturaleza y morfología del material celular que, como se describió anteriormente, se excreta durante los 7-9 dda podría ser clave.

Como se ha comentado con anterioridad, la cutícula del fruto de tomate muestra una estructura amorfa, aunque en otras especies es muy común que la cutícula manifieste una morfología laminar o fibrilar (Jeffree, 2006). En base a ello podrían establecerse nuevas vías de investigación con el objetivo de determinar la implicación de los *cutinsomas* y de CUS1 en la formación de esas estructuras altamente ordenadas.

Los mecanismos de síntesis de cutina que se han postulado en este capítulo hacen referencia únicamente a los primeros estadios de desarrollo de la cutícula. Estos constituyen la base de un escenario a nivel molecular más complejo que además incluiría la implicación de una enzima, o bien un conjunto de enzimas, en la ramificación de la cutina por medio de la esterificación de los hidroxilos secundarios, y en la deposición de la cutina durante los estadios más avanzados del desarrollo. Teniendo en cuenta el papel primordial que la cutícula juega en la supervivencia de la planta y cómo esta responde a los cambios en el medio ambiente sería de especial interés la identificación de estas proteínas y de los mecanismos por los cuales se regulan todos estos procesos.



## BIBLIOGRAFÍA

- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT.** 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55:611–622.
- Cánovas F.**1995. Manejo del cultivo sin suelo. In: F Nuez, ed, El Cultivo del Tomate. Mundi Prensa, Madrid, Spain, pp: 227–254.
- Casadevall A, Nosanchuk JD, Williamson P, Rodrigues ML.** 2009. Vesicular transport across the fungal cell wall. *Trends Microbiol* 17: 158-162.
- D'Angeli S, Falasca G, Matteucci M, Altamura MM.** 2013. Cold perception and gene expression differ in *Olea europaea* seed coat and embryo during drupe cold acclimation. *New Phytol* 197: 123-138.
- D'Angeli S, Matteucci M, Fattorini L, Gismondi A, Ludovici M, Canini A, Altamura MM.** 2016. *OeFAD8*, *OeLIP* and *OeOSM* expression and activity in cold-acclimation of *Olea europaea*, a perennial dicot without winter-dormancy. *Planta* 243: 1279-1296.
- Domínguez E, López-Casado G, Cuartero J, Heredia A.** 2008. Development of fruit cuticle in cherry tomato (*Solanum lycopersicum*). *Funct Plant Biol* 35: 403-411.
- Domínguez E, Heredia-Guerrero JA, Benítez JJ, Heredia A.** 2010. Self-assembly of supramolecular lipid nanoparticles in the formation of plant biopolyester cutin. *Mol Biosyst* 6: 948-950.
- Domínguez E, Heredia-Guerrero JA, Heredia A.** 2011. The biophysical design of plant cuticles: an overview. *New Phytol* 189: 938-949.
- Domínguez E, Fernández MD, López Hernández JC, Pérez-Parra J, España L, Heredia A, Cuartero J.** 2012. Tomato fruit continues growing while ripening, affecting cuticle properties and cracking. *Physiol Plant* 146: 473-486.
- Domínguez E, Heredia-Guerrero JA, Heredia A.** 2015. Plant cutin genesis: unanswered questions. *Trends Plant Sci* 20: 551-558.
- España L, Heredia-Guerrero, Segado P, Benítez JJ, Heredia A, Domínguez E.** 2014. Biomechanical properties of tomato fruit cuticle during development are modulated by changes in the relative amount of their components. *New Phytol* 202: 790-802.
- Expósito-Rodríguez M, Borges AA, Borges-Pérez A, Pérez JA.** 2008. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. *BMC Plant Biol* 8: 131.
- Frey-Wyssling A, Mühlenthaler A.** 1965. Ultrastructural Plant Cytology. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.



**Girard AL, Mounet F, Lemaire-Chamley M, Gaillard C, Elmorjani K, Vivancos J, Runavot JL, Quemener B, Petit J, Germain V, Rothan C, Marion D, Bakan B.** 2012. Tomato *GDSL1* is required for cutin deposition in the fruit cuticle. *Plant Cell* 24: 3119-3134.

**Guzman-Puyol S, Benítez JJ, Domínguez E, Bayer IS, Cingolani R, Athanassiou A, Heredia A, Heredia-Guerrero JA.** 2015. Pectin-lipid self-assembly: influence on the formation of polyhydroxy fatty acids nanoparticles. *PLoS One* 10:e0124639.

**Hallam ND.** 1970. Leaf wax fine structure and ontogeny in *Eucalyptus* demonstrated by means of a specialized fixation technique. *J Microsc* 92:137-144.

**Heide-Jørgensen HS.** 1978. The xeromorphic leaves of *Hakea suaveolens* R.Br. II. Structure of epidermal cells, cuticle development and ectodesmata. *Bot Tidsskr* 72: 227-244.

**Heide-Jørgensen HS.**1991. Cuticle development and ultrastructure: evidence for a procuticle of high osmium affinity. *Planta* 183: 511-519.

**Heredia A.** 2003. Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer. *Biochim Biophys Acta* 1620: 1-7.

**Heredia A, Heredia-Guerrero JA, Dominguez E, Benitez JJ.** 2009. Cutin synthesis: A slippery paradigm. *Biointerphases* 4: 1-3.

**Heredia-Guerrero JA, Benítez JJ y Heredia A.** 2008. Self-assembled polyhydroxy fatty acids vesicles: a mechanism for plant cutin synthesis. *Bioessays* 30: 273-277.

**Heredia-Guerrero JA, Dominguez E, Luna M, Benitez JJ, Heredia A.** 2010. Structural characterization of polyhydroxy fatty acid nanoparticles related to plant lipid biopolyesters. *Chem Phys Lipids* 163: 329-333.

**Isaacson T, Kosma DK, Matas AJ, Buda GJ, He Y, Yu B, Pravitasari A, Batteas JD, Stark RE, Jenks MA, Rose JK.** 2009. Cutin deficiency in the tomato fruit cuticle consistently affects resistance to microbial infection and biomechanical properties, but not transpirational water loss. *Plant J* 60: 363-377.

**Jeffree CE.** 2006. The fine structure of the plant cuticle. In: M Riederer M, C Müller, eds, *Biology of the Plant Cuticle*. Blackwell Publishing, Oxford, UK, pp: 11-125.

**Kwiatkowska M.** 2004. The incorporation of 3H-palmitic acid into *Ornithogalum umbellatum* lipotubuloids, which are a cytoplasmic domain rich in lipid bodies and microtubules. Light and EM autoradiography. *Acta Soc Bot Pol* 73: 181-186.

**Kwiatkowska M, Polit JT, Popłońska K, Stępiński D, Wojtczak A.** 2013. Immunogold method evidences that kinesin and myosin bind to and coupe microtubules and actin filaments in lipotubuloids of *Ornithogalum umbellatum* ovary epidermis. *Acta Physiol Plant* 35: 1967-1977.

**Kwiatkowska M, Wojtczak A, Popłońska K, Polit JT, Stępiński D, Domínguez E, Heredia A.** 2014. *Cutinsomes* and lipotubuloids appear to participate in cuticle formation in *Ornithogalum umbellatum* ovary epidermis: EM-immunogold research. *Protoplasma* 251: 1151-1161.

**Kwiatkowska M, Polit JT, Stępiński D, Popłońska K, Wojtczak A, Domínguez E, Heredia A.** 2015. Lipotubuloids in ovary epidermis of *Ornithogalum umbellatum* act as metabolons: suggestion of the name 'lipotubuloid metabolon'. *J Exp Bot* 66: 1157-1163.

**Kutschera U, Bergfeld R, Schopfer P.** 1987. Cooperation of epidermis and inner tissues in auxin-mediated growth of maize coleoptiles. *Planta* 170: 168-180.

**Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG.** 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.

**Pfaffl MW.** 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45.

**Philippe G, Gaillard C, Petit J, Geneix N, Dalgalarrrondo M, Bres C, Mauxion JP, Franke R, Rothan C, Schreiber L, Marion D, Bakan B.** 2016. Ester cross-link profiling of the cutin polymer of wild-type and cutin synthase tomato mutants highlights different mechanisms of polymerization. *Plant Physiol* 170: 807-820.

**Prats-Mateu B, Hauser MT, Heredia A, Gierlinger N.** 2016. Waterproofing in *Arabidopsis*: following phenolics and lipids in situ by Confocal Raman Microscopy. *Front Chem* 4: 10-16.

**Toyooka K, Goto Y, Asatsuma S, Koizumi M, Mitsui T, Matsuoka K.** 2009. A mobile secretory vesicle cluster involved in mass transport from the Golgi to the plant cell exterior. *Plant Cell* 21: 1212-1229.

**Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F.** 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3: research 0034.

**Yeats TH, Martin L, Viart H, Isaacson T, He Y, Zhao L, Matas AJ, Buda G, Domozych DS, Clausen MH, Rose JKC.** 2012. The identification of cutin synthase: formation of the plant polyester cutin. *Nature Chem Biol* 8: 609-611.

**Yeats TH, Huang W, Chatterjee S, Viart HM, Clausen MH, Stark RE, Rose JK.** 2014. Tomato Cutin Deficient 1 (CD1) and putative orthologs comprise an ancient family of cutin synthase-like (CUS) proteins that are conserved among land plants. *Plant J* 77: 667-675.

**Yeats TH, Rose JKC.** 2013. The formation and function of plant cuticles. *Plant Physiol* 163: 5-20.



## **CAPÍTULO 3**

# **ESTUDIO DE LA CUTÍCULA DEL FRUTO DE TOMATE DE LAS ESPECIES DE LA SECCIÓN *LYCOPERSICON***



## INTRODUCCIÓN

El tomate cultivado (*Solanum lycopersicum* L.) es un miembro de la familia *Solanaceae*, encuadrado actualmente en el género *Solanum* dentro de la sección *Lycopersicon* (Peralta *et al.*, 2008). No obstante, su ubicación genérica dentro de esta familia ha sido tema de controversia a lo largo de los años. Los botánicos reconocieron desde un principio su afinidad con otras plantas de la actual familia *Solanaceae* tras la introducción de los tomates en Europa. En 1561, Anguillara identificó al tomate como la planta descrita por Galeno en el siglo II d.C. denominada *Lycopersicon* (Peralta y Spooner, 2006). Un siglo más tarde, Tournefort (1694) consideró que el tomate cultivado formaba parte de un grupo distinto de las plantas que actualmente forman el género *Solanum* y lo encuadró en uno diferente al que denominó *Lycopersicon*, de acuerdo con el nombre previamente propuesto por Anguillara. Sin embargo, unos años después, Linneo (1753) incluyó al tomate cultivado dentro del género *Solanum* bajo el nombre *Solanum lycopersicum* mientras que Miller (1754) definió formalmente el género *Lycopersicon*, clasificando al tomate cultivado como *Lycopersicon esculentum* (1768). Esta última clasificación persistió durante décadas hasta que, en base a la información morfológica y molecular recabada a lo largo de los últimos años, el tomate cultivado ha quedado nuevamente englobado dentro del género *Solanum*, al igual que las 12 especies de tomates silvestres emparentadas con dicha especie. Todas ellas conforman la sección *Lycopersicon* (Peralta y Spooner, 2000, Foolad, 2007; Peralta *et al.*, 2008).

Los tomates silvestres se distribuyen por la región andina, que abarca las islas Galápagos y los países de Colombia, Perú, Ecuador, Bolivia y Chile. La vasta extensión de esta zona incluye hábitats muy diversos, desde las costas áridas del océano pacífico hasta los 3300 metros de altitud de las montañas de los Andes, pasando por los numerosos valles que caracterizan a esta región. Su adaptación a los diferentes microclimas y a la heterogeneidad de las condiciones del suelo les ha permitido desarrollarse en áreas geográficamente aisladas. De esta forma, la variedad geográfica ha desencadenado la diversidad de las distintas especies de tomates silvestres (Warnock, 1988; Peralta y Spooner, 2000). Por ello, las especies encuadradas en la sección *Lycopersicon* (Tabla 3.1) representan un excelente modelo para el estudio de la demografía de los organismos vegetales y su adaptación local (Böndel *et al.*, 2015). Así, es posible encontrar en este grupo desde especies endémicas como *S. cheesmaniae* o *S. galapagense*, propias de las

islas Galápagos (Darwin *et al.*, 2003), hasta especies adaptadas a ambientes desérticos, como *S. chilense*, o costeros, como *S. peruvianum*, así como algunas capaces de desarrollarse a elevada altitud en pendientes rocosas, como *S. neorickii* (Peralta *et al.*, 2008).

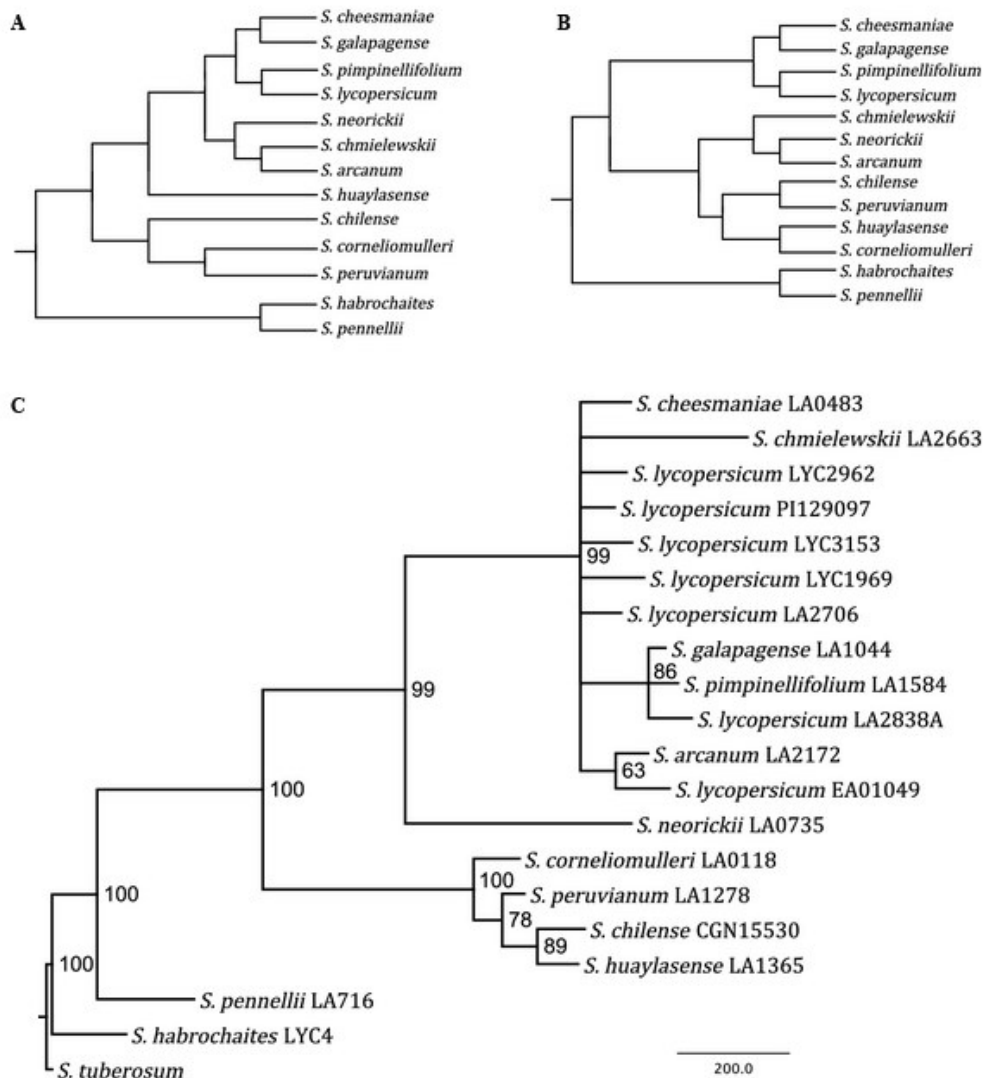
**Tabla 3.1. Especies que conforman la sección *Lycopersicon*.** Tomado de Peralta *et al.* (2005, 2008).

Especie	Hábitat	Altitud (m)
<i>S. arcanum</i> Peralta	Pendientes y valles secos.	100-2800
<i>S. cheesmaniae</i> (L. Riley) Fosberg	Gran variedad de hábitats. Ambientes salinos.	0-500
<i>S. chilense</i> (Dunal) Reiche	Llanuras rocosas muy áridas. Desiertos costeros.	0-3250
<i>S. chmielewskii</i> (C.M. Rick, Kesicki, Fobes & M. Holle) D.M. Spooner, G.J. Anderson & R.K. Jansen	Valles áridos.	1600-3200
<i>S. corneliomuelleri</i> J.F. Macbr.	Pendientes rocosas y arenosas.	200-3300
<i>S. galapagense</i> S. Darwin & Peralta	Regiones costeras y áridas de rocas basálticas y lava.	0-50
<i>S. habrochaites</i> S. Knapp & D.M Spooner f. <i>glabratum</i> C.H. Müll.	Ambientes forestales.	200-3300
<i>S. huaylasense</i> Peralta	Pendientes rocosas. Valle del río Fortaleza.	1700-3000
<i>S. lycopersicum</i> L.	Gran variedad de hábitats distribuidos por todo el mundo.	0-4000
<i>S. neorickii</i> (C.M. Rick, Kesicki, Fobes & M. Holle) D.M. Spooner, G.J. Anderson & R.K. Jansen	Pendientes rocosas. A menudo puede encontrarse en las inmediaciones de las carreteras.	1950-2600
<i>S. pennellii</i> Correl	Laderas rocosas y secas y áreas arenosas.	0-2300
<i>S. peruvianum</i> L.	Colinas y desiertos costeros. Ocasionalmente crece en los valles costeros, al borde de los ríos.	0-600
<i>S. pimpinellifolium</i> L.	Hábitats costeros secos.	0-500 (excepcionalmente hasta 1400)



Las relaciones filogenéticas entre las distintas especies emparentadas con el tomate cultivado han sido objeto de numerosos estudios y aún no han sido totalmente esclarecidas. Peralta *et al.* (2008), basándose en estudios cladísticos y fenéticos previos que incluían datos morfológicos y moleculares, reconocieron cuatro grupos informales dentro de la sección *Lycopersicon*: ‘*Lycopersicon*’, ‘*Arcanum*’, ‘*Eriopersicon*’ y ‘*Neolycopersicon*’, que reflejan las posibles relaciones entre las diferentes especies de la sección. ‘*Lycopersicon*’ está formado por las especies *S. lycopersicum*, *S. pimpinellifolium*, *S. galapagense* y *S. cheesmaniae*. ‘*Arcanum*’ incluye las especies *S. arcanum*, *S. chmielewskii* y *S. neorickii* mientras que ‘*Eriopersicon*’ incluye las especies *S. huaylasense*, *S. chilense*, *S. cornelliomuelleri*, *S. peruvianum* y *S. habrochaites*. Finalmente, ‘*Neolycopersicon*’ sólo contiene la especie *S. pennellii* y se considera hermana del resto de la sección. Estudios filogenéticos posteriores apoyan esta clasificación con algunas salvedades (Rodríguez *et al.*, 2009; Aflitos *et al.*, 2014; Dodsworth *et al.*, 2016). Así, en el análisis realizado por Rodríguez *et al.* (2009) con 18 marcadores COSII (*Conserved Ortholog Set II*), *S. huaylasense* queda como especie hermana del grupo ‘*Arcanum*’ en lugar de formar parte del grupo ‘*Eriopersicon*’ mientras que *S. habrochaites* y *S. pennellii* agrupan juntas como taxones hermanos (Fig. 3.1.A). Esto último también queda reflejado en el análisis filogenético realizado por Aflitos *et al.* (2014) basado en marcadores SNP (*Single-Nucleotide Polymorphism*) de todo el genoma (Fig. 3.1.B). En este caso, *S. huaylasense* sí queda integrada en el grupo ‘*Eriopersicon*’. Más recientemente, Dodsworth *et al.* (2016) emplearon los elementos repetitivos del genoma, obtenidos en la secuenciación del genoma (Aflitos *et al.*, 2014), para realizar un análisis de las distintas especies de la sección *Lycopersicon* (Fig. 3.1.C). Estos autores obtuvieron algunas diferencias notables con respecto a lo obtenido por Aflitos *et al.* (2014). Así, *S. habrochaites* aparece como especie hermana de los grupos ‘*Lycopersicon*’ y ‘*Eriopersicon*’ y no como especie hermana de *S. pennellii*. Por su parte, el grupo ‘*Arcanum*’ desaparece quedando *S. chmielewskii* y *S. arcanum* dentro del grupo ‘*Lycopersicon*’ y *S. neorickii* como especie hermana de este grupo. Esta localización de *S. chmielewskii* y *S. arcanum* podría estar reflejando su empleo en la mejora del tomate cultivado como fuente de introgresión de diversos caracteres (Dodsworth *et al.*, 2016). En este sentido, ‘Heinz 1706 BG’ contiene múltiples introgresiones de *S. pimpinellifolium* (Tomato Genome Consortium, 2012) y Lin *et al.* (2014) encontraron en líneas puras y en tomates de industria

fragmentos exóticos de ADN que contenían genes de resistencia, los cuales permanecieron intactos tras varias generaciones de retrocruzamientos.



**Figura 3.1:** Relaciones filogenéticas de la sección *Lycopersicon*. Imagen tomada de Dodsworth *et al.* (2016). **A:** Representación realizada por Dodsworth *et al.* (2016) del filograma bayesiano propuesto por Rodríguez *et al.* (2009). Todas las ramas tienen valores de análisis de *bootstrap* elevados con excepción de la señalada con un asterisco. **B:** Representación realizada por Dodsworth *et al.* (2016) del árbol de consenso estricto obtenido por Aflitos *et al.* (2014) mediante análisis de máxima verosimilitud. Todas las ramas tienen valores de análisis de *bootstrap* elevados. **C:** Árbol filogenético obtenido por análisis de máxima parsimonia (Dodsworth *et al.*, 2016). Los números indican los valores del análisis de *bootstrap*. La longitud de las ramas es proporcional al número de cambios en la abundancia de los elementos repetitivos (barra).

El tomate alcanzó un alto grado de domesticación antes de ser llevado a Europa, donde fue identificado por primera vez por el botánico Matthioli en el año 1544. En un primer momento fue cultivado como planta ornamental, ya que por entonces existía la creencia de 120

que podría ser venenoso. No fue hasta finales del siglo XVI cuando fue considerado como comestibles en regiones del sur de Europa, desde las cuales se extendió a los países del norte y a otras áreas del mundo (Liedl *et al.*, 2013). No obstante, el curso de su domesticación a partir de las especies silvestres aún no se conoce con total certeza. Actualmente son dos las hipótesis más aceptadas; una de ellas sostiene que el centro del origen de la domesticación está en Perú (de Candolle, 1886) mientras que Jenkins (1948) lo sitúa en México (Esquinas-Alcázar y Nuez, 1995; Peralta y Spooner, 2007; Bauchet y Causse, 2012). El análisis comparativo de entradas de tomate procedentes de ambas regiones ha mostrado que comparten isoenzimas (Rick y Fobes, 1975) y marcadores moleculares similares (Villand *et al.*, 1998). No obstante, ninguna de estas hipótesis es concluyente, por lo que también se ha planteado la opción de que la domesticación surgiera de manera independiente en ambas localizaciones (Peralta y Spooner, 2006; Bauchet y Causse, 2012).

Otra de las cuestiones que genera cierta controversia acerca de la domesticación es el posible papel de *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (Alef.) Voss en este proceso. Mientras que algunos autores han propuesto a esta variedad como un intermediario entre *S. pimpinellifolium* y el tomate cultivado (Rick y Fobes, 1975; Blanca *et al.*, 2012) diversos estudios genéticos han mostrado que la mayor parte de las entradas pertenecientes a la misma son una mezcla de tomates silvestres y cultivados en vez del ancestro de las formas cultivadas (Nesbitt y Tanksley, 2002; Peralta *et al.*, 2008). Blanca *et al.* (2012) han señalado que un gran número de entradas de dicha variedad son una mezcla entre el tomate cultivado y *S. pimpinellifolium*, mientras que aquellas que no lo son podrían ser similares al ancestro a partir del cual se originó el tomate cultivado. Así, estos autores proponen una hipótesis por la que el proceso de domesticación tendría lugar en dos pasos: una predomesticación que habría tenido lugar en la región andina seguida de una auténtica domesticación en Mesoamérica. Cabe aclarar que en base a los resultados de los estudios moleculares mencionados (Nesbitt & Tanksley, 2002) y dado que no es posible distinguir las formas cultivadas de las silvestres en especímenes de herbario, la clasificación actual del tomate no reconoce la variedad *cerasiforme* (Peralta *et al.*, 2008).

El empleo de plantas modelo ha permitido un importante avance en la comprensión de procesos fundamentales relacionados con la bioquímica, genética, fisiología, desarrollo, etc. (Hunter, 2008). El tomate se ha convertido en un modelo de planta con fruto tipo baya

ya que tiene varias de las características que definen a las plantas modelo, esto es, un genoma relativamente pequeño, pocos cromosomas, se puede transformar fácilmente y además hay una amplia colección de mutaciones monogénicas disponibles para su estudio (Rick, 1974; Peterson *et al.*, 1998; Lozano *et al.*, 2009; Tomato Genetics Resource Center, <http://tgrc.ucdavis.edu/>). Así, en las últimas décadas ha habido un avance considerable en el conocimiento de diversos aspectos relacionados con la anatomía (Gillaspy *et al.*, 1993), el crecimiento y la maduración del fruto (Seymour *et al.*, 2013), la composición y cambios estructurales de la pared celular (Lunn *et al.*, 2013) al igual que con el desarrollo y propiedades de la cutícula (Domínguez *et al.*, 2011; Martín y Rose, 2014). En este sentido, se ha puesto de manifiesto el importante papel que juega la cutícula en aspectos como el desarrollo de la epidermis, la firmeza e integridad del fruto, la pérdida de agua o la resistencia a fisiopatías tales como el agrietado (Young, 1947; Paran y van der Knaap, 2007; Javelle *et al.*, 2010; Domínguez *et al.*, 2011; Rodríguez *et al.*, 2011).

La variabilidad natural presente en las especies silvestres de tomate convierte a estas en un potente recurso para la mejora del tomate cultivado. Así, se ha identificado tolerancia a la sal en *S. cheesmaniae* (Monforte *et al.*, 1996, 1997, 1999), mayor contenido en sólidos solubles en *S. chmielewskii* (Azanza *et al.*, 1995), caracteres asociados a la cosecha y mayor contenido en azúcares del fruto en *S. pennellii* (Eshed y Zamir, 1995; Fridman *et al.*, 2000, 2002) o resistencia a araña roja y oídio en *S. pimpinellifolium* y *S. habrochaites*, respectivamente (Fernández-Muñoz *et al.*, 2003; Alba *et al.*, 2009; Satková *et al.*, 2016). Sin embargo, a nivel de cutícula son pocos los trabajos que han ahondado en la variabilidad natural existente, estando la mayoría centrados en el análisis de la variabilidad dentro del tomate cultivado (Matas *et al.*, 2004; Bargel y Neinhuis, 2005; López-Casado *et al.*, 2007; Domínguez *et al.*, 2008, 2009) o del efecto de determinadas mutaciones sobre la cutícula y su desarrollo (Bargel y Neinhuis, 2004; Adato *et al.*, 2009; Isaacson *et al.*, 2009; Kosma *et al.*, 2010; Nadakuduti *et al.*, 2012). Más recientemente se ha empezado a explorar la variabilidad natural presente en las especies silvestres aunque de modo limitado. Así, Yeats *et al.* (2012a) realizaron una primera aproximación estudiando algunos caracteres de la cutícula de frutos maduros en seis entradas silvestres y Haliński y Stepnowski (2016) han estudiado el perfil de alcanos de las ceras epicuticulares de hoja en otras seis especies silvestres. Sin embargo, no se ha realizado ningún estudio en profundidad de la cutícula de las especies silvestres emparentadas con el tomate cultivado

con vistas a la identificación de entradas con caracteres potencialmente deseables. Es este precisamente, el objetivo de este trabajo, una caracterización preliminar de la cutícula de diversas entradas de las especies de la sección *Lycopersicon* con especial énfasis en el desarrollo anatómico de la epidermis de los frutos, la arquitectura y composición de la cutícula y en las propiedades ópticas de la misma. Esta aproximación, inédita por su extensión y objetivos de estudio, permitirá, además de profundizar en el conocimiento de la ultraestructura de la cutícula del fruto, establecer unas primeras bases para la utilidad de determinadas especies con fines puntuales de mejora agronómica.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Instalaciones

Los diferentes cultivos necesarios para la consecución del presente capítulo se realizaron en las instalaciones de la Estación Experimental “La Mayora”, perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), situadas al sudeste de España en el término municipal de Algarrobo (Málaga).

El invernadero donde se llevaron a cabo es de tipo multitúnel, constituido por tres naves de policarbonato distribuidas en una superficie total de 576 m<sup>2</sup> (24 m x 24 m). Cuenta con una entrada provista de doble puerta con ventilación hacia el exterior para evitar la entrada de insectos y con aperturas cenitales cubiertas con mallas anti-insectos.

### Material vegetal

El material vegetal cultivado y analizado en el presente capítulo engloba a un conjunto de 33 entradas correspondientes a las 13 especies de tomate incluidas en la sección *Lycopersicon* (Tabla 3.2). A lo largo de la presente memoria las entradas irán acompañadas de abreviaturas formadas por las 3 primeras letras del nombre de la especie a la que pertenecen para facilitar su identificación. En el caso de la variedad cerasiforme de *S. lycopersicum*, la abreviatura está formada por las 3 primeras letras de la variedad, obviándose la especie. De igual manera la forma *glabratum* de *S. habrochaites* se abrevia con las 3 primeras letras de la forma. La entrada de Heinz empleada corresponde a ‘Heinz 1706 BG’, aunque en la presente memoria se la denomina Heinz. El cultivar ‘Moneymaker’ está abreviado en esta memoria como MM. En las Figuras 3.2, 3.3 y 3.4 se indican la localización geográfica y la altitud en las que fueron recolectadas.

Cabe reseñar que la clasificación actual de la sección *Lycopersicon* no reconoce ningún taxón por debajo del nivel de especie (Peralta *et al.*, 2008). Sin embargo, en la presente memoria se ha mantenido la nomenclatura de *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* ya que la entrada Mex-70 es una variedad local de tamaño intermedio entre el tomate domesticado y *S. pimpinellifolium*. Asimismo, es necesario aclarar que, aunque la entrada PE-67 está catalogada como *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* en el *Tomato Genetics Resource Center* (<http://tgrc.ucdavis.edu/>, Universidad de Davis, USA), estudios moleculares recientes han determinado que pertenece a la especie *S. pimpinellifolium* (Blanca *et al.*, 2012).

**Tabla 3.2. Entradas empleadas en el presente trabajo.** Para cada una de ellas se indica la especie a la que pertenece, la ciudad o provincia y país en el que fueron recolectadas, el modo de compatibilidad y el color de sus frutos.

Especie	Entrada	Recolección	Características
<i>S. lycopersicum</i>	MM	Cultivar tradicional de mejora obtenido por F. Stoner Seed Co. (RU).	Frutos rojos.
	Heinz	Cultivar moderno californiano de industria obtenido por HeinzSeed Co. (USA).	Frutos rojos.
<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	Mex-70	Huauchinango (México).	Autógama. Frutos rojos.
<i>S. pimpinellifolium</i>	PE-67	La Convención (Perú).	Autógama. Frutos rojos.
	LA-1589	Virú (Perú).	Autógama. Frutos rojos.
	PE-7	Chiclayo (Perú).	Autógama facultativa. Frutos rojos.
	TO-937	Chiclayo (Perú).	Autógama facultativa. Frutos rosa oscuro.
<i>S. cheesmaniae</i>	LA-0429	Isla de Santa Cruz (Galápagos, Ecuador).	Autógama. Frutos amarillentos.
	LA-1139	Isla de Isabela (Galápagos, Ecuador).	Autógama. Frutos amarillentos.
<i>S. galapagense</i>	LA-0317	Isla de Bartolomé (Galápagos, Ecuador).	Autógama. Frutos anaranjados.
	LA-0530	Isla de Fernandina (Galápagos, Ecuador).	Autógama. Frutos anaranjados.
<i>S. chmielewskii</i>	LA-1028	Abancay (Perú).	Autógama facultativa. Frutos verdes.
	LA-2678	Anta (Perú).	Autógama facultativa. Frutos amarillos.
	LA-2695	Paruro (Perú).	Autógama facultativa. Frutos verdes.
	LA-3644	Paruro (Perú).	Autógama facultativa. Frutos de color variable (blanco, amarillo o púrpura).
	LA-3654	Abancay (Perú).	Autógama facultativa. Frutos amarillos.
<i>S. neorickii</i>	LA-2200	Chachapoyas (Perú).	Autógama. Frutos verdes.
	PE-52	Abancay (Perú).	Autógama. Frutos verdes.



**Tabla 3.2 (continuación).**

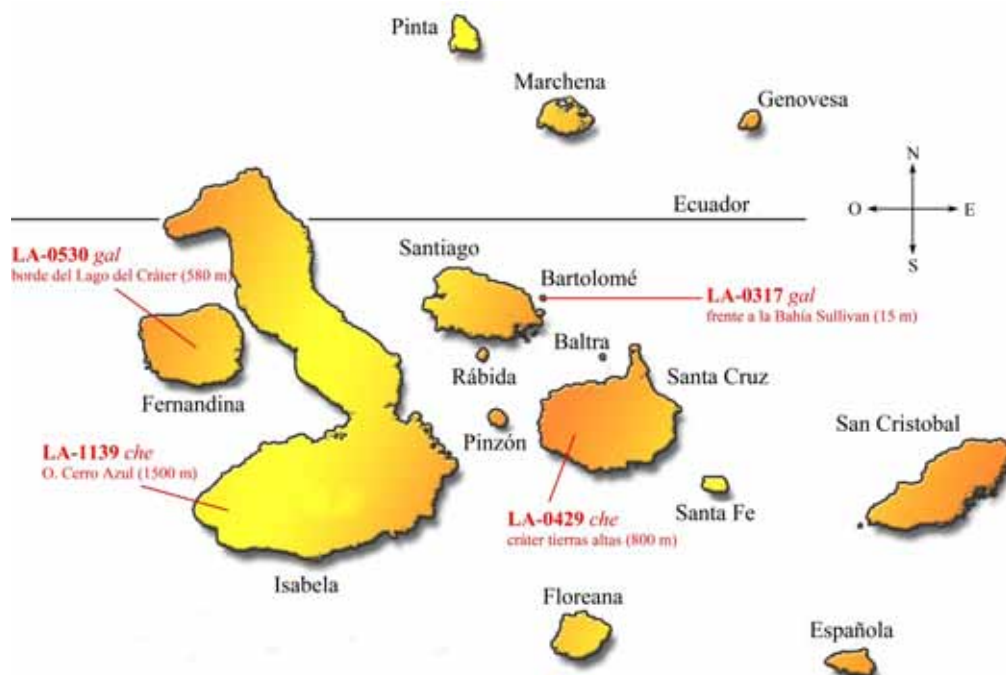
<b>Especie</b>	<b>Entrada</b>	<b>Recolección</b>	<b>Características</b>
<i>S. arcanum</i>	PE-29	Contumazá (Perú).	Alógama autoincompatible. Frutos verdes-blanquecinos.
	PE-33	Otuzco (Perú).	Alógama autoincompatible. Frutos verdes-blanquecinos.
<i>S. huaylasense</i>	PE-18	Huaylas (Perú).	Alógama autoincompatible. Frutos verdes.
	PE-20	Huaylas (Perú).	Alógama autoincompatible. Frutos verdes.
<i>S. peruvianum</i>	PE-81	Entre Camaná y Caylloma (Perú).	Alógama autoincompatible. Frutos verdes-blanquecinos.
	PI-212407	Barranca (Perú).	Alógama autoincompatible. Frutos verdes-blanquecinos.
<i>S. corneliomuelleri</i>	PI-126448	Canta (Perú).	Alógama autoincompatible. Frutos verdes.
	PI-251311	Arequipa (Perú).	Alógama autoincompatible. Frutos verdes.
<i>S. chilense</i>	LA-1969	Tarata (Perú).	Alógama autoincompatible. Frutos verdes-blanquecinos.
	LA-2779	Parinacota (Chile).	Alógama autoincompatible. Frutos verdes.
<i>S. habrochaites</i>	LA-1777	Áncash (Perú).	Alógama autoincompatible. Frutos verdes.
	PI-126445	Canta (Perú).	Alógama autoincompatible. Frutos verdes.
<i>S. habrochaites</i> f. <i>gla</i>	PI-134418	Guayas (Ecuador).	Alógama autoincompatible. Frutos verdes.
<i>S. pennellii</i>	LA-0716	Caravelí (Perú).	Autocompatible facultativa. Frutos verdes.
	PE-45	Santa (Perú).	Alógama autoincompatible. Frutos verdes.

Todas las entradas recogidas en la Tabla 3.2 fueron cultivadas durante la campaña primavera-verano de 2014. Asimismo, en la primavera de 2015 se cultivaron nuevamente las entradas MM *lyc*, PE-18 *hua*, PE-20 *hua*, PE-29 *arc* y PE-33 *arc* junto con algunas entradas adicionales de estas dos últimas especies. PE-19 *hua*: recolectada en Ancash, Perú, y PE-16 *arc*, PE-30 *arc*, PE-31 *arc* y PE-32 *arc*, recolectadas en Cajamarca, Perú.





**Figura 3.2:** Localización geográfica de las entradas recolectadas en el continente americano. Se incluye el estado, provincia o región (según el país) al que pertenece la localidad donde fueron recolectadas así como la altitud.



**Figura 3.3:** Localización geográfica de las entradas endémicas de las Islas Galápagos. Se incluye la altitud.



**Figura 3.4:** Localización geográfica de las entradas propias de Perú. Se incluye el departamento al que pertenece la localidad donde fueron recolectadas así como la altitud.

Cabe aclarar que TO-937 es una línea pura de mejora derivada, tras varios pasos de autofecundación, de la entrada silvestre PE-2 (Alba *et al.*, 2009). La localización geográfica descrita en la Tabla 3.2 y en la Figura 3.2 para TO-937 corresponde en realidad a PE-2.

### Semilleros y cultivos

Por cada entrada se cultivaron 25 plantas. Las semillas se germinaron en placas de Petri con papel de filtro humedecido en una estufa a 25°C y en oscuridad tras un tratamiento previo con una solución de hipoclorito sódico al 4% (p/v) durante media hora y tres lavados posteriores con agua destilada. Una vez germinadas, se sembraron en bandejas de

polietileno de 54 alvéolos que se rellenaron con una mezcla de sustrato hortícola y fibra de coco con un aporte de vermiculita para mejorar la aireación del sustrato. Las bandejas se regaron cada dos días debido al pequeño volumen del alvéolo y se mantuvieron en un invernadero de vidrio hasta el momento del trasplante. Al mismo tiempo se dieron unos tratamientos preventivos contra *Pythium* sp. con Previcur<sup>®</sup>-N (722 g/L de propamocarb clorhidrato; Bayer CropScience, Alemania) al 0,15% (v/v).

El trasplante se llevó a cabo cuando las plantas tenían dos o tres hojas verdaderas, pasándolas a balas de fibra de coco a razón de 3 plantas por bala. Estas se colocaron sobre unas canaletas de obra que permitieron el drenaje de las mismas y la recogida de los lixiviados. El marco de plantación fue de 0.5 m entre plantas y 1.8 m entre líneas. Las plantas se entutoraron con una rafia atada a la base del tallo, enrollada a lo largo del mismo y sujeta por arriba a las líneas de alambre, las cuales se encontraban sujetas a la estructura del invernadero a una altura de 2 m. Las plantas se podaron a 2 tallos para disponer de un mayor número de flores, las cuales se vibraron 2 veces por semana para facilitar su polinización. En cuanto a las plantas procedentes de especies autoincompatibles (*S. chmielewskii*, *S. pennellii*, *S. habrochaites*, *S. chilense*, *S. peruvianum*, *S. huaylasense*, *S. corneliomuelleri* y *S. arcanum*) se procedió a la polinización manual con una mezcla de polen de todas las plantas de una misma entrada. Se cultivaron 15 plantas por entrada.

Por la red de riego del invernadero se dispensó la solución nutritiva Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950) modificada para el cultivo del tomate. La composición de dicha solución se muestra en la Tabla 3.3. El pH final fue de 5.83, y su conductividad eléctrica osciló entre 2130-2170  $\mu$ S. El riego se realizó mediante un sistema programado de goteo antidrenante con un caudal de 2 L/h. Se realizaron un total de 6 riegos al día, con una duración de 8 min y espaciados cada 1 h 20 min, desde las 10 am hasta las 6 pm. Las entradas procedentes de especies de climas áridos (*S. pennelli*, *S. galapagense*, *S. cheesmaniae*, *S. neorickii* y *S. chilense*) se distribuyeron en un sector del invernadero aparte, en cuyo caso los riegos fueron de 6 min.

**Tabla 3.3. Composición de la solución nutritiva Hoagland modificada para el cultivo de tomate.**

<b>Macronutrientes</b>	<b>mM</b>	<b>Micronutrientes</b>	<b>μM</b>
KNO <sub>3</sub>	6.60	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	92.20
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.00	MnCl <sub>2</sub>	37.80
MgSO <sub>4</sub>	2.04	ZnSO <sub>4</sub>	2.84
CaCl <sub>2</sub>	5.30	CuSO <sub>4</sub>	1.00
HNO <sub>3</sub>	2.00	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub>	0.70
		FeNaEDTA	51.60

Para prevenir las principales enfermedades que afectan al cultivo de tomate se administraron regularmente dos tratamientos: uno insecticida contra mosca blanca y pulgón y otro fungicida contra oídio. El tratamiento insecticida se aplicó semanalmente y se alternaron dos soluciones diferentes (solución 1: imidacloprid + piriproxifen; solución 2: metomilo + buprofezin). El tratamiento fungicida solo se aplicó en caso de presencia del hongo y se alternaron diferentes materias activas como bupirimato, azoxystrobin, etc.

El cultivo de primavera-verano de 2015 se realizó en un invernadero de tipo multitúnel donde las plantas se cultivaron en suelo con un marco de plantación de 0.5 m entre plantas y 1.5 m entre filas. Se cultivaron 15 plantas de cada entrada, las cuales se podaron a 2 tallos y se abonaron una vez por semana con la solución nutritiva propuesta por Cánovas (1995). Las entradas de las especies *S. arcanum* y *S. huaylasense* se polinizaron manualmente con una mezcla de polen de todas las plantas de la misma entrada.

### **Recolección de muestras**

Los ensayos descritos en el presente capítulo fueron llevados a cabo durante los años 2014 y 2015. El periodo de cosecha se extendió desde principios de mayo hasta mediados de julio. En ambas campañas se procedió al marcaje de un gran número de flores y se llevó a cabo una recolección pormenorizada de frutos procedentes de diferentes plantas de cada entrada en dos momentos concretos del desarrollo: a los 15 dda y en la maduración. La recolección en el caso de aquellas entradas cuyos frutos presentan una coloración verdosa cuando estos alcanzan el estadio maduro se fundamentó en la localización de los que habían sufrido un cambio sutil en su coloración o bien en su consistencia, teniendo además en consideración la posición que estos ocupaban en el racimo de la planta.

Paralelamente a la recolección de los frutos se realizó un seguimiento de su diámetro ecuatorial con la ayuda de un calibre. Así, por cada entrada se reunieron las medidas de un mínimo de 20-30 frutos en cada estadio de desarrollo.

### **Fijación de las muestras**

De forma previa a la inclusión de las muestras se obtuvieron pequeños fragmentos del pericarpo de los frutos procedentes de la zona ecuatorial para su fijación por inmersión. Por cada entrada y por cada estadio de desarrollo se reunieron dos grupos, cada uno constituido por 3 fragmentos. Uno de esos grupos se fijó mediante su inmersión en FAA (compuesto por 1 parte de formaldehído, 1 parte de acetona y 18 partes de etanol) durante un mínimo de 24 h, conservándose posteriormente a una temperatura de 4° C hasta el momento de la inclusión en historesina Leica. El segundo grupo se sumergió en paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0.1 M pH 7.4 y se mantuvo a 4°C hasta el día siguiente. Transcurrido ese tiempo, las muestras se lavaron en el mismo tampón y se procedió a su inclusión en resina LR White.

### **Inclusión en resina Leica**

El protocolo de inclusión en resina Leica (Kit Leica Historesin, Heidelberg, Alemania) se aplicó sobre aquellos fragmentos de pericarpo previamente fijados con FAA y conllevó los siguientes pasos:

- **Deshidratación:** La eliminación del agua contenida en los tejidos se llevó a cabo en diluciones seriadas de etanol al 70% (2 pases de 30 min), 80% (2 pases de 30 min) y 95% (2 pases de 1 h).
- **Preinfiltración:** las muestras se sumergieron en una mezcla de la solución de infiltración y etanol 95% en proporción 1:1 durante 1 h para favorecer el contacto entre las mismas y la resina. Tras ello, se sometieron a vacío de forma inmediata durante 15 min con el objetivo de facilitar la infiltración de la resina.
- **Infiltración:** los fragmentos se pusieron en contacto con la solución de infiltración (50 ml resina básica + 0.5 g activador) durante 2 h y de nuevo se sometieron a vacío para favorecer la impregnación de los tejidos con la solución.



- **Inclusión:** La inclusión final de las muestras se realizó a partir de una mezcla de 15 ml de solución de infiltración + 1 ml de compuesto endurecedor y se completó tras 40-120 min a temperatura ambiente.

### **Inclusión en resina LR White**

Las muestras previamente fijadas en paraformaldehído fueron incluidas en resina LR White mediante el siguiente protocolo de inclusión:

- **Deshidratación:** tras lavar los fragmentos en tampón y posteriormente en agua, estos fueron deshidratados sumergiéndolos en diluciones seriadas de etanol al 50% (15 min), 70% (15 min), 90% (10 min) y 100% (10 min).
- **Preinfiltración:** para favorecer el contacto entre las muestras y la resina “London White” se realizó un paso previo a la infiltración que consistió en someterlas a una mezcla de resina y etanol 100% en una proporción 1:1 durante 24 h.
- **Infiltración:** la inclusión en la resina comprendió dos pasos, el primero de 2 h de duración y el segundo de 1 h. Las muestras se mantuvieron en un rotor a lo largo del proceso para promover la penetración de la resina en los tejidos.
- **Polimerización:** finalmente, los fragmentos fueron traspasados al interior de cápsulas BEEM<sup>®</sup> (Fedelco, España), cubiertos con resina y almacenados a 65°C durante 24 h, tras las cuales fueron almacenados a temperatura ambiente.

### **Preparación de portaobjetos gelatinizados**

La gelatinización de los portaobjetos tiene como finalidad favorecer la adhesión de las muestras a los mismos en aquellos casos en los que se aplican metodologías que implican el uso de soluciones líquidas. Para ello, los portaobjetos se mantuvieron en una solución desengrasante (etanol 100% y éter dietílico en proporción 1:1) durante un mínimo de 24 h, tras las cuales se lavaron con etanol. La solución de gelatina se preparó calentando 200 mL de agua destilada a 60°C en una placa calefactora y disolviendo en ella 1 g de gelatina oro (Panreac) y 0.1 g de sulfato de potasio y cromo (III) dodecahidrato (Merck). Una vez preparada, los portaobjetos fueron colocados en una canastilla y se sumergieron durante 10 s en la mezcla; tras este tiempo, se mantuvieron al aire durante 5 min y se volvieron a



sumergir otros 10 s. Finalmente, se dispusieron en una estufa a 37°C en la que se dejaron secar durante 2 días.

### **Obtención de cortes**

Por un lado, se obtuvieron cortes con un grosor de 4  $\mu\text{m}$  a partir de aquellos fragmentos de pericarpo incluidos en resina Leica. Estos se realizaron con la ayuda de un microtomo de rotación (Leica, RM2125, Alemania) y se depositaron sobre gotas de agua en portaobjetos previamente gelatinizados. Tras ello, se secaron en una estufa (Selecta, España) a 37°C durante 24 h y se almacenaron a temperatura ambiente para su posterior análisis por microscopía óptica.

Las muestras incluidas en resina LR White se emplearon para realizar cortes ultrafinos transversales de un grosor aproximado de 50 nm. Para ello se utilizó una cuchilla de diamante Diatome con un ángulo de 45° (Hatfield, Pensilvania, Estados Unidos) acoplada a un ultramicrotomo Reichert-Jung modelo Ultracut-E (Reichert Technologies, Alemania). Dichas secciones fueron recogidas y almacenadas en rejillas de níquel para su estudio mediante microscopía electrónica de transmisión.

### **Tinción histológica con Sudán IV**

El Sudán IV se empleó para la visualización de la cutícula, ya que al ser sustancia lisocroma es capaz de disolverse en los lípidos que la constituyen, tornándolos a un color anaranjado o rojizo. La solución colorante de Sudán IV se preparó a una concentración 0.5% en etanol al 85%. Las secciones de pericarpo de 4  $\mu\text{m}$  de grosor distribuidas en portaobjetos gelatinizados se cubrieron con el colorante a temperatura ambiente durante 15 min y se aclararon posteriormente con alcohol al 50% para eliminar el exceso de la solución. Una vez teñidas, las preparaciones fueron visualizadas con un microscopio óptico convencional Nikon E800 equipado con una cámara fotográfica digital Nikon DXM1200 conectada a un ordenador provisto con el programa ACT-1 v 2.63 (Nikon).

### **Tinción histológica con hemisulfato de berberina**

El hemisulfato de berberina se empleó para la visualización de compuestos fenólicos. La solución colorante se preparó a una concentración 0.1% en agua bidestilada. Las

secciones de pericarpo de 4  $\mu\text{m}$  de grosor distribuidas en portaobjetos gelatinizados se cubrieron con el colorante a temperatura ambiente y en oscuridad durante 15 min y se lavaron posteriormente 3 veces con agua. A continuación se empleó como medio de montaje una solución de  $\text{FeCl}_3$  al 0.1% en una mezcla de glicerol y agua a partes iguales. Las preparaciones fueron visualizadas con el filtro UV del microscopio óptico de epifluorescencia Nikon E800 equipado con una cámara fotográfica digital Nikon DXM1200 conectada a un ordenador provisto con el programa ACT-1 v 2.63 (Nikon).

### **Determinación del grosor de la cutícula**

El grosor de la cutícula se determinó a partir de aquellas muestras de pericarpo que fueron teñidas con Sudán IV. Para ello se llevó a cabo la toma sistematizada de imágenes mediante un microscopio óptico convencional Nikon eclipse E400 acoplado a una cámara digital Sony DFW-X700 asociada a su vez a un ordenador provisto del programa de captura y análisis de imagen Visilog-Noesis v 6.3 (Noesis, Francia). Las medidas se realizaron en aquella zona de la cutícula situada sobre la región central de cada célula, ya que esta se considera la región menos variable. Se realizaron 10 medidas en un mínimo de 5 cortes histológicos no seriados para cada una de las 3 réplicas biológicas. Este procedimiento se aplicó tanto para los frutos de 15 dda como para los frutos maduros. Los datos se expresaron como la media  $\pm$  error estándar.

### **Microscopía electrónica de transmisión (MET)**

La observación y el análisis de los cortes ultrafinos se realizaron a través de un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1400 (Akishima, Tokio, Japón) acoplado a un captador de imágenes de 11 megapíxeles, con un voltaje de aceleración de 80 kV. El software usado para la captura de las imágenes fue Digital Micrograph™ (Gatan).

### **Microscopía electrónica de barrido (MEB)**

El material previamente fijado se deshidrató mediante su inmersión en una serie de diluciones de etanol al 50%, 70%, 80%, 90% (2 pases de 30 min en cada una de las diluciones) y 100% (2 pases de 1 h). Una vez deshidratadas, las muestras se sometieron a secado por punto crítico y por último se recubrieron con una capa de oro coloidal que le

proporciona propiedades conductoras a los tejidos. Finalmente, la superficie de los frutos PI-126448 *cor* fue examinada con un microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-840, Japón) acoplado a un sistema de adquisición digital de imágenes.

### **Técnicas inmunohistoquímicas**

Tras el exhaustivo análisis del conjunto de las imágenes del pericarpo de todas las especies tomadas por MET se procedió a la selección de un conjunto de entradas al que se le aplicó un protocolo inmunohistoquímico con objeto de detectar la posible presencia de la proteína CUS1 y determinar su ultralocalización en sus frutos de 15 dda. Para ello los cortes se incubaron con BSA (Albúmina de suero bovino, del inglés *Bovine serum albumin*) al 3% en PBS con el objeto de bloquear los sitios de unión inespecíficos de los anticuerpos al tejido durante 1 h. Transcurrido este tiempo, se realizaron 3 lavados con tampón PBS de 5 min cada uno. A continuación se incubaron en una dilución 1:300 del anticuerpo primario anti-CUS1 en tampón PBS, los cuales fueron amablemente cedidos por la Dra. Bénédicte Bakan, del Institut National de la Recherche Agronomique (Nantes, Francia). Simultáneamente se realizaron controles negativos con tampón PBS sin el anticuerpo primario diluido. Transcurridas 1.5 h se realizaron tres lavados en PBS y seguidamente, las rejillas se dispusieron durante 1 h sobre gotas de una dilución 1:50 de anticuerpos anti-IgG de conejo generados en cabra y acoplados a partículas de oro coloidal de 10 nm de diámetro (Aurion, Wageningen, Países Bajos). A continuación, los cortes se lavaron nuevamente con PBS y con agua destilada y se tiñeron con una solución de acetato de uranilo al 4% durante 15 min. Finalmente, las muestras volvieron a lavarse cuidadosamente con agua destilada. Todos estos pasos se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

### **Cuantificación de la autofluorescencia**

Para evaluar la autofluorescencia de la cutícula de los frutos correspondientes a cada una de las entradas se procedió, en primer lugar, a la obtención de una serie de cortes del pericarpo de 4  $\mu\text{m}$  de grosor dispuestos en portaobjetos mediante la metodología descrita con anterioridad. Para cada estadio (15 dda y maduro) se estudiaron 3 réplicas biológicas procedentes de fragmentos de pericarpo de frutos de distintas plantas. Para cada réplica se realizaron 12 cortes no seriados. Posteriormente, se analizaron a través de un microscopio

óptico Nikon equipado con una lámpara de mercurio de alta presión de 100W y una serie de filtros que permiten visualizar la epifluorescencia de las muestras. Además, está dotado de una cámara digital de alta resolución (Nikon DXM1200) conectada a un ordenador provisto del programa ACT-1 v 2.63 (Nikon), que permitieron la captación, el almacenaje y el tratamiento de fotografías. Los filtros utilizados en este estudio fueron el UV-2A (filtro de excitación (EX): 330-380 nm; espejo dicróico (DM):400 nm; filtro de barrera (BA): 420 nm) y el FITC (EX 465-495 nm; DM 505 nm; BA 515-555 nm). Se tomaron 7 imágenes procedentes de cortes distintos y no seriados para cada una de las 3 réplicas biológicas. El procesamiento de las imágenes a través del software ImageJ (Maryland, USA) permitió, por un lado, segmentarlas para aislar de la imagen solamente la zona de la cutícula y eliminar la interferencia de autofluorescencia emitida en una buena parte de los casos por otras estructuras del pericarpo, así como la separación de los canales rojo, verde y azul (RGB) que conforman una imagen en color, su conversión a escala de grises y posterior medida de la intensidad de la autofluorescencia. Finalmente, los datos obtenidos referentes a cada uno de los canales se expresaron como media de la intensidad de la autofluorescencia (la razón entre la suma de los valores de los píxeles y el número total de píxeles) para cada imagen. Previo a la medida de la autofluorescencia se determinó, con un subconjunto de imágenes representativo de la variabilidad existente, el valor umbral que permitió la eliminación del ruido de fondo sin afectar a la detección de la fluorescencia. Una vez determinado dicho valor umbral, se aplicó a la medida de autofluorescencia de todas las imágenes. El cálculo de la intensidad de autofluorescencia total se realizó aplicando la expresión matemática  $y=0.333(Rojo) + 0.333 (Verde) + 0.333 (Azul)$ .

### **Aislamiento de la cutícula**

Para la extracción de las membranas cuticulares de los frutos maduros se aplicó el procedimiento descrito por Orgell (1955) y modificado por Yamada *et al.* (1964) tal y como aparece en Petracek y Bukovac (1995). Esta metodología conllevó en primer lugar la recogida de frutos sin anomalías superficiales procedentes de diferentes plantas de las distintas entradas, los cuales se lavaron superficialmente con agua destilada. Una vez lavados, fueron divididos en 4 secciones a las que se les extrajo todo el tejido de pericarpo cuidadosamente con ayuda de un escalpelo. Tras ello, se suspendieron en una solución acuosa de tampón citrato pH 4.0 (Panreac) con una mezcla de celulasa (0.2% p/v, Fluka-Sigma, EC 3.2.1.4) y pectinasa (2% p/v, Sigma, EC 3.2.1.15) de origen fúngico. A la

solución de extracción se le añadió además 1 mM de  $\text{NaN}_3$  (Sigma) para prevenir el crecimiento microbiano. Para facilitar la infiltración de la solución enzimática en el tejido, las muestras fueron sometidas a vacío antes de su incubación a  $36^\circ\text{C}$  en un baño termostático con agitación. Transcurridos entre 4 y 7 días, las cutículas se separaron del tejido epidérmico y la solución enzimática se reemplazó por otra recientemente preparada en la que se mantuvieron durante otros 7 días. Tras ellos, las membranas cuticulares se lavaron exhaustivamente en agua destilada durante 2 días para eliminar restos de la solución enzimática. Por último, se pasaron unos segundos por metanol y se dejaron secar a temperatura ambiente sobre una superficie de teflón. Una vez secas, las muestras se guardaron en un desecador con gel de sílice para su posterior estudio.

### **Determinación del peso específico de las cutículas aisladas**

La cantidad de cutícula por unidad de área se determinó a partir de trozos de cutículas aisladas procedentes de distintos frutos en el estadio maduro a las que se les cortaron los bordes con el fin de obtener láminas planas. Las muestras se extendieron sobre un portaobjetos y se empleó un cubreobjetos que se pegó por los bordes para mantener los trozos de cutícula planos. Tras ello, se calculó la superficie total de cada uno mediante la toma de fotografías gracias a una cámara LCC-RCA equipada con una lente macro MS18Z6 (Ernitec, Dinamarca) asociada un ordenador Nikon eclipse E400 a un programa de captura y análisis de imagen (Visilog-Noesis v 6.3, Noesis, Francia). Una vez conocida su superficie, las muestras se dispusieron en cámaras con gel de sílice para su completa deshidratación y posterior pesado. El peso específico se expresó como la media de la cantidad de cutícula por unidad de área ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )  $\pm$  error estándar, realizándose un total de 10 medidas por cada entrada.

### **Determinación del porcentaje de ceras cuticulares**

Las ceras cuticulares fueron extraídas a partir de unos 50 mg de cutícula aislada procedentes de frutos maduros de cada una de las entradas. Previo a la pesada, las muestras se mantuvieron durante un día en un desecador con gel de sílice para su total deshidratación. A continuación, las cutículas se sometieron a condiciones de reflujo en 100 mL de una mezcla de cloroformo y metanol (2:1 v/v) durante 3 h a  $65^\circ\text{C}$ . Posteriormente se lavaron 3 veces en metanol y se dejaron secar sobre una superficie de teflón. Una vez

secas, las muestras se introdujeron nuevamente en la cámara con gel de sílice durante varios días, transcurridos los cuales se volvieron a pesar. El porcentaje de ceras se determinó gravimétricamente a partir de las diferencias de peso. Se realizaron 5 repeticiones biológicas por entrada.

### **Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) / Reflectancia total atenuada (ATR)**

A partir de las cutículas aisladas y deshidratadas, y una vez que las ceras fueron eliminadas tal y como se describió anteriormente, se obtuvieron espectros infrarrojos de tres réplicas biológicas por cada entrada, tanto de la cara externa como de la interna, en modo de reflectancia total atenuada (ATR). Estos fueron realizados en un espectrómetro FTIR (FT/IR-4100, Jasco, España), operando a una resolución de  $4\text{ cm}^{-1}$ . Para cada espectro se realizaron 250 acumulaciones, abarcando un rango espectral desde los  $4000$  hasta los  $750\text{ cm}^{-1}$ . Finalmente, los espectros fueron analizados por medio del software Spectra Manager v.2 (Jasco, España). Para cada muestra se determinaron 2 parámetros: el índice de esterificación (España *et al.*, 2014) a partir de la razón entre la absorbancia de las bandas de  $1730\text{ cm}^{-1}$  (correspondiente a la vibración de estiramiento de los grupos funcionales éster, C=O) y  $2918\text{ cm}^{-1}$  (correspondiente a las vibraciones de estiramiento asimétricas de los grupos metileno, CH<sub>2</sub>) que permite conocer el grado de esterificación de los hidroxiácidos de la matriz de cutina, y el área de las bandas  $1606\text{ cm}^{-1}$  y  $1624\text{ cm}^{-1}$ , relacionadas con los flavonoides.

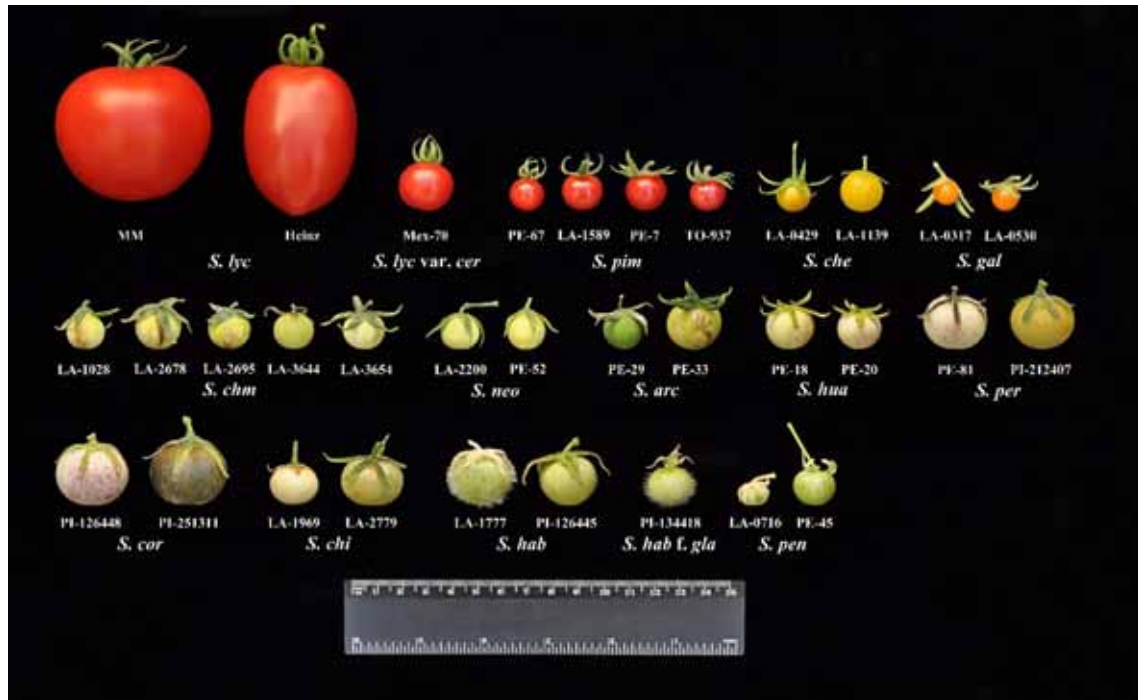
### **Estadística**

Los análisis de correlación se realizaron con el programa informático SPSS Statistics v 23 (IBM Corp., NY, USA) empleándose el coeficiente de correlación lineal de Pearson (\*\* indican  $p \leq 0.01$ ).

## RESULTADOS

En la Figura 3.5 se muestran frutos de las diferentes entradas de tomate estudiadas en este capítulo. Se pueden apreciar las notables diferencias de tamaño entre el tomate domesticado (MM y Heinz) y las especies silvestres. Para facilitar la lectura, en la presente memoria se ha empleado una clasificación informal de la sección *Lycopersicon*, similar a la establecida por Muller (1940), atendiendo a la coloración del fruto. Así, el grupo de fruto rojo designará a las especies *S. lycopersicum*, *S. pimpinellifolium*, *S. galapagense* y *S. cheesmaniae* mientras que el grupo o complejo de fruto verde comprenderá el resto de las especies. Dentro del denominado grupo de fruto rojo se observa variabilidad de color, siendo solo las entradas de las dos primeras especies de fruto rojo mientras que las de *S. cheesmaniae* se caracterizan por un color amarillento y las de *S. galapagense* por su color naranja. Todas las especies del complejo de fruto verde tienen frutos de dicho color o blanquecinos, acumulando en algunos casos antocianos durante la maduración, como es el caso de PE-81 y las dos entradas de *S. corneliomuelleri*. Si bien en las entradas con frutos verdes se apreció un cierto cambio de color durante la maduración, esto no se observó en PE-29, donde los frutos mantuvieron el mismo tono verde que presentaron durante el crecimiento. La entrada LA-3644 *chm* está descrita como productora de frutos de color variable (blanco, amarillo y morado); sin embargo, los frutos recolectados tuvieron todos ellos una coloración similar entre sí y a los del resto de las entradas de *S. chmielewskii*. Asimismo, se puede apreciar a simple vista la densidad del indumento que recubre los frutos de *S. habrochaites*.





**Figura 3.5:** Composición a escala de frutos en estadio maduro de las entradas estudiadas, indicando de forma abreviada la especie a la que pertenecen. Escala en cm.

A pesar de la variabilidad natural presente en las entradas autoincompatibles no se observan diferencias significativas a nivel de fruto entre las distintas plantas de dichas entradas. La excepción fue PI-126448 *cor*, que presenta segregación para el color del fruto maduro, habiendo plantas con frutos de color marrón-verdoso (v) en maduración y otras plantas con frutos blanquecinos (b) (Fig. 3.6). Estas diferencias en color también se traducen en diferencias de textura, teniendo los frutos marrones una textura acorchada en su superficie. Debido a ello, se estudiaron los frutos de ambos grupos de plantas por separado, mostrándose en esta memoria los datos combinados solo en aquellos parámetros en los que no se detectaron diferencias y por separado cuando las hubo. A partir de ahora, y a lo largo de este capítulo, a estos dos tipos de frutos se les denominará PI-126448 *cor* (v) y PI-126448 *cor* (b) para referirse a los de color marrón-verdoso y blanquecino, respectivamente.



**Figura 3.6:** Fotografía de frutos maduros de la entrada PI-126448 *cor* mostrando la variabilidad existente entre plantas. Escala en cm.

### Crecimiento del fruto

De forma paralela a la recolección de los frutos de las distintas plantas se llevó a cabo un seguimiento de su diámetro. Así, para cada una de las entradas se reunieron las medidas de un mínimo de 20-30 frutos correspondientes a cada estadio de desarrollo (Tabla 3.4). Los datos recogidos evidencian la gran diferencia de tamaño que existe entre el tomate cultivado y el resto de las especies. Dichas diferencias se observan desde estadios tempranos del desarrollo, ya que a los 15 dda MM y Heinz presentan frutos considerablemente superiores al resto, y se mantienen en los frutos maduros. Así, en los casos más extremos se pueden observar diferencias en el diámetro de hasta 30 mm a los 15 dda y superiores a 40 mm en el estadio maduro. En el otro extremo del rango de tamaño se encuentran las entradas de *S. galapagense* con un diámetro de fruto maduro inferior a los 10 mm. El resto de las entradas presenta un tamaño de fruto más o menos similar, con la excepción de *S. corneliomuelleri* y, en menor medida de *S. peruvianum*, que muestran un tamaño de fruto mayor.

**Tabla 3.4. Diámetro (en mm) de los frutos de tomate en los estadios 15 dda y maduro.** Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar.

<b>Entrada</b>	<b>15 dda</b>	<b>Maduro</b>
MM <i>lyc</i>	35.12 $\pm$ 0.47	55.91 $\pm$ 0.72
Heinz <i>lyc</i>	26.35 $\pm$ 0.67	42.67 $\pm$ 0.64
Mex-70 <i>cer</i>	15.63 $\pm$ 0.20	18.48 $\pm$ 0.14
PE-67 <i>pim</i>	10.28 $\pm$ 0.15	12.76 $\pm$ 0.11
LA-1589 <i>pim</i>	8.23 $\pm$ 0.16	13.36 $\pm$ 0.26
PE-7 <i>pim</i>	10.83 $\pm$ 0.35	11.09 $\pm$ 0.27
TO-937 <i>pim</i>	11.27 $\pm$ 0.14	11.70 $\pm$ 0.12
LA-0429 <i>che</i>	13.25 $\pm$ 0.15	14.32 $\pm$ 0.22
LA-1139 <i>che</i>	12.44 $\pm$ 0.23	14.27 $\pm$ 0.19
LA-0317 <i>gal</i>	6.44 $\pm$ 0.11	8.01 $\pm$ 0.15
LA-0530 <i>gal</i>	7.95 $\pm$ 0.07	9.79 $\pm$ 0.11
LA-1028 <i>chm</i>	12.34 $\pm$ 0.14	14.89 $\pm$ 0.39
LA-2678 <i>chm</i>	13.59 $\pm$ 0.13	17.41 $\pm$ 0.42
LA-2695 <i>chm</i>	12.06 $\pm$ 0.22	15.82 $\pm$ 0.23
LA-3644 <i>chm</i>	12.16 $\pm$ 0.23	15.66 $\pm$ 0.43
LA-3654 <i>chm</i>	13.65 $\pm$ 0.16	15.54 $\pm$ 0.36
LA-2200 <i>neo</i>	11.86 $\pm$ 0.17	13.34 $\pm$ 0.25
PE-52 <i>neo</i>	14.13 $\pm$ 0.11	14.30 $\pm$ 0.17
PE-29 <i>arc</i>	11.71 $\pm$ 0.29	15.55 $\pm$ 0.25
PE-33 <i>arc</i>	13.33 $\pm$ 0.25	20.18 $\pm$ 0.31
PE-18 <i>hua</i>	9.98 $\pm$ 0.16	16.27 $\pm$ 0.23
PE-20 <i>hua</i>	9.96 $\pm$ 0.22	16.29 $\pm$ 0.49
PE-81 <i>per</i>	12.77 $\pm$ 0.24	22.95 $\pm$ 0.35
PI-212407 <i>per</i>	11.98 $\pm$ 0.25	22.56 $\pm$ 0.48
PI-126448 <i>cor</i>	16.17 $\pm$ 0.35	25.22 $\pm$ 0.36
PI-251311 <i>cor</i>	15.77 $\pm$ 0.38	27.30 $\pm$ 0.29
LA-1969 <i>chi</i>	7.00 $\pm$ 0.61	13.73 $\pm$ 0.55
LA-2779 <i>chi</i>	10.78 $\pm$ 0.19	17.11 $\pm$ 0.50
LA-1777 <i>hab</i>	7.38 $\pm$ 0.17	19.28 $\pm$ 0.61
PI-126445 <i>hab</i>	10.76 $\pm$ 0.25	15.59 $\pm$ 0.32
PI-134418 <i>gla</i>	11.54 $\pm$ 0.26	16.50 $\pm$ 0.26
LA-0716 <i>pen</i>	5.21 $\pm$ 0.20	11.57 $\pm$ 0.34
PE-45 <i>pen</i>	12.86 $\pm$ 0.17	16.75 $\pm$ 0.24

La maduración de las diferentes entradas ocurrió entre los 35 dda, en los casos más avanzados, y los 60-70 dda. A pesar de ello, en varias entradas se puede observar que el tamaño de fruto no varía sustancialmente entre los 15 dda y el estadio maduro. Tal es el caso de las entradas de *S. cheesmaniae*, *S. galapagense*, *S. chmielewskii*, *S. neorickii* y varias de *S. pimpinellifolium*, entre otras. En el resto existe un aumento más notable durante este periodo de 1.6-2.6 veces el tamaño del fruto a 15 dda. No obstante, se observa

una cierta homogeneidad en el comportamiento de las entradas de una misma especie, si bien es cierto que hay especies como *S. pennellii* o *S. arcanum* donde cada entrada presenta un comportamiento diferente.

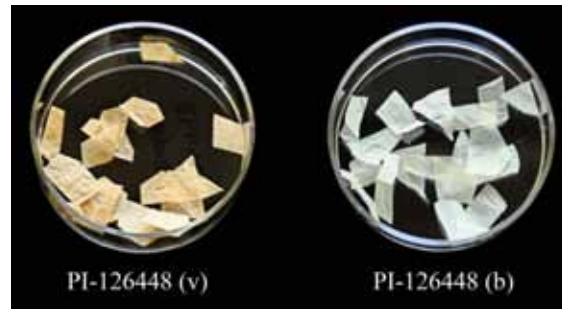
### Cantidad de cutícula

La Figura 3.7 muestra varios fragmentos de cutícula de las diferentes entradas de tomate estudiadas. Así, se puede apreciar que las cutículas de las especies del complejo de fruto rojo se caracterizan por presentar un color naranja-amarillento en maduración. El color de las cutículas no se ve influido por el color en maduración de estos frutos, ya que tanto las cutículas procedentes de frutos rojos como de frutos amarillentos o anaranjados presentan una coloración similar. La excepción fue la entrada TO-937 de *S. pimpinellifolium* cuya cutícula muestra un color crema. Como ya se indicó en el apartado anterior, esta entrada se caracteriza por poseer frutos de color rosa oscuro en maduración y, como está descrito en la bibliografía, los tomates rosa se caracterizan por tener cutículas no coloreadas. Por su parte, las cutículas de las entradas de fruto verde presentan un color crema o blanquecino. Concretamente las cutículas de las entradas de *S. peruvianum*, *S. corneliomuelleri* y *S. pennellii* son de color blanco y bastante translúcidas mientras que las cutículas del resto de especies de fruto verde son de color crema.



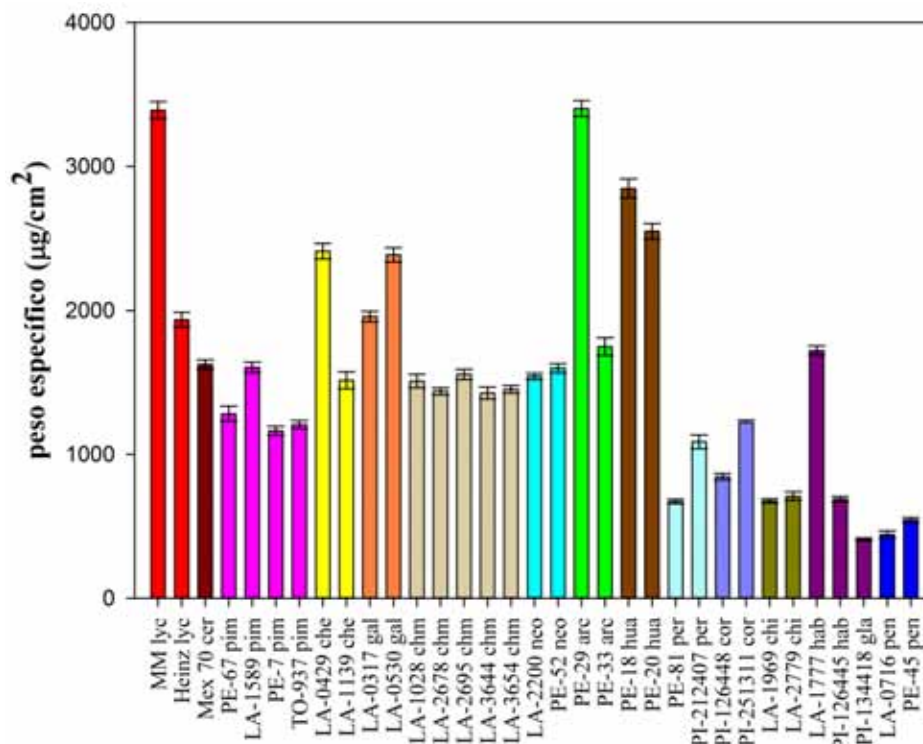
**Figura 3.7:** Imagen en la cual se recogen parte de las membranas cuticulares obtenidas a partir de diversos frutos maduros correspondientes a las diferentes entradas analizadas, indicando de forma abreviada la especie a la que pertenecen.

La Figura 3.8 muestra las diferencias existentes a nivel de cutícula entre los frutos verdes y blancos de la entrada PI-126448 de *S. corneliomuelleri*. Tal y como se puede observar, las cutículas de los frutos PI-126448 (b) son de color blanquecino y translúcidas mientras que las de PI-126448 (v) muestran un color marrón claro y son bastante opacas.



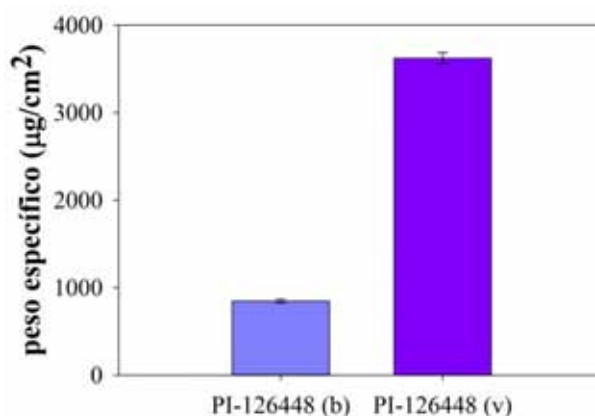
**Figura 3.8:** Membranas cuticulares aisladas a partir de frutos maduros de PI-126448 *cor* (v) y de PI-126448 *cor* (b).

En la Figura 3.9 se presenta la cantidad de cutícula por unidad de superficie para cada una de las entradas estudiadas. Este parámetro refleja nuevamente la variabilidad existente entre las especies de la sección *Lycopersicon*. Es necesario indicar que no se observan diferencias claras en la cantidad de cutícula entre el tomate domesticado y el resto de las especies ni entre el conjunto de las especies de fruto rojo y el de las de fruto verde. De modo general, se observa una bajada en la cantidad de cutícula en las especies más alejadas del tomate cultivado, concretamente en *S. peruvianum*, *S. corneliomuelleri*, *S. chilense*, *S. habrochaites* y *S. pennellii*. Las entradas de *S. huaylasense* y, en menor medida, las de *S. cheesmaniae* y *S. galapagense*, muestran valores elevados de cantidad de cutícula. Por su parte, *S. arcanum* presenta una gran variabilidad entre las dos entradas estudiadas. Un comportamiento similar se observa en *S. habrochaites* donde la cantidad de cutícula de LA-1777 fue muy superior a la de las otras dos entradas. Sin embargo, LA-1777 *hab* se caracteriza por necesitar días cortos para la floración, por lo que hubo que esperar al invierno para la recolección de los frutos. Está descrito que las condiciones ambientales y la edad de las plantas afectan a la deposición de la cutícula (Hull *et al.*, 1975; Hajibagheri *et al.*, 1983; Kosma *et al.*, 2009; Domínguez *et al.*, 2012); por tanto, no se puede descartar que estos parámetros hayan influido en las diferencias de cantidad de cutícula observadas entre LA-1777 *hab* y el resto de las entradas de *S. habrochaites*. Algo parecido ocurre con MM *lyc*; en el grupo de trabajo se ha observado que es una entrada que puede modificar su cantidad de cutícula de modo significativo en función de las condiciones de cultivo.



**Figura 3.9:** Peso específico ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) de la cutícula de los frutos en el estadio maduro correspondiente a cada una de las entradas estudiadas. Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar.

La comparación de la cantidad de cutícula de los dos tipos de frutos de PI-16448 muestra diferencias muy significativas (Fig. 3.10). Mientras que PI-126448 *cor* (b) presenta una cantidad de cutícula en torno a los  $800 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , PI-126448 *cor* (v) muestra una cantidad 4.5 veces superior, alrededor de  $3600 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ .

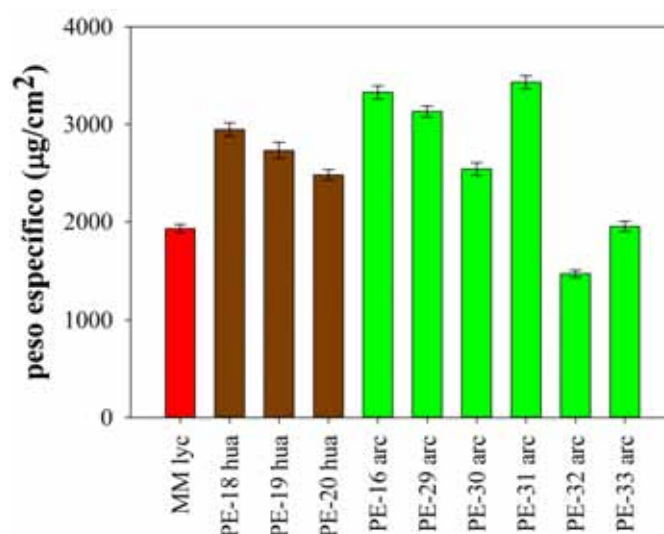


**Figura 3.10:** Peso específico ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) de la cutícula de los frutos en el estadio maduro de PI-126448 *cor* (b) y PI-126448 *cor* (v). Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar.

*S. arcanum* está descrita como una especie emparentada con *S. neorickii* y *S. chmielewskii*, mientras que *S. huaylasense* es una especie más cercana al grupo formado por *S. chilense*, *S. habrochaites*, *S. corneliomuelleri* y *S. peruvianum* (Peralta *et al.*, 2005).



Sin embargo, los datos de cantidad de cutícula de *S. huaylasense* y *S. arcanum* no muestran parecido con los obtenidos para ninguna de las especies de fruto verde a las que están más próximas. Con el fin de corroborar estos datos se volvieron a cultivar estas especies junto con MM *lyc* y se procedió a la extracción y análisis de la cantidad de cutícula de los frutos maduros. Se cultivaron 3 entradas de *S. huaylasense*, las 2 ya mencionadas y 1 adicional, así como 6 entradas de *S. arcanum*. En la Figura 3.11 se presentan los datos de cantidad de cutícula. Como se puede observar, la cantidad de cutícula de MM *lyc* disminuye al ser las condiciones de cultivo distintas. Sin embargo, el resto de las entradas muestran valores similares a los obtenidos previamente. En el caso de *S. huaylasense* la entrada adicional cultivada, PE-19 *hua*, presenta una cantidad de cutícula similar a las otras 2 entradas. Por su parte, en *S. arcanum* se puede constatar la presencia de una variabilidad considerable para la cantidad de cutícula, con algunas entradas como PE-32 y PE-33 con cantidades similares a *S. chmielewskii* y *S. neorickii* y otras con valores muy superiores.



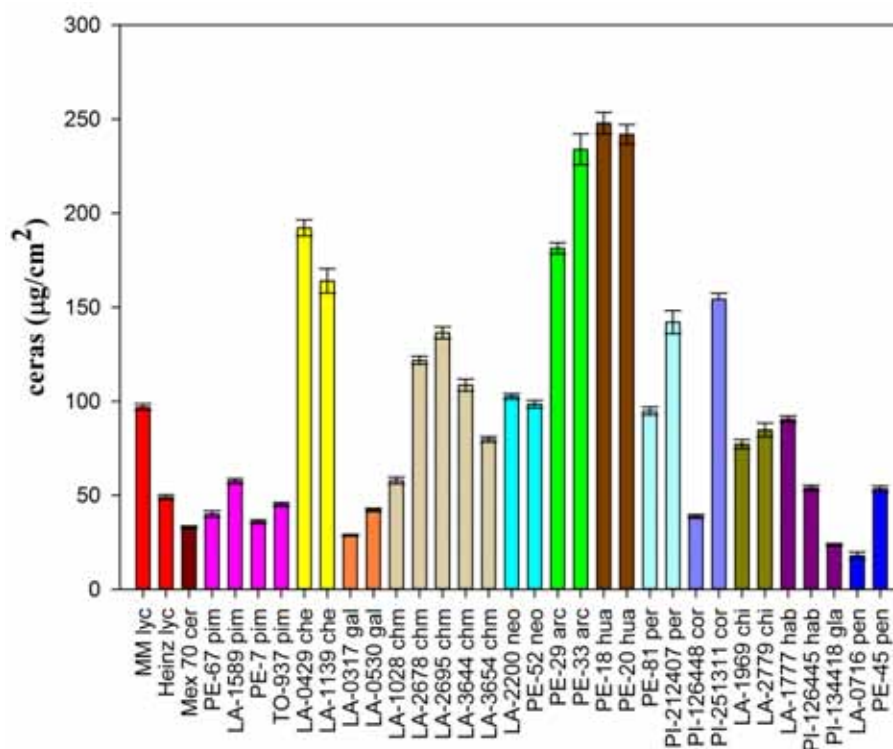
**Figura 3.11:** Peso específico ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) de la cutícula de los frutos en el estadio maduro correspondiente a cada una de las entradas estudiadas. Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar.

### Cantidad de ceras cuticulares

A partir de los datos referentes al peso específico fue posible estimar la cantidad de ceras presente en los frutos maduros de cada una de las entradas (Fig. 3.12). De nuevo, la abundancia de este componente cuticular refleja la notable variabilidad existente dentro de la sección *Lycopersicon*. Los valores más elevados en torno a los 200-250  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  se observan en *S. cheesmaniae*, *S. arcanum* y *S. huaylasense*. Por su parte, algunas entradas de *S. chmielewskii*, *S. peruvianum* y *S. corneliomuelleri* presentan unos valores menores a



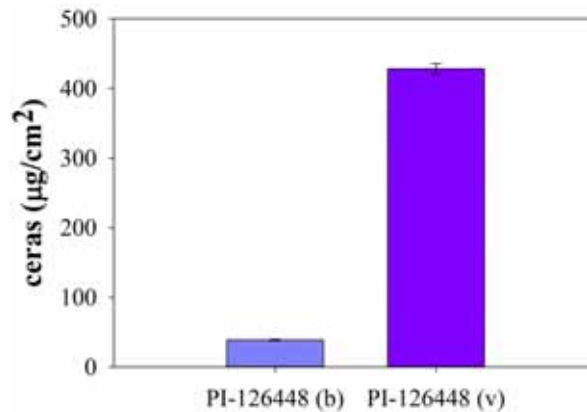
los del grupo anterior pero aún elevados. Finalmente, los valores más bajos están presentes en algunas entradas de *S.pennellii* y *S. galapagense* así como en PI-134418 *gla* con valores de 20-30  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ .



**Figura 3.12:** Cantidad de ceras por unidad de área presente en la cutícula de los frutos de tomate maduros de las diferentes entradas. Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar.

En el análisis del contenido de ceras de la cutícula es importante tener en cuenta no solo la cantidad de las mismas sino el porcentaje de cutícula que representan. Así, de modo general, las especies silvestres presentan un porcentaje de ceras superior al de *S. lycopersicum* con la excepción de *S. galapagense*, cuyas ceras constituyeron solo el 1.5% de la cutícula. *S. pimpinellifolium* muestra un porcentaje de ceras superior al tomate domesticado pero inferior al del resto de las especies silvestres. Los mayores porcentajes de ceras se identifican en *S. peruvianum* y *S. chilense*, con valores que oscilan entre 11-14% de la cutícula. *S. cheesmaniae*, *S. huaylasense* y *S. pennellii* muestran también valores elevados del 8-11%. Dos especies que muestran una gran variabilidad entre entradas son *S. arcanum* y *S. corneliomuelleri* donde PE-33 *arc* y PI-251311 *cor* presentan valores en torno al 13% mientras que las otras dos entradas respectivas solo del 4-5%. Es interesante mencionar que, con la excepción de *S. cheesmaniae*, todas las especies del complejo de fruto rojo presentan un porcentaje de ceras inferior a las especies del grupo de fruto verde.

La comparación entre los frutos verdes y blancos de la entrada PI-126448 arroja grandes diferencias para la cantidad y el porcentaje de ceras. De acuerdo con la Figura 3.13, PI-126448 *cor* (v) presenta 11 veces más cantidad de ceras que PI-126448 *cor* (b). Estas diferencias también afectan al porcentaje de ceras, que es 2.6 veces superior en PI-126448 *cor* (v) con un valor del 12%.



**Figura 3.13:** Cantidad de ceras por unidad de área presente en la cutícula de los frutos maduros de PI-126448 *cor* (b) y PI-126448 *cor* (v). Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar.

### Grosor de la cutícula

En la Tabla 3.5 se recoge el grosor medio de la cutícula de los frutos de 15 dda y de los frutos maduros, en la cual es posible observar nuevamente la gran variabilidad existente entre las distintas especies y entradas. En el estadio 15 dda los valores oscilan entre los 1-1.3  $\mu\text{m}$  de *S. habrochaites* y los valores de 7.5-9.7  $\mu\text{m}$  de *S. cheesmaniae* y Heinz *lyc*. En general, el grosor de la mayoría de las entradas oscila entre 3.5 y 6  $\mu\text{m}$ . Cabe reseñar que cuando la membrana cuticular es muy delgada, en torno a la micra, la precisión de la medida es menor. Se observa una cierta homogeneidad en el grosor de las entradas correspondientes a una misma especie salvo en los casos de *S. lycopersicum*, *S. corneliomuelleri*, *S. chilense* y *S. pennellii*, donde las diferencias dentro de cada especie son superiores a 1.5 veces el grosor. Sin embargo, las marcadas diferencias de grosor entre las entradas de estas especies desaparecen en *S. lycopersicum* y *S. chilense* en el estadio maduro, mientras que *S. corneliomuelleri* y *S. pennellii* se mantienen e incluso se acentúan. Adicionalmente, también aparecen diferencias notables entre las entradas de *S. peruvianum* en el estadio maduro y se acrecentan las diferencias entre PE-7 *pim* y el resto de las entradas de *S. pimpinellifolium*. En el estadio maduro, el grosor oscila entre los valores elevados de *S. lycopersicum* en torno a 12-13  $\mu\text{m}$  y las 1.7  $\mu\text{m}$  de LA-0716 *pen*.

**Tabla 3.5. Grosor (en  $\mu\text{m}$ ) de la cutícula de los frutos de tomate en los estadios de 15 dda y maduro.**  
Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar.

Entrada	15 dda	Maduro
MM <i>lyc</i>	4.25 $\pm$ 0.13	13.24 $\pm$ 0.24
Heinz <i>lyc</i>	7.48 $\pm$ 0.14	12.22 $\pm$ 0.60
Mex-70 <i>cer</i>	6.01 $\pm$ 0.14	10.59 $\pm$ 0.15
PE-67 <i>pim</i>	6.47 $\pm$ 0.15	8.58 $\pm$ 0.25
LA-1589 <i>pim</i>	7.22 $\pm$ 0.14	9.19 $\pm$ 0.17
PE-7 <i>pim</i>	4.99 $\pm$ 0.15	4.07 $\pm$ 0.12
TO-937 <i>pim</i>	6.37 $\pm$ 0.15	7.49 $\pm$ 0.25
LA-0429 <i>che</i>	9.69 $\pm$ 0.15	9.53 $\pm$ 0.37
LA-1139 <i>che</i>	7.48 $\pm$ 0.13	8.66 $\pm$ 0.28
LA-0317 <i>gal</i>	6.07 $\pm$ 0.15	7.99 $\pm$ 0.24
LA-0530 <i>gal</i>	6.82 $\pm$ 0.14	8.25 $\pm$ 0.23
LA-1028 <i>chm</i>	5.55 $\pm$ 0.12	7.00 $\pm$ 0.24
LA-2678 <i>chm</i>	4.58 $\pm$ 0.11	7.19 $\pm$ 0.41
LA-2695 <i>chm</i>	4.96 $\pm$ 0.15	8.70 $\pm$ 0.25
LA-3644 <i>chm</i>	4.07 $\pm$ 0.11	7.40 $\pm$ 0.24
LA-3654 <i>chm</i>	4.57 $\pm$ 0.15	6.95 $\pm$ 0.26
LA-2200 <i>neo</i>	6.73 $\pm$ 0.12	7.13 $\pm$ 0.27
PE-52 <i>neo</i>	5.83 $\pm$ 0.14	7.11 $\pm$ 0.23
PE-29 <i>arc</i>	3.51 $\pm$ 0.11	8.89 $\pm$ 0.30
PE-33 <i>arc</i>	3.84 $\pm$ 0.15	8.71 $\pm$ 0.40
PE-18 <i>hua</i>	4.98 $\pm$ 0.15	9.28 $\pm$ 0.25
PE-20 <i>hua</i>	4.10 $\pm$ 0.09	9.80 $\pm$ 0.29
PE-81 <i>per</i>	3.23 $\pm$ 0.09	4.01 $\pm$ 0.21
PI-212407 <i>per</i>	3.11 $\pm$ 0.10	8.49 $\pm$ 0.26
PI-126448 <i>cor</i>	5.07 $\pm$ 0.14	9.01 $\pm$ 0.19
PI-251311 <i>cor</i>	3.41 $\pm$ 0.11	4.86 $\pm$ 0.13
LA-1969 <i>chi</i>	2.63 $\pm$ 0.08	5.85 $\pm$ 0.21
LA-2779 <i>chi</i>	5.09 $\pm$ 0.09	5.08 $\pm$ 0.21
LA-1777 <i>hab</i>	1.28 $\pm$ 0.04	4.80 $\pm$ 0.11
PI-126445 <i>hab</i>	1.31 $\pm$ 0.04	5.26 $\pm$ 0.18
PI-134418 <i>gla</i>	1.15 $\pm$ 0.04	3.67 $\pm$ 0.12
LA-0716 <i>pen</i>	1.79 $\pm$ 0.07	1.70 $\pm$ 0.07
PE-45 <i>pen</i>	2.73 $\pm$ 0.09	6.04 $\pm$ 0.18

Salvo algunas excepciones, la cutícula incrementa su espesor entre los 15 dda y la maduración, duplicándose en algunas entradas, e incluso llegando a casi triplicarse como ocurre en PI-251311 *cor*, donde el grosor pasa de 3.41 a 9.01  $\mu\text{m}$ . En algunos casos como *S. cheesmaniae* las entradas que apenas incrementan su grosor de cutícula durante el periodo comprendido entre 15 dda y la maduración coinciden con aquellas en las que apenas hay cambios en el tamaño del fruto durante este periodo. Sin embargo, no hay una

relación directa entre el incremento de tamaño de fruto y el espesor de la cutícula durante dicho intervalo. Por otro lado, se estudió la posible correlación entre la cantidad de cutícula en el estadio maduro y el grosor de la misma. El análisis de los datos mostró que grosores similares como los de PE-81 *per* y PE-7 *pim* o PE-29 *arc* y PI-126448 *cor* están acompañados de diferencias en la cantidad de cutícula del doble y el triple, respectivamente.

### Estudio histológico

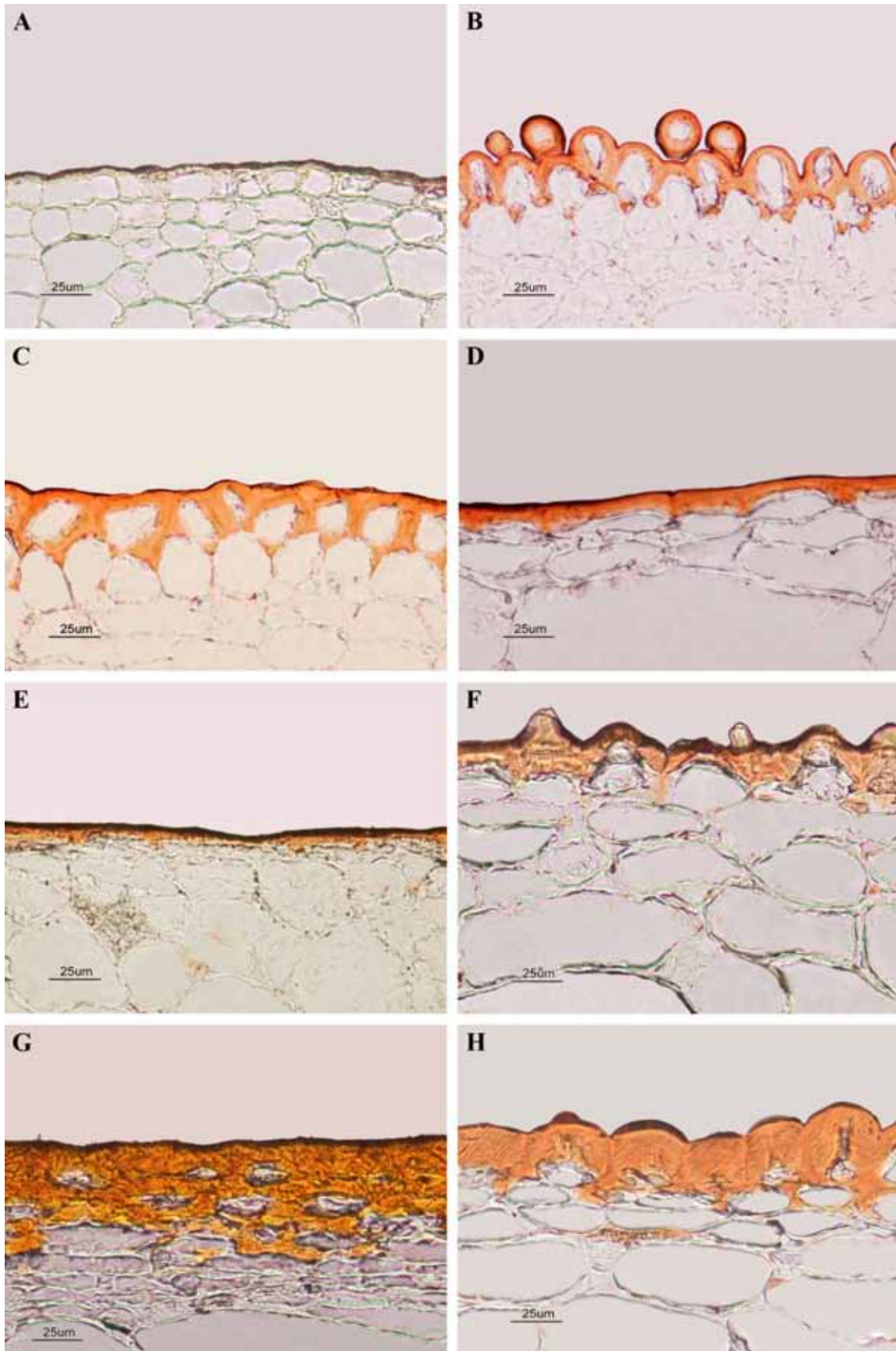
Las tinciones histológicas llevadas a cabo con el colorante Sudán IV sobre las secciones transversales de 4  $\mu\text{m}$  de grosor permitieron llevar a cabo un primer análisis generalizado del pericarpo de los frutos de 15 dda y maduros de las distintas entradas. De esta forma ha sido posible constatar que la variabilidad también se extiende a otros caracteres de la cutícula como el grosor, la morfología, o el grado de invaginación de la misma, así como en el tamaño y en la forma de las células epidérmicas subyacentes. El Anexo I agrupa las imágenes de microscopía óptica de todas las entradas en los dos estadios del desarrollo estudiados.

Las diferencias en el grosor de la cutícula se manifiestan claramente en los cortes histológicos de las 33 entradas estudiadas para los dos estadios del desarrollo. A 15 dda se observaron diferencias en el perímetro externo de la cutícula. Así, la mayoría de las entradas muestran una superficie externa más o menos plana a 15dda (Fig.3.14, A, C, y D). Sin embargo, en algunas entradas la superficie celular presenta un aspecto ondulado (Fig. 3.14, B). En la mayoría de los casos esto es resultado de la morfología de la pared celular externa de las células epidérmicas, las cuales son alargadas y se encuentran unidas entre sí por la porción inferior de las paredes anticlinales. Adicionalmente, la presencia de tricomas, sobre todo glandulares, altamente cutinizados contribuye a la irregularidad de la superficie, tal y como ocurre en *S. chmielewskii* (Fig. 3.14, B). Esta irregularidad del contorno de la epidermis está principalmente restringida a *S. chmielewskii*, PE-29 *arc*, PE-52 *neo* y PE-18 *hua*. En la mayoría de las entradas las células de la epidermis muestran una forma más o menos redondeada con algunas excepciones como PE-7 *pim*, cuyas células presentan un aspecto rectangular con el eje mayor perpendicular a la superficie, y otras como PE-33 *arc*, LA-2779 *chi* o PI-126445 *hab* con células alargadas con el eje mayor paralelo a la superficie. Igualmente, se observan diferencias en el número de capas

celulares que forman la hipodermis, el cual varía desde la presencia de 3 capas de células hipodérmicas a la práctica ausencia de las mismas en *S. corneliomuelleri* y *S. pennellii*.

A excepción de algunos frutos de 15 dda, como los procedentes de la entrada LA-1777 *hab* (Fig. 3.14, A), la cutícula se muestra en todos los casos como una capa situada en la parte más externa de las células epidérmicas que penetra en mayor o menor medida hacia el interior formando las invaginaciones o ‘pegs’. Así, en buena parte de los casos la cutícula impregna las paredes anticlinales en toda su extensión pero sin alcanzar las paredes periclinales internas de las células (Fig.3.14, D). Existen algunas excepciones como PE-45 *pen* y PI-134418 *hab* (Anexo I) donde hay zonas en las que la cutícula no llega a cubrir la totalidad de la pared anticlinal. El caso opuesto sería el representado por Mex-70 *cer*, LA-1589 *pim* y LA-0429 *che* donde la cutícula engloba por completo a las células epidérmicas y alguna capa de células hipodérmicas (Anexo I). En los casos menos severos la cutícula solo rodea por completo a las células de la epidermis (Anexo I).

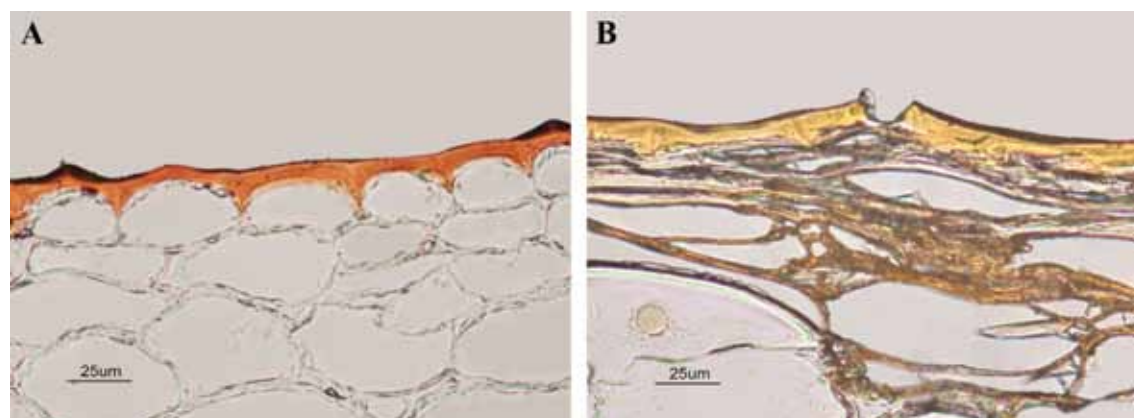
En el estadio maduro se observan varios cambios con respecto a 15 dda. Hay un aumento del grado de invaginación de la cutícula que queda reflejado bien como un incremento del material cuticular presente en las paredes anticlinales, aumentando así la envergadura de los ‘pegs’ (Fig. 3.14, G, F y H), o bien como una mayor profundización de la cutícula, pudiendo llegar a alcanzar varias capas de células tal y como ocurre en el caso de MM *lyc* (Fig. 3.14, G). Las entradas que presentan un elevado grado de invaginación en 15 dda no muestran un incremento de la cutinización de las capas de hipodermis en maduro. La cutícula de PE-45 *pen* no impregna las paredes anticlinales epidérmicas durante el proceso de desarrollo y maduración, quedando la cutícula sin invaginar, lo mismo que a 15 dda (Fig. 3.14, E). Adicionalmente, la ondulación presentada por el perímetro externo de la epidermis se aplatina considerablemente con el desarrollo, si bien las entradas que muestran un contorno irregular en 15 dda siguen teniéndolo en el estadio maduro.



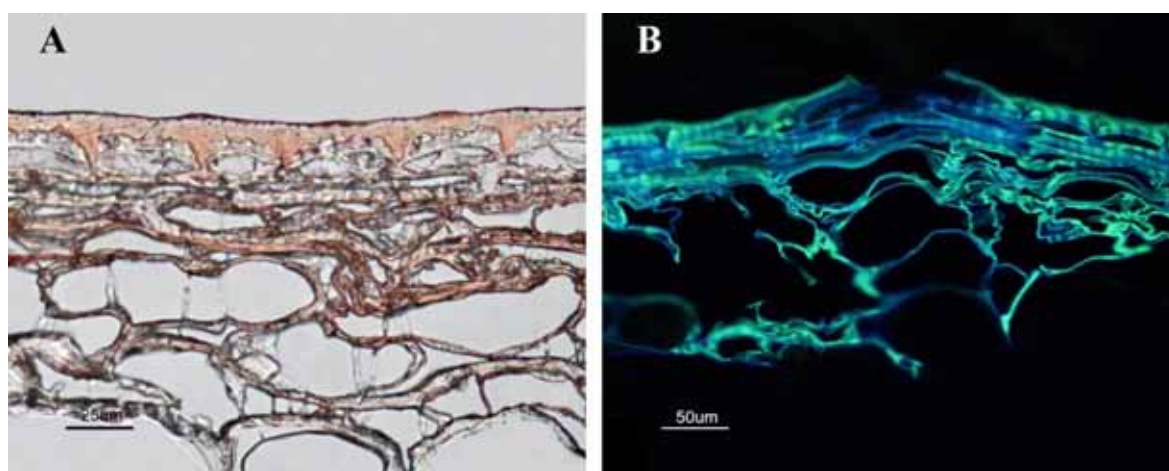
**Figura 3.14:** Imágenes de microscopía óptica convencional de secciones transversales de pericarpo teñidas con Sudán IV correspondientes a frutos de 15 dda (**A:** LA-1777 *hab*; **B:** LA-2695 *chm*; **C:** LA-0530 *gal*; **D:** LA-2779 *chi*) y a frutos maduros (**E:** PE-45 *pen*; **F:** LA-2678 *chm*; **G:** MM *lyc*; **H:** PE-20 *hua*).



Por último, los frutos verdes y blanquecinos de PI-126448 *cor* no presentan diferencias histológicas a 15 dda pero sí en maduro. Lo más llamativo es el colapso de las células de la epidermis e hipodermis junto con alguna capa de células del parénquima. Dicho colapso está acompañado de la deposición de material lipídico en las paredes celulares. Adicionalmente, se observan microgrietas en la superficie de la cutícula que en los casos más severos provocan la rotura de la epidermis y que no están presentes en PI-126448 *cor* (b) (Fig. 3.15). La deposición de material lipídico en las células de la hipodermis y del parénquima, así como la desestructuración del tejido, no están siempre asociadas a la presencia de grietas ni afecta en todos los casos a las células epidérmicas (Fig. 3.16, A). La tinción con hemisulfato de berberina muestra la deposición de material de naturaleza fenólica en los tejidos afectados (Fig. 3.16, B). El estudio mediante MEB de los frutos de PI-126448 *cor* (v) evidenció la presencia de numerosas microgrietas en la superficie (Fig. 3.17). Estas microgrietas solo aparecen durante la maduración de los frutos.

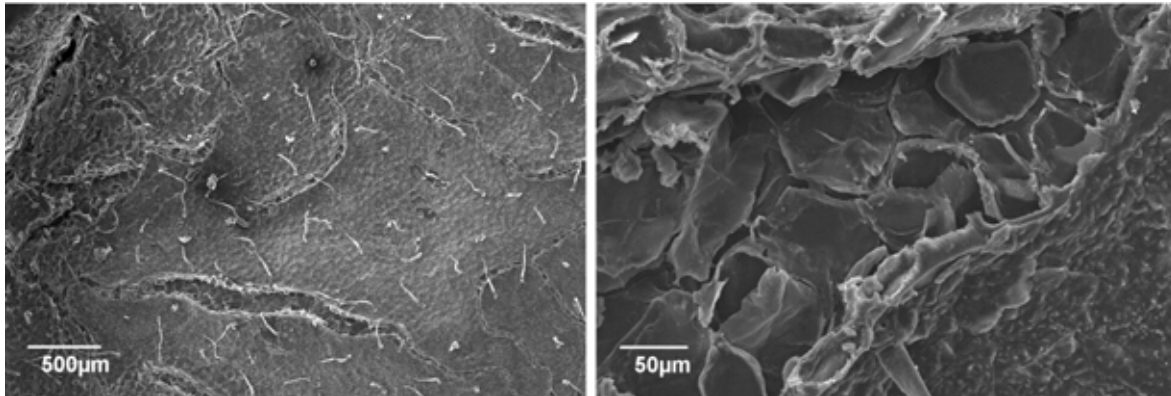


**Figura 3.15:** Imágenes de microscopía óptica convencional de secciones transversales de pericarpio teñidas con Sudán IV correspondientes a frutos maduros de PI-126448 *cor* (b) (A) y de PI-126448 *cor* (v) (B).



**Figura 3.16:** Imágenes de microscopía óptica convencional (A) y de epifluorescencia (B) de secciones transversales de pericarpio de frutos maduros de PI-126448 *cor* (v) (A) teñida con Sudán IV y (B) teñida con hemisulfato de berberina.



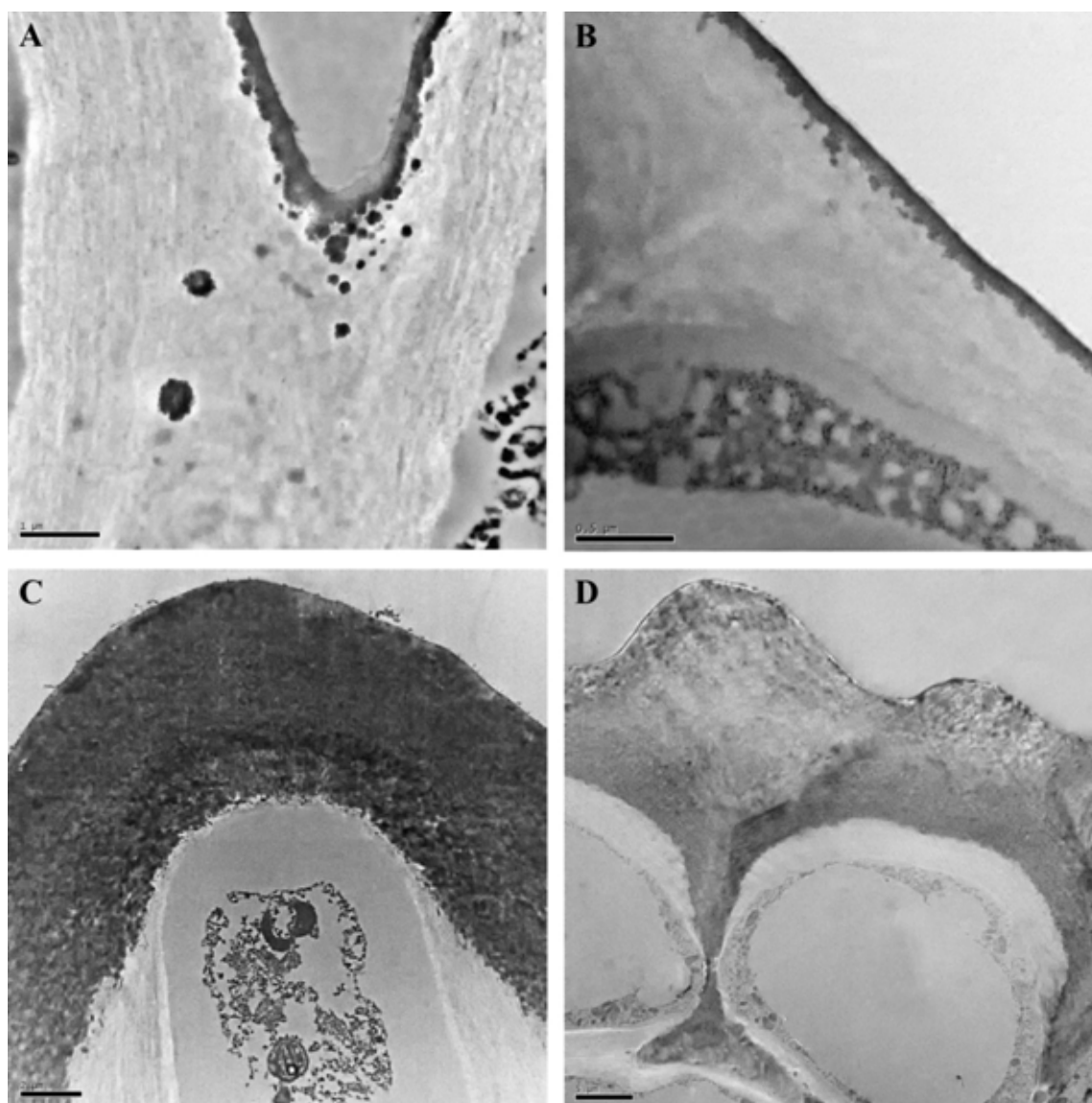


**Figura 3.17:** Imágenes de MEB de la superficie de los frutos PI-126448 *cor* (v).

Asimismo, se estudió la ultraestructura de la cutícula de los frutos de las distintas especies de tomate mediante MET. Para ello se procedió a la toma de imágenes a diferentes aumentos de secciones transversales de los mismos, tanto a los 15 dda como en el estadio maduro. El Anexo II recoge algunas imágenes de MET de frutos de todas las entradas en los dos estadios del desarrollo.

Lo primero que cabe destacar es que los grosores estimados a partir de imágenes de microscopía óptica son similares a los que se aprecian en MET con excepción de aquellos casos en los que la cutícula era muy delgada, en torno a una micra, donde sí parece que las medidas estuvieron sobredimensionadas. Tal es el caso de LA-1777 *hab* y LA-0716 *pen* (comparar datos Tabla 3.5 con Figura 3.18). A los 15 dda la cutícula se manifiesta en la totalidad de especies como una capa de carácter electrodensito distribuida de manera uniforme a lo largo de la superficie del fruto. De modo general, en la mayor parte de las entradas la cutícula muestra un aspecto reticular, sin distinguirse capas o zonas en su interior. No obstante, se aprecian entradas como LA-1589 *pim* y PE-7 *pim* donde la cutícula es considerablemente menos electrodensa que el resto (Anexo II). En otras se pueden diferenciar zonas con distinta densidad a los electrones dentro de la cutícula en desarrollo. La cutinización de la pared celular más externa es muy notable en este estadio, aproximadamente la mitad de la misma está impregnada de cutícula en la mayoría de las entradas. Se observan algunos casos extremos como LA-2695 *chm* y PE-52 *neo* donde la cutinización de la pared celular más externa es casi completa. En el lado opuesto se encuentran LA-1777 *hab*, PI-134418 *gla*, LA-0716 *pen* y, en menor medida, PI-126445 *hab* donde la cutícula solo recubre una pequeña porción externa de la pared celular (Anexo II). La excepción de este grupo que incluye las entradas estudiadas de *S. habrochaites* y *S. pennellii* es PE-45 *pen*, donde la cutinización de la pared celular externa es notable.

Igualmente, se aprecian diferencias destacables en el grosor de la pared celular externa. En las entradas antes mencionadas, LA-1777 *hab*, PI-134418 *gla* y LA-0716 *pen*, la pared celular más externa es considerablemente más delgada que en el resto de las entradas. Asimismo, la naturaleza fibrilar de la pared celular externa se aprecia claramente en algunas entradas como las de *S.lycopersicum*, *S.lycopersicum* var. *cerasiforme* y *S.pimpinellifolium* (Anexo II). Esta disposición en la cual se alternan capas paralelas electroclaras con otras algo más electrodensas permanece con posterioridad hasta que el fruto alcanza la maduración (Anexo II). No obstante, también se han encontrado algunas entradas en las que la pared celular externa muestra una apariencia amorfa a los 15 dda sin distinguirse ninguna disposición en capas.

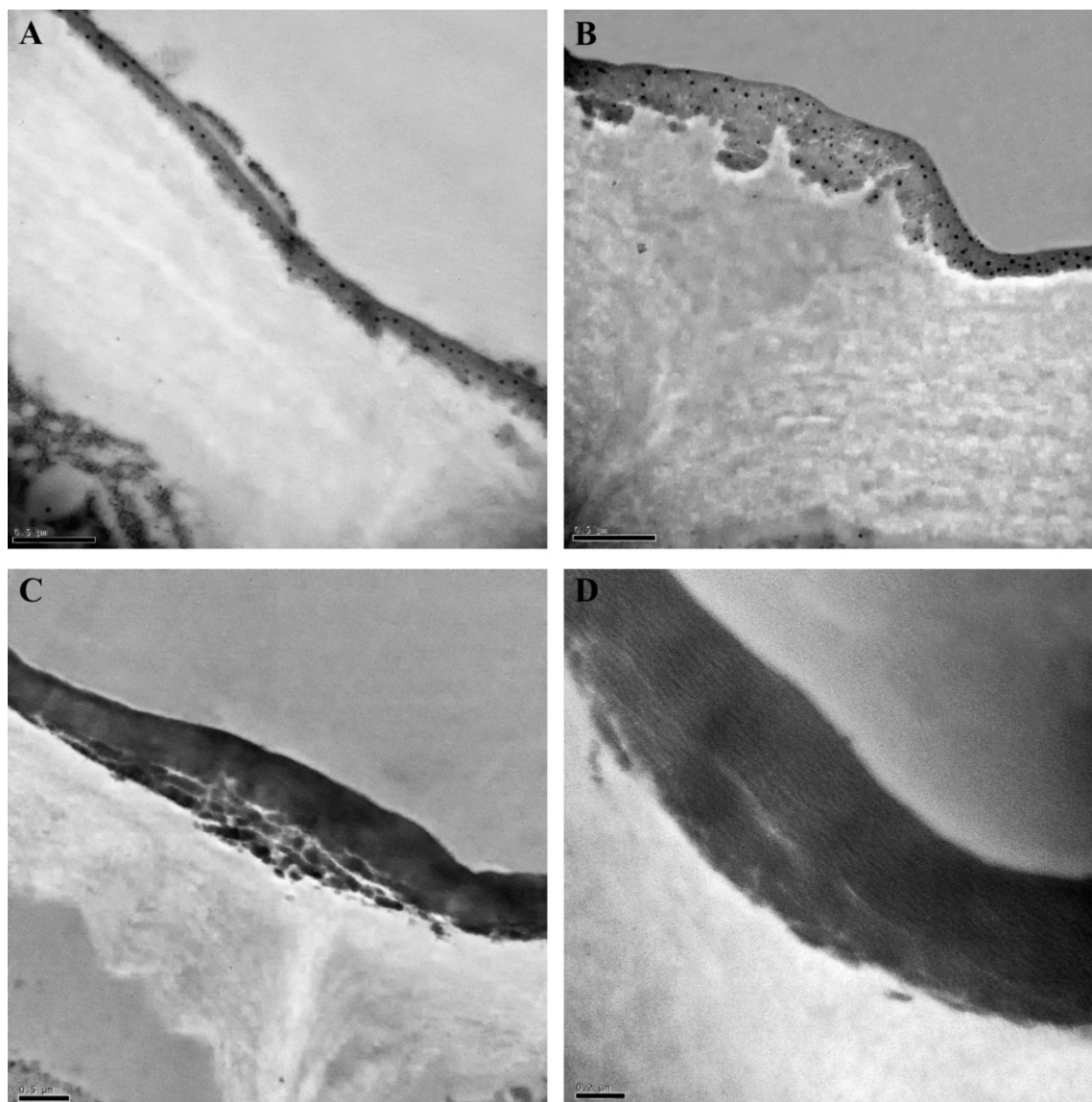


**Figura 3.18:** Imágenes de MET de cortes transversales del pericarpo de frutos a los 15 dda (**A:** LA-0716 *pen*, barra: 01  $\mu\text{m}$ ; **B:** PI-134418 *gla*, barra: 0.5  $\mu\text{m}$ ; **C:** PE-52 *neo*, barra: 2  $\mu\text{m}$ ; **D:** Mex-70 *cer*, barra: 5  $\mu\text{m}$ ).

La estructura reticulada de la cutícula a 15 dda se caracteriza por su naturaleza más o menos granulada con pequeñas estructuras más densas a los electrones (Fig. 3.18, A, Anexo II). Adicionalmente, la cara interna de la cutícula presenta un contorno irregular y es posible identificar estructuras globulares electodensas de forma irregular que están en contacto con la cutícula algunas y otras en la región de la pared celular externa más próxima a la cutícula (Fig. 3.18, A-D). Dichas regiones globulares se observan en la práctica totalidad de las especies aunque son mucho más notables en aquellas entradas con cutículas más delgadas y poco desarrolladas, como *S. habrochaites f. glabratum*, *S. habrochaites*, y LA-0716 *pen*. En el caso de LA-0716 *pen*, estas estructuras globulares presentes en la cara interna de la cutícula son más abundantes y muestran un tamaño más variable y un contorno más irregular (Fig. 3.18, A). Estas estructuras son más frecuentes en las regiones de la cutícula en contacto con las paredes anticlinales y no solo en proximidad con la cutícula sino también en la zona inferior de la pared celular externa (Fig. 3.18, A). Dichas partículas se mantienen en el estadio maduro e incluso aumentan sus dimensiones y, al igual que ocurre a los 15 dda, son más abundantes en las regiones de las paredes anticlinales donde ya se han formado invaginaciones (Fig. 3.20, A).

Los frutos de LA-1777 *hab* y PI-126445 *hab* (Fig.3.19, E; Anexo II) no solo se caracterizan por la ausencia de material cuticular en las paredes anticlinales a los 15 dda, lo que junto con LA-0716 *pen* las diferencia del resto, sino que además exhiben una cutícula con unas estructuras singulares. La cutícula de LA-1777 *hab* presenta una estructura singular caracterizada por la presencia de numerosos gránulos nanoscópicos más electodensos que la cutícula distribuidos homogéneamente en toda su longitud y espesor. Dichos gránulos se localizan exclusivamente en la capa cuticular, estando por tanto ausentes de la pared celular externa (Fig. 3.19, A). En las regiones cuticulares más engrosadas, como es el caso de las situadas sobre las paredes anticlinales, se observa una mayor abundancia de estos gránulos (Fig. 3.19, B). En la cutícula de los frutos maduros no se localizaron dichos gránulos (Anexo II). Por otra parte, destaca la entrada PI-126445 *hab* por ser la única que presenta una cutícula de aspecto laminar. En las imágenes de MET de frutos de 15 dda pueden distinguirse numerosas capas paralelas más o menos electodensas y de grosor nanométrico a lo largo de todo el espesor de la misma (Fig.3.19, C y D). En la región de la cutícula situada sobre la intersección entre dos células se observa el acumulamiento de material electodenso por la cara interna, pero a diferencia de lo que

ocurre en las demás entradas, dichos acúmulos parecen distribuirse en capas más o menos paralelas a la superficie (Fig.3.14, C). Sin embargo, conforme prosigue el desarrollo y los frutos maduran la cutícula deja de mostrar una estructura laminar y adquiere un aspecto reticular (Anexo II).

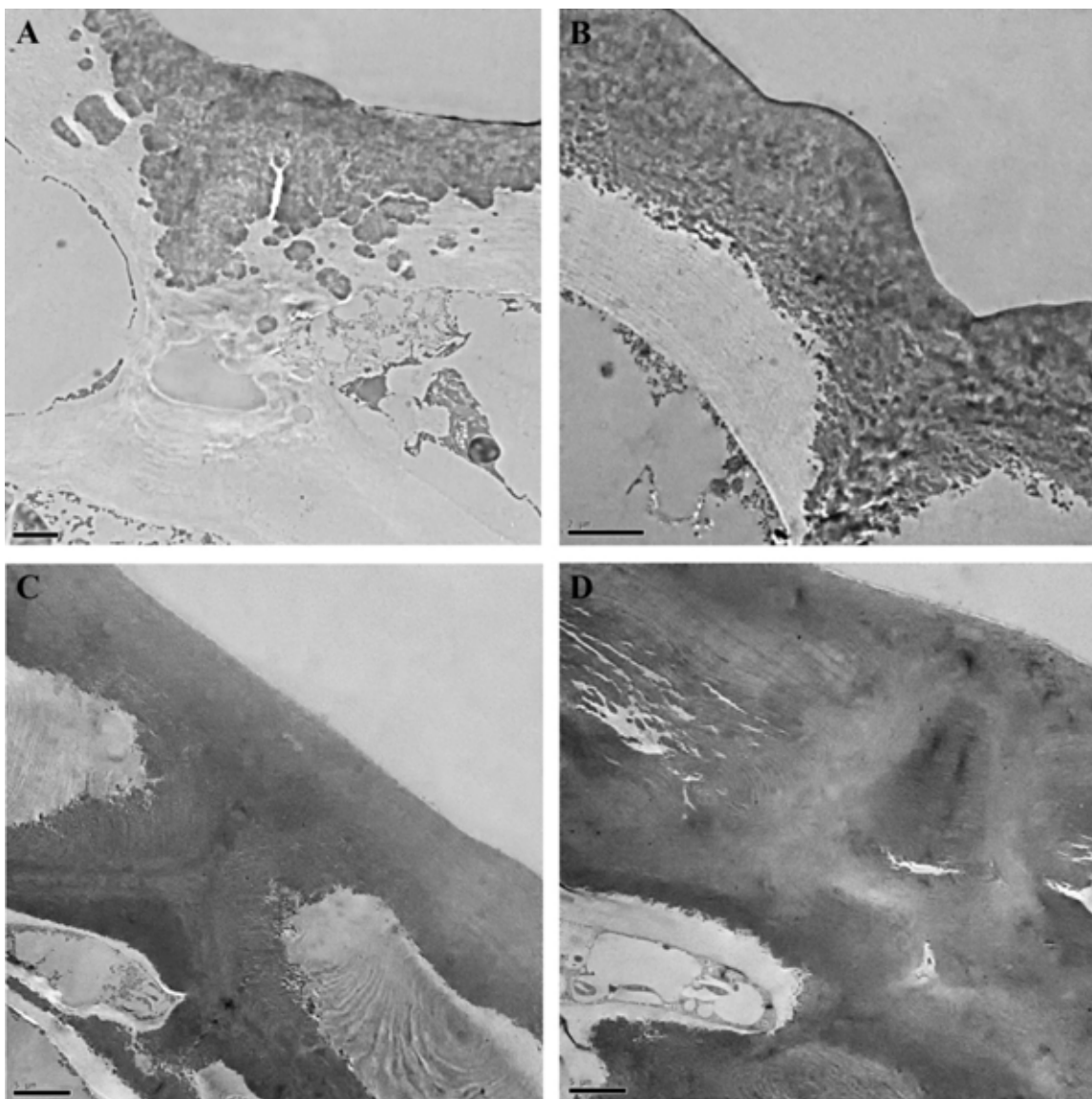


**Figura 3.19:** Imágenes de MET de cortes transversales de pericarpo en las que se muestra la cutícula de los frutos en el estadio de 15 dda (**A** y **B**: LA-1777 *hab*, barra: 0.5  $\mu\text{m}$ ; **C** y **D**: PI-126445 *hab*, barras: 0.5  $\mu\text{m}$  y 0.2  $\mu\text{m}$ ).

En el estadio maduro la ultraestructura de la cutícula es más homogénea en cuanto a su densidad a los electrones en las especies del complejo de fruto rojo, mientras que en las de fruto verde se mantiene la estructura granulada e incluso en algunas entradas de las especies *S. huaylasense* y *S. corneliomuelleri*, entre otras, se aprecia una cierta laminación en la cutícula (Anexo II). El borde interno de la cutícula sigue manteniendo una cierta

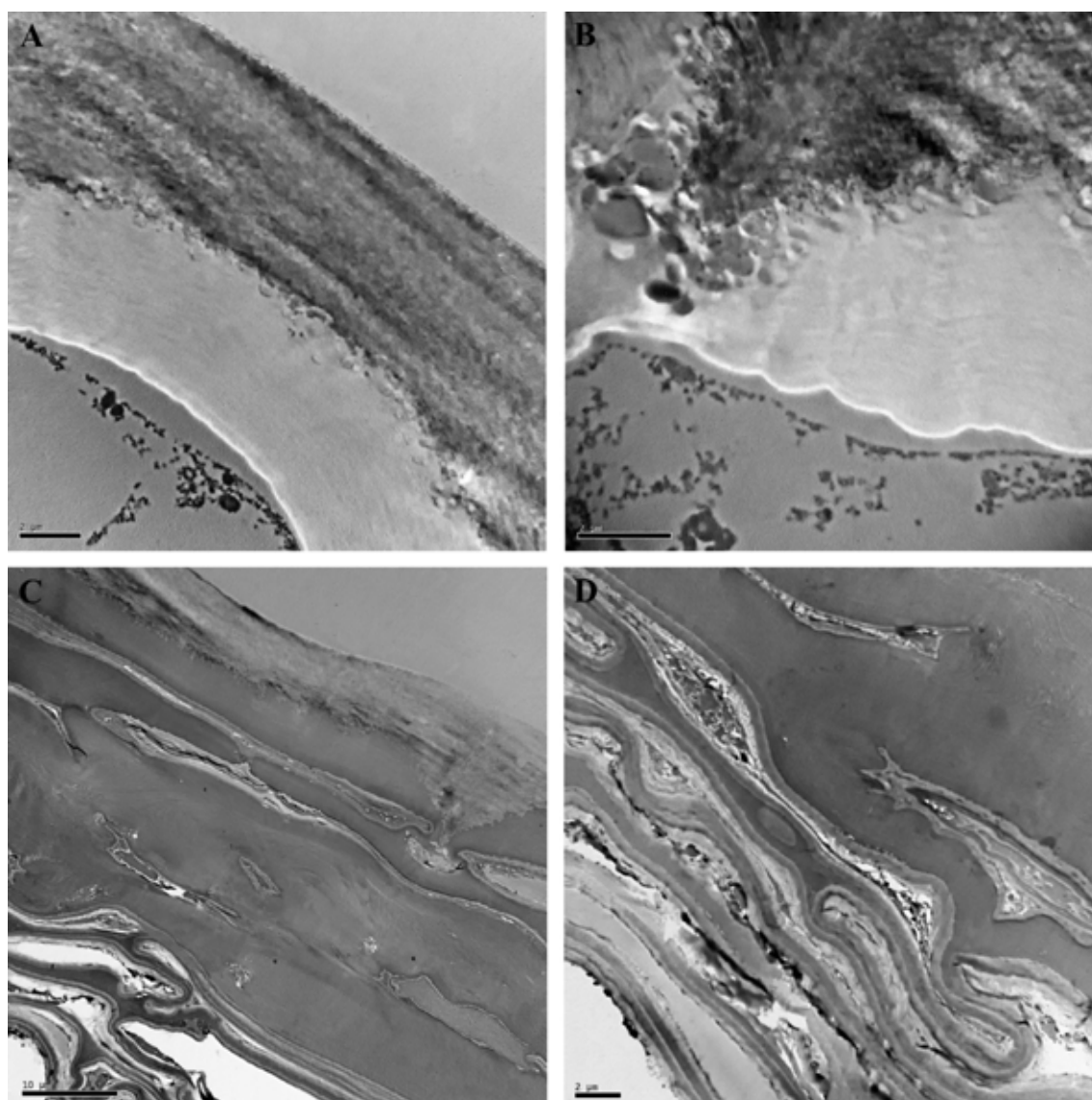


irregularidad, que es mucho más acusada en algunas entradas como LA-0716 *pen* y PI-134418 *gla*, donde incluso las estructuras globulares en proximidad con la cara interna de la cutícula no solo siguen siendo igual de abundantes sino que además incrementan su tamaño (Fig. 3.20, A y B). La cutinización de la pared celular más externa aumenta durante el desarrollo en la mayoría de las entradas alcanzando su máximo en maduro (Fig. 3.20, C y D) con la excepción de aquellas en las que ya a 15 dda muestran una impregnación casi completa de la pared celular. Finalmente, las invaginaciones de la cutícula están más desarrolladas en las entradas del complejo de fruto rojo que en el resto, tanto a 15 dda como en el estadio maduro.



**Figura 3.20:** Imágenes de MET de cortes transversales de pericarpio en las que se muestra la cutícula de los frutos en el estadio maduro (**A:** LA-0716 *pen*, barra: 2  $\mu$ m; **B:** PI-134418 *gla*, barra: 2  $\mu$ m; **C:** LA-1589 *pim*, barra: 5  $\mu$ m; **D:** MM *lyc*, barra: 5  $\mu$ m).

La ultraestructura de las células de la hipodermis no presenta diferencias apreciables en las distintas entradas. Sin embargo, en los frutos de PI-126448 *cor* de color verde sí se observan diferencias notables con respecto a los blanquecinos. Así, la estructura de la cutícula es similar en ambos tipos de frutos. No obstante, la pared celular subyacente a la cutícula, así como el resto de paredes de la epidermis, hipodermis e incluso de alguna capa celular del parénquima, muestran un carácter electrodenso y homogéneo en PI-126448 *cor* (v) mientras que en PI-126448 *cor* (b) su estructura es laminada y clara a los electrones (Fig. 3.21, A-D). Igualmente, se puede apreciar que esta deposición de material electrodenso en las paredes celulares aumenta el grosor de las mismas llegando a ocluir el interior celular.



**Figura 3.21:** Microfotografías de TEM de cortes transversales del pericarpo de frutos maduros de PI-126448 *cor* (b) (A y B, barras: 2 µm) y PI-126448 *cor* (v) (C y D, barras: 10 µm y 2 µm).

### Inmunolocalización de la proteína CUS1

A fin de determinar la presencia y la ultralocalización de la proteína CUS1 en el epicarpo de los frutos de tomate se realizaron diversos ensayos de inmunolocalización sobre cortes transversales de epidermis de frutos de 15 dda. Estos se llevaron a cabo en 10 entradas procedentes de especies distintas que se seleccionaron en función de la cantidad de cutícula. Dicha selección incluye a las entradas MM *lyc*, LA-1589 *pim*, LA-0429 *che*, PE-52 *neo*, PE-29 *arc*, PE-81 *per*, PI-251311 *cor*, LA-1777 *hab*, PI-126445 *hab* y PE-45 *pen*. Una vez concluidos se procedió a la toma de imágenes de TEM, las cuales permitieron confirmar la presencia de la proteína en estos frutos y a su vez realizar un análisis de la densidad de marcaje de los anticuerpos anti-CUS1, cuyos valores medios se recogen en la Tabla 3.6.

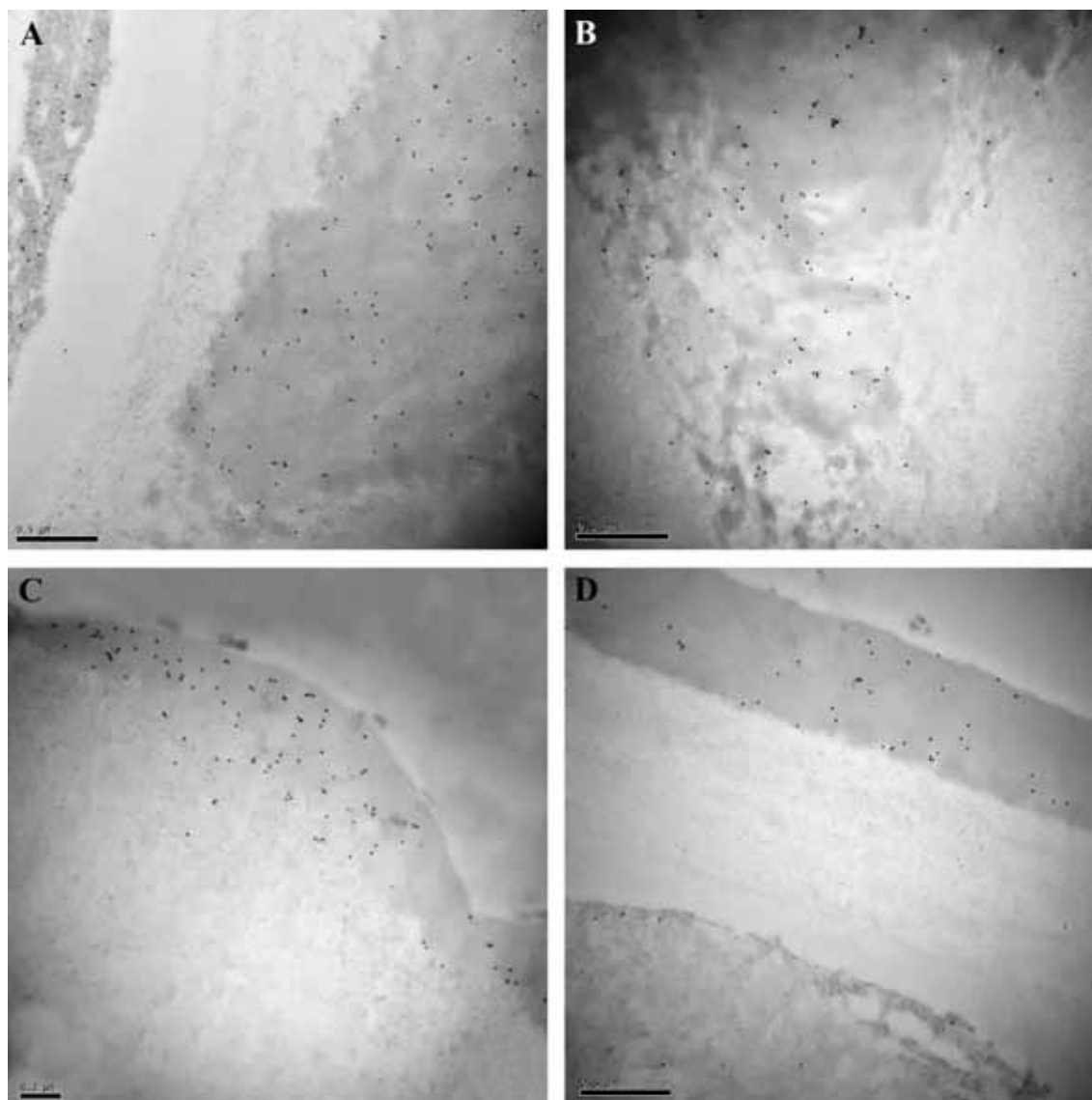
**Tabla 3.6. Densidad de marcaje de CUS1 en el pericarpo de frutos de tomate en el estadio de 15 dda.** La densidad de marcaje se expresa como la media del número de partículas de oro por  $\mu\text{m}^2 \pm$  error estándar. Los controles sin anticuerpos primarios mostraron una densidad de marcaje  $< 0.15$ .

Entrada	CUS1
MM <i>lyc</i>	22.30 $\pm$ 1.17
LA-1589 <i>pim</i>	5.84 $\pm$ 0.62
LA-0429 <i>che</i>	12.36 $\pm$ 0.64
PE-52 <i>neo</i>	9.75 $\pm$ 0.88
PE-29 <i>arc</i>	27.19 $\pm$ 1.92
PE-81 <i>per</i>	7.94 $\pm$ 1.07
PI-251311 <i>cor</i>	23.22 $\pm$ 1.39
LA-1777 <i>hab</i>	69.66 $\pm$ 2.87
PI-126445 <i>hab</i>	35.00 $\pm$ 1.80
PE-45 <i>pen</i>	11.62 $\pm$ 0.81

La cantidad de partículas de oro por  $\mu\text{m}^2$  varía considerablemente entre las diferentes entradas. Las dos entradas de *S. habrochaites*, LA-1777 y PI-126445, se caracterizan por presentar la mayor densidad de marcaje, mientras que los valores más bajos se encuentran en LA-1589 *pim* y PE-81 *per*. No hay una correlación entre la densidad de marcaje de la proteína CUS1 y la cantidad de cutícula de las entradas estudiadas ( $r = 0.10$ ). Así, las entradas con una cantidad de cutícula superior a los 3000  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , MM *lyc* y PE-29 *arc*, muestran una densidad de marcaje intermedia. Por su parte, LA-1777 *hab* presenta más del doble de marcaje que las anteriores pero la mitad de cutícula. Igualmente PE-52 *neo* y



PE-81 *per* muestran densidades de marcaje similares pero cantidades de cutícula muy diferentes. Sí hay una correlación negativa, aunque no llega a ser significativa, entre la densidad de marcaje y el grosor de la cutícula a 15 dda ( $r = -0.60$ ), ya que la mayor densidad de puntos se localiza en las entradas con menor grosor.



**Figura 3.22:** Inmunolocalización de la proteína CUS1 a los 15 dda en cortes transversales de la epidermis de frutos de tomate. **A:** MM *lyc*, barra: 0.5  $\mu\text{m}$ ; **B:** LA-0429 *che*, barra: 0.5  $\mu\text{m}$ ; **C:** PI-126445 *hab*, barra: 0.2  $\mu\text{m}$ ; **D:** LA-1777 *hab*, barra: 0.5  $\mu\text{m}$ .

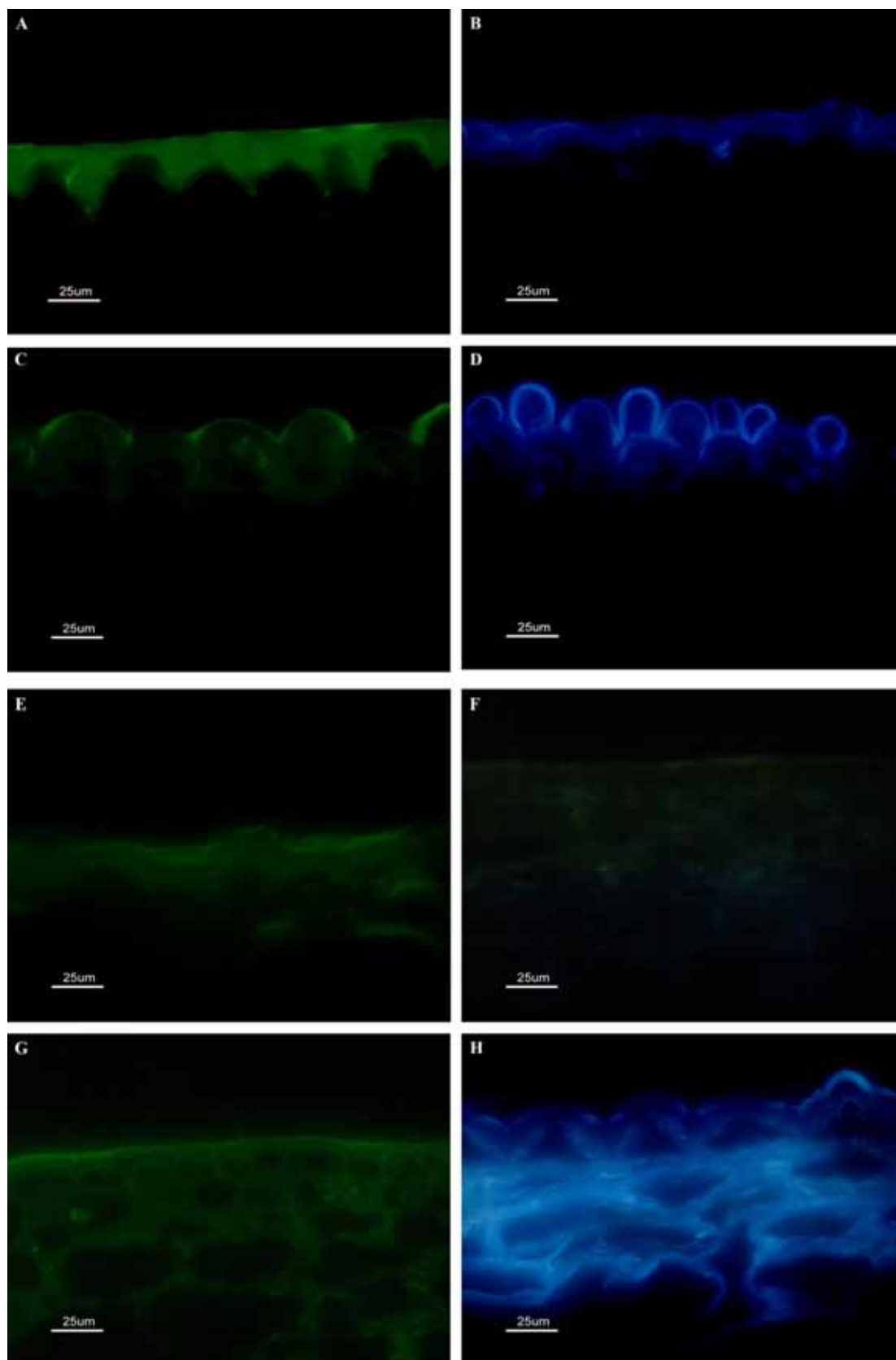
En la Figura 3.22 se agrupan imágenes correspondientes a algunos de los cortes transversales del pericarpio de frutos de 15 dda sobre los que se realizaron los ensayos de inmunolocalización de CUS1. La localización subcelular de la proteína es similar en todas las entradas estudiadas. Por una parte, la enzima se encuentra en el interior de las células epidérmicas, concretamente en la región superior de las mismas, cerca de la pared celular externa (Fig. 3.22, A, C y D). Asimismo, las partículas de oro se distribuyen por la región

cutinizada de la pared celular externa (Fig. 3.22, A-D), incluyendo las invaginaciones (Fig. 3.22, A y B), siendo la densidad de partículas de oro mayor en la cutícula que en el interior de las células epidérmicas. CUS1 presenta una distribución homogénea a lo largo de la cutícula estando prácticamente ausente en la pared celular externa. Como ya se indicó en el capítulo anterior, CUS1 no se localiza fuera de la epidermis del fruto en ninguna de las entradas estudiadas.

### **Autofluorescencia de la cutícula**

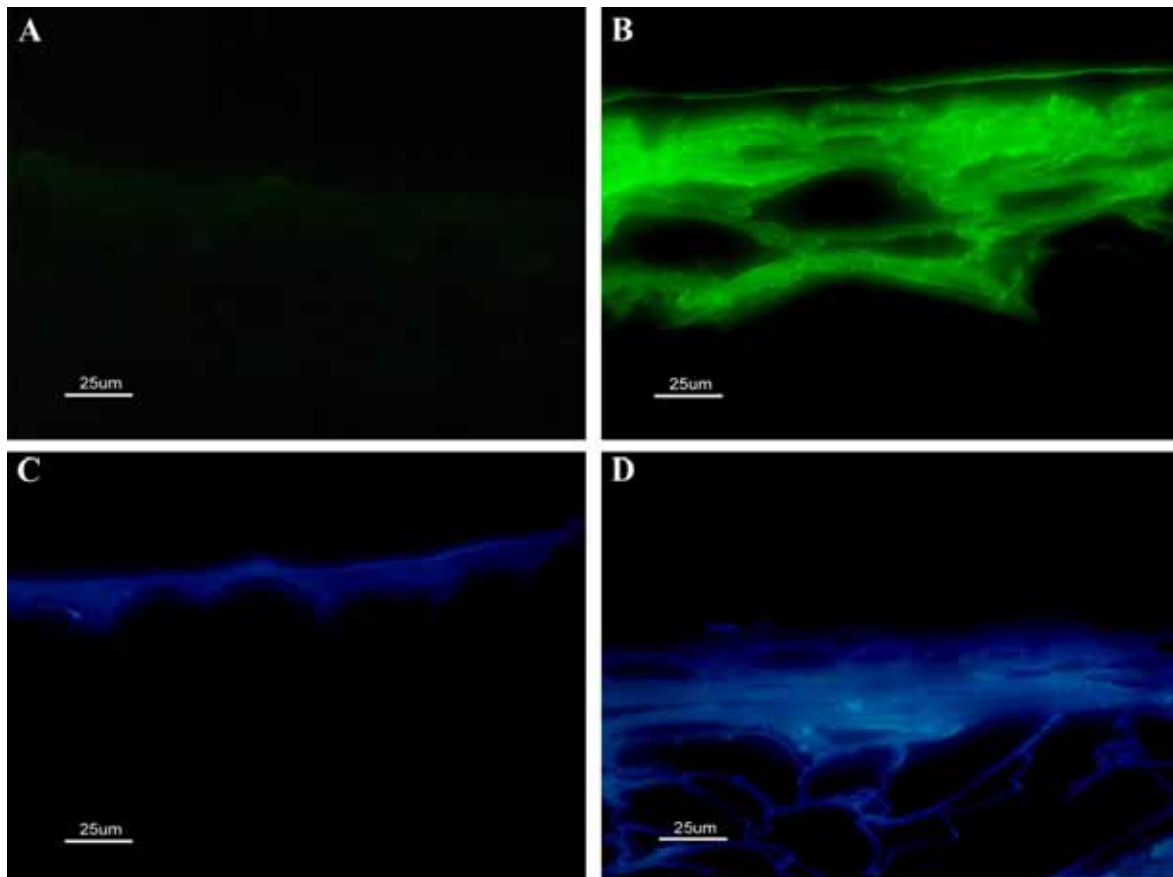
El análisis de la autofluorescencia de la cutícula de los frutos de 15 dda y maduros puso nuevamente de manifiesto la gran heterogeneidad de las especies examinadas, encontrándose notables diferencias no solo en cuanto a la presencia o ausencia de autofluorescencia en la cutícula en función de la longitud de onda de la luz de excitación o del estadio del fruto, sino también en su intensidad, su distribución dentro de la cutícula, o su emisión por otras zonas del pericarpo. Para facilitar la redacción, a lo largo del texto se referirá a la fluorescencia emitida tras el empleo de los filtros UV y FITC como fluorescencia UV y FITC. Independientemente del filtro utilizado, en aquellos casos en los que existe autofluorescencia en la cutícula se muestra de forma más o menos uniforme a lo largo del perímetro de la misma (Fig. 3.23, A-H). Sin embargo, la emisión desde la superficie hacia el interior de esta capa no es siempre uniforme. Así, en la mayoría de las especies del complejo de fruto rojo la fluorescencia FITC tiene una distribución más o menos homogénea a lo largo del grosor de la cutícula (Fig. 3.23, A). No obstante, esta distribución homogénea también está presente en la fluorescencia UV y en algunas entradas de fruto verde (Fig. 3.23, B). Por otro lado, en algunas entradas la fluorescencia es superior en la zona más externa de la cutícula y disminuye hacia el interior celular (Fig. 3.23, C y D). Esto se aprecia en la fluorescencia UV de buena parte de los frutos de 15 dda, siendo más patente en algunas especies como *S. chmielewskii* (Fig. 3.23, D). Igualmente se observan entradas con muy baja intensidad de fluorescencia tanto FITC como UV (Fig. 3.23, E y F). Asimismo, en muchas de las entradas la autofluorescencia emitida por el pericarpo no queda restringida únicamente a la capa cuticular, sino que las paredes celulares de la epidermis y un número variable de capas de la hipodermis también emiten autofluorescencia tanto FITC (Fig. 3.23, G) como UV (Fig. 3.23, H), de forma independiente al estadio de desarrollo del fruto.





**Figura 3.23:** Imágenes de microscopía óptica de epifluorescencia de cortes transversales del pericarpo de **A:** LA-1139 *che* maduro; **B:** LA-2777 *chi* maduro; **C:** PE-20 *hua* 15 dda; **D:** LA-1028 *chm* 15dda; **E:** PI-212407 *per* 15 dda; **F:** MM *lyc* maduro; **G:** LA-1777 *hab* maduro; **H:** LA-2695 *chm* maduro. Las imágenes que muestran autofluorescencia de color verde fueron tomadas con el filtro FITC, mientras que aquellas donde la autofluorescencia es azul fueron realizadas con el filtro UV.

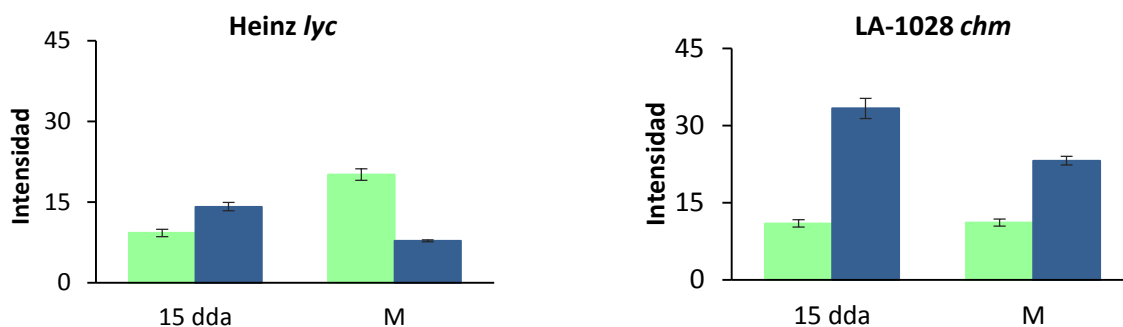
Como ya se observó en la Figura 3.17 B, las células colapsadas del pericarpo de los tomates de PI-126448 *cor* (v) muestran acumulación de compuestos fenólicos en sus paredes. El estudio de la autofluorescencia del pericarpo de PI-126448 *cor* (b) y (v) confirma lo ya presentado en el apartado anterior. En PI-126448 *cor* (b) solo se observa autofluorescencia en la cutícula tanto con el filtro FITC como con el UV (Fig. 3.24, A y C). Sin embargo, en los frutos verdes la autofluorescencia en la cutícula es muy baja en comparación con la emisión de las paredes de las capas celulares subyacentes, aunque se puede observar algo de fluorescencia en el extremo superior de la cutícula (Fig. 3.24, B y D). Igualmente, la intensidad de la fluorescencia del pericarpo de PI-126448 *cor* (v) fue aparentemente mayor con el filtro FITC que con el UV (Fig. 3.24, B y D). Con el objeto de evitar la interferencia de las capas celulares inferiores, las imágenes de PI-126448 *cor* (v) se procesaron para eliminar dicha región y poder medir exclusivamente la fluorescencia de la cutícula.



**Figura 3.24:** Imágenes de microscopía óptica de epifluorescencia de cortes transversales del pericarpo de frutos maduros de PI-126448 *cor*. **A** y **C**: PI-126448 (b); **B** y **D**: PI-126448 (v). Las imágenes que fueron tomadas con el filtro FITC se muestran en la fila superior mientras que las inferiores corresponden a las realizadas con el filtro UV.

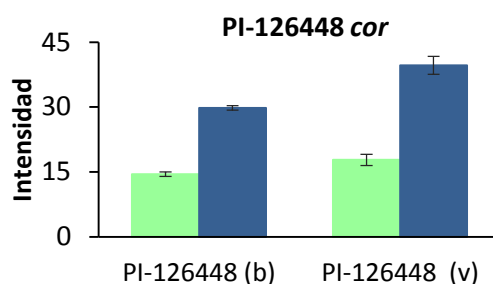
Se ha calculado la intensidad total de la autofluorescencia emitida por la cutícula de los frutos de 15 dda y maduros tras excitación en el UV (330-380 nm, filtro UV) y en el azul (465-495 nm, filtro FITC). A los 15 dda, la autofluorescencia UV es superior a la FITC en todas las especies estudiadas. La cantidad de fluorescencia UV es similar en la mayoría de las entradas salvo algunas excepciones como PE-18 *hua*, PE-29 *arc*, PE-52 *neo* y LA-1028 *chm* que presentan valores más altos. No se observa ninguna relación entre la mayor fluorescencia UV y el grosor o cantidad de cutícula. Por su parte, la fluorescencia FITC a 15 dda presenta valores similares en todas las entradas. En el estadio maduro se observa una disminución de la fluorescencia UV en las especies del complejo de fruto rojo con la excepción de PE-67 *pim* donde se mantiene el valor de fluorescencia estimado en 15 dda. En las entradas de fruto verde también se mantiene o aumenta ligeramente la cantidad de fluorescencia UV en maduro y en algunos casos como LA-0716 *pen*, y LA-1777 *hab* este aumento es notable. Las entradas de *S. chmielewskii* LA-1028 y LA-3644 junto con LA-2200 *neo* muestran un comportamiento opuesto al resto de las entradas de fruto verde: una disminución de la fluorescencia UV en maduro. A modo de resumen, la comparación de los valores de fluorescencia UV en maduro para las distintas entradas muestra valores bajos dentro del grupo de fruto rojo, con la excepción de PE-67 *pim*, mientras que todas las entradas de fruto verde presentan valores superiores. De modo contrario, la fluorescencia FITC en el estadio maduro es superior en las especies del complejo de fruto rojo que en las de fruto verde. Las excepciones son LA-1139 *che* y LA-0530 *gal*, en las que los valores son más bajos que en el resto de las entradas del grupo de fruto rojo. Así, en el estadio maduro la cutícula de las especies silvestres de fruto verde muestra una mayor autofluorescencia UV que FITC. En las especies del complejo de fruto rojo el comportamiento es distinto. En *S. lycopersicum* y *S. pimpinellifolium* hay una mayor autofluorescencia FITC que UV. La excepción de nuevo es PE-67 *pim* que muestra un comportamiento similar a las especies de fruto verde, mayor fluorescencia UV que FITC. Las entradas de *S. cheesmaniae* y *S. galapagense* presentan valores similares de fluorescencia UV y FITC en maduro con la excepción de LA-0317 *gal* que se comporta como *S. lycopersicum*. La entrada TO-937 *pim* tiene unos valores de fluorescencia UV y FITC en maduro similares, al igual que *S. cheesmaniae*. Como ya se mencionó al inicio de los resultados, las cutículas de esta entrada se caracterizan por no ser coloreadas. A modo de ejemplo, la Figura 3.25 muestra la autofluorescencia de Heinz *lyc* y LA-1028 *chm* como

representación de las entradas del complejo de fruto rojo y de fruto verde, respectivamente. Las gráficas correspondientes a todas las entradas se recogen en el Anexo III.



**Figura 3.25:** Representaciones gráficas de la intensidad total de la autofluorescencia FITC (verde) y UV (azul) emitida por la cutícula de frutos de 15 dda y maduros (M) de Heinz *lyc* y LA-1028 *chm*. Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar.

La fluorescencia en el estadio maduro de los frutos PI-126448 *cor* (b) y PI-126448 *cor* (v) se presenta en la Figura 3.26. Como se puede observar, la autofluorescencia FITC es similar en ambas cutículas; sin embargo, hay un aumento en la autofluorescencia UV en los frutos PI-126448 *cor* (v).



**Figura 3.26:** Representación gráfica de la intensidad total de la autofluorescencia FITC (verde) y UV (azul) emitida por la cutícula de frutos maduros de PI-126448 *cor* (b) y PI-126448 *cor* (v). Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar.

Adicionalmente, se ha evaluado la contribución de los diferentes canales (rojo, verde y azul) a la fluorescencia emitida por la cutícula de los frutos de 15 dda y maduros de todas las entradas. Como ya se indicó en el apartado de Material y Métodos, el filtro FITC tiene un rango de emisión de 515-555 nm, por lo que la contribución de los canales rojo y azul a la fluorescencia observada es muy baja o nula (Anexo IV). Es decir, en este caso es la componente verde la que contribuye en su totalidad, o en mayor medida, a la intensidad de la autofluorescencia de la cutícula. Sin embargo, el filtro UV-2A tiene un rango de emisión desde 420 nm hasta el final del espectro visible, por lo que es posible una mayor contribución de los 3 canales a la fluorescencia total.

**Tabla 3.7. Intensidad de la autofluorescencia correspondiente a los canales rojo (R), verde (V) y azul (A) emitida por la cutícula de los frutos de tomate de 15 dda y maduros con el filtro UV. Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar. (-), no hay autofluorescencia o el valor medio se sitúa por debajo del valor umbral establecido.**

Entrada	15 dda			Maduro		
	R	V	A	R	V	A
MM <i>lyc</i>	11.7 $\pm$ 0.8	17.8 $\pm$ 1.1	31.8 $\pm$ 1.9	11.9 $\pm$ 0.6	14.0 $\pm$ 0.8	-
Heinz <i>lyc</i>	-	13.9 $\pm$ 1.0	20.9 $\pm$ 1.5	10.7 $\pm$ 0.5	12.8 $\pm$ 0.5	-
Mex-70 <i>cer</i>	10.0 $\pm$ 0.3	19.1 $\pm$ 1.6	29.0 $\pm$ 1.9	11.7 $\pm$ 0.7	12.9 $\pm$ 0.6	13.1 $\pm$ 0.8
PE-67 <i>pim</i>	13.6 $\pm$ 0.6	32.4 $\pm$ 1.9	52.3 $\pm$ 1.4	13.3 $\pm$ 1.1	25.6 $\pm$ 0.2	54.2 $\pm$ 2.8
LA-1589 <i>pim</i>	14.4 $\pm$ 0.8	18.9 $\pm$ 1.7	32.9 $\pm$ 2.5	12.5 $\pm$ 1.3	14.9 $\pm$ 1.3	11.9 $\pm$ 0.7
PE-7 <i>pim</i>	13.0 $\pm$ 1.1	22.3 $\pm$ 2.2	42.8 $\pm$ 3.0	13.2 $\pm$ 0.6	16.1 $\pm$ 0.5	12.3 $\pm$ 0.5
TO-937 <i>pim</i>	-	18.7 $\pm$ 1.7	43.1 $\pm$ 2.2	13.2 $\pm$ 1.1	16.6 $\pm$ 1.2	17.8 $\pm$ 1.0
LA-0429 <i>che</i>	10.2 $\pm$ 0.7	27.1 $\pm$ 1.6	52.0 $\pm$ 2.5	13.3 $\pm$ 1.2	18.4 $\pm$ 1.6	20.2 $\pm$ 1.6
LA-1139 <i>che</i>	-	19.6 $\pm$ 1.2	46.2 $\pm$ 2.6	11.0 $\pm$ 0.8	17.2 $\pm$ 1.2	14.4 $\pm$ 1.3
LA-0317 <i>gal</i>	13.1 $\pm$ 1.2	19.4 $\pm$ 1.8	35.8 $\pm$ 1.7	11.7 $\pm$ 0.3	12.9 $\pm$ 1.5	11.7 $\pm$ 0.5
LA-0530 <i>gal</i>	12.6 $\pm$ 1.1	20.6 $\pm$ 0.9	34.7 $\pm$ 2.5	12.6 $\pm$ 1.2	15.6 $\pm$ 1.1	12.1 $\pm$ 1.2
LA-1028 <i>chm</i>	12.2 $\pm$ 1.7	33.7 $\pm$ 2.3	54.2 $\pm$ 3.2	-	19.5 $\pm$ 1.7	44.3 $\pm$ 0.9
LA-2678 <i>chm</i>	11.1 $\pm$ 0.7	19.2 $\pm$ 1.2	40.5 $\pm$ 1.2	-	25.5 $\pm$ 2.3	57.8 $\pm$ 1.5
LA-2695 <i>chm</i>	12.5 $\pm$ 1.3	23.4 $\pm$ 1.5	45.8 $\pm$ 2.8	12.9 $\pm$ 1.4	34.3 $\pm$ 2.0	57.6 $\pm$ 2.3
LA-3644 <i>chm</i>	12.8 $\pm$ 1.3	34.3 $\pm$ 2.3	52.3 $\pm$ 2.0	-	20.9 $\pm$ 1.9	47.8 $\pm$ 2.3
LA-3654 <i>chm</i>	11.0 $\pm$ 0.5	25.6 $\pm$ 0.3	53.5 $\pm$ 1.2	10.9 $\pm$ 0.4	24.7 $\pm$ 1.4	50.2 $\pm$ 1.5
LA-2200 <i>neo</i>	-	29.0 $\pm$ 1.1	56.2 $\pm$ 2.7	-	19.2 $\pm$ 0.7	40.1 $\pm$ 3.5
PE-52 <i>neo</i>	11.7 $\pm$ 0.9	31.7 $\pm$ 0.8	59.3 $\pm$ 3.8	-	26.8 $\pm$ 2.7	57.1 $\pm$ 2.2
PE-29 <i>arc</i>	-	32.9 $\pm$ 2.9	70.1 $\pm$ 5.1	11.9 $\pm$ 0.9	26.4 $\pm$ 2.0	64.2 $\pm$ 3.7
PE-33 <i>arc</i>	-	22.5 $\pm$ 1.2	52.0 $\pm$ 3.5	11.9 $\pm$ 1.1	33.8 $\pm$ 2.5	69.8 $\pm$ 3.4
PE-18 <i>hua</i>	14.0 $\pm$ 1.1	33.2 $\pm$ 2.2	74.6 $\pm$ 3.0	-	27.9 $\pm$ 0.5	58.9 $\pm$ 3.2
PE-20 <i>hua</i>	-	28.1 $\pm$ 2.4	62.5 $\pm$ 2.2	-	27.4 $\pm$ 1.1	58.5 $\pm$ 3.2
PE-81 <i>per</i>	-	18.8 $\pm$ 1.7	50.4 $\pm$ 2.6	-	32.5 $\pm$ 2.1	74.3 $\pm$ 3.1
PI-212407 <i>per</i>	-	22.7 $\pm$ 1.9	54.9 $\pm$ 3.3	-	22.4 $\pm$ 0.5	61.6 $\pm$ 3.9
PI-126448 <i>cor</i> (b)	13.0 $\pm$ 0.4	21.9 $\pm$ 1.7	47.6 $\pm$ 2.4	-	25.3 $\pm$ 2.0	62.5 $\pm$ 1.3
PI-251311 <i>cor</i>	-	13.6 $\pm$ 1.4	50.3 $\pm$ 1.9	-	20.0 $\pm$ 1.8	49.9 $\pm$ 1.5
LA-1969 <i>chi</i>	14.4 $\pm$ 0.4	34.3 $\pm$ 1.4	61.2 $\pm$ 1.3	-	15.5 $\pm$ 1.5	39.6 $\pm$ 2.2
LA-2779 <i>chi</i>	-	16.1 $\pm$ 1.6	57.0 $\pm$ 1.6	-	21.5 $\pm$ 1.5	54.6 $\pm$ 2.0
LA-1777 <i>hab</i>	-	14.4 $\pm$ 0.5	24.5 $\pm$ 1.8	12.7 $\pm$ 0.9	35.1 $\pm$ 2.1	57.6 $\pm$ 3.5
PI-126445 <i>hab</i>	-	22.3 $\pm$ 2.2	50.1 $\pm$ 2.2	-	17.2 $\pm$ 1.5	41.3 $\pm$ 1.7
PI-134418 <i>gla</i>	-	21.1 $\pm$ 2.0	51.1 $\pm$ 1.6	-	24.4 $\pm$ 1.9	54.3 $\pm$ 1.5
LA-0716 <i>pen</i>	-	16.5 $\pm$ 1.4	40.5 $\pm$ 1.7	12.4 $\pm$ 1.0	29.4 $\pm$ 2.4	61.4 $\pm$ 2.6
PE-45 <i>pen</i>	-	16.8 $\pm$ 1.7	46.9 $\pm$ 3.4	-	19.2 $\pm$ 2.0	41.1 $\pm$ 2.2



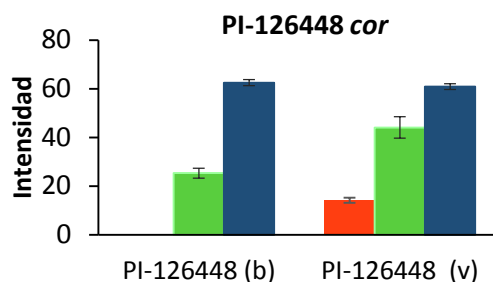


La Tabla 3.7 muestra dicha contribución tanto en el estadio 15 dda como en maduro para todas las entradas estudiadas. El canal rojo tiene una contribución baja a la fluorescencia en los dos estadios del desarrollo. Curiosamente, todas las entradas del complejo de fruto rojo muestran contribución del canal rojo en el estadio maduro y la mayoría de ellas en 15 dda. Sin embargo, en las especies del complejo de fruto verde muy pocas entradas muestran contribución del canal rojo en los dos estadios. Es necesario mencionar el caso de *S. chmielewskii*, donde hubo contribución del rojo en el estadio de 15 dda pero en maduro solo 2 entradas muestran valores por encima del umbral. Los canales verde y sobre todo azul son los que contribuyen principalmente a la aurofluorescencia UV en ambos estadios de desarrollo. La contribución del canal verde a la fluorescencia UV a 15 dda es variable entre las distintas entradas, algunas mostrando valores del doble con respecto a otras. Sin embargo, la contribución del canal azul es superior en todas las especies respecto a *S. lycopersicum*, *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* y *S. galapagense*, con la excepción de LA-1777 *hab* que presenta valores similares al tomate domesticado. En 15 dda la fluorescencia del canal azul es siempre superior a la del verde, incluso más del doble en PI-251311 *cor* y LA-2779 *chi*. En el estadio maduro la fluorescencia asociada al canal verde disminuye de modo general con respecto a 15 dda, salvo algún caso como PE-81 *per* y LA-0716 *pen*, donde hay una subida. En el canal azul se observa una disminución de la fluorescencia en maduro en las especies del complejo de fruto rojo, pero en el resto de las especies se mantiene o incluso sube con respecto a 15 dda. El caso más extremo lo representa *S. lycopersicum* donde no se detecta fluorescencia azul en maduro. En las especies del complejo de fruto rojo los canales verde y azul contribuyen por igual a la fluorescencia UV de la cutícula en el estadio maduro. Sin embargo, en las especies de fruto verde el canal azul tiene una contribución del doble con respecto al verde a la fluorescencia UV. Como ya se indicó previamente, PE-67 *pim* es la excepción, ya que no solo presenta valores de fluorescencia azul elevados sino que además se mantienen al entrar en maduración.

La contribución de los distintos canales a la fluorescencia total de la cutícula de los frutos PI-126448 *cor* (b) y (v) es similar con el filtro FITC. Sin embargo, las diferencias en fluorescencia UV observadas en la Figura 3.26 se pueden atribuir a un aumento significativo de la fluorescencia del canal verde en PI-126448 *cor* (v) (Fig. 3.27).



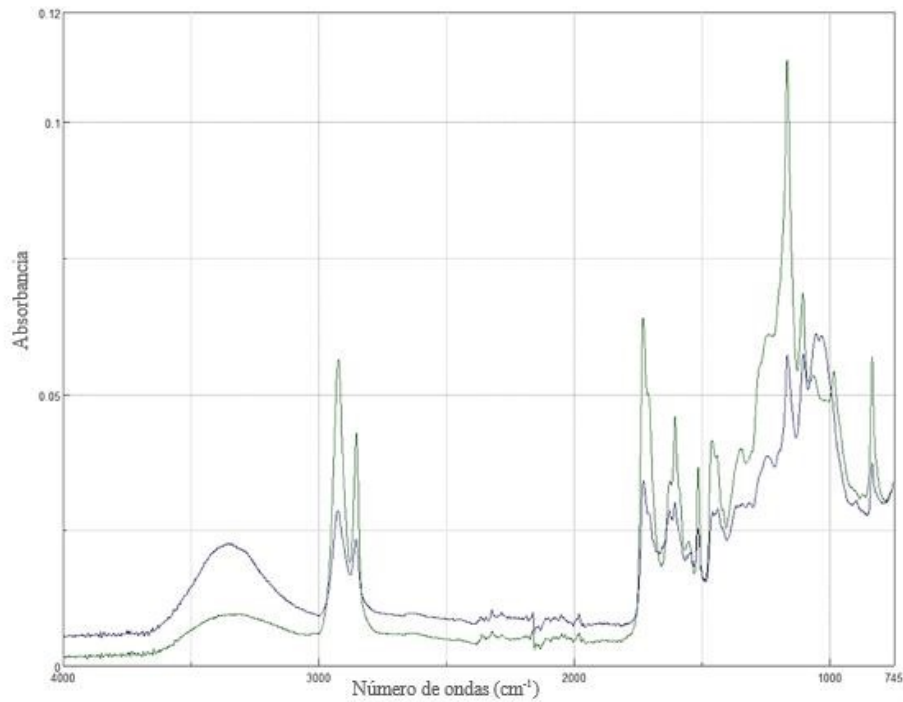
Asimismo, existe una contribución pequeña del canal rojo mientras que el canal azul, el de mayor contribución, no presenta diferencias entre ambos tipos de frutos.



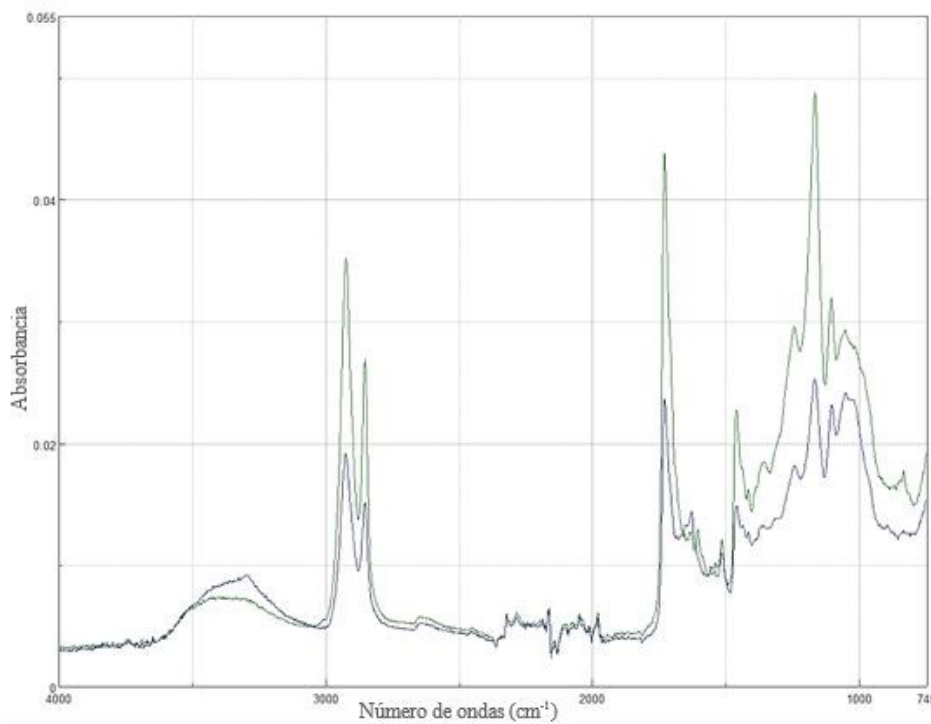
**Figura 3.27:** Representación gráfica de la intensidad de la autofluorescencia correspondiente a los canales rojo (R), verde (V) y azul (A) emitida por la cutícula de los frutos de PI-126448 *cor* (b) y PI-126448 *cor* (v) maduros con el filtro UV. Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar.

### Caracterización de la cutícula mediante espectroscopia infrarroja

Una vez eliminadas las ceras cuticulares, se registraron los espectros infrarrojos de las cutículas aisladas a partir de los frutos maduros de cada una de las entradas, analizando en cada caso tanto la parte externa como la cara interna. El espectro de infrarrojo de una cutícula de tomate rojo maduro tiene un perfil característico de bandas. En la Figura 3.28 se recoge a modo de ejemplo el espectro de las caras externas e internas de la cutícula de MM *lyc*. Como se puede observar, existen diferencias claras de intensidad de bandas entre ambas caras. Mientras que en la superficie externa existe un claro predominio de grupos metilenos, vinculados a las bandas de tensión asimétrica y simétrica, y de los ésteres, asociados a la banda de tensión del grupo carbonilo, en la cara interna prevalecen los polisacáridos, lo cual queda reflejado en la mayor intensidad de las bandas de flexión y tensión del grupo hidroxilo y de la de tensión del enlace C-O-C glucosídico. Además de ello, aparece una banda a  $1606\text{ cm}^{-1}$  debida a la absorción por parte de los enlaces C-C presentes en los compuestos aromáticos (Fig. 3.28). Por su parte, la entrada LA-2779 *chi* presenta algunas características singulares en sus espectros (Fig. 3.29). A diferencia del resto de las entradas, los espectros de LA-2779 *chi* muestran una banda de tensión del enlace C-O-C glucosídico ( $1050\text{ cm}^{-1}$ ) asociada a los polisacáridos de una intensidad mayor en la cara externa que en la interna, al contrario de lo que cabría esperar. Adicionalmente presentan una banda a  $1588\text{ cm}^{-1}$ , asociada a la tensión del enlace C-C de los compuestos aromáticos, y otra a  $1551\text{ cm}^{-1}$ , relacionada con la tensión C-C de los aromáticos conjugados con dobles enlaces. Ambas bandas están presentes solo en la cara interna.



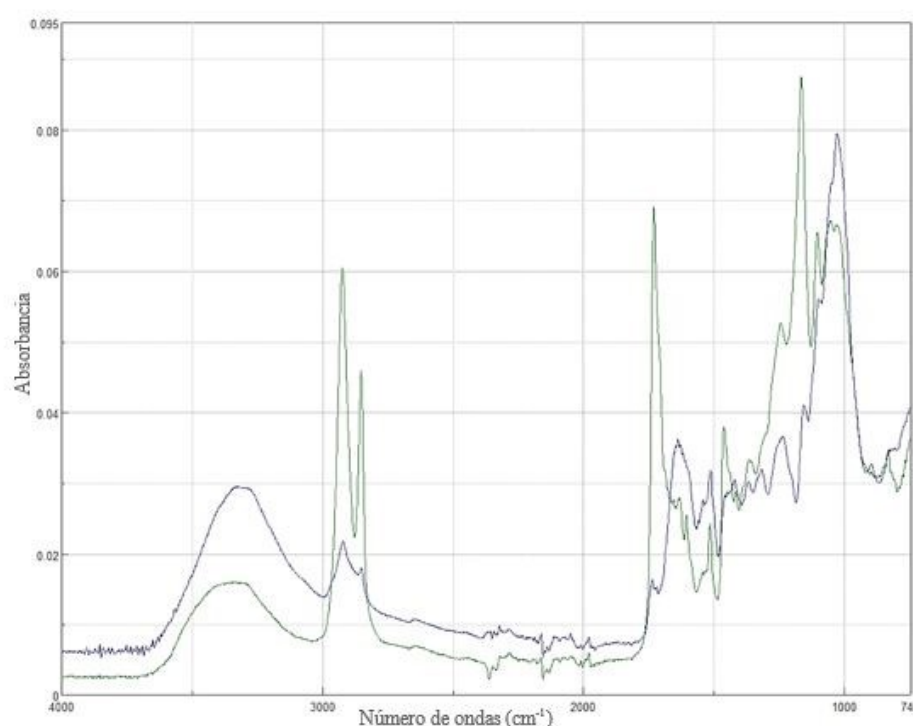
**Figura 3.28:** Espectro ATR-FTIR correspondiente a la cara externa (en verde) y a la cara interna (en azul) de la cutícula sin ceras de fruto maduro de *MM lyc*.



**Figura 3.29:** Espectro ATR-FTIR correspondiente a la cara externa (en verde) y a la cara interna (en azul) de la cutícula sin ceras de fruto maduro de *LA-2779 chi*.

En PI-126448 *cor* se observan diferencias significativas en los espectros de las cutículas procedentes de frutos verdes y blancos. Los espectros de PI-126448 *cor* (b) son

bastante similares al resto de las especies. Sin embargo, PI-126448 *cor* (v) presenta en su cara interna una banda a  $1624\text{ cm}^{-1}$  característica de los flavonoides, así como unas bandas de tensión asimétrica y simétrica a  $2927$  y  $2852\text{ cm}^{-1}$ . Además, presenta otra asociada al grupo carbonilo ( $1730\text{ cm}^{-1}$ ) con una intensidad anormalmente baja, mientras que aquellas bandas atribuidas a los polisacáridos muestran una intensidad excepcionalmente alta. En cambio, en los espectros relativos a la cara externa son las bandas de los metilenos las que destacan frente a las demás, tanto por su intensidad como por su estrechez (Fig. 3.30). Por último presenta, al igual que LA-2779 *chi*, las bandas de  $1588$  y  $1551\text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 3.30:** Espectro ATR-FTIR correspondiente a la cara externa (en verde) y a la cara interna (en azul) de la cutícula sin ceras de fruto maduro de PI-126448 *cor* (v).

La caracterización del conjunto de los espectros infrarrojos se centró en el análisis de dos parámetros, el índice de esterificación y el área de las bandas  $1606\text{ cm}^{-1}$  y  $1624\text{ cm}^{-1}$ , relacionadas con la presencia de fenoles y flavonoides. En la Tabla 3.8 se agrupan los valores del índice de esterificación de la cara externa e interna, respectivamente, de cada una de las entradas. En la cara externa el índice de esterificación fue superior en las especies del complejo de fruto verde que en las de fruto rojo, con las excepciones de PE-67 *pim*, TO-937 *pim* y *S. cheesmaniae*. Los valores de la cara interna fueron muy similares entre sí, no mostrando diferencias claras entre especies.

**Tabla 3.8. Índice de esterificación de la cara externa e interna de la cutícula de los frutos de tomate en estadio maduro.** Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar.

<b>Entrada</b>	<b>Externa</b>	<b>Interna</b>
MM <i>lyc</i>	1.13 $\pm$ 0.01	1.21 $\pm$ 0.01
Heinz <i>lyc</i>	1.04 $\pm$ 0.03	1.13 $\pm$ 0.02
Mex-70 <i>cer</i>	1.18 $\pm$ 0.01	1.22 $\pm$ 0.01
PE-67 <i>pim</i>	1.20 $\pm$ 0.01	1.23 $\pm$ 0.02
LA-1589 <i>pim</i>	1.08 $\pm$ 0.01	1.16 $\pm$ 0.02
PE-7 <i>pim</i>	1.18 $\pm$ 0.01	1.18 $\pm$ 0.01
TO-937 <i>pim</i>	1.30 $\pm$ 0.01	1.34 $\pm$ 0.02
LA-0429 <i>che</i>	1.27 $\pm$ 0.02	1.30 $\pm$ 0.01
LA-1139 <i>che</i>	1.20 $\pm$ 0.02	1.22 $\pm$ 0.02
LA-0317 <i>gal</i>	1.04 $\pm$ 0.01	1.20 $\pm$ 0.02
LA-0530 <i>gal</i>	1.17 $\pm$ 0.01	1.23 $\pm$ 0.01
LA-1028 <i>chm</i>	1.35 $\pm$ 0.01	1.35 $\pm$ 0.01
LA-2678 <i>chm</i>	1.27 $\pm$ 0.01	1.23 $\pm$ 0.01
LA-2695 <i>chm</i>	1.30 $\pm$ 0.01	1.30 $\pm$ 0.03
LA-3644 <i>chm</i>	1.28 $\pm$ 0.01	1.25 $\pm$ 0.01
LA-3654 <i>chm</i>	1.28 $\pm$ 0.02	1.23 $\pm$ 0.01
LA-2200 <i>neo</i>	1.29 $\pm$ 0.01	1.29 $\pm$ 0.01
PE-52 <i>neo</i>	1.25 $\pm$ 0.01	1.31 $\pm$ 0.02
PE-29 <i>arc</i>	1.28 $\pm$ 0.01	1.27 $\pm$ 0.02
PE-33 <i>arc</i>	1.20 $\pm$ 0.01	1.28 $\pm$ 0.02
PE-18 <i>hua</i>	1.24 $\pm$ 0.01	1.17 $\pm$ 0.02
PE-20 <i>hua</i>	1.26 $\pm$ 0.01	1.18 $\pm$ 0.01
PE-81 <i>per</i>	1.22 $\pm$ 0.02	1.26 $\pm$ 0.02
PI-212407 <i>per</i>	1.22 $\pm$ 0.02	1.21 $\pm$ 0.01
PI-126448 <i>cor</i> (b)	1.22 $\pm$ 0.02	1.11 $\pm$ 0.02
PI-251311 <i>cor</i>	1.22 $\pm$ 0.01	1.14 $\pm$ 0.02
LA-1969 <i>chi</i>	1.20 $\pm$ 0.01	1.21 $\pm$ 0.01
LA-2779 <i>chi</i>	1.22 $\pm$ 0.01	1.23 $\pm$ 0.02
LA-1777 <i>hab</i>	1.28 $\pm$ 0.02	1.34 $\pm$ 0.02
PI-126445 <i>hab</i>	1.34 $\pm$ 0.02	1.43 $\pm$ 0.02
PI-134418 <i>gla</i>	1.37 $\pm$ 0.02	1.35 $\pm$ 0.03
LA-0716 <i>pen</i>	1.37 $\pm$ 0.02	1.39 $\pm$ 0.02
PE-45 <i>pen</i>	1.41 $\pm$ 0.03	1.37 $\pm$ 0.03

**Tabla 3.9. Área normalizada de los flavonoides correspondiente a la cara externa e interna de las cutículas aisladas a partir de los frutos maduros.** Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar.

<b>Entrada</b>	<b>Externa</b>	<b>Interna</b>
MM <i>lyc</i>	22.94 $\pm$ 0.93	7.13 $\pm$ 0.76
Heinz <i>lyc</i>	41.82 $\pm$ 2.2	14.84 $\pm$ 1.57
Mex-70 <i>cer</i>	38.91 $\pm$ 1.63	13.85 $\pm$ 0.99
PE-67 <i>pim</i>	44.62 $\pm$ 1.55	18.83 $\pm$ 1.12
LA-1589 <i>pim</i>	55.03 $\pm$ 4.12	26.28 $\pm$ 0.98
PE-7 <i>pim</i>	58.66 $\pm$ 2.66	25.98 $\pm$ 2.56
TO-937 <i>pim</i>	3.91 $\pm$ 0.13	1.48 $\pm$ 0.12
LA-0429 <i>che</i>	3.38 $\pm$ 0.38	1.44 $\pm$ 0.25
LA-1139 <i>che</i>	13.14 $\pm$ 0.24	3.16 $\pm$ 0.45
LA-0317 <i>gal</i>	41.91 $\pm$ 2.10	19.52 $\pm$ 0.40
LA-0530 <i>gal</i>	20.10 $\pm$ 0.88	9.09 $\pm$ 0.74
LA-1028 <i>chm</i>	1.44 $\pm$ 0.18	1.03 $\pm$ 0.12
LA-2678 <i>chm</i>	4.01 $\pm$ 0.09	1.96 $\pm$ 0.04
LA-2695 <i>chm</i>	3.10 $\pm$ 0.22	1.81 $\pm$ 0.20
LA-3644 <i>chm</i>	4.93 $\pm$ 0.44	2.21 $\pm$ 0.25
LA-3654 <i>chm</i>	2.31 $\pm$ 0.14	1.23 $\pm$ 0.11
LA-2200 <i>neo</i>	3.39 $\pm$ 0.13	2.32 $\pm$ 0.13
PE-52 <i>neo</i>	2.23 $\pm$ 0.10	1.72 $\pm$ 0.15
PE-29 <i>arc</i>	1.22 $\pm$ 0.14	1.47 $\pm$ 0.16
PE-33 <i>arc</i>	4.74 $\pm$ 0.47	2.05 $\pm$ 0.18
PE-18 <i>hua</i>	1.50 $\pm$ 0.18	20.12 $\pm$ 2.63
PE-20 <i>hua</i>	1.54 $\pm$ 0.14	22.85 $\pm$ 3.30
PE-81 <i>per</i>	2.31 $\pm$ 0.14	5.35 $\pm$ 0.74
PI-212407 <i>per</i>	4.18 $\pm$ 0.27	13.39 $\pm$ 1.46
PI-126448 <i>cor</i> (b)	2.67 $\pm$ 0.17	21.43 $\pm$ 2.74
PI-251311 <i>cor</i>	2.34 $\pm$ 0.33	23.76 $\pm$ 3.63
LA-1969 <i>chi</i>	5.12 $\pm$ 0.33	2.65 $\pm$ 0.17
LA-2779 <i>chi</i>	5.56 $\pm$ 0.38	2.88 $\pm$ 0.32
LA-1777 <i>hab</i>	1.27 $\pm$ 0.19	0.61 $\pm$ 0.07
PI-126445 <i>hab</i>	3.62 $\pm$ 0.59	1.53 $\pm$ 0.10
PI-134418 <i>gla</i>	2.23 $\pm$ 0.34	1.69 $\pm$ 0.38
LA-0716 <i>pen</i>	1.91 $\pm$ 0.17	2.83 $\pm$ 0.21
PE-45 <i>pen</i>	1.97 $\pm$ 0.33	2.78 $\pm$ 0.39

Por otra parte, se procedió a la suma de los valores del área normalizada de las bandas 1606 y 1628  $\text{cm}^{-1}$  a fin de profundizar en el estudio de los flavonoides de las diferentes cutículas (Tabla 3.9). En la cara externa los mayores valores se encuentran, de nuevo, en las especies del complejo de fruto rojo con la excepción de TO-937 *pim* y LA-0429 *che* que presentan valores similares a las especies de fruto verde. Sin embargo, si bien las

entradas del complejo de fruto rojo muestran valores elevados en la cara interna, las cutículas de *S. huaylasense* y de PI-212407 *per*, PI-126448 *cor* (b) y PI-251311 *cor* muestran también unos valores considerablemente más elevados que el resto de las especies de fruto verde. Al igual que en la cara externa, TO-937 *pim* y, en este caso, las dos entradas de *S. cheesmaniae* presentan valores más bajos en la cara interna que el resto de las entradas del grupo de fruto rojo.

Con respecto a los frutos PI-126448 *cor* blancos y verdes se observan diferencias notables en los parámetros analizados (Tabla 3.10). PI-126448 *cor* (v) presenta menor índice de esterificación en la cara interna que PI-126448 *cor* (b). Igualmente hay una disminución del área de los flavonoides en ambas caras, aunque es más considerable en la cara interna.

**Tabla 3.10. Índice de esterificación y áreas normalizadas de los flavonoides correspondientes a la cara externa e interna de las cutículas aisladas de PI-126448 *cor*.** Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar.

	PI-126448 (b)	PI-126448 (v)
Índice esterificación		
externa	1.22 $\pm$ 0.02	1.16 $\pm$ 0.01
interna	1.11 $\pm$ 0.02	0.67 $\pm$ 0.03
Flavonoides		
externa	2.67 $\pm$ 0.17	1.30 $\pm$ 0.18
interna	21.43 $\pm$ 2.74	4.96 $\pm$ 0.81

Se observa una correlación negativa significativa entre la fluorescencia UV y la FITC, especialmente con la componente azul de la fluorescencia UV, la más importante ( $r = -0.723^{**}$ ). De igual forma la componente azul de la fluorescencia UV es la que presenta una mayor correlación negativa con la cantidad de flavonoides de la cara externa ( $r = 0.664^{**}$ ). Por su parte, la fluorescencia FITC correlaciona positivamente con la cantidad de flavonoides de la cara externa de la cutícula ( $r = 0.771^{**}$ ). El índice de esterificación de la cara externa correlaciona significativamente con la cantidad de flavonoides presentes en la cara externa ( $r = -0.720^{**}$ ). Sin embargo, el índice de esterificación de la cara interna muestra mayor correlación con la cantidad de flavonoides de la cara interna ( $r = -0.743^{**}$ ). Estos resultados sugieren que los flavonoides contribuyen a la fluorescencia FITC de la cutícula pero no a la fluorescencia UV, la cual se ve disminuida en presencia de estos compuestos. Asimismo, su acumulación tiene un efecto negativo en la proporción de enlaces éster presentes en la cutícula.



## DISCUSIÓN

La domesticación de las plantas silvestres se considera uno de los eventos más relevantes en la evolución de estos organismos, no solo por los drásticos cambios que desencadenó en ellos sino por el impacto ocasionado a nivel global, alterando la distribución de las especies y permitiendo el progreso de la civilización humana (Nesbitt y Tanksley, 2002). Aunque los primeros pasos de la domesticación fueron llevados a cabo por agricultores sin ningún conocimiento sobre conceptos de genética o de los sistemas de reproducción de las plantas que cultivaban, los avances en la investigación han permitido tanto la mejora de los cultivos existentes como la domesticación de nuevas plantas (Cong *et al.*, 2008). El tomate representa uno de los cultivos más importantes a nivel mundial por su elevado consumo y por su relevancia en la investigación, al ser uno de los modelos vegetales más empleados. Su domesticación desencadenó la aparición de una amplia gama de rasgos morfológicos y fisiológicos que segregó a los cultivos domesticados de sus antepasados silvestres. Los resultados reunidos en este capítulo revelan la notable heterogeneidad existente entre los frutos del tomate cultivado (*Solanum lycopersicum* L.) y las diferentes especies de tomate silvestres ancestrales que conforman la sección *Lycopersicon*. Una de las modificaciones más destacables en el fruto y desencadenado por el proceso de domesticación hace referencia a su tamaño. Así, las diferencias en el diámetro de los frutos pueden sobrepasar los 30 mm a los 15 dda y los 50 mm al alcanzar la maduración. Las entradas de tomate cultivado analizadas, MM y Heinz, presentan frutos con un tamaño muy superior al de los de las entradas de tomates silvestres, destacando especialmente los de MM, que ya a los 15 dda presentan un mayor tamaño que los frutos maduros del resto de las especies. El incremento del tamaño del fruto de tomate como consecuencia de su domesticación ha sido objeto de estudio por otros investigadores, ya que este carácter afecta tanto a la calidad como al rendimiento de los cultivos. Así, se han descrito varios QTLs (acrónimo del inglés quantitative trait locus, esto es, locus de un carácter cuantitativo) relacionados con el incremento de los frutos en la transición evolutiva entre *S. pimpinellifolium* y *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*. Uno de estos QTLs, fw2.2, está relacionado con el control del ciclo celular y es considerado como una pieza clave en esta transición (Frary *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2014). De igual manera, se han descrito 2 QTLs implicados en el incremento del tamaño y del número de lóculos del fruto. Casi todas las especies de tomates silvestres, así como algunos cultivares de frutos

pequeños, presentan frutos con 2-4 lóculos. La domesticación propició que esa cifra se elevara hasta 8, llegando a superarse en algunos cultivares (Cong *et al.*, 2008).

Al igual que ocurre con el tamaño del fruto de tomate también existen notables diferencias en lo concerniente a otros caracteres del pericarpo, tanto a nivel de la epidermis y de la cutícula como en los tejidos subyacentes a ella. Por un lado, se ha encontrado una apreciable variabilidad en el grosor de la capa cuticular de los frutos de las diferentes especies analizadas, cuyos valores oscilan en un intervalo de unas 9  $\mu\text{m}$  a los 15 dda y de 12  $\mu\text{m}$  tras la maduración. A los 15 días de desarrollo, los frutos de las especies de tomate silvestres consideradas filogenéticamente más alejadas de *S. lycopersicum*, es decir, *S. habrochaites* y *S. pennellii* (Rodríguez *et al.*, 2009; Aflitos *et al.*, 2014) presentan una cutícula mucho más delgada que las entradas de tomate cultivados. El grosor en estos casos oscila en torno a 1  $\mu\text{m}$ , de forma similar a lo que ocurre en los frutos de *S. lycopersicum* ‘Cascada’ durante los estadios iniciales de desarrollo (ver capítulo 1). Estas diferencias se mantienen en el estadio maduro, donde, al igual que ocurre con el diámetro del fruto, MM y Heinz son las entradas que presentan los valores más elevados (Tabla 3.5). En este estadio de desarrollo las cutículas de menor espesor corresponden a frutos de entradas de *S. habrochaites* y *S. pennellii*. Esta circunstancia ha sido previamente descrita por Yeats *et al.* (2012a). Sin embargo, *S. lycopersicum* mostró un grosor intermedio dentro del conjunto de frutos analizados por estos autores, si bien es cierto que su estudio fue llevado a cabo en un número considerablemente menor de muestras.

La heterogeneidad de la cutícula de los frutos de tomate de las diferentes especies de la sección *Lycopersicon* no solo se restringe a su espesor, sino que también se manifiesta en otros aspectos como su morfología y el grado de invaginación hacia las capas celulares subyacentes. La cutícula se muestra en todas ellas como una capa situada sobre la parte más externa de las células epidérmicas que penetra en mayor o menor medida hacia el interior a través de las paredes periclinales que las separan, formando las invaginaciones o ‘pegs’, ya presentes a los 15 días de desarrollo en la mayoría de las entradas. Sin embargo, el nivel de penetración de los componentes cuticulares hacia el interior del pericarpo es muy variable, observándose nuevamente las mayores diferencias entre las entradas de tomate cultivado y las entradas filogenéticamente más alejadas. Mientras que en las primeras pueden alcanzar varias capas de células, llegando en ocasiones a constreñir las mismas, en las entradas de *S. habrochaites* y *S. pennellii* los ‘pegs’ están menos

desarrollados o son casi o totalmente inexistentes. Estos resultados se asemejan nuevamente a los observados en las entradas analizadas por Yeats *et al.* (2012a). En cuanto a la morfología de la cutícula, pueden distinguirse por una parte entradas en las esta capa se asienta sobre la epidermis del fruto de tal modo que origina una superficie más o menos plana, mientras que en otros casos la cutícula no está desarrollada por debajo de una superficie externa lisa sino que es posible apreciar protuberancias u ondulaciones. La variabilidad en la morfología de la cutícula podría ser una consecuencia de la pluralidad de la distribución geográfica de las diferentes especies, y por ende de la multiplicidad de condiciones ambientales bajo las que se desarrollan (Yeats *et al.*, 2012a). La presencia de tricomas en la superficie del fruto podría favorecer la reflexión de la luz, ejerciendo así una función protectora en aquellas especies que habitan en zonas con una alta intensidad lumínica y que, además, están sometidas a un alto estrés hídrico. Este podría ser el caso de *S. chmielewskii*, que crece en valles áridos y presenta un fruto con una superficie muy irregular. La eficacia de estas protuberancias reflejando la radiación ha sido constatada en hojas de diferentes especies (Ehleringer y Bjorkman, 1978; Robberecht *et al.*, 1980).

A nivel ultramicroscópico, la cutícula se manifiesta en la totalidad de las especies como una capa de carácter electrodenso que se distribuye de manera uniforme y continua a lo largo de la superficie del fruto. Asimismo, en la mayor parte de ellas muestra un aspecto reticular y homogéneo tras los primeros 15 días de desarrollo, sin distinguirse capas o zonas con diferente comportamiento osmiofílico en su interior. Esta estructuración de la cutícula es bastante universal, encontrándose tanto en otras especies, entre las que se encuentran *Capsicum annum*, *Magnolia grandiflora* o *Nicotiana tabacum*, como en diferentes regiones de la planta tales como las hojas o los pétalos (Holloway, 1982a; Jeffrey, 2006). De igual manera a lo descrito anteriormente en el capítulo 1 para la variedad Cascada, aquellas entradas cuya cutícula es reticulada a los 15 dda no manifiestan modificaciones en su estructura al alcanzar la maduración. Esta uniformidad en la ultraestructura de la cutícula del fruto de la mayoría de las entradas contrasta con las singularidades observadas en las especies filogenéticamente más alejadas de *S. lycopersicum*. Por un lado, la cutícula de los frutos de 15 dda de PI-134418 *gla* se muestra como una lámina muy delgada de carácter electrodenso en cuya cara interna parecen acumularse partículas nanoscópicas e igualmente electrodensas, lo que acarrea una naturaleza globular de su superficie. Esta particularidad se mantiene cuando el fruto

alcanza el estadio maduro, momento en el cual el tamaño de las partículas mencionadas se ve incrementado. Dicha organización del material cuticular también se observa en los frutos de LA-0716 *pen*, pero en este caso las partículas localizadas cerca de la cara interna de la cutícula son aún más electrodensas, de un tamaño más variable y con un contorno más irregular, y además el aumento de las dimensiones de estas partículas cuando el fruto madura es mucho más acentuado. De igual manera, la cutícula de los frutos de LA-1777 *hab* es a los 15 dda una lámina muy fina y electrodensa y con una cara interna de naturaleza globular, pero además de todos estos aspectos posee una característica singular: la presencia de numerosos gránulos nanoscópicos aún más electrodensos distribuidos a lo largo de toda su longitud, localizados exclusivamente en la capa cuticular. En cambio, a diferencia de las anteriores, la cutícula de los frutos maduros de esta entrada carece de esta peculiaridad. Esta fina capa de naturaleza globular por su cara interna observada en estos frutos se asemeja a la procutícula descrita en esta tesis en los frutos de Cascada. Esta se considera como un estadio de desarrollo temprano de la cutícula (Jeffree, 2006). No obstante, cabe destacar la disparidad en cuanto al momento del desarrollo del fruto en el que la cutícula presenta estas características; mientras que en Cascada se manifiesta hasta los 9 días de desarrollo, los frutos silvestres aún conservan esta estructura tras 15 dda. Asimismo, en todos los casos mencionados se observa una mayor congregación de estos glóbulos en aquellas zonas de la cutícula localizadas sobre las zonas de contacto entre dos células epidérmicas, y se localizan tanto en las proximidades de la misma como en todo el espesor de la pared celular más externa. En estas regiones tiene lugar un incremento en el material cuticular que da como resultado la formación, en mayor o menor grado, de las invaginaciones cuticulares, lo cual podría ser un indicio de que estas partículas podrían actuar como vesículas cargadas de material lipídico que, tras su migración a través de la pared celular, liberarían su contenido a la cutícula creciente. Así, la forma irregular de la cara interna de esta capa sería una consecuencia de la acumulación progresiva y el ensamblaje de dominios de cutina que habrían sido previamente transportados por estas nanoestructuras. Como se ha comentado previamente, la acumulación y la fusión de estas nanopartículas en la parte más externa de la pared celular de las células epidérmicas podría funcionar como un posible mecanismo para la formación de la procutícula (Heredia-Guerrero *et al.*, 2008; Domínguez *et al.*, 2010; D'Angeli *et al.*, 2013; Kwiatkowska *et al.*, 2014), si bien es cierto que tanto su origen como su contenido exacto (lipídico, proteico y/o polisacárido) actualmente se desconocen.

Por otra parte, entre todas las entradas analizadas destaca PI-126445 *hab*, no solo por presentar una cutícula con una ultraestructura significativamente distinta a LA-1777 *hab*, sino además por ser la única que exhibe un aspecto laminar (Figura 3.19). En las imágenes de MET del pericarpo de sus frutos de 15 días de desarrollo pueden distinguirse numerosas capas paralelas más o menos electrodensas y de grosor nanométrico a lo largo de todo el espesor de la misma. En la región situada sobre la intersección entre dos células se produce nuevamente la acumulación de material lipídico por la cara interna de esta capa pero, a diferencia de lo que acontece en las entradas descritas anteriormente, dichos acúmulos parecen distribuirse en capas paralelas en la pared celular más externa más próxima a la cutícula ya formada. Sin embargo, conforme prosigue el desarrollo y los frutos maduran el material cuticular deja de distribuirse en láminas y la cutícula adquiere un aspecto reticular semejante al observado en los frutos de la mayor parte de las entradas. Esta organización en capas del material cuticular ha sido descrito en hojas, en las cuales la cutícula puede hallarse totalmente laminada como en el caso de *Beta vulgaris* o *Taraxacum officinale*, o puede presentar una estructura mixta, laminada por la parte más externa y reticulada en el interior, como ocurre en *Agave americana* o *Clivia miniata* (Holloway, 1982a). A la luz de todos estos resultados se podría concluir, por un lado, que desde un punto de vista sistemático no es posible asignar un tipo de cutícula determinado al clado conformado por las especies de la sección *Lycopersicon*. Asimismo, el hecho de que en algunos casos la ultraestructura de la cutícula sufra una transformación en el tránsito entre los 15 dda y el estadio maduro es indicativo de que el tipo de cutícula depende del estadio de desarrollo en el que se encuentre el órgano en cuestión (Jeffree, 1996). El ácido 10-16 dihidroxihexadecanoico y sus isómeros posicionales son generalmente los constituyentes principales de la cutícula de las gimnospermas y angiospermas modernas (Holloway, 1982b). Aunque en la cutícula de la mayor parte de las angiospermas es posible encontrar una mezcla de ácidos C<sub>16</sub> y C<sub>18</sub> se han descrito algunas especies con una composición particular. Entre ellas se encuentran la cutícula de *Agave americana*, en la cual los ácidos C<sub>18</sub> forman armazón principal (Caldicott, 1973), una característica poco habitual, así como la de *Clivia miniata*, donde es posible encontrar una mezcla de cutina y cután, o la de *Beta vulgaris*, en la cual es el cután el principal polímero (Tegelaar, 1990). El hecho de que se hayan descrito diferencias sustanciales en la composición de la cutícula de algunas de las especies que muestran una estructura laminada suscita la necesidad de un análisis en mayor profundidad con objeto de determinar si las singularidades observadas en el pericarpo de

los frutos de algunas de las entradas silvestres pudieran obedecer a diferencias en la composición de la cutícula, o bien en los mecanismos de su síntesis.

Al contrario de lo que ocurre a nivel de la cutícula, no se han encontrado diferencias ostensibles en cuanto a la ultraestructura de la pared celular más externa de la epidermis de los frutos de las entradas analizadas. En la mayor parte de ellas es posible observar que ya en el estadio de 15 dda dicha pared está organizada en multicapas, las cuales son más notorias en las especies cuyos frutos son rojos al madurar (*S.lycopersicum*, *S.lycopersicum* var. *cerasiforme* y *S. pimpinellifolium*). Esta disposición en la cual se alternan capas paralelas electroclaras con otras algo más electrodensas permanece con posterioridad hasta que el fruto alcanza la maduración. No obstante, también se han encontrado algunas entradas en las que la pared celular más externa muestra una apariencia amorfa y electroclara a los 15 dda, en cuyo interior no se distinguen capas. Estas dos configuraciones de la pared celular más externa también fueron observadas en el pericarpo de los frutos de la variedad ‘Cascada’ durante el desarrollo. Mientras que durante el periodo de división celular impera la apariencia amorfa, tras el inicio de la fase de expansión celular muestra un aspecto laminar. Si bien durante el primer periodo se ha demostrado la existencia en esta variedad tanto de pectinas esterificadas como no esterificadas (ver Capítulo 1) la aparición de múltiples capas paralelas dispuestas de forma helicoidal podría deberse a la ordenación de microfibrillas de celulosa (Kutschera, 2008; Rey, 2010). Por ello, podría ser interesante investigar si esta asociación entre los cambios en la composición de la pared celular más externa de la epidermis de estos frutos y de su ultraestructura se reproduce de igual manera en los frutos de las diferentes especies de tomate de la sección *Lycopersicon*.

Por debajo de la epidermis no se han observado diferencias apreciables en la ultraestructura del pericarpo, con la excepción de la entrada PI-126448 *cor*, cuyos frutos maduros manifiestan unas peculiares características que no han sido halladas en ninguna otra de todas las entradas estudiadas. Esta entrada es, sin duda, singular. En ella pueden distinguirse frutos maduros de diferentes tonalidades: blanco-morado y verde-marrón. Esta distinción entre los frutos no solo se ciñe a la coloración, sino que además muestran unas notables diferencias en la ultraestructura del pericarpo. Por un lado, en aquellos frutos con una tonalidad blanca-morada se ha observado la presencia de multitud de vesículas de diferentes tamaños que se distribuyen por las proximidades de la cara interna de la cutícula

Estas vesículas, al contrario de lo descrito anteriormente en otras entradas, presentan un contenido de carácter electroclaro, e igualmente parecen ser más abundantes y de mayor tamaño en la pared celular más externa contigua a las invaginaciones cuticulares. Sin embargo, tales vesículas no aparecen en los frutos de coloración verde-marrón, cuyo pericarpo se encuentra totalmente suberificado, característica ausente en los restantes frutos analizados en este trabajo. En él se puede distinguir una región más externa en la que las células se encuentran parcialmente comprimidas debido a la alta suberificación de las paredes, y una región más interna en la que la compresión es mucho más intensa. (Fig. 3.21). Esta configuración ha sido previamente descrita en las semillas de pomelo (Espelie, 1980). La suberificación de las paredes celulares tiene lugar como respuesta a daños físicos, así como para sellar la zona de abscisión (Vandoorn y Stead, 1997). En el caso de esta entrada, este proceso parece tener lugar como consecuencia del microagrietado, fenómeno consistente en la aparición de numerosas grietas de pequeño tamaño (de aproximadamente 1-2 mm y menores) que se restringen a la epidermis y que, como ya se ha descrito previamente, pueden llegar a suberificar (Young, 1947).

Como ya se ha descrito en esta tesis la proteína CUS1 es una lipasa/hidrolasa con un dominio GDLS que participa en la síntesis del biopolímero de cutina (Girard *et al.*, 2012; Yeats *et al.*, 2012b). Los ensayos de inmunodetección de esta enzima realizados en este capítulo revelaron su presencia en el epicarpo de la totalidad de los frutos de 15 dda seleccionados para tal fin, independientemente tanto del grosor como de la ultraestructura de la cutícula. Así, CUS1 puede localizarse tanto en el interior de las células que conforman la epidermis del fruto, distribuyéndose únicamente por su región apical, en estrecho contacto con la pared celular más externa, así como en la región cutinizada de la pared celular más externa, donde la densidad de las partículas de oro es mayor, encontrándose un gran número de ellas en las invaginaciones. La ubicación de CUS1 en esta franja cutinizada es similar en todas las entradas, repartiéndose de forma homogénea desde la superficie del fruto hasta la frontera con la región no cutinizada de la pared celular más externa. El marcaje de la proteína en dicha región es muy escaso, siendo totalmente ausente en otras regiones del epicarpo (Fig. 3.22). Este patrón de distribución de la proteína, así como la diferente densidad de marcaje en las zonas mencionadas, se asemeja a lo acontecido en los frutos de la variedad Cascada en ciertos estadios de desarrollo correspondientes a la fase de división celular (ver capítulo 2). La localización de CUS1 en



la región cutinizada de la pared celular más externa también ha sido puesta en manifiesto mediante el desarrollo de otros ensayos de inmunolocalización de la enzima (Girard *et al.*, 2012; Yeats *et al.*, 2012b). Por otra parte, la densidad de marcaje de la proteína entre las diferentes entradas es considerablemente variable, lo cual constituye una nueva evidencia de la heterogeneidad de las especies analizadas en este trabajo. Los datos recogidos en los ensayos de inmunodetección no reflejan una correlación entre el grosor de la cutícula y la mayor o menor abundancia de la proteína en esta región. Dicho de otro modo, una mayor cantidad de cutina no implica una mayor densidad de CUS1, lo que refuerza la hipótesis formulada en el anterior capítulo. Así, esta enzima no sería la responsable directa del fuerte entrecruzamiento que tiene lugar entre los ácidos grasos polihidroxilados que componen la cutina del fruto de tomate (Domínguez *et al.*, 2015). Por ello, cabría pensar nuevamente en la participación de otro mecanismo a nivel molecular, o en la implicación de otra enzima u enzimas en la deposición de este biopolímero.

De igual manera, los resultados obtenidos sugieren que el peso específico de la cutícula de los frutos en el estadio maduro no guarda una relación clara con el grosor de la misma, así como con el tamaño del fruto. Si bien es cierto que existe una cierta homogeneidad entre las entradas de una misma especie, este parámetro refleja nuevamente la alta heterogeneidad de los especímenes que constituyen la sección *Lycopersicon*. Así, se pueden encontrar cutículas densas y compactas como las de LA-1777 *hab* (con un peso específico alto y un bajo espesor) o entradas en las que la cutícula refleja unas características contraopuestas, como Heinz *lyc*.

Asimismo, la cantidad de ceras epicuticulares presente en la cutícula de los frutos maduros varía notablemente entre las especies de tomate estudiadas. Los valores más bajos se observan en PI-134418 *gla*, donde no llegan a alcanzar los 25  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , mientras que en el lado opuesto se encuentran las entradas de *S. huaylasense*, en las que las cifras son hasta 10 veces más elevadas. Se ha descrito que, dependiendo de la especie y del órgano, la cantidad de ceras puede oscilar en un rango entre 1 y varios cientos de microgramos por cada unidad de superficie. En ocasiones, como en el caso de algunas plantas de tomate cultivado, la cantidad de ceras presente en la cutícula del fruto supera con creces a la encontrada en la cutícula de las hojas de la misma especie (Vogg *et al.*, 2004). No obstante, los datos recabados en este trabajo muestran una cierta tendencia a la homogeneidad entre las entradas relativas a una misma especie. Las ceras epicuticulares presentan importantes

funciones fisiológicas entre las que se encuentra la protección frente a los rayos UV (Reicosky y Hanover, 1978). Una cantidad elevada de este componente podría resultar ventajosa para aquellas especies que habitan en zonas montañosas a una gran altitud, como *S. huaylasense*, *S. arcanum* o *S. cornelliomuelleri*. Otra de estas funciones es la de limitar la pérdida de agua. Algunas plantas, entre las que se encuentra el tomate, reaccionan a menudo ante un estrés hídrico incrementando la cantidad total de ceras y aumentando la proporción de compuestos alifáticos de cadena larga (Xu *et al.*, 1995; Shepherd y Griffiths, 2006). Sin embargo, la disparidad de los resultados obtenidos no permite definir argumentos concluyentes con respecto a la cantidad de ceras y las distintas condiciones ambientales en las que habitan estas especies. Dicha disparidad hace entrever que la mayor o menor abundancia de este componente cuticular no parece representar un papel importante en el proceso de domesticación del tomate. Desde un punto de vista químico, las ceras cuticulares son habitualmente una mezcla de diversos tipos de compuestos alifáticos. La cantidad y el tipo de los distintos componentes varían ampliamente de una especie vegetal a otra (Hamilton, 1996). La mezcla total de ceras de un taxón en concreto podría incluir porcentajes relativamente altos de componentes específicos o un grupo determinado de compuestos (Jetter *et al.*, 2006). En un estudio reciente realizado por Haliński *et al.* (2015) se han analizado los distintos componentes que conforman el total de ceras presentes la cutícula de las hojas de varias entradas de tomate de *S. lycopersicum*, *S. pennellii* y *S. pimpinellifolium*. Los componentes más abundantes en estos casos son los hidrocarburos, y los triterpenos en menores cantidades. Estos autores proponen a los hidrocarburos cuticulares como potenciales marcadores taxonómicos para establecer relaciones de parentesco entre las distintas especies de tomate. Así, podría ser interesante analizar en investigaciones futuras si en la cutícula de los frutos de las especies de tomate de la sección *Lycopersicon* se obtendrían resultados equiparables a los de estos autores.

La microscopía de fluorescencia constituye una técnica sumamente útil para recabar información sobre la estructura y los componentes de la superficie de las plantas, no solo de la cutícula, sino también de la epidermis y, en algunos casos, de las capas subepidérmicas. En concreto, la microscopía de epifluorescencia ha sido ampliamente usada en las últimas décadas para el estudio de los tejidos foliares tras el considerable auge de las técnicas de análisis digital de imágenes, la microscopía confocal y la microscopía multifotón (Blancaflor y Gilroy, 2000). Dichas técnicas posibilitan la localización de

estructuras macromoleculares en función de sus patrones de emisión y absorción de fluorescencia (Fricker *et al.*, 1997). Así, el procesamiento del conjunto de imágenes tomadas mediante microscopía de epifluorescencia en el presente estudio permitió visualizar y analizar la autofluorescencia de la cutícula de los frutos verdes inmaduros y maduros del total de las entradas. Dichas imágenes pusieron de manifiesto una vez más la gran heterogeneidad de las especies examinadas, encontrándose notables diferencias no solo en cuanto a la presencia o ausencia de autofluorescencia de esta capa en función de la longitud de onda de la luz de excitación o del estadio de desarrollo del fruto, sino también en la distribución de dicha autofluorescencia en la misma, en su intensidad y en su emisión por otras zonas del pericarpo. El análisis de todas estas variables dio como resultado la separación en dos grandes grupos de las diferentes especies de tomate de la sección *Lycopersicon*, distinguiéndose así a las especies cuyos frutos maduros son rojos, anaranjados o amarillentos (*S. lycopersicum*, *S. lycopersicum* var *cer*, *S. pimpinellifolium*, *S. cheesmaniae* y *S. galapagense*) de las restantes. En cuanto a la emisión de autofluorescencia desde la superficie hacia el interior del fruto, la intensidad de la fluorescencia verde es, de forma general, más o menos semejante desde la cara externa a la interna en la cutícula de las entradas del primer grupo. Sin embargo, en los casos en los que existe autofluorescencia azul, esta suele ser más intensa en la parte más superficial de la cutícula. Esta mayor intensidad de la cutícula del fruto en la zona más externa podría deberse a la presencia de flavonoides asociados a las ceras epicuticulares, las cuales se distribuyen por esa región (Laguna *et al.*, 1999). Ya sea verde o azul, y de forma independiente al estadio de desarrollo en el que se encuentre el fruto, la autofluorescencia emitida por el pericarpo en buena parte de las entradas no se restringe únicamente a la capa cuticular, sino que las paredes celulares de las células epidérmicas también emiten autofluorescencia. La fuerte fluorescencia de la cutícula de algunas plantas cuando son excitadas con luz ultravioleta, así como la emitida por las paredes celulares de las células epidérmicas, ha sido previamente observada por otros autores (Harris y Hartley, 1976; Considine y Knox, 1979). Los ácidos ferúlico y cumárico, ácidos cinámicos, son considerados los compuestos responsables de la emisión de fluorescencia azul por parte de las paredes celulares (Harris y Hartley, 1976). En este sentido, cabe destacar la entrada PI-126448 *cor* (v), ya que tanto la autofluorescencia verde como la azul advertida en el pericarpo de sus frutos maduros agrietados se deben en mayor medida a la emitida por las paredes celulares epidérmicas, así como a la de aquellas que conforman los tejidos

subyacentes, altamente suberificadas (Fig. 3.24 B,D). La suberina está compuesta principalmente por una mezcla de ácidos grasos de cadena larga ( $C_{20}$  a  $C_{30}$ ), alcoholes, hidroxiácidos grasos o ácidos dicarboxílicos y friedelina (un triterpeno), los cuales se depositan entre la pared celular y la membrana plasmática. Además de ello, contiene una gran cantidad de fenilpropanoides que han sido postulados como los responsables de la intensa autofluorescencia de los tejidos suberificados (Mader, 1954; Kolattukudy, 1980). El incremento en la intensidad de la autofluorescencia azul-verde en las regiones del pericarpo del fruto de tomate colindantes a una zona donde se ha producido la rotura de la cutícula ha sido igualmente descrito por Cho *et al.*, (2013). En cuanto a la intensidad total de la autofluorescencia irradiada por la cutícula existe una tendencia clara: mientras que en el grupo de especies del complejo verde la intensidad total de la autofluorescencia azul es la más elevada en ambos estadios de desarrollo, en el caso de las entradas con frutos de otra coloración la autofluorescencia verde supera en general a la azul en el estadio maduro. Del análisis de la contribución de cada componente (rojo, verde y azul) a la intensidad total de la autofluorescencia se puede inferir, por una parte, que la autofluorescencia verde es debida casi en su totalidad al canal referido a ese mismo color, encontrándose los valores más elevados en el grupo de entradas cuyos frutos maduros son de una coloración rojiza, anaranjada o amarillenta. En cambio, a la autofluorescencia azul contribuyen tanto la componente verde como a la azul. Mientras que en lo referido al canal verde no revelan una tendencia clara, los resultados obtenidos en lo relativo al canal azul sugieren un comportamiento desigual del conjunto de entradas anteriormente mencionadas con respecto a las restantes. Así, se produce una notable disminución de la intensidad de la autofluorescencia en la transición del fruto de los 15 días de desarrollo a la maduración, alcanzándose valores cercanos al umbral y llegando incluso a ser nula. Las especies que presentan frutos maduros verdosos o blanquecinos no siguen esta pauta, hallándose entradas en las que dicha intensidad disminuye en la maduración y otras en las que aumenta o en las que se mantiene más o menos constante. La autofluorescencia azul-verde es el resultado de complejas interacciones biofísicas y bioquímicas que tienen lugar entre gran cantidad de compuestos que forman parte de los organismos vegetales (Harris y Hartley, 1976). De este modo, las diferencias en las pautas de emisión de fluorescencia aquí descritas son un reflejo de la variable composición de la cutícula de los frutos de tomate estudiados. Cuando tiene lugar la maduración del tomate se produce la degradación progresiva de la clorofila *a* al mismo tiempo que tiene lugar la síntesis del licopeno en

determinados cultivares, lo que desencadena la aparición del color rojo del fruto. La escasa intensidad de la fluorescencia en la región espectral correspondiente al rojo podría ser indicativa de una baja concentración de moléculas de clorofila (Cho *et al.*, 2013). Asimismo, durante la maduración del fruto tiene lugar la síntesis de flavonoides específicos que son transportados desde las células epidérmicas hacia la cutícula (Laguna *et al.*, 1999). Los flavonoides son un tipo de compuestos fenólicos de bajo peso molecular que están ampliamente distribuidos en el reino vegetal; su presencia en la cutícula del fruto ha sido ampliamente descrita previamente (Hunt y Baker, 1980; Baker *et al.*, 1982). La diferencia más significativa entre los frutos de tomate verdes y los frutos maduros es la presencia de dos flavonoides en la cutícula de estos últimos: la naringenina y la chalconaringenina. Ambos están asociados tanto a la cutina como a las ceras epicuticulares (Hunt *et al.*, 1980; Baker *et al.*, 1982; Pfündel *et al.*, 2006). Además de ellos, en la cutícula de los frutos también se localizan ácidos fenólicos en cantidades variables, entre los que se encuentran mayoritariamente los ácidos cumárico y ferúlico (Hunt *et al.*, 1980). Lai *et al.* (2007) han descrito que la intensidad de la fluorescencia de la cutícula del tomate en las regiones espectrales azul-verde (entre los 400-550 nm), es atribuible a la presencia de flavonoides y carotenoides que se acumulan durante el proceso de maduración.

El índice de esterificación es la ratio de las bandas asociadas a las vibraciones de tensión asimétrica del metileno y de tensión del enlace carbonilo del grupo éster. Dicho parámetro, obtenido tras un exhaustivo análisis de los espectros FT-IR de las cutículas aisladas de las diferentes entradas, determina la relación existente entre la unidad estructural más repetida de la cutícula (CH<sub>2</sub>) y el grupo éster, cuyo entrecruzamiento conforma la matriz de cutina. Esta relación se puede calcular de diferentes formas (Benítez *et al.*, 2004; Chefetz, 2007; Girard *et al.*, 2012; Heredia-Guerrero *et al.*, 2012; España *et al.*, 2014). En este trabajo, dicho índice se ha determinado a partir de la ratio de las absorbancias de las bandas  $\nu(\text{C}=\text{O})/\nu_{\text{a}}(\text{CH}_2)$ . El valor del índice de esterificación es directamente proporcional al grado de entrecruzamiento (Heredia-Guerrero *et al.*, 2014). En la totalidad las especies de tomate aquí analizadas se han encontrado unos valores similares del índice de esterificación a ambos lados de la cutícula. Entre ellas destacan aquellas cuyo fruto es de color rojo o anaranjado al alcanzar la maduración, ya que presentan unos índices de esterificación significativamente menores que las restantes. Esta singular particularidad ha sido observada previamente a lo largo del crecimiento del fruto

en distintas variedades de tomate cultivado (España *et al.*, 2014). El índice de esterificación varía en función del estadio del fruto. Este se mantiene elevado a lo largo del crecimiento pero disminuye en el momento de la maduración, lo cual es indicativo de una ruptura de los enlaces ésteres. Este hecho es importante y queda comprobado de modo general después del análisis de las entradas estudiadas en el presente trabajo.

Otra conclusión que presenta el análisis llevado a cabo mediante espectroscopía FT-IR es que, a pesar de la variabilidad biológica de las diferentes entradas estudiadas y de su distinta procedencia, todas ellas exhiben, en mayor o menor medida, una composición y una distribución espacial de sus componentes similar. La cutícula de la totalidad de las especies analizadas se caracteriza por presentar una cara externa en la que predominan los metilenos y los grupos ésteres y una cara interna en la que destacan las bandas ligadas a los polisacáridos. Los flavonoides aparecen en la mayoría de los casos más abundantes en la cara externa de la cutícula que en la cara interna. La asimetría de composición entre la cara externa e interna inherente a la cutícula de las plantas superiores queda claramente reflejada sin excepción alguna en todas las entradas estudiadas.

A modo de breve conclusión final en este apartado de discusión podríamos indicar que el exhaustivo análisis llevado a cabo de la epidermis de los frutos de la sección *Lycopersicon* conduce a resaltar la gran heterogeneidad de características y comportamiento de los mismos. El proceso de domesticación ha homogeneizado determinados caracteres y propiedades, fijado tendencias y ha mantenido características estructurales como las referentes al reagrupamiento a nivel macromolecular e interacción de los componentes mayoritarios de la cutícula del fruto. Sin embargo, la mayoría de los parámetros estudiados en este capítulo presentan siempre singularidades que, lejos de ser un problema, pueden ser usados en procesos de mejora del fruto de tomate. Así, entradas con alto contenido en ceras cuticulares, grosor, grado de invaginación, color definido o la presencia de una superficie rugosa con o sin tricomas podrían ser usados en dichos procesos de mejora para la obtención de variedades más resistentes o sensibles por su implicación en importantes propiedades como son las de naturaleza biomecánica e hídrica.

## BIBLIOGRAFÍA

**Adato A, Mandel T, Mintz-Oron S, Venger I, Levy D, Yativ M, Domínguez E, Wang Z, De Vos RCH, Jetter R, Schreiber L, Heredia A, Rogachev I, Aharoni A.** 2009. Fruit surface flavonoid accumulation in tomato is controlled by a SLMYB12-regulated transcriptional network. *PLoS Genet* 5: e1000777.

**Aflitos S, Schijlen E, de Jong H, de Ridder D, Smit S, Finkers R, Wang J, Zhang G, Li N, Mao L, Bakker F, Dirks R, Breit T, Gravendeel B, Huits H, Struss D, Swanson-Wagner R, van Leeuwen H, van Ham RC, Fito L, Guignier L, Sevilla M, Ellul P, Ganko E, Kapur A, Reclus E, de Geus B, van de Geest H, Te Lintel Hekkert B, van Haarst J, Smits L, Koops A, Sanchez-Perez G, van Heusden AW, Visser R, Quan Z, Min J, Liao L, Wang X, Wang G, Yue Z, Yang X, Xu N, Schranz E, Smets E, Vos R, Rauwerda J, Ursem R, Schuit C, Kerns M, van den Berg J, Vriezen W, Janssen A, Datema E, Jahrman T, Moquet F, Bonnet J, Peters S.** 2014. Exploring genetic variation in the tomato (*Solanum* section *Lycopersicon*) clade by whole-genome sequencing. *Plant J* 80(1):136-48.

**Alba JM., Montserrat, M. y Fernández-Muñoz, R.** 2009. Resistance to the two spotted spider mite (*Tetranychus urticae*) by acylsucroses of wild tomato *Solanum pimpinellifolium* trichomes studied in a recombinant inbred line population. *Exp Appl Acarol* 47: 35-47.

**Azanza F, Kim D, Tanksley SD, Juvik JA.** 1995. Genes from *Lycopersicon chmielewskii* affecting tomato quality during fruit ripening. *Theor Appl Genet* 91(3):495-504.

**Baker EA, Bukovac MJ, Hunt GM.** 1982. Composition of tomato fruit cuticle as related to fruit growth and development. In: Cutler DF, Alvin KL, Price CE, eds, *The Plant Cuticle*. Academic Press, London, UK, pp: 33-44.

**Bargel H, Neinhuis C.** 2004. Altered Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Fruit Cuticle Biomechanics of a Pleiotropic Non Ripening Mutant. *J Plant Growth Regul* 23 (2): 61-75.

**Bargel H, Neinhuis C.** 2005. Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit growth and ripening as related to the biomechanical properties of fruit skin and isolated cuticle. *J Exp Bot* 56 (413): 1049-1060.

**Bauchet G, Causse M.** 2012. Genetic diversity in tomato (*Solanum lycopersicum*) and its wild relatives. In: Çalişkan M, ed, *Genetic Diversity in Plants*. InTechOpen, Rijeka, Croatia, pp: 133-162.

**Benítez JJ, García-Segura R, Heredia A.** 2004. Plant biopolyester cutin: a tough way to its chemical synthesis. *Biochim Biophys Acta* 1674(1):1-3.

**Blanca J, Cañizares J, Cordero L, Pascual L, Díez MJ, Nuez F.** 2012. Variation revealed by SNP genotyping and morphology provides insight into the origin of the tomato. *PLoS ONE* 7: e48198.

**Blancaflor EB, Gilroy S.** 2000. Plant cell biology in the new millennium: new tools and new insights, *Am J Bot* 87: 1547-1560.



- Böndel KB, Lainer H, Nosenko T, Mboup M, Tellier A, Stephan W.** 2015. North-South Colonization Associated with Local Adaptation of the Wild Tomato Species *Solanum chilense*. *Mol Biol Evol* 32(11): 2932-43.
- Caldicott AB.** 1973. Cutin Acids and Molecular Phylogeny, Ph.D., University of Bristol, UK.
- Cánovas F.** 1995. Manejo del cultivo sin suelo. In: Nuez F, ed, El Cultivo del Tomate. Mundi Prensa, Madrid, Spain, pp: 227–254.
- Chefetz B.** 2007. Decomposition and sorption characterization of plant cuticles in soil. *Plant Soil* 298: 21-30.
- Cho B, Kim MS, Baek IS, Kim DY, Lee WH, Kim J, Bae H, Kim YS.** 2013. Detection of cuticle defects on cherry tomatoes by using hyperspectral fluorescence imagery. *Postharvest Biol Technol* 76:40–49.
- Cong B, Barrero LS, Tanksley SD.** 2008. Regulatory change in YABBY-like transcription factor led to evolution of extreme fruit size during tomato domestication. *Nat Genet* 40: 800–804.
- Considine JA, Knox RB.** 1979. Development and histochemistry of the cells, cell walls and cuticle of the dermal system of fruit of the grape, *Vitis vinifera* L. *Protoplasma* 99: 347–365.
- D'Angeli S, Falasca G, Matteucci M, Altamura MM.** 2013. Cold perception and gene expression differ in *Olea europaea* seed coat and embryo during drupe cold acclimation. *New Phytol* 197: 123–138.
- Darwin SC, Knapp S, Peralta IE.** 2003. Taxonomy of tomatoes in the Galapagos Islands: native and introduced species of *Solanum* section *Lycopersicon*. *Syst biodiver* 1: 29-53.
- de Candolle A.** 1886. *Origin of cultivated plants*. Hafner Publishing Company, New York, USA.
- Dodsworth S, Chase MW, Särkinen TE, Knapp S, Leitch AR.** 2016. Using genomic repeats for phylogenomics: a case study in wild tomatoes (*Solanum* section *Lycopersicon*: Solanaceae). *Biol J Linn Soc* 117: 96–105.
- Domínguez E, Cuartero J, Heredia A.** 2011. An overview on plantcuticle biomechanics. *Plant Sci* 181: 77–84.
- Domínguez E, España L, López-Casado G, Cuartero J, Heredia A.** 2009. Biomechanics of isolated tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit cuticles during ripening: the role of flavonoids. *Funct Plant Biol* 36: 613-620.
- Domínguez E, Fernández MD, López Hernández JC, Pérez-Parra J, España L, Heredia A, Cuartero J.** 2012. Tomato fruit continues growing while ripening, affecting cuticle properties and cracking. *Physiol Plant* 146: 473-486.

**Domínguez E, Heredia-Guerrero JA, Benítez JJ, Heredia A.** 2010. Selfassembly of supramolecular lipid nanoparticles in the formation of plant biopolyester cutin. *Mol Biosyst* 6: 948–950.

**Domínguez E, Heredia-Guerrero JA, Heredia A.** 2011. The biophysical design of plant cuticles: an overview. *New Phytol* 189: 938-949.

**Domínguez E, Heredia-Guerrero JA, Heredia A.** 2015. Plant cutin genesis: unanswered questions. *Trends Plant Sci* 20: 551-558.

**Domínguez E, López-Casado G, Cuartero J, Heredia A.** 2008. Development of fruit cuticle in cherry tomato (*Solanum lycopersicum*). *Funct Plant Biol* 35: 403-411.

**Ehleringer J, Björkman O.** 1978. Pubescence and leaf spectral characteristics in a desert shrub, *Encelia farinosa*. *Oecologia* 36:151-162.

**Eshed Y, Zamir, D.** 1995. An introgression line population of *Lycopersicon pennellii* in the cultivated tomato enables the identification and fine mapping of yield associated QTL. *Genetics* 141:1147-1162.

**España L, Heredia-Guerrero JA, Segado P, Benítez JJ, Heredia A, Domínguez E.** 2014. Biomechanical properties of tomato fruit cuticle during development are modulated by changes in the relative amount of their components. *New Phytol* 202: 790-802.

**Espelie KE, Davis RW, Kolattukudy PE.** 1980. Composition, ultrastructure and function of the cutin-containing and suberin-containing layers in the leaf, fruit peel, juice-sac and inner seed coat of grapefruit (*Citrus-paradisi* Macfed.) *Planta* 149:498–511.

**Esquinas-Alcázar J, Nuez F.**1995. Situación taxonómica, domesticación y difusión del tomate. In: Nuez F, ed, El Cultivo del tomate. Mundi-Prensa, Madrid, Spain, pp: 11-42.

**Fernández-Muñoz R, Salinas M, Álvarez M, Cuartero J.** 2003. Inheritance of resistance to two-spotted spider mite and glandular leaf trichomes in wild tomato *Lycopersicon pimpinellifolium* (Jusl.) Mill. *J Am Soc Hortic Sci* 128(2): 188-195.

**Foolad MR.** 2007. Genome mapping and molecular breeding of tomato. *Int J Plant Genomics* 2007: 64358.

**Frary A, Nesbitt TC, Grandillo S, Knaap E, Cong B, Liu J, Meller J, Elber R, Alpert KB, Tanksley SD.**2000. *fw2.2*: a quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science* 289: 85–88.

**Fricker MD, Errington RJ, Wood JL, Tlalka M, May M, White NS.** 1997. Quantitative confocal fluorescence measurements in living tissues. In: Van Duijn B, Wiltnik A, eds, Signal Transduction - Single Cell Research. SpringerVerlag, Heidelberg, Germany, pp: 413-445.

**Fridman E, Pleban T, Zamir D.** 2000. A recombination hotspot delimits a wild species QTL for tomato sugar content to 484-bp within an invertase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 4718-4723.

- Fridman E, Liu YS, Carmel-Goren L, Gur A, Shores M, Pleban T, Eshed Y, Zamir D.** 2002. Two tightly linked QTLs modify tomato sugar content via different physiological pathways. *Mol Genet Genomics* 266: 821-826.
- Gillaspy G, Ben-David H, Gruissem W.** 1993. Fruits: A Developmental Perspective. *Plant Cell* 10: 1439–1451.
- Girard AL, Mounet F, Lemaire-Chamley M, Gaillard C, Elmorjani K, Vivancos J, Runavot JL, Quemener B, Petit J, Germain V, Rothan C, Marion D, Bakan B.** 2012. Tomato *GDSL1* is required for cutin deposition in the fruit cuticle. *Plant Cell* 24: 3119-3134.
- Hajibagheri M, Hall J, Flowers T.** 1983. The structure of the cuticle in relation to cuticular transpiration in leaves of the halophyte *Suaeda maritima* (L.) Dum. *New Phytol* 94: 125-131.
- Haliński LP, Kalkowska M, Kalkowski M, Piorunowska J, Topolewska A, Stepnowski P.** 2015. Cuticular wax variation in the tomato (*Solanum lycopersicum* L.), related wild species and their interspecific hybrids. *Biochem Syst Ecol* 60: 215-224.
- Haliński LP, Stepnowski P.** 2016. Cuticular hydrocarbons and sucrose esters as chemotaxonomic markers of wild and cultivated tomato species (*Solanum* section *Lycopersicon*). *Phytochemistry* 132:57-67.
- Hamilton RJ.** 1996. Waxes: chemistry molecular biology and functions. The Oily Press, Dundee, UK.
- Harris PJ, Hartley RD.** 1976. Detection of bound ferulic acid in cell walls of the Gramineae by ultraviolet fluorescence microscopy. *Nature* 259: 508–510.
- Heredia-Guerrero JA, Benítez JJ, Domínguez E, Bayer IS, Cingolani R., Athanassiou A, Heredia A.** 2014. Infrared and Raman spectroscopic features of plant cuticles: a review. *Front Plant Sci* 5:305.
- Heredia-Guerrero JA, Benítez JJ, Heredia A.** 2008. Self-assembled polyhydroxy fatty acids vesicles: a mechanism for plant cutin synthesis. *BioEssays* 30: 273–277.
- Heredia-Guerrero JA, de Lara R, Domínguez E, Heredia A, Benavente J, Benítez JJ.** 2012. Chemical-physical characterization of isolated plant cuticles subjected to low-dose  $\gamma$  -irradiation. *Chem Phys Lipids* 165: 803-808.
- Hoagland DR, Arnon DI.** 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *Calif Agr Exp Sta Cir* 347.
- Holloway PJ.** 1982a. Structure and histochemistry of plant cuticular membranes: an overview. In: Cutler DF, Alvin KL, CE Price, eds, *The Plant Cuticle*. Academic Press, London, UK, pp: 1–32.

**Holloway PJ.** 1982b. The chemical constitution of plant cutins. In: Cutler DF, Alvin KL, Price CE, eds, The plant cuticle. Academic Press, London, UK, pp: 45–85.

**Hull HM, Morton HL, Wharrie JR.** 1975. Environmental influences on cuticle development and resultant foliar penetration. *Bot Rev* 41: 421-452.

**Hunt GM, Baker EA.** 1980. Phenolic constituents of tomato fruit cuticles. *Phytochemistry* 19: 1415-1419.

**Hunter P.** 2008. The paradox of model organisms. *Embo Reports* 9: 717-720.

**Isaacson T, Kosma DK, Matas AJ, Buda GJ, He Y, Yu B, Pravitasari A, Batteas JD, Stark RE, Jenks MA, Rose JK.** 2009. Cutin deficiency in the tomato fruit cuticle consistently affects resistance to microbial infection and biomechanical properties, but not transpirational water loss. *Plant J* 60(2):363-77.

**Javelle M, Vernoud V, Rogowsky PM, Ingram GC.** 2010. Epidermis: the formation and functions of a fundamental plant tissue. *New Phytol* 189: 17-39.

**Jeffree CE.** 1996. Structure and ontogeny of plant cuticles. In: Kerstiens G, ed, Plant Cuticles: an Integrated Functional Approach. BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford, UK, pp: 33–82.

**Jeffree CE.** 2006. The fine structure of the plant cuticle. In: Riederer M, Müller C, eds, Biology of the Plant Cuticle. Blackwell Publishing, Oxford, UK, pp: 11–125.

**Jetter R, Kunst L, Samuels L.** 2006. Composition of plant cuticular waxes. In: Riederer M, Müller C, eds, Biology of the plant cuticle. Blackwell, London, UK, pp: 145—181.

**Kolattukudy PE.** 1980. Biopolyester membranes of plants: cutin and suberin. *Science* 208(4447): 990-1000.

**Kosma DK, Bourdenx B, Bernard A, Parsons EP, Lü S, Joubès J, Jenks MA.** 2009. The impact of water deficiency on leaf cuticle lipids of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 151: 1918-1929.

**Kosma DK, Parsons EP, Isaacson T, Lü S, Rose JK, Jenks MA.** 2010. Fruit cuticle lipid composition during development in tomato ripening mutants. *Physiol Plant* 139(1):107-17.

**Kutschera U.** 2008. The growing outer epidermal wall: design and physiological role of a composite structure. *Ann Bot (Lond)* 101: 615–621.

**Kwiatkowska M, Wojtczak A, Popłońska K, Polit JT, Stępiński D, Domínguez E, Heredia A.** 2014. Cutinsomes and lipotubuloids appear to participate in cuticle formation in *Ornithogalum umbellatum* ovary epidermis: EM-immunogold research. *Protoplasma* 251: 1151–1161.

**Laguna L, Casado CC, Heredia A.** 1999. Flavonoid biosynthesis in tomato fruit cuticles after in vivo incorporation of 3H-phenylalanine precursor. *Plant Physiol* 105:491–498.

**Lai A, Santangelo E, Soressi GP, Fantoni R.** 2007. Analysis of the main secondary metabolites produced in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) epicarp tissue during fruit ripening using fluorescence techniques. *Postharvest Biol Technol* 43: 335–342.

**Liedl BE, Labate JA, Stommel JR, Slade A, Kole C.** 2013. Genetics, Genomics, and Breeding of Tomato. CRC Press, Science Pub, Boca Raton, Florida, USA.

**Lin T, Zhu G, Zhang J, Xu X, Yu Q, Zheng Z, Zhang Z, Lun Y, Li S, Wang X, Huang Z, Li J, Zhang C, Wang T, Zhang Y, Wang A, Zhang Y, Lin K, Li C, Xiong G, Xue Y, Mazzucato A, Causse M, Fei Z, Giovannoni JJ, Chetelat RT, Zamir D, Städler T, Li J, Ye Z, Du Y, Huang S.** 2014. Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding. *Nat Genet* 46: 1220–1226.

**Linneo C.** 1753. *Species Plantarum*. Laurentius Salvius, Stockholm, Sweden.

**López-Casado GM, Matas AJ, Domínguez E, Cuartero J, Heredia, A.** 2007. Biomechanics of isolated tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit cuticles: the role of the cutin matrix and polysaccharides. *J Exp Bot* 58: 3875–3883.

**Lozano R, Gimenez E, Cara B, Capel J, Angosto T.** 2009. Genetic analysis of reproductive development of tomato. *Int J Dev Biol* 53: 1635–1648.

**Lunn D, Phan TD, Tucker GA, Lycett GW.** 2013. Cell wall composition of tomato fruit changes during development and inhibition of vesicle trafficking is associated with reduced pectin levels and reduced softening. *Plant Physiol Bioch* 66:91–97.

**Mader H.** 1954. Untersuchungen an Korkmembranen. *Planta* 43:163–181.

**Martin LB, Rose JK.** 2014. There's more than one way to skin a fruit: formation and functions of fruit cuticles. *J Exp Bot* 65: 4639–4651.

**Matas AJ, Cobb ED, Paolillo DJ, Niklas KJ.** 2004. Crack resistance in cherry tomato fruit correlates with cuticular membrane thickness. *HortScience* 39: 1354–1358.

**Monforte AJ, Asins MJ, Carbonell EA.** 1996. Salt tolerance in *Lycopersicon* species. IV. Efficiency of marker-assisted selection for salt tolerance improvement. *Theor Appl Genet* 93(5):765–72.

**Monforte AJ, Asins MJ, Carbonell EA.** 1997. Salt tolerance in *Lycopersicon* species. V. Does genetic variability at quantitative trait loci affect their analysis? *Theor Appl Genet* 95: 284–293.

**Monforte AJ, Asins MJ, Carbonell EA.** 1999. Salt tolerance in *Lycopersicon* spp. VII. Pleiotropic action of genes controlling earliness on fruit yield. *Theor Appl Genet* 98: 593–601.

**Muller CH.** 1940. A revision of genus *Lycopersicon*. *USDA Misc Publ*, 382.

**Nadakuduti SS, Pollard M, Kosma Dk, Allen C Jr, Ohlregge JB, Barry CS.** 2012. Pleiotropic phenotypes of the *sticky peel* mutant provide new insight into the role of *CUTIN DEFICIENT2* in epidermal cell function in tomato. *Plant Physiol* 159: 945-960.

**Nesbitt TC, Tanksley SD.** 2002. Comparative sequencing in the genus *Lycopersicon*: implications for the evolution of fruit size in the domestication of cultivated tomatoes. *Genetics* 162: 365-379.

**Orgell WH.** 1955. The isolation of plant cuticle with pectin enzymes. *Plant Physiol* 30: 78-80.

**Paran I, van der Knaap E.** 2007. Genetic and molecular regulation of fruit and plant domestication traits in tomato and pepper. *J Exp Bot* 58: 3841-3852.

**Peralta IE, Spooner DM.** 2007. History, origin and early cultivation of tomato (*Solanaceae*). In: Razdan M, Mattoo A, eds, Genetic Improvement of Solanaceous Crops, Vol 2: Tomato. Science Publishers, Enfield, USA, pp: 1-27.

**Peralta IE, Spooner DM.** 2005. Morphological characterization and relationships of wild tomatoes (*Solanum* L. Section *Lycopersicon*). *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden* 104: 227-257.

**Peralta IE, Spooner DM.** 2006. History, origin and early cultivation of tomato (*Solanaceae*). In: Razdan, MK, Mattoo, AK, eds, Genetic Improvement of Solanaceous Crops. Volume 2: Tomato. Science Publishers, Enfield, USA, pp: 1-24.

**Peralta IE., Spooner DM.** 2000. Classification of wild tomatoes: a review. *Kurtziana* 28: 45-54.

**Peralta IE, Knapp S, Spooner DM.** 2005. New Species of Wild Tomatoes (*Solanum* Section *Lycopersicon*: *Solanaceae*) from Northern Peru. *Syst Botany* 30: 424-434.

**Peralta IE, Spooner DM, Knapp S.** 2008. Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (*Solanum* sect. *Lycopersicoides*, sect *Juglandifolia*, sect. *Lycopersicon*; *Solanaceae*). *Syst Bot Monogr* 84: 1-186.

**Peterson DG, Pearson WR, Stack SM.** 1998. Characterization of the tomato (*Lycopersicon esculentum*) genome using in vitro and in situ DNA reassociation. *Genome* 41: 346-356.

**Petracek PD, Bukovac MJ.** 1995. Rheological properties of enzymatically isolated tomato fruit cuticle. *Plant Physiol* 109: 675-679.

**Pfündel EE, Agati G, Cerovic ZG.** 2006. Optical properties of plant surfaces. In: Riederer M, Müller C, eds, Biology of the plant cuticle. Blackwell Publishing, Oxford, UK, pp: 216-249.

**Reicosky DA, Hanover JW.** 1978. Physiological effects of surface waxes I. Light reflectance for glaucous and nonglucous *Picea pungens*. *Plant Physiol* 62:101-104.

- Rey AD.** 2010. Liquid crystal models of biological materials and processes. *Soft Matter* 6: 3402–3429.
- Rick CM, Fobes F.** 1975. Allozyme variation in the cultivated tomato and closely related species. *J Torrey Bot Soc* 102: 376-384.
- Rick CM.** 1974. The tomato. In: King RC, ed, Handbook of genetics: Plenum-Press, New York, USA, pp. 247-280.
- Robberecht R, Caldwell MM, Billings WD.** 1980. Leaf ultraviolet optical properties along a latitudinal gradient in the arctic-alpine life zone. *Ecology* 61: 612-619.
- Rodríguez F, Wu F, Ané C, Tanksley S, Spooner DM.** 2009. Do potatoes and tomatoes have a single evolutionary history, and what proportion of the genome supports this history? *BMC Evol Biol* 9: 191.
- Rodríguez GR, Muños S, Anderson C, Sim SC, Michel A, Causse M, Gardener BB, Francis D, van der Knaap, E.** 2011. Distribution of *SUN*, *OVATE*, *LC*, and *FAS* in the tomato germplasm and the relationship to fruit shape diversity. *Plant Physiol* 156: 275–285.
- Satková P, Starý T, Plešková V, Zapletalová M, Kašparovský T, Činčalová-Kubienová L, Luhová L, Mieslerová B, Mikulík J, Lochman J, Petřivalský M.** 2016. Diverse responses of wild and cultivated tomato to BABA, oligandrin and *Oidium neolycopersici* infection. *Ann Bot* 1-12.
- Seymour GB, Østergaard L, Chapman NH, Knapp S, Martin C.** 2013. Fruit development and ripening. *Annu Rev Plant Biol.* 64:219-41.
- Shepherd T, Griffiths DW.** 2006. The effects of stress on plant cuticular waxes. *New Phytol* 171: 469–499.
- SPSS.** 2014. IBM SPSS Statistics for Windows, version 23.0. IBM Corp, Armonk, NY.
- Tegelaar EW.** 1990. Resistant Biomacromolecules in Morphologically Characterised Constituents of Kerogen: A Key to the Relationship between Biomass and Fossil Fuels, Ph.D., University of Utrecht, The Netherlands.
- Vandoorn WG, Stead AD.** 1997. Abscission of flowers and floral parts. *J Exp Bot* 48: 821–837.
- Vogg G, Fischer S, Leide J, Emmanuel E, Jetter R, Levy AA, Riederer M.** 2004. Tomato fruit cuticular waxes and their effects on transpiration barrier properties: functional characterization of a mutant deficient in a very-long-chain fatty acid  $\beta$ -ketoacyl-CoA synthase. *J Exp Bot* 55: 1401–1410.
- Warnock SJ.** 1988. A review of taxonomy and phylogeny of the genus *Lycopersicon*. *HortScience* 23: 669-673.



**Xu H, Gauthier L, Gosselin A.** 1995. Stomatal and cuticular transpiration of greenhouse tomato plants in response to high solution electrical conductivity and low soil water content. *J Am Soc Hortic Sci* 120: 417–422.

**Yamada Y, Wittwer S, Bukovac M.** 1964. Penetration of ions through isolated cuticles. *Plant Physiol* 39: 28-32.

**Yeats TH, Buda GJ, Wang Z, Chehanovsky N, Moyle LC, Jetter R, Schaffer AA, Rose JK.** 2012a. The fruit cuticles of wild tomato species exhibit architectural and chemical diversity, providing a new model for studying the evolution of cuticle function. *Plant J* 69(4):655-66.

**Yeats TH, Martin L, Viart H, Isaacson T, He Y, Zhao L, Matas AJ, Buda G, Domozych DS, Clausen MH, Rose JKC.** 2012b. The identification of cutin synthase: formation of the plant polyester cutin. *Nature Chem Biol* 8: 609-611.

**Young PA.** 1947. Cuticle cracks in tomato fruits. *Phytopathology* 37(2): 143-145.



# CONCLUSIONES





Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten establecer las siguientes conclusiones:

1. La formación de la cutícula del fruto de tomate es un proceso dinámico en íntima conexión temporal con el de la formación de la pared celular más externa de las células epidérmicas. Mientras que durante la división celular la epidermis presenta una mínima cutinización, en la transición al periodo de expansión celular, que ocurre entre los 9-10 dda, se produce un notable incremento de su grosor debido a una súbita y elevada acumulación de material lipídico.
2. Desde la antesis hasta los 9 dda la cutícula del fruto de Cascada aparece como una submicrométrica capa electrodensa de morfología globular en su cara interna. Esta fina capa podría considerarse como la procutícula, un estadio de desarrollo temprano de la cutícula. A partir del comienzo de la fase de expansión celular, la cutícula sufre pocos cambios en su ultraestructura, manteniéndose principalmente amorfa.
3. Se ha constatado y documentado por vez primera la presencia a lo largo de la pared celular epidérmica, durante el proceso de división celular, de singulares dominios polimórficos citoplasmáticos procedentes probablemente de procesos o ciclos de contracción de la membrana plasmática. Dichos dominios contienen estructuras globulares electrodensas en su interior y se postula que podrían actuar como vesículas o gotas lipídicas que formarían parte del proceso de formación de la procutícula.
4. La proteína cutina sintasa, CUS1, se expresa en el pericarpo del fruto de Cascada hasta los 30 dda y presenta una clara localización extracelular sobre la cutina en formación en la pared celular externa de las células epidérmicas, existiendo un pico de su expresión y presencia entre los 10 y los 20 dda. Igualmente, los cuatro genes CUS adicionales identificados en tomate se expresan en el pericarpo del fruto aunque en mucha menor medida, siendo el patrón de expresión de CUS2, CUS4 y CUS5 similar al de CUS1.
5. Los *cutinsomas* se localizan en las células epidérmicas y en la pared celular más externa del fruto de Cascada exclusivamente durante el periodo de división celular.

Estas nanopartículas ya están presentes en el ovario justo en el límite entre la zona cutinizada y la no cutinizada de la pared celular más externa. En cambio, no se ubican en el interior de la cutina bien desarrollada, sugiriendo una participación activa en la formación de la procutícula del mismo. Se postula por tanto, una acción temporal coordinada entre este mecanismo de formación de la cutina y el de la proteína cutin sintasa.

6. Una primera y exhaustiva aproximación al estudio de la cutícula de las distintas especies de la sección *Lycopersicon* ha mostrado la existencia de una variabilidad importante para caracteres tales como el grosor, grado de invaginación y composición de la cutícula. La implicación de varios de estos caracteres en las propiedades biomecánicas e hídricas, de gran interés agronómico, sugieren su potencial aprovechamiento en programas de mejora. Las diferencias en la cantidad de cutícula observadas entre especies no estuvieron asociadas a una mayor o menor presencia de la proteína CUS1.
7. Se ha determinado una mayor cantidad de flavonoides presentes en las cutículas aisladas de las especies del complejo de fruto rojo frente a las especies de fruto verde. Esta variación estuvo asociada con un cambio en las propiedades ópticas de las cutículas de frutos maduros. En las especies del complejo de fruto rojo se observó durante la maduración un aumento de la autofluorescencia emitida por la cutícula tras excitación con luz azul y paralelamente una disminución de la autofluorescencia tras excitación con luz UV. Este cambio en el perfil de fluorescencia estuvo asociado a la acumulación de flavonoides.

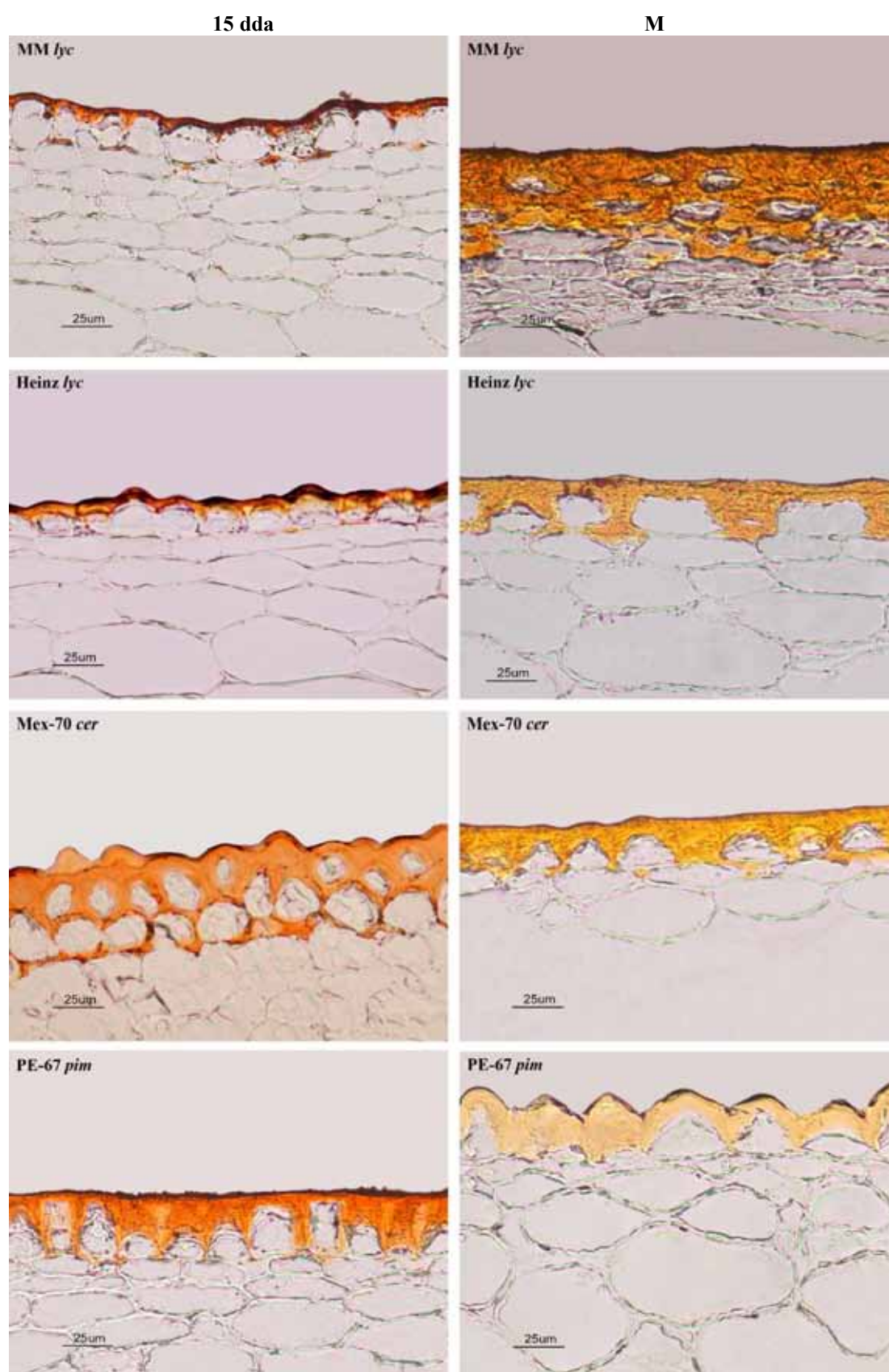
# ANEXOS





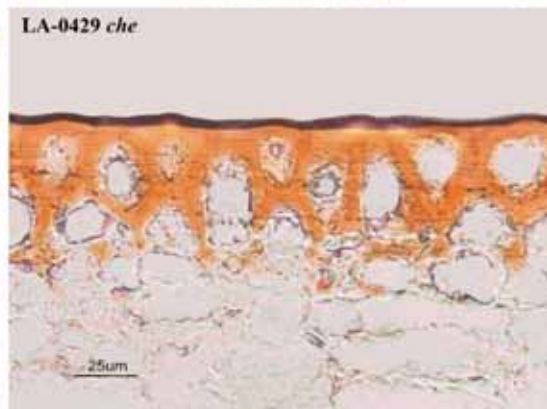
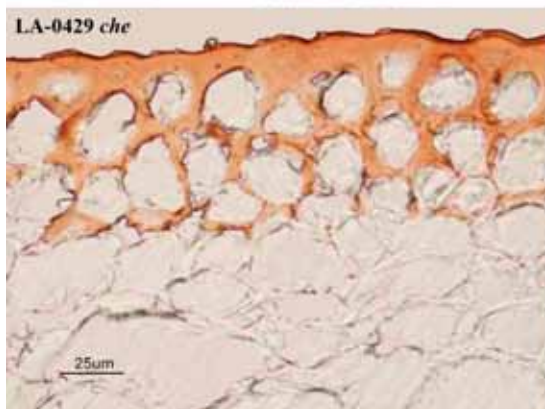
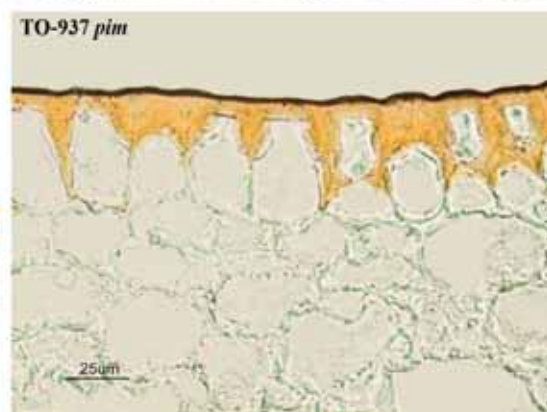
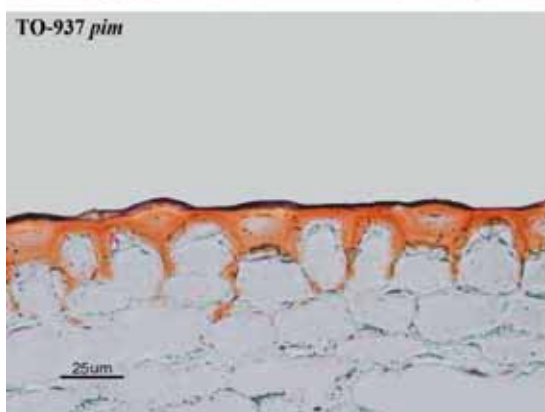
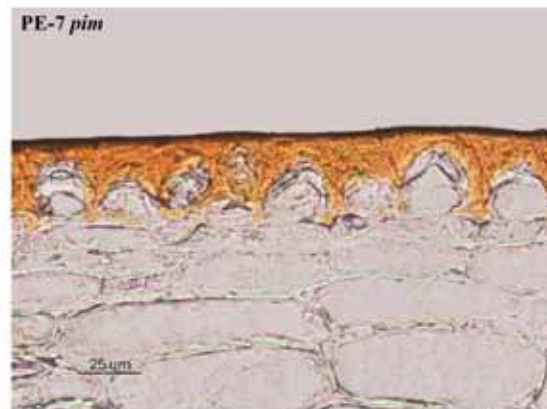
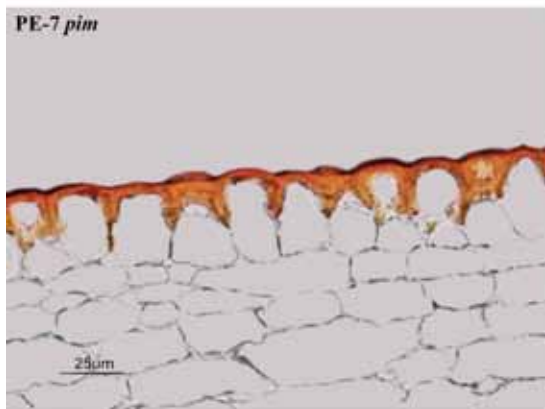
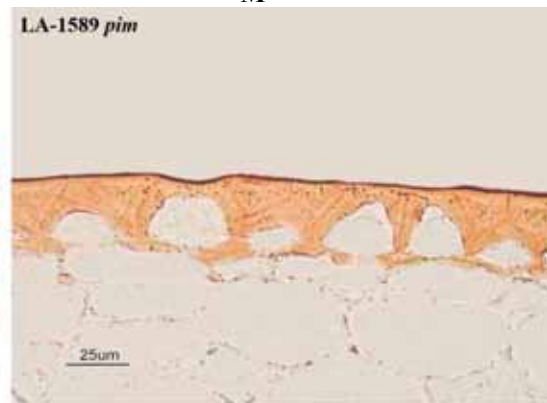
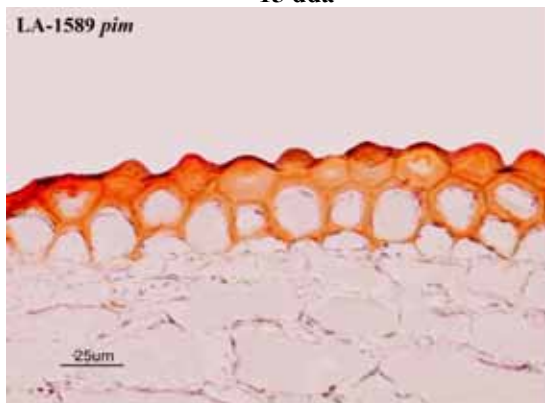


**Anexo I.** Fotomicrografías de cortes transversales de pericarpio de tomate en estadios verde inmaduro (15 dda) y maduro (M) teñidos con Sudán IV para visualizar la cutícula.



15 dda

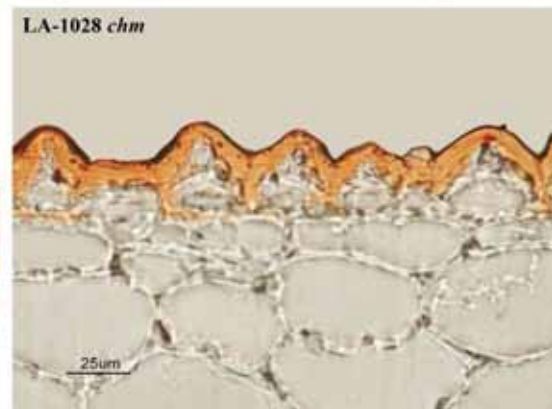
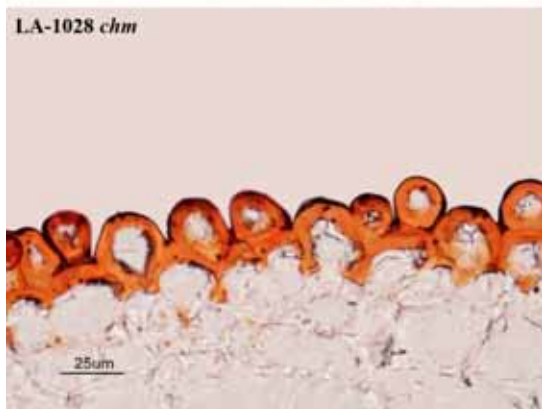
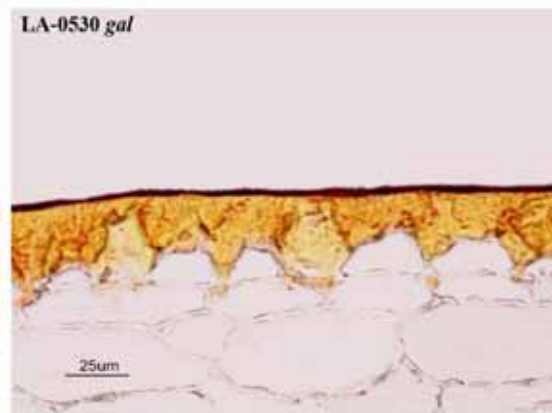
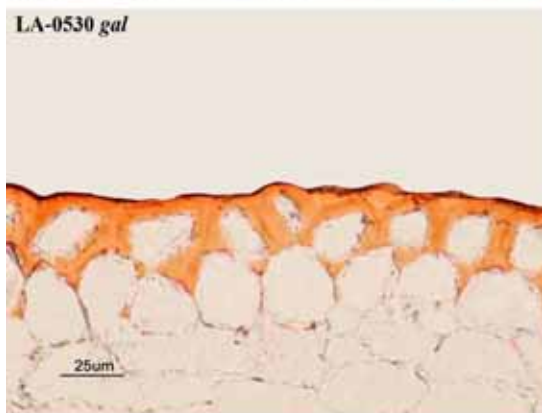
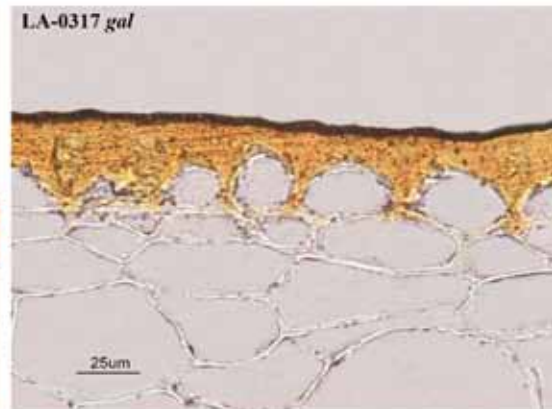
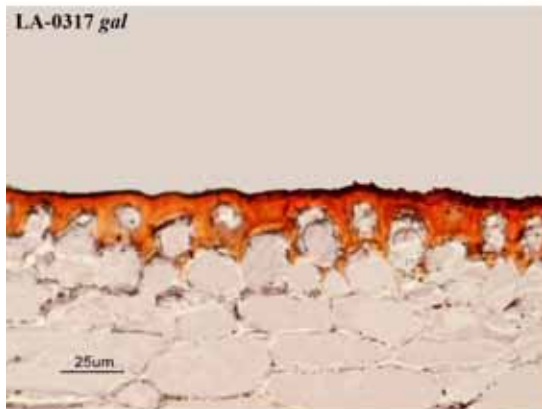
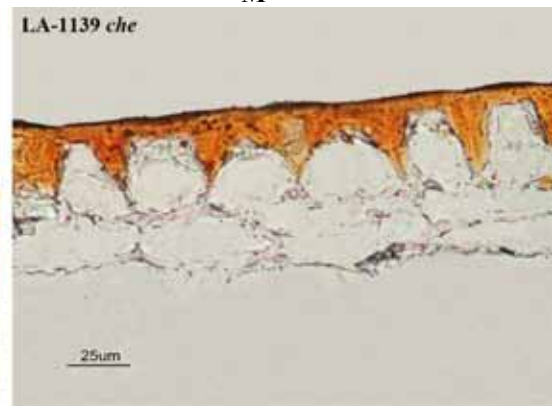
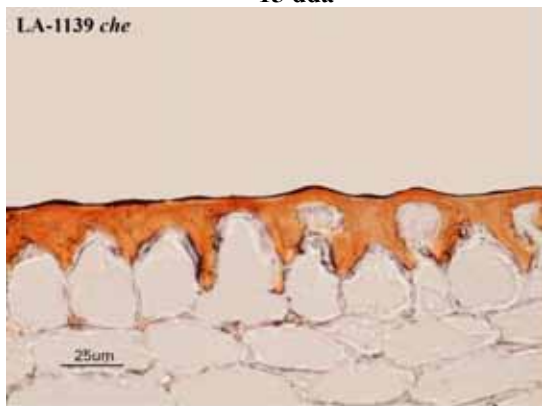
M





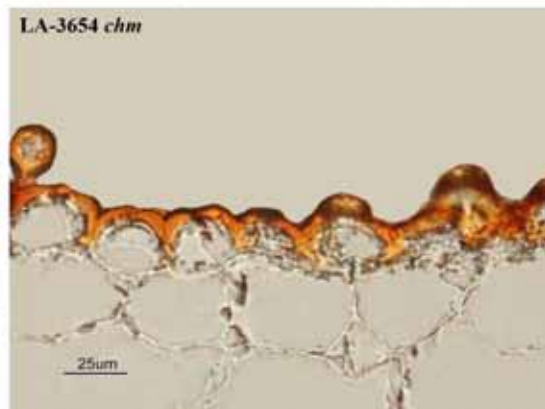
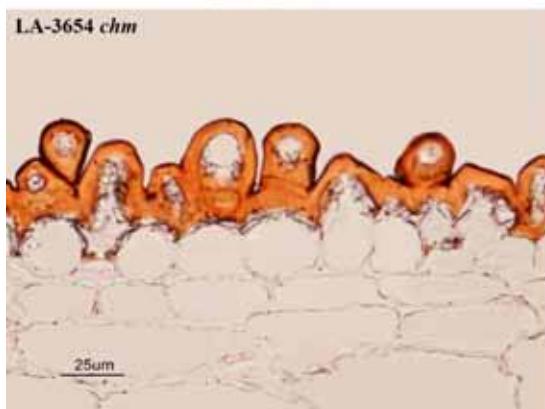
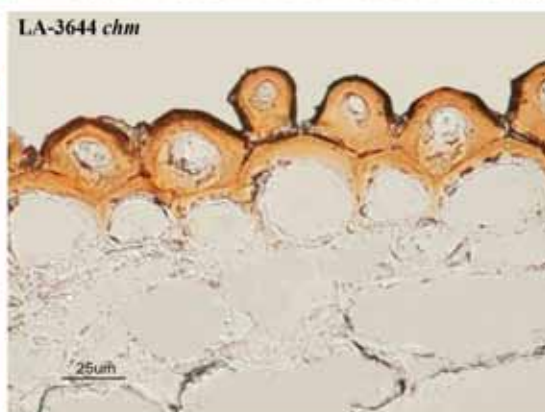
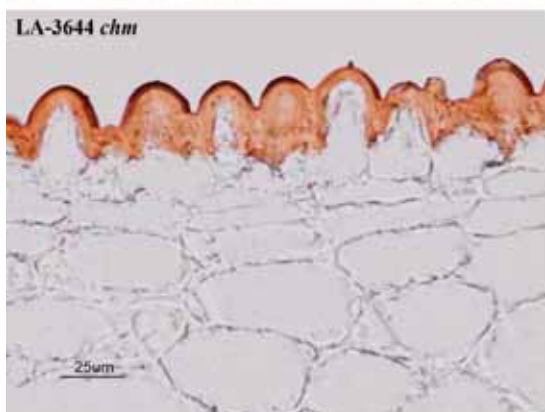
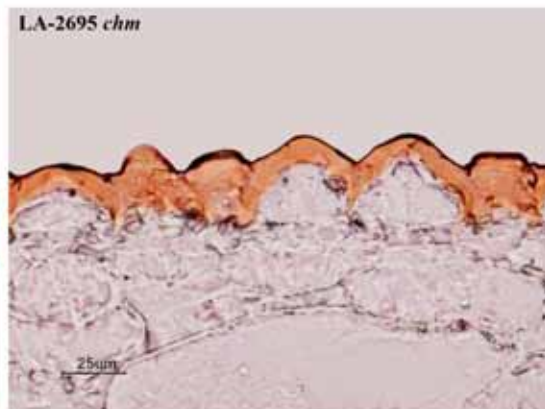
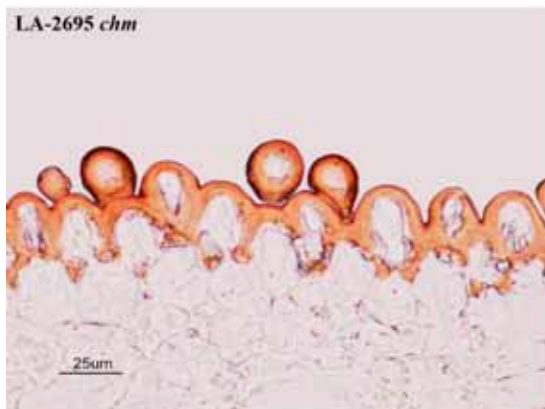
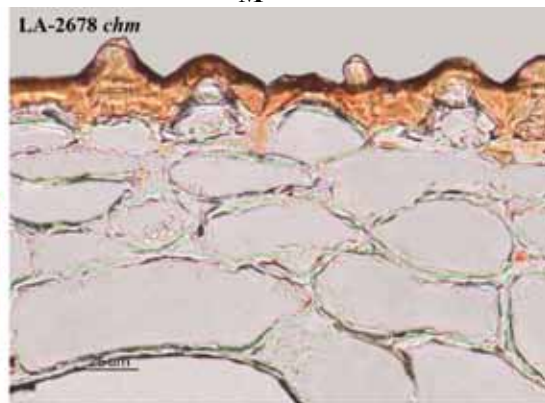
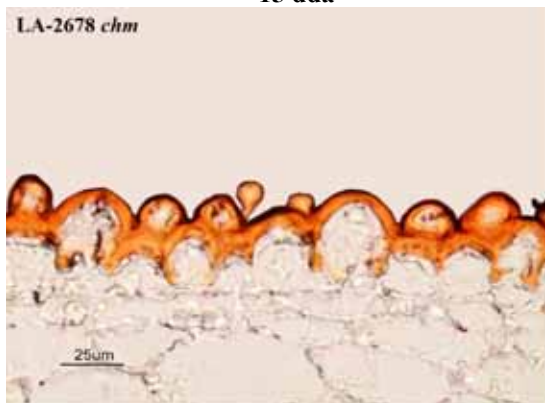
15 dda

M



15 dda

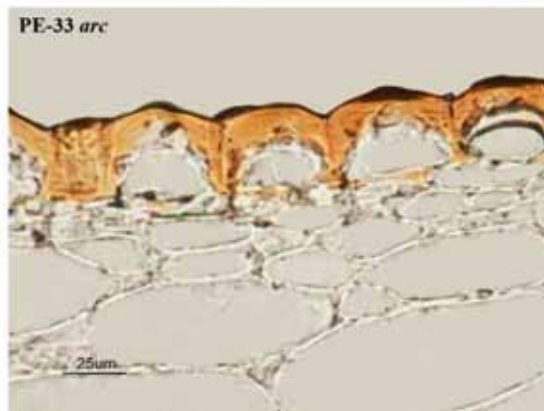
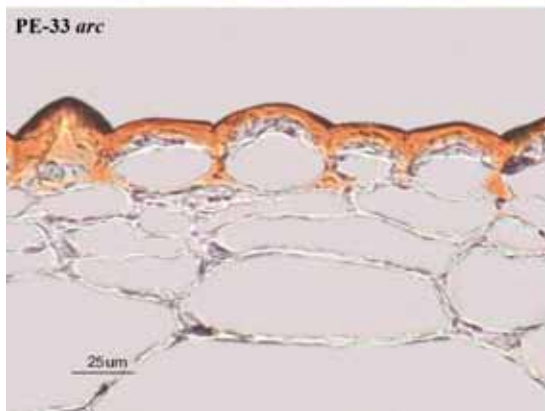
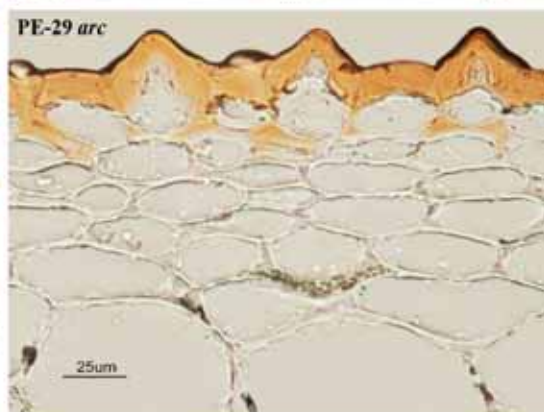
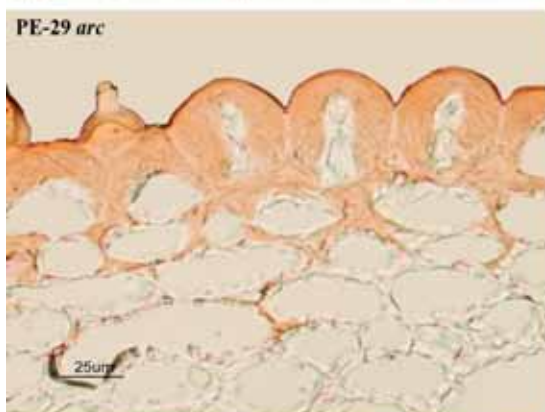
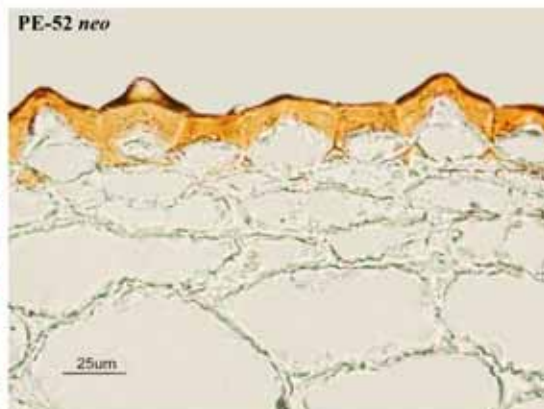
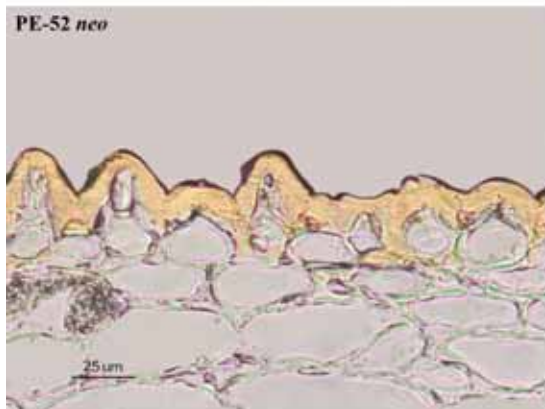
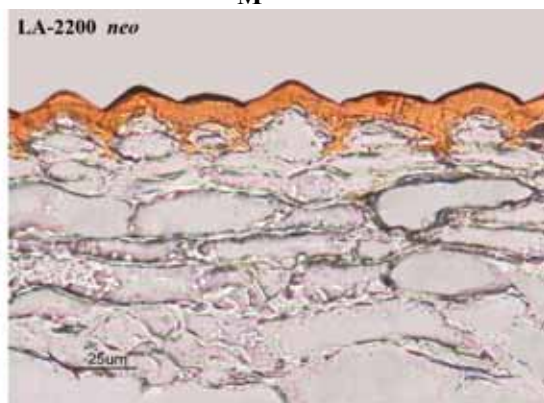
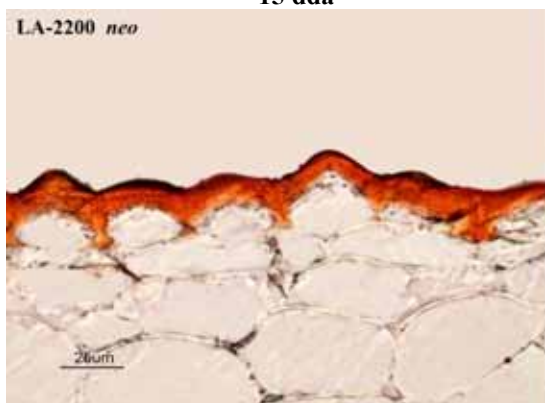
M





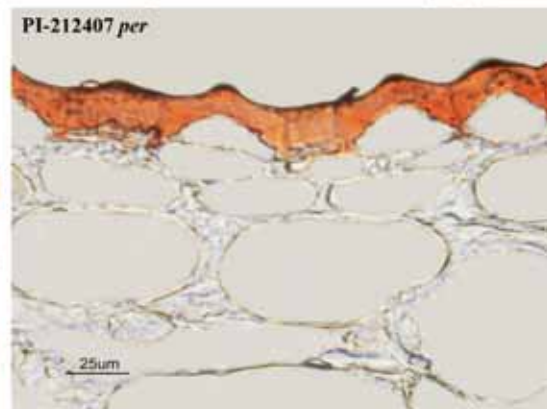
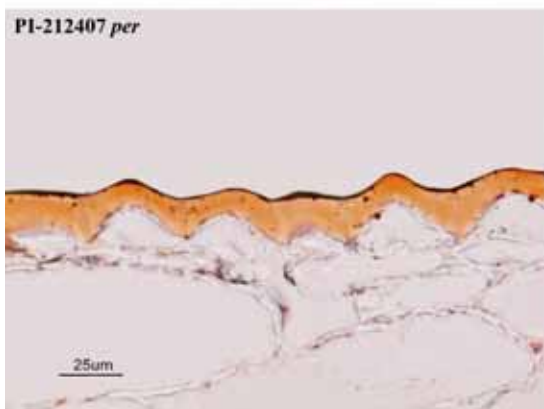
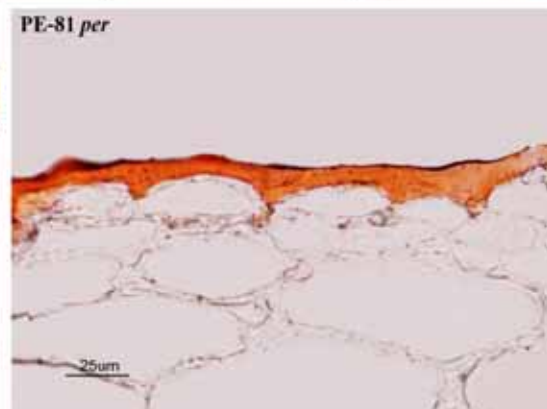
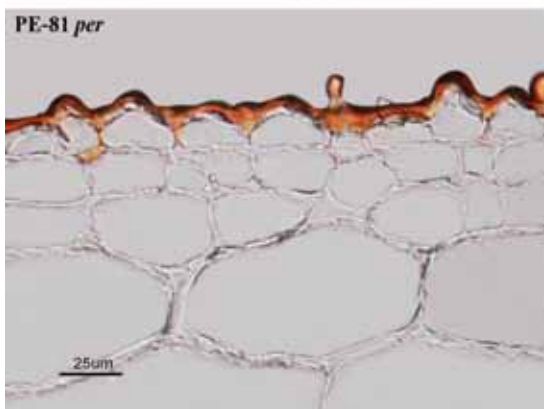
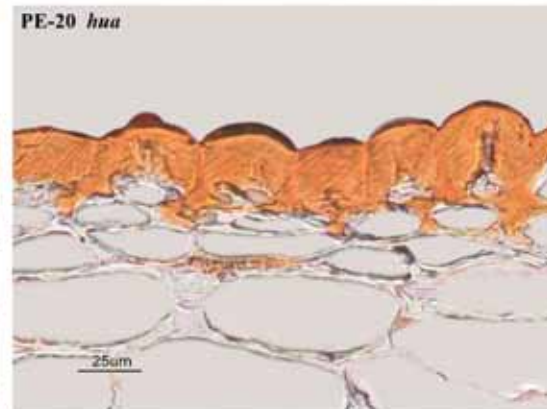
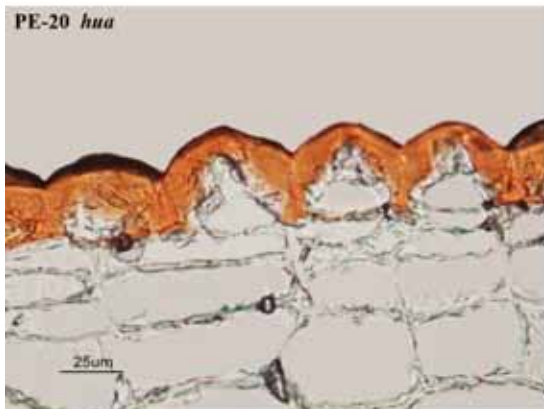
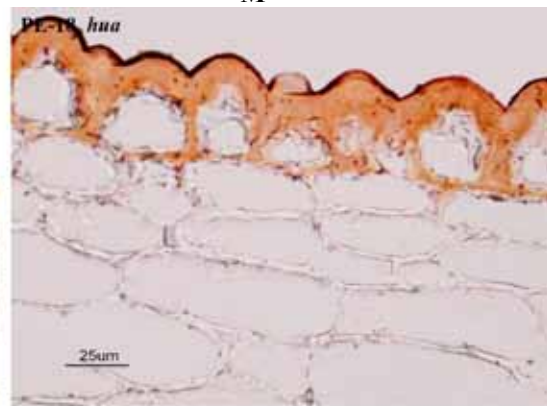
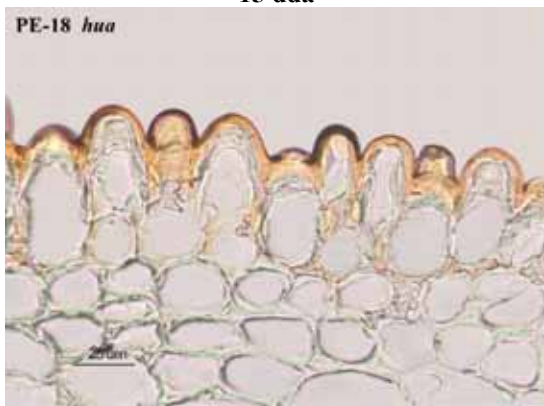
15 dda

M



15 dda

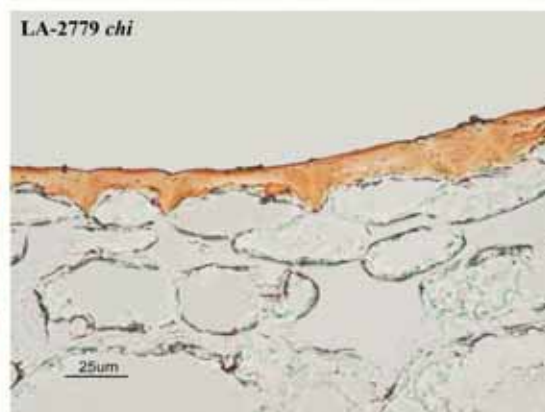
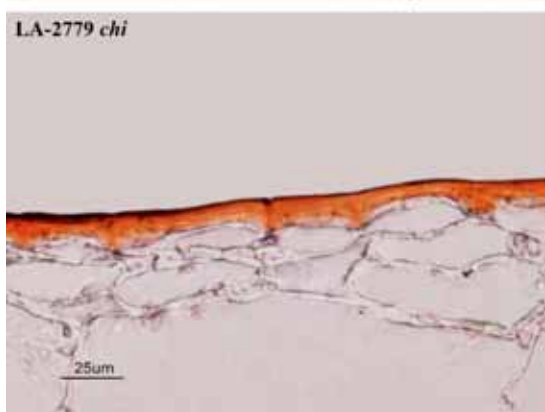
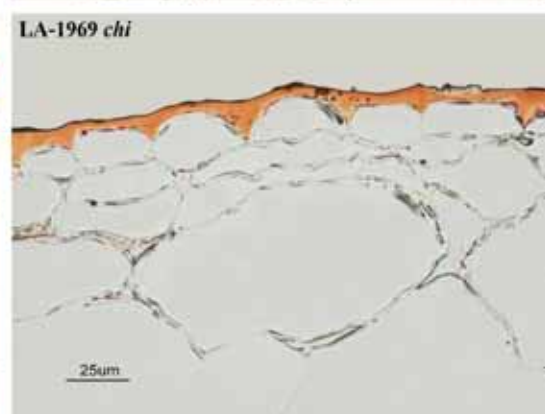
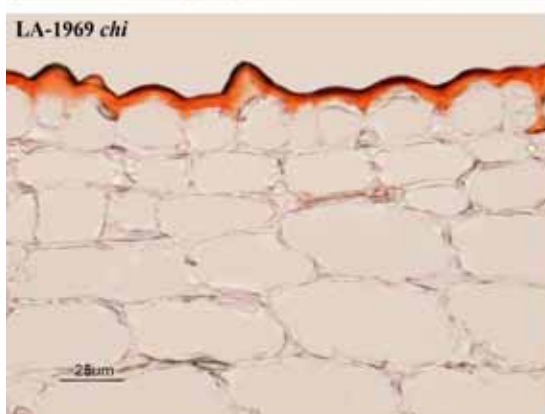
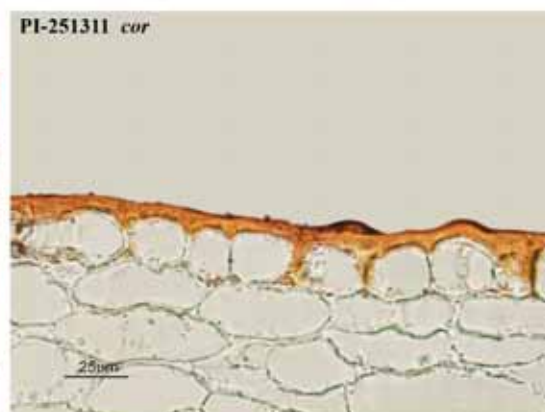
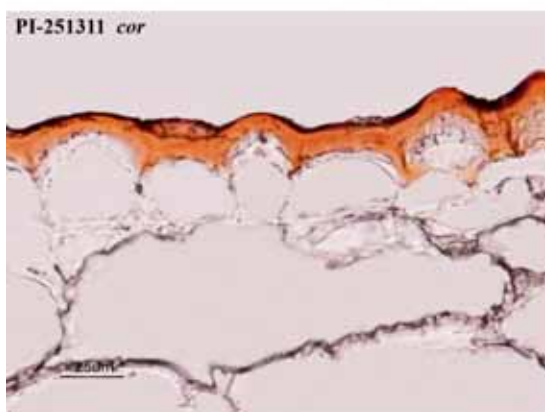
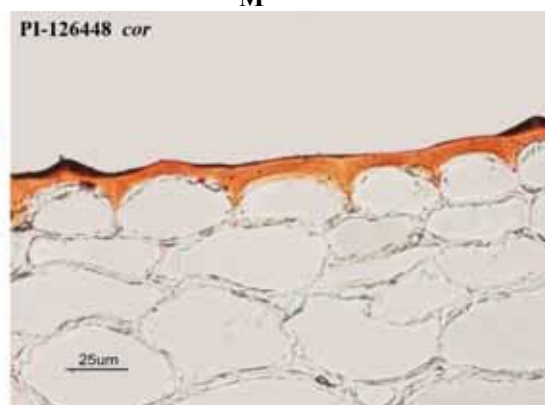
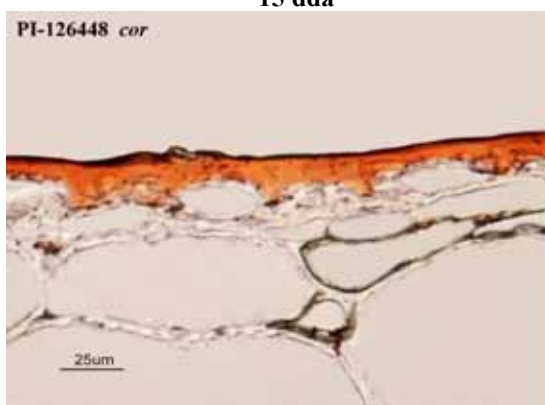
M





15 dda

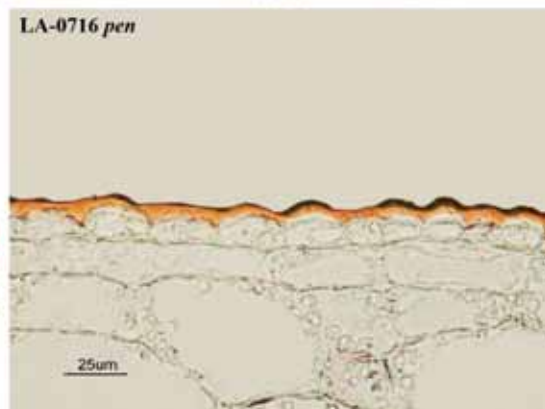
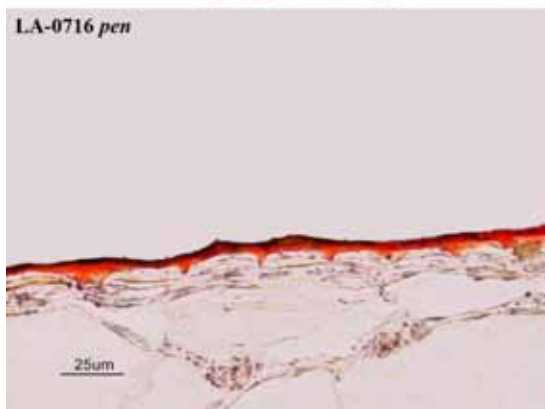
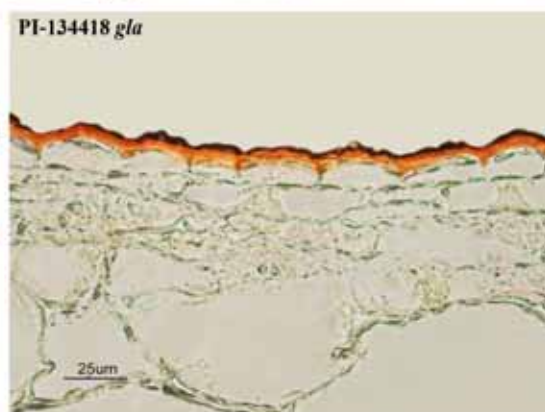
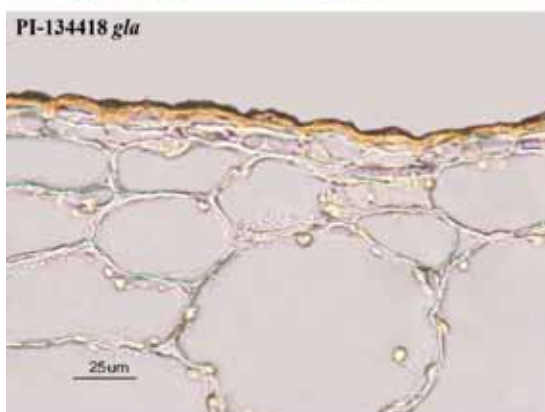
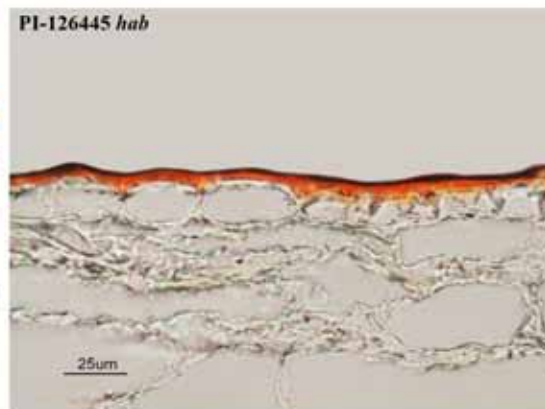
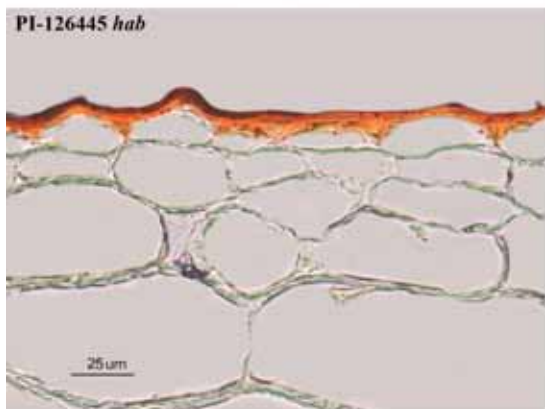
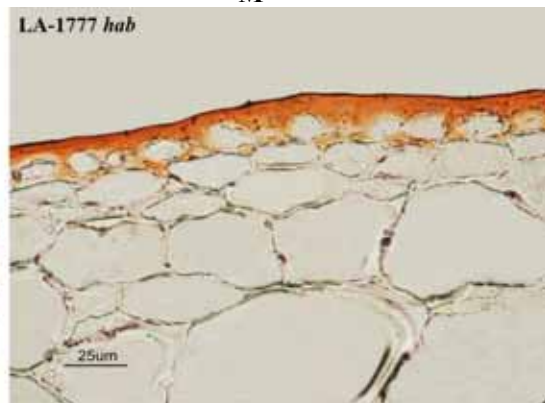
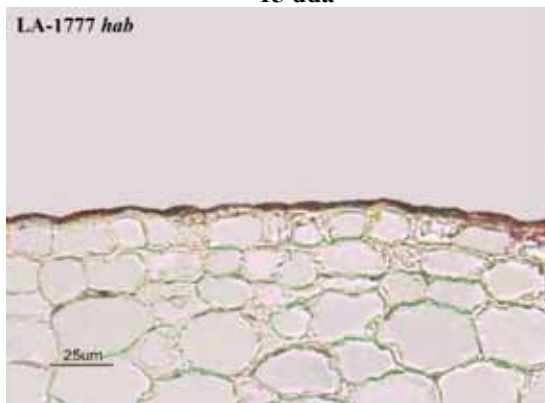
M





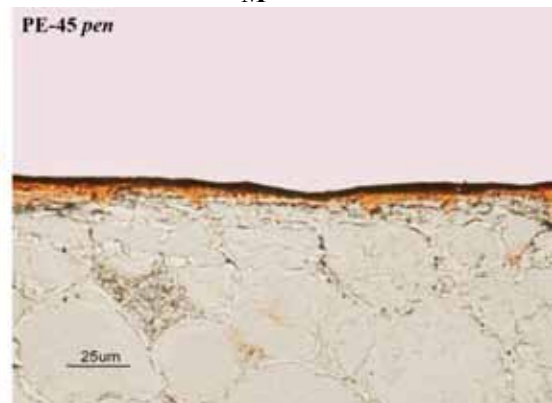
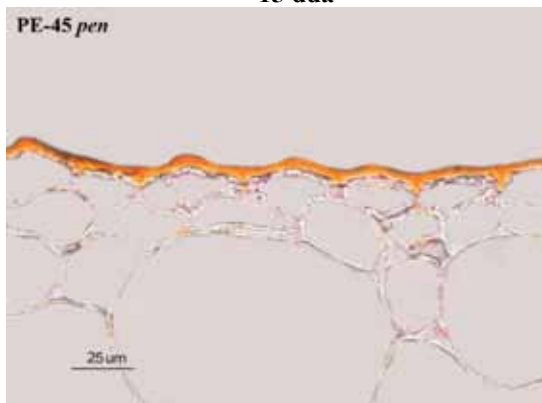
15 dda

M



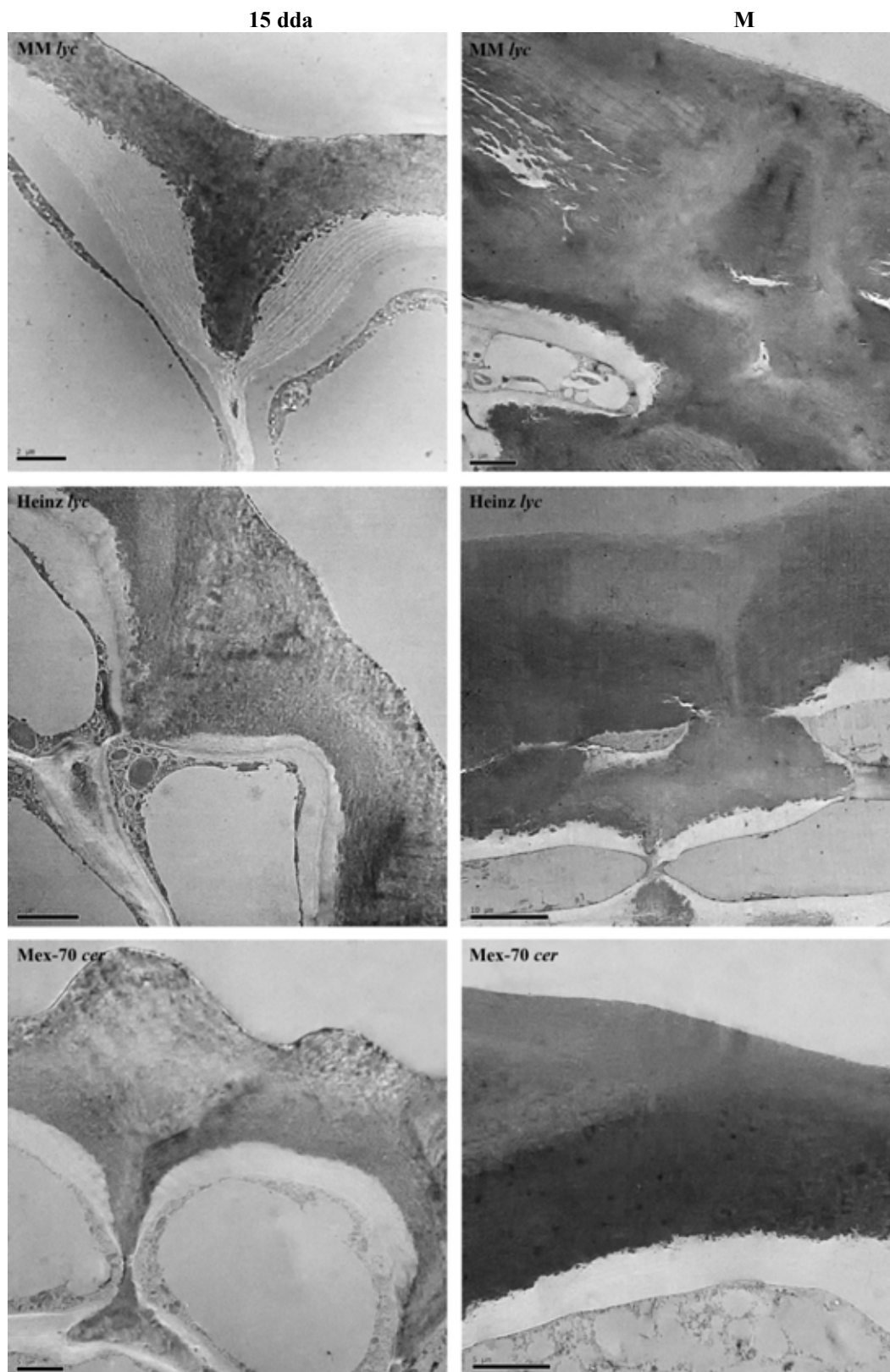
15 dda

M





**Anexo II.** Imágenes de MET correspondientes a cortes transversales de pericarpo de tomate en los estadios 15 dda y maduro.



MM *lyc*: 15dda, barra 2  $\mu\text{m}$ ; maduro, barra 5  $\mu\text{m}$ .

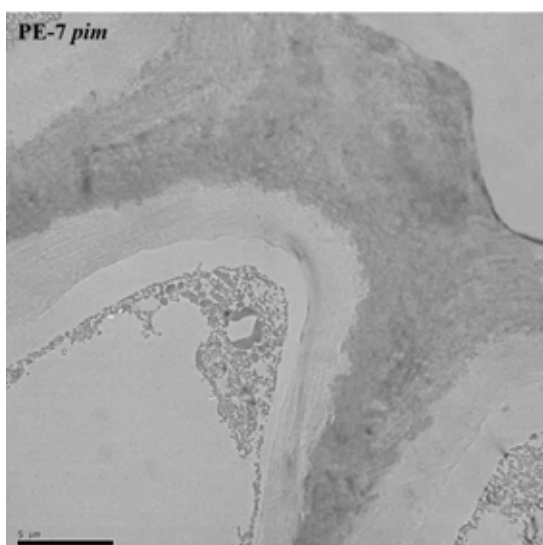
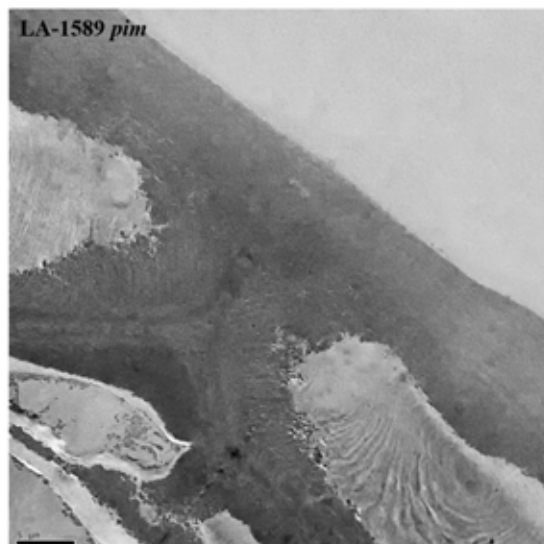
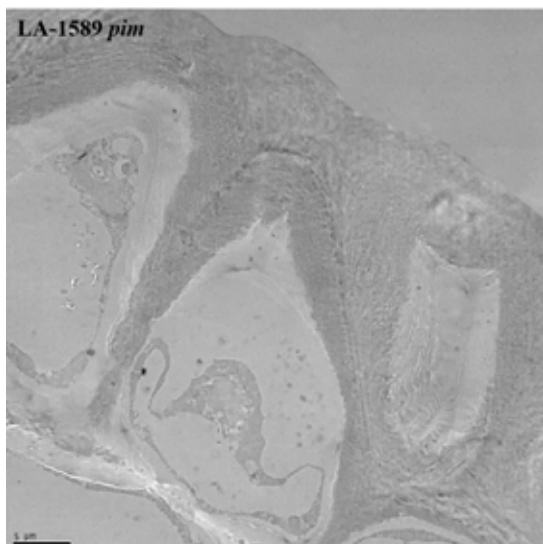
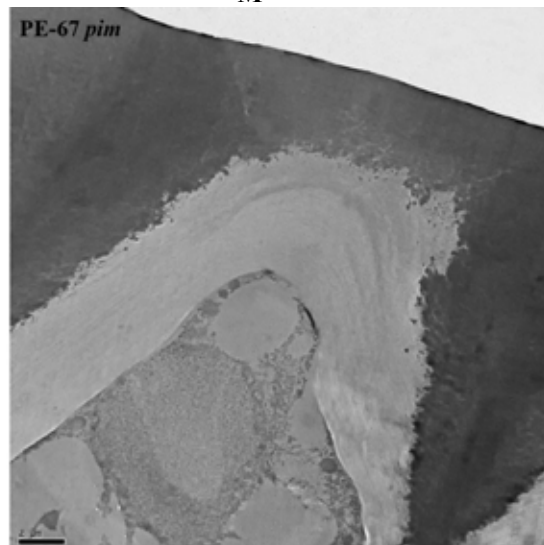
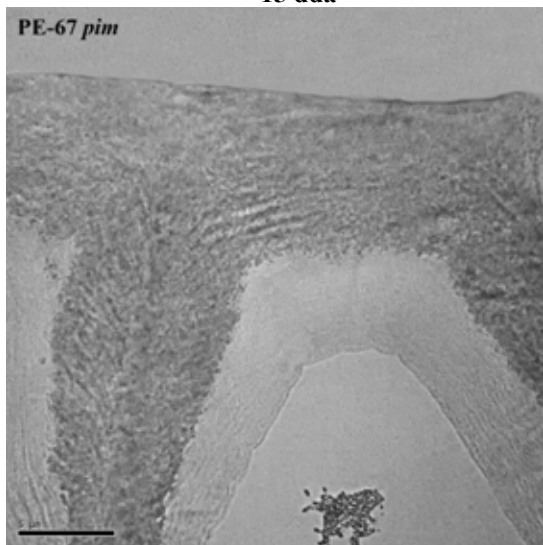
Heinz *lyc*: 15dda, barra 5  $\mu\text{m}$ ; maduro, barra 10  $\mu\text{m}$ .

Mex-70 *cer*: 15dda y maduro, barras 5  $\mu\text{m}$ .



15 dda

M



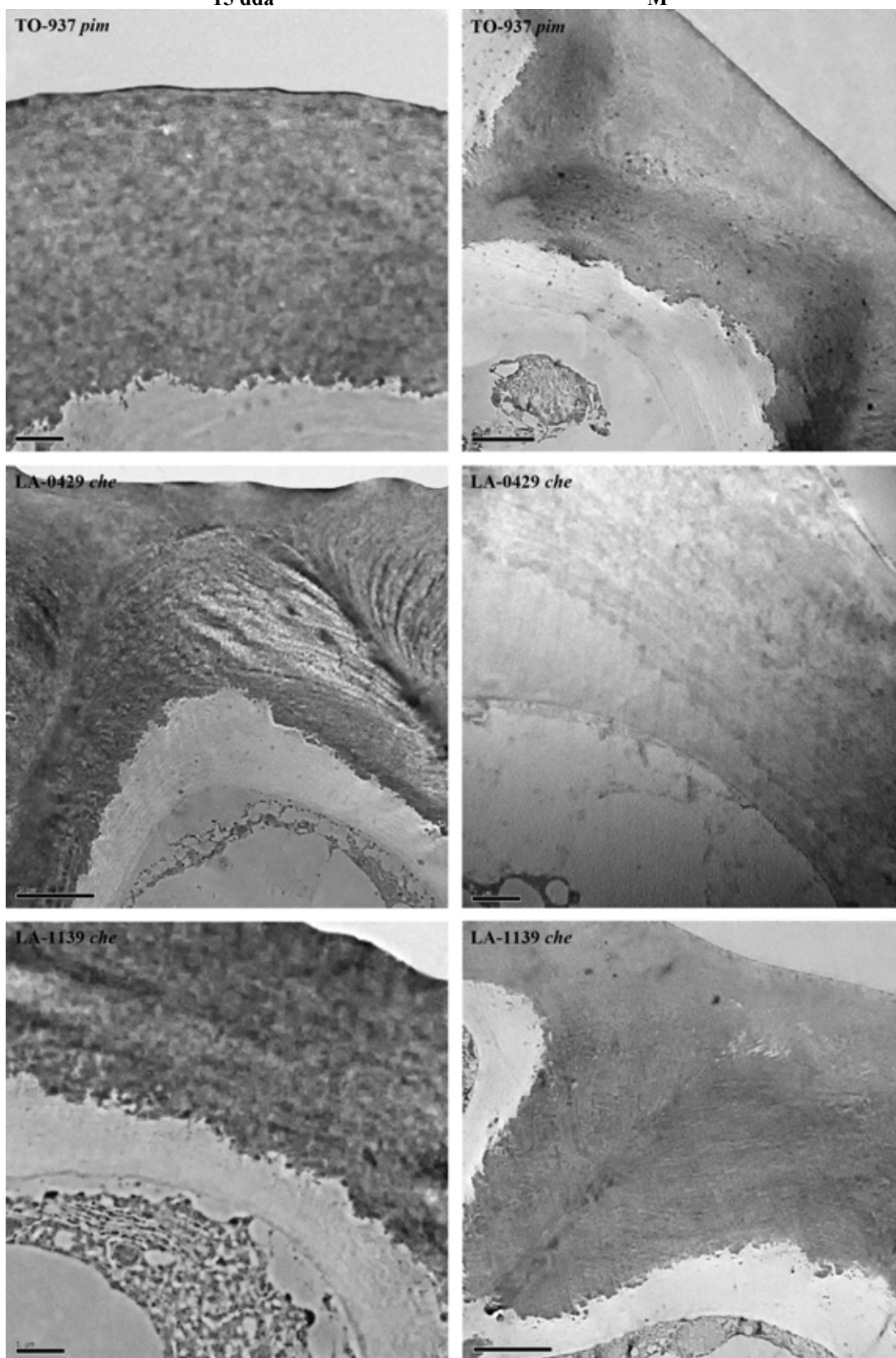
PE-67 *pim*: 15dda, barra 5  $\mu\text{m}$ ; maduro, barra 2  $\mu\text{m}$ .

LA-1589 *pim*: 15dda y maduro, barras 5  $\mu\text{m}$ .

PE-7 *pim*: 15dda y maduro, barras 5  $\mu\text{m}$ .

15 dda

M

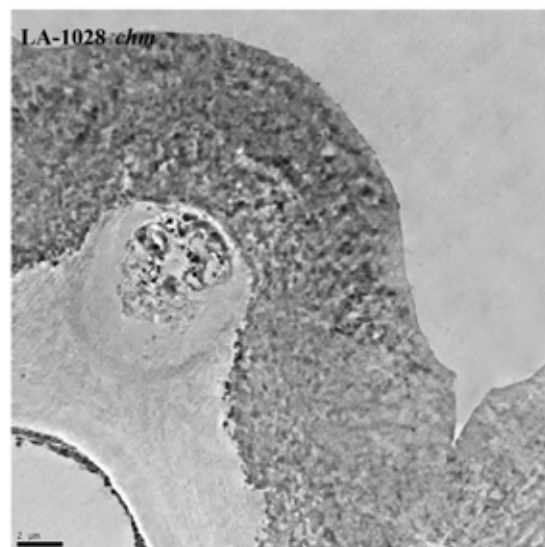
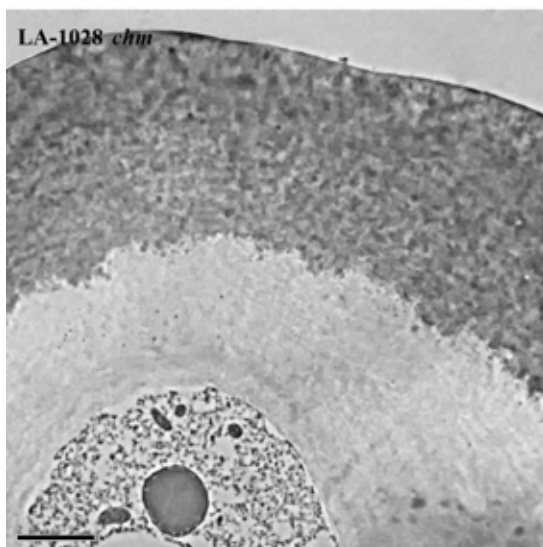
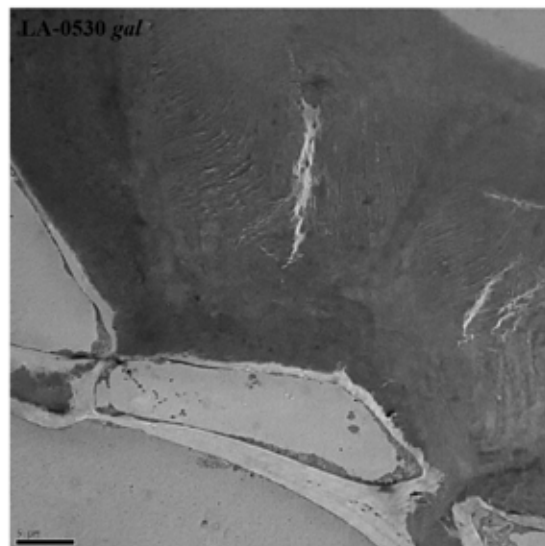
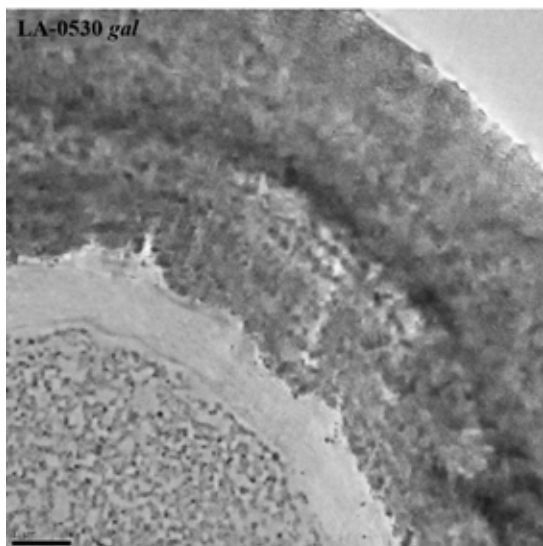
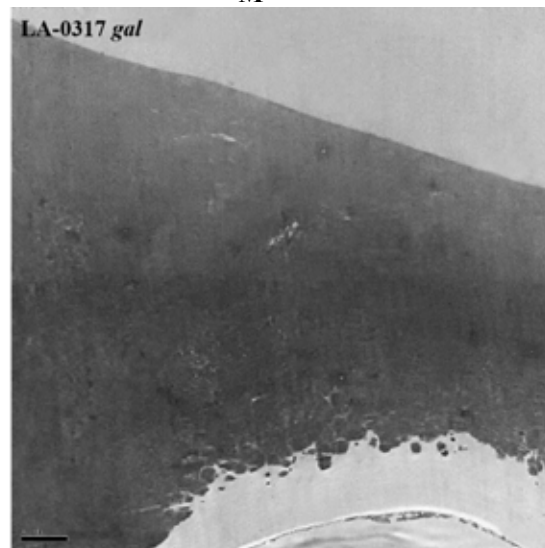
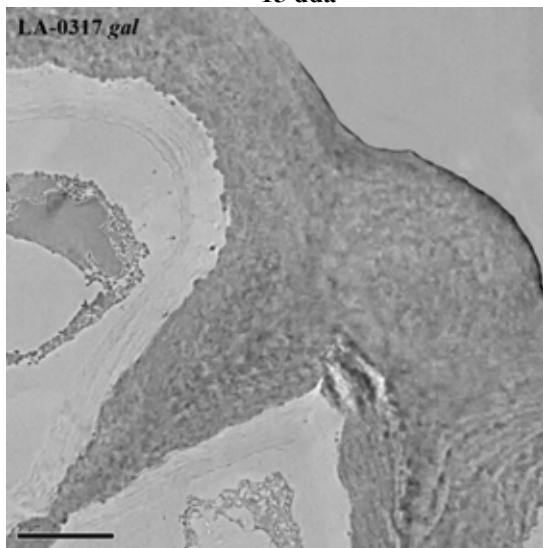


TO-937 *pim*: 15dda, barra 1  $\mu\text{m}$ ; maduro, barra 5  $\mu\text{m}$ .  
 LA-0429 *che*: 15dda, barra 5  $\mu\text{m}$ ; maduro, barra 1  $\mu\text{m}$ .  
 LA-1139 *che*: 15dda, barra 1  $\mu\text{m}$ ; maduro, barra 5  $\mu\text{m}$ .



15 dda

M

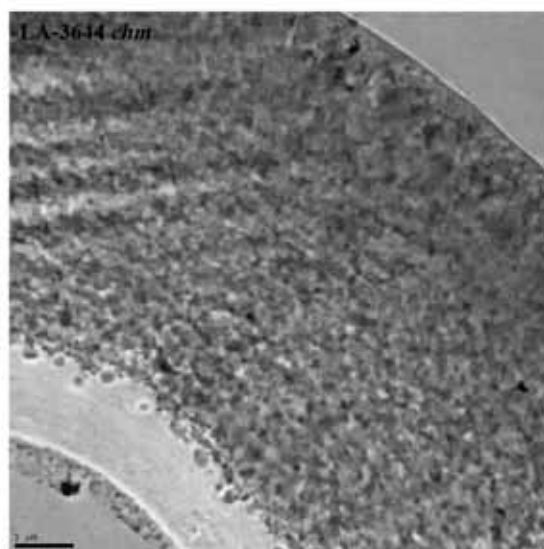
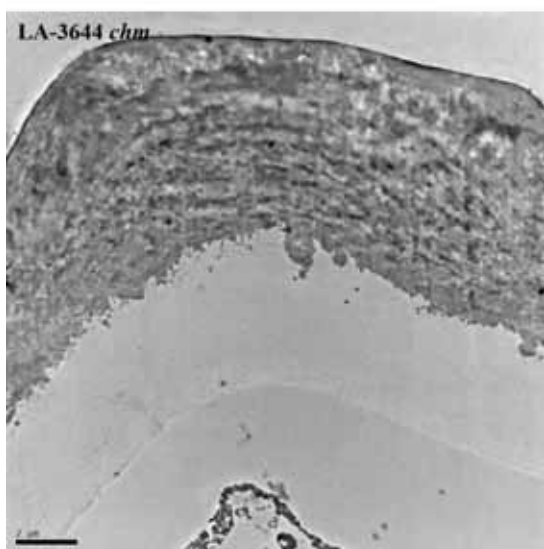
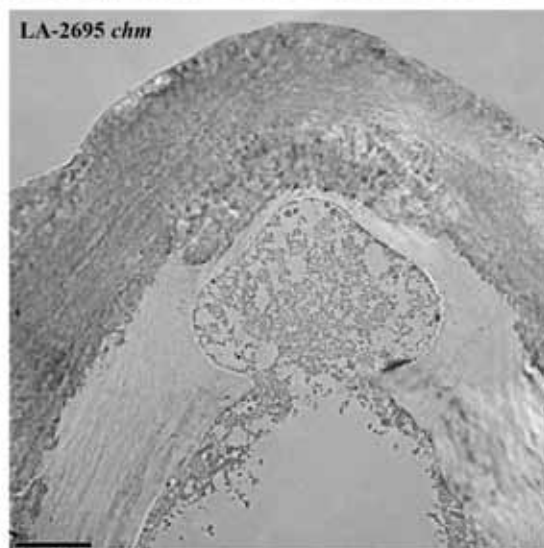
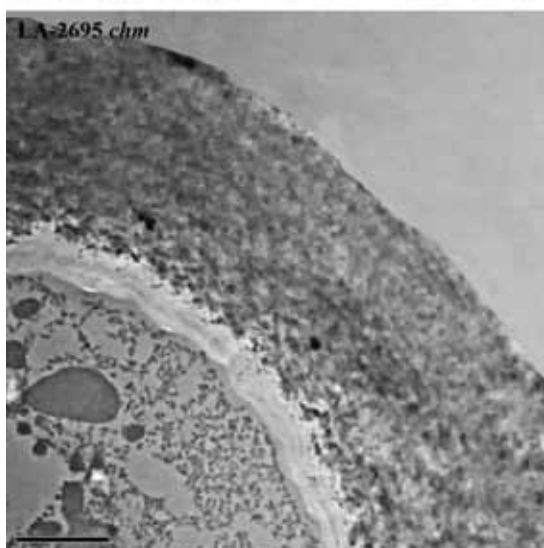
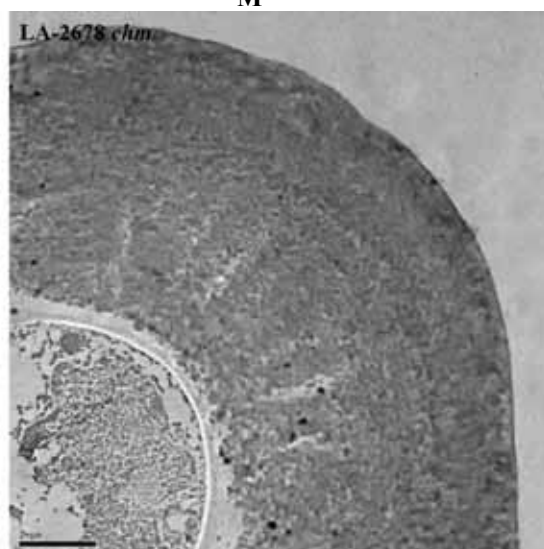
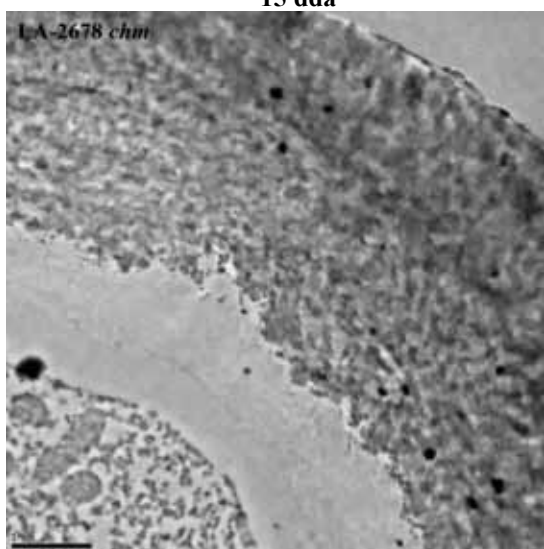


LA-0317 *gal*: 15dda, barra 5  $\mu\text{m}$ ; maduro, barra 2  $\mu\text{m}$ .  
LA-0530 *gal*: 15dda, barra 1  $\mu\text{m}$ ; maduro, barra 5  $\mu\text{m}$ .  
LA-1028 *chm*: 15dda y maduro, barras 2  $\mu\text{m}$ .



15 dda

M



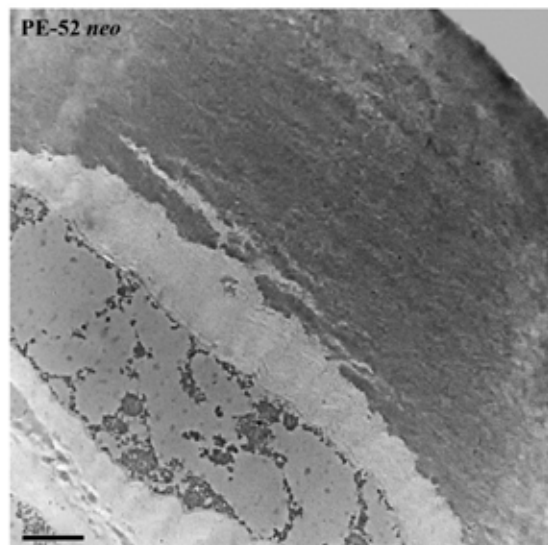
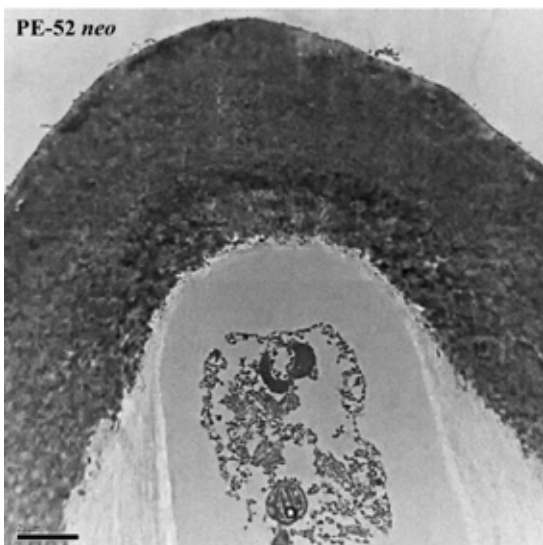
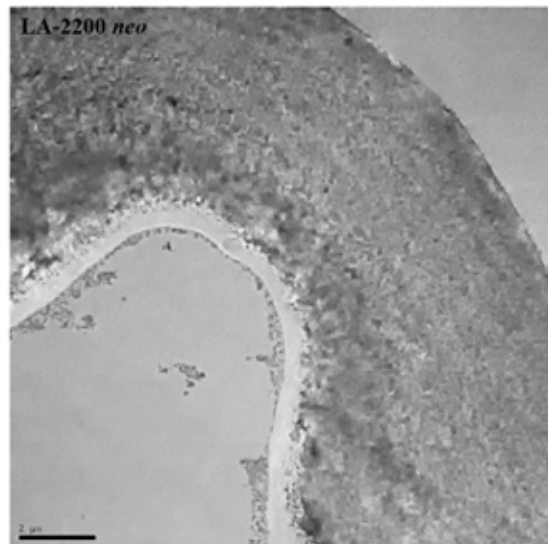
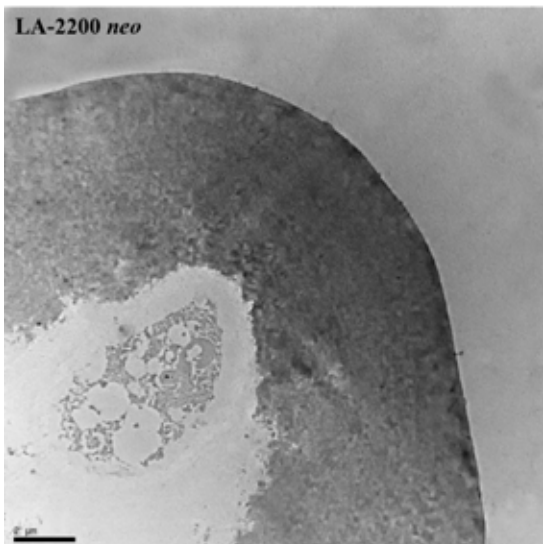
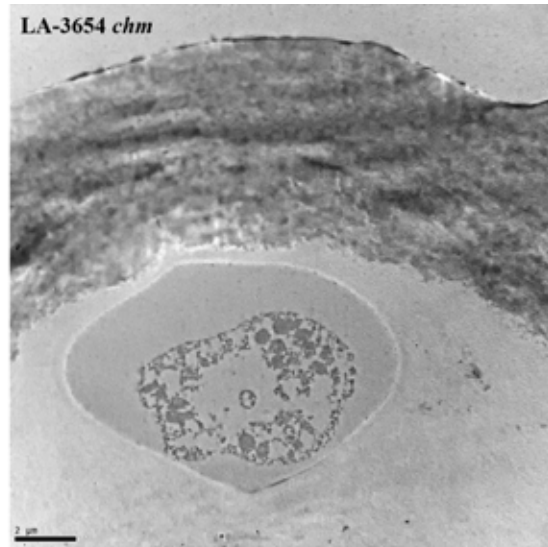
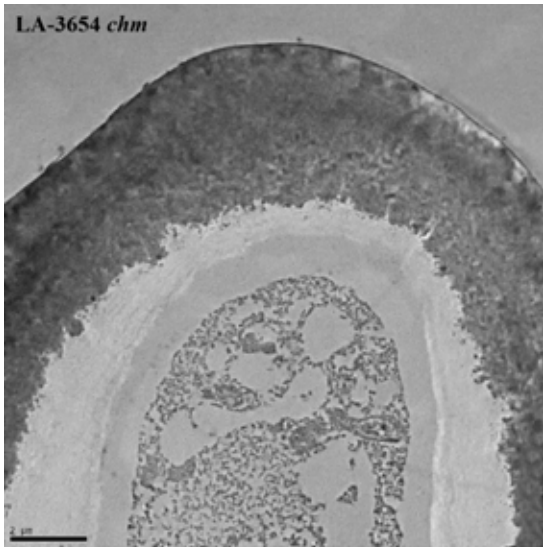
LA-2678 *chm*: 15dda, barra 1  $\mu\text{m}$ ; maduro, barra 2  $\mu\text{m}$ .

LA-2695 *chm*: 15dda, barra 2  $\mu\text{m}$ ; maduro, barra 5  $\mu\text{m}$ .

LA-3644 *chm*: 15dda, barra 2  $\mu\text{m}$ ; maduro, barra 1  $\mu\text{m}$ .

15 dda

M



LA-3654 *chm*: 15dda y maduro, barras 2 μm.

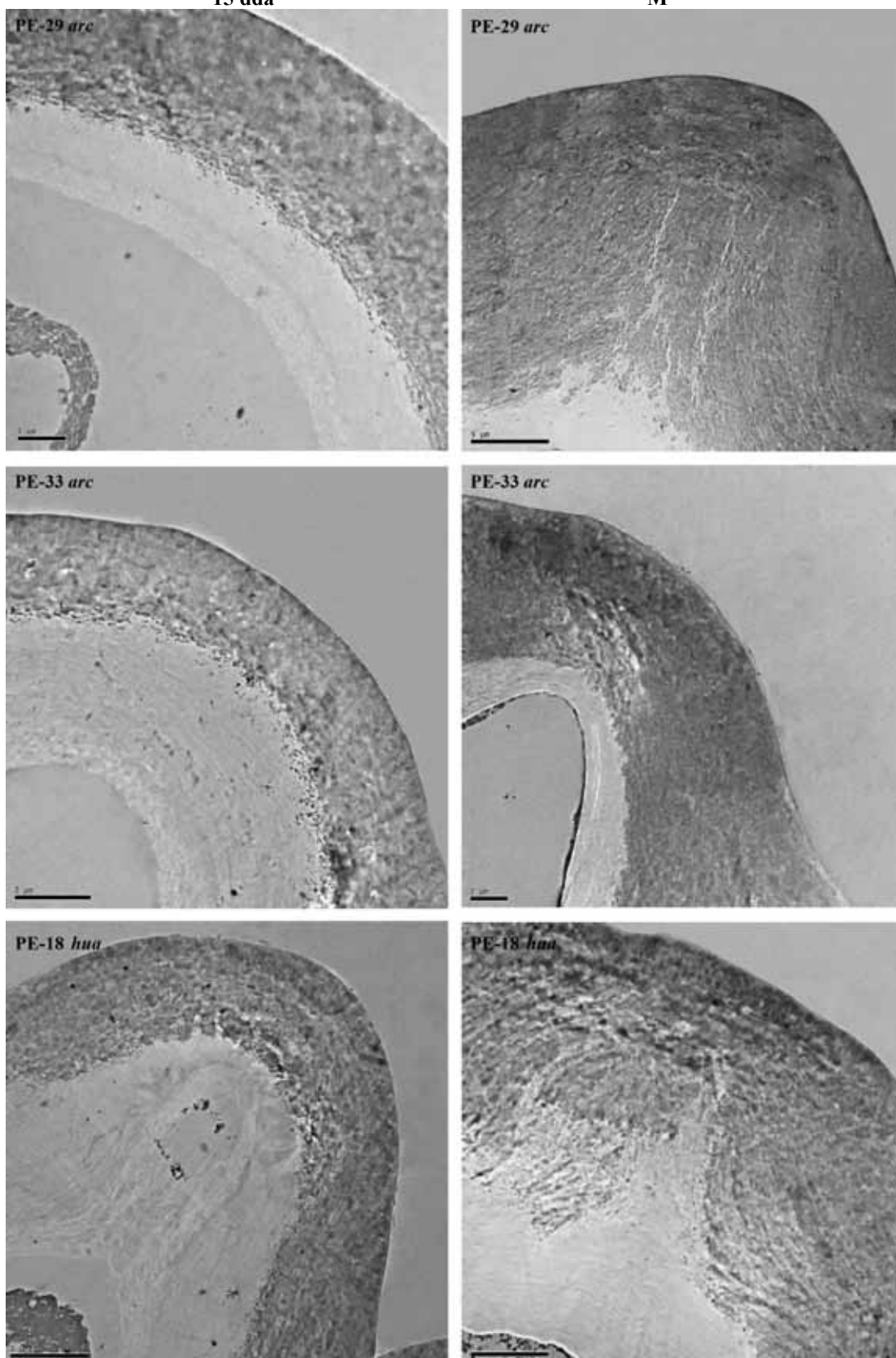
LA-2200 *neo*: 15dda y maduro, barras 2 μm.

PE-52 *neo*: 15dda y maduro, barras 2 μm.



15 dda

M



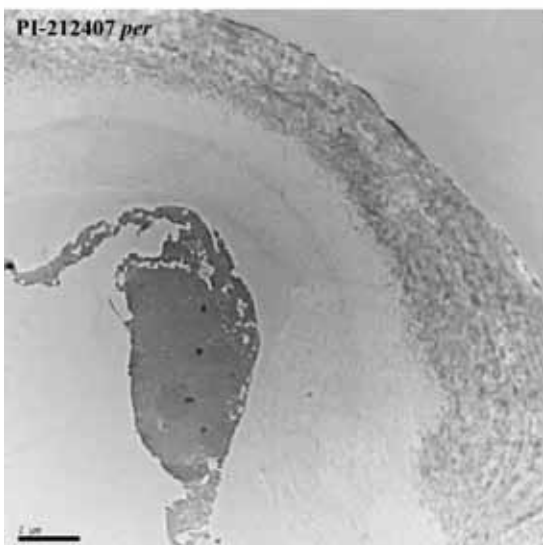
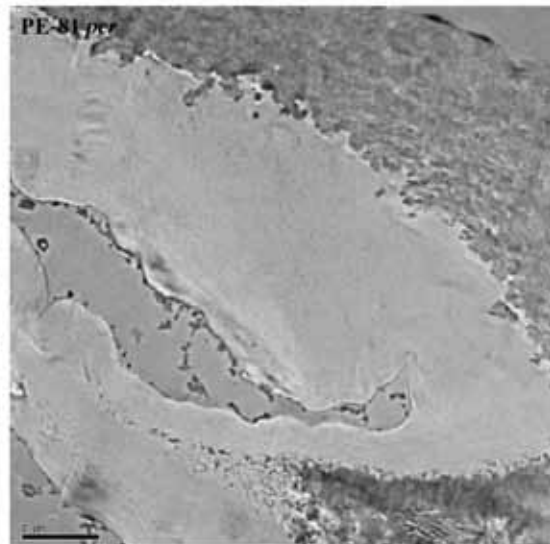
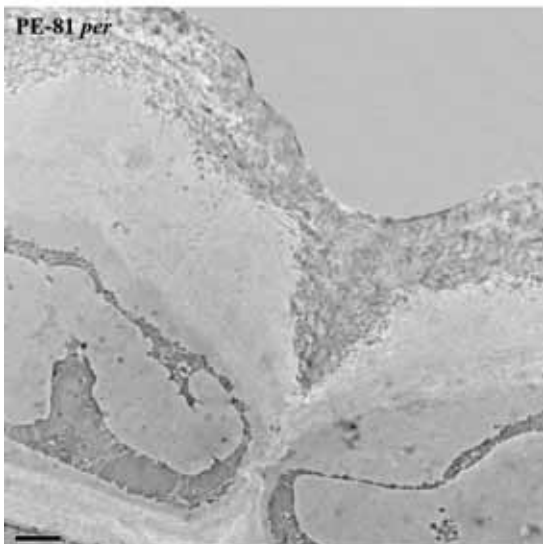
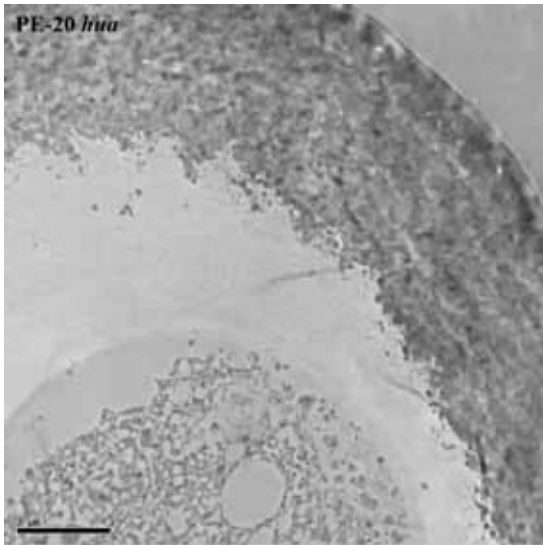
PE-29 *arc*: 15dda, barra 1  $\mu\text{m}$ ; maduro, barra 5  $\mu\text{m}$ .

PE-33 *arc*: 15dda y maduro, barras 2  $\mu\text{m}$ .

PE-18 *hua*: 15dda y maduro, barras 5  $\mu\text{m}$ .

15 dda

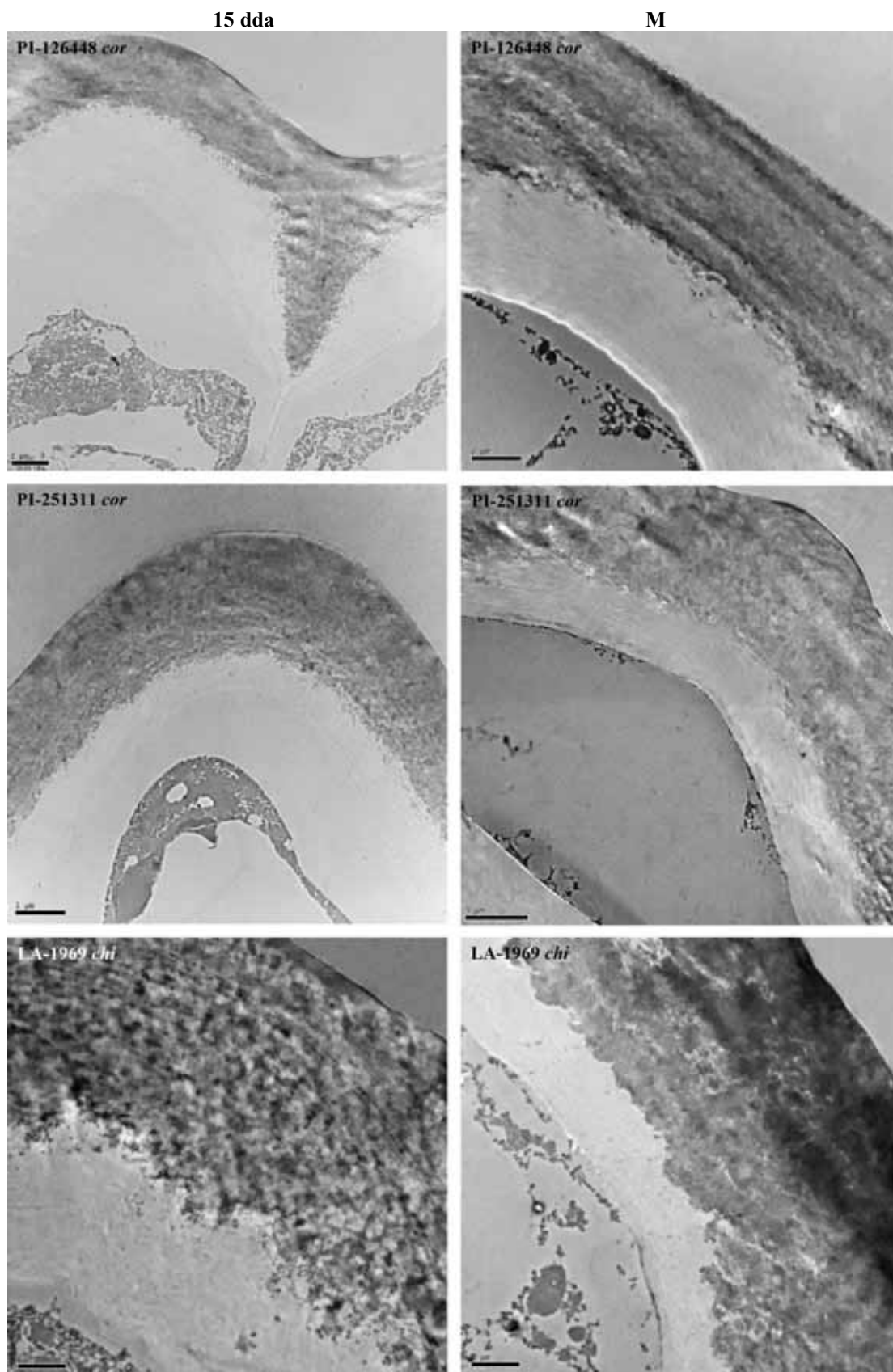
M



PE-20 *hua*: 15dda, barra 2  $\mu\text{m}$ ; maduro, barra 5  $\mu\text{m}$ .

PE-81 *per*: 15dda y maduro, barras 2  $\mu\text{m}$ .

PI-212407 *per*: 15dda y maduro, barras 2  $\mu\text{m}$ .



PI-126448 *cor*: 15dda y maduro, barras 2  $\mu$ m.

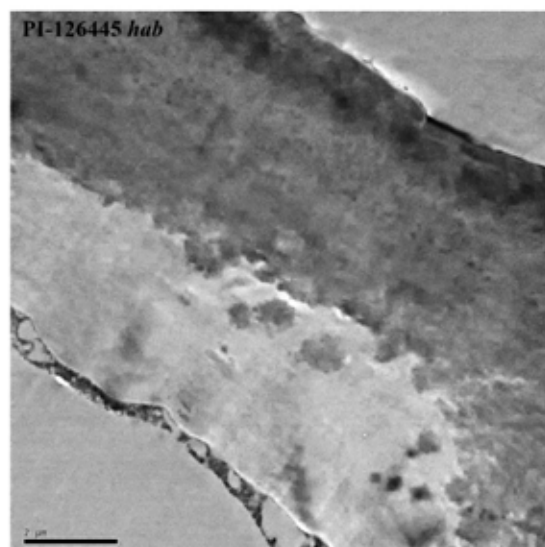
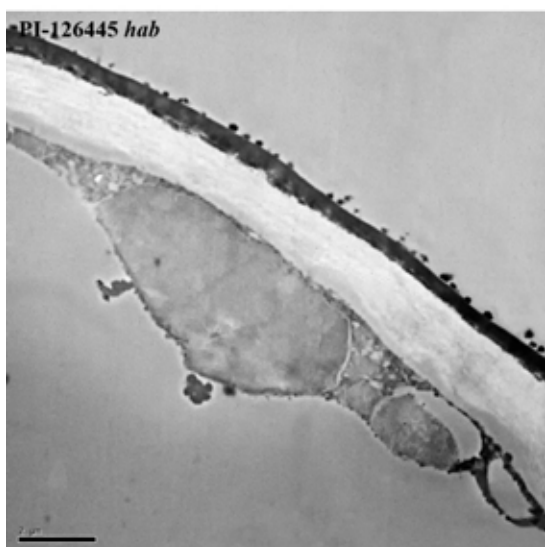
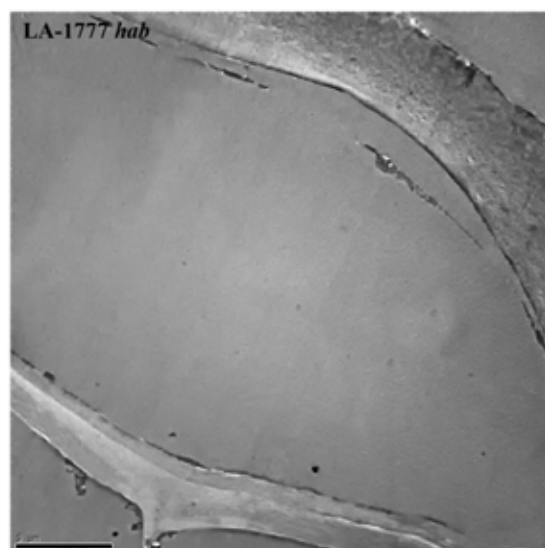
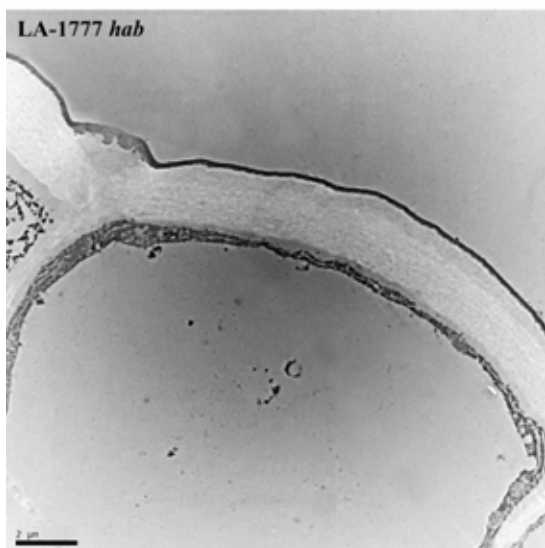
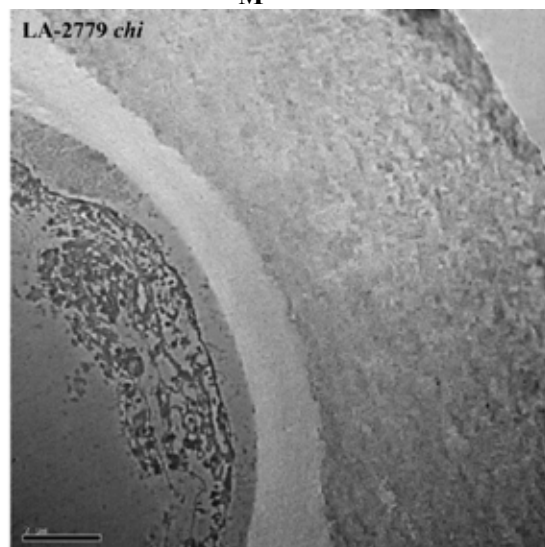
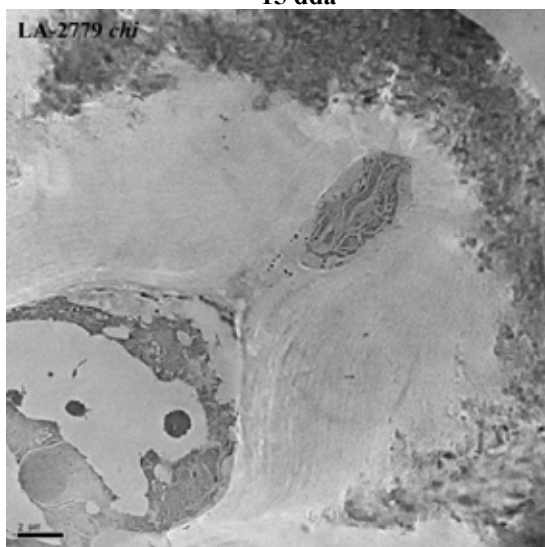
PI-251311 *cor*: 15dda, barra 2  $\mu$ m; maduro, barra 5  $\mu$ m.

LA-1969 *chi*: 15dda y maduro, barras 1  $\mu$ m.



15 dda

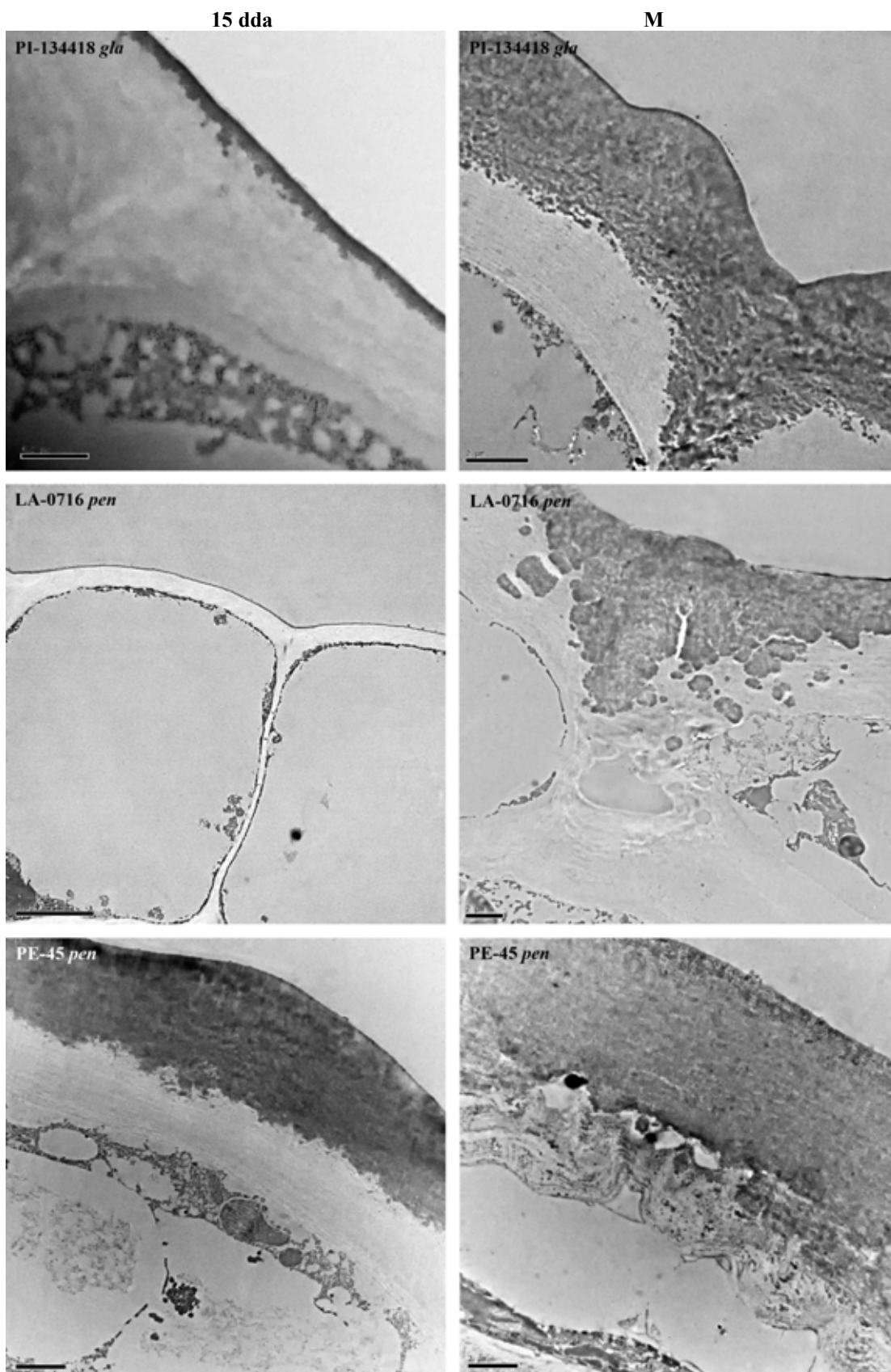
M



LA-2779 *chi*: 15dda y maduro, barras 2 µm.

LA-1777 *hab*: 15dda, barra 2 µm; maduro, barra 5 µm.

PI-126445 *hab*: 15dda y maduro, barras 2 µm.



PI-134418 *gla*: 15dda y maduro, barras 2  $\mu$ m.

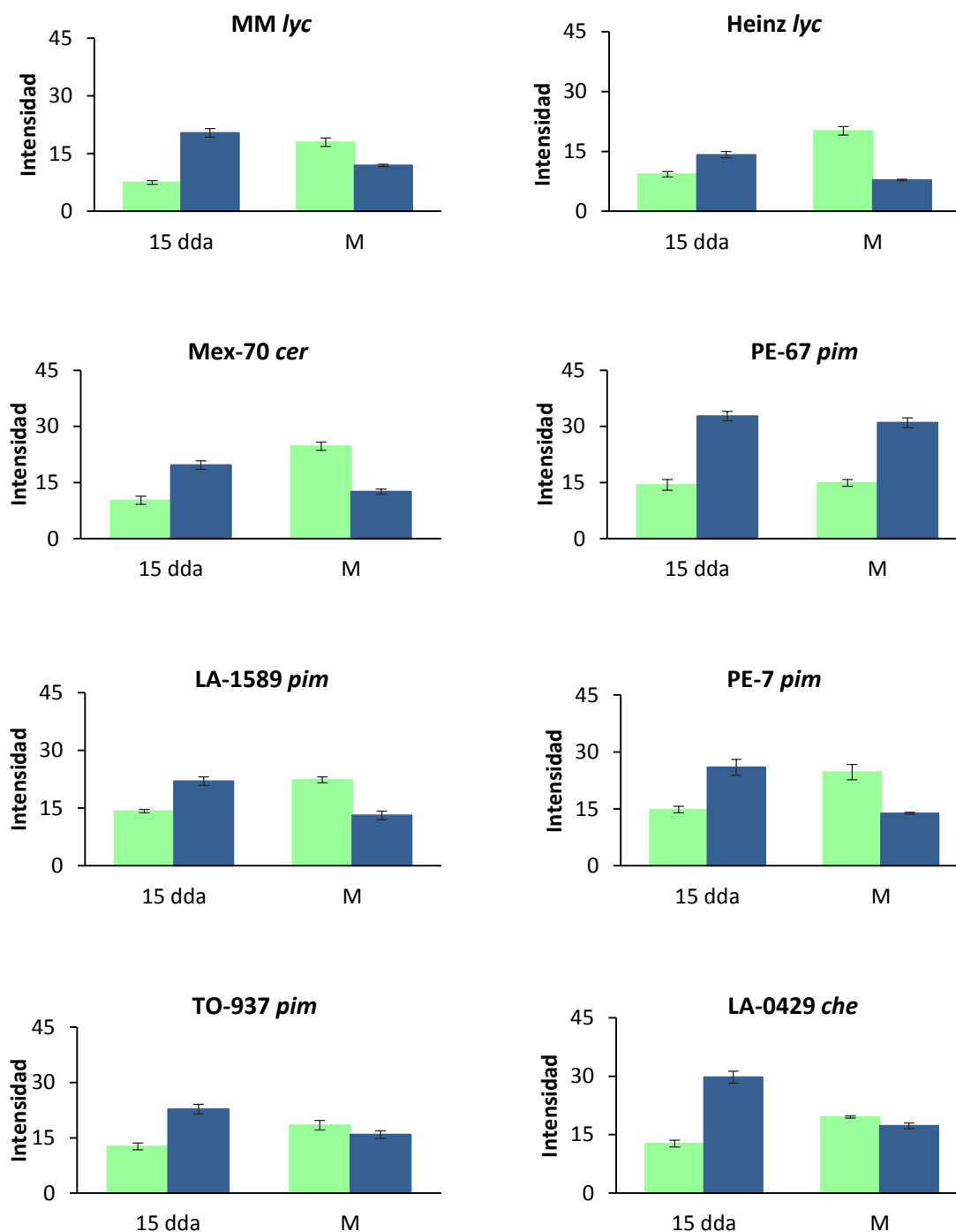
LA-0716 *pen*: 15dda, barra 2  $\mu$ m; maduro, barra 5  $\mu$ m.

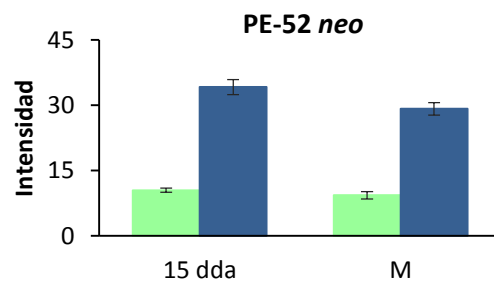
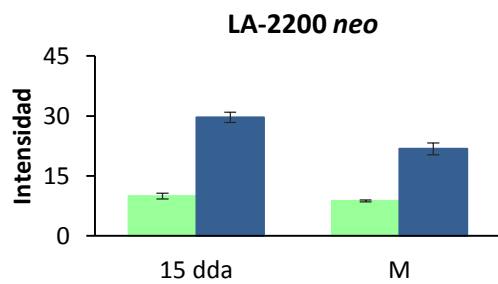
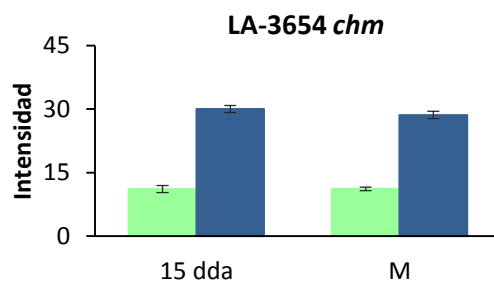
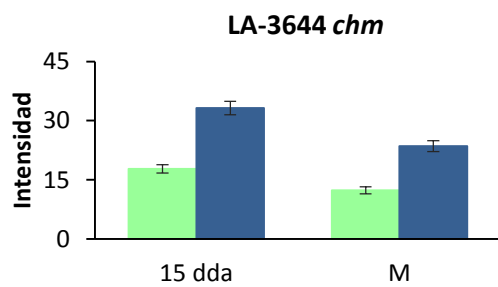
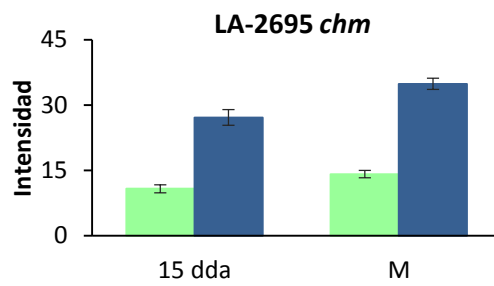
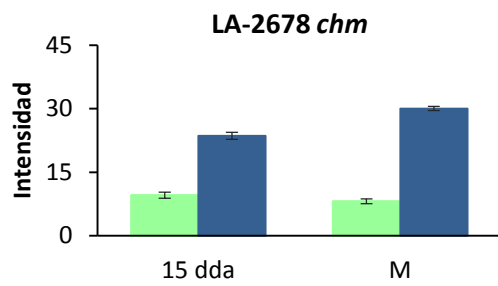
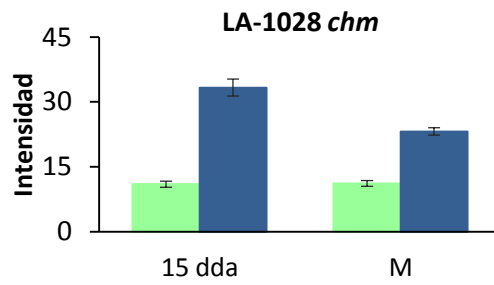
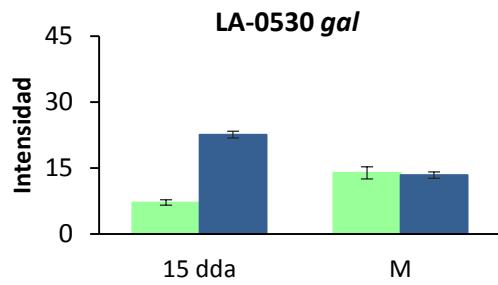
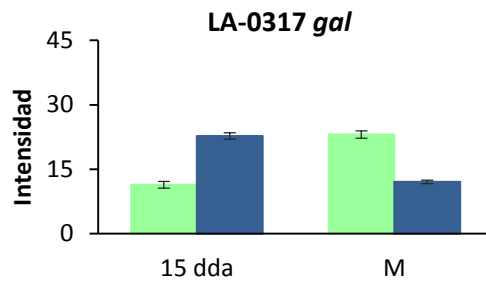
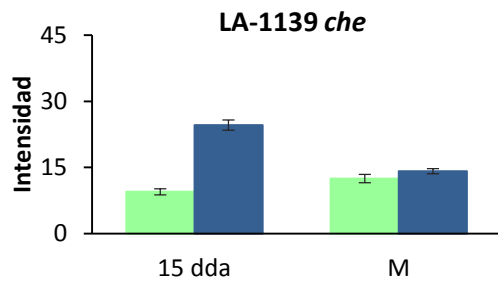
PE-45 *pen*: 15dda y maduro, barras 2  $\mu$ m.

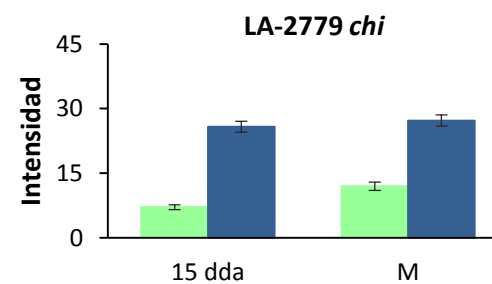
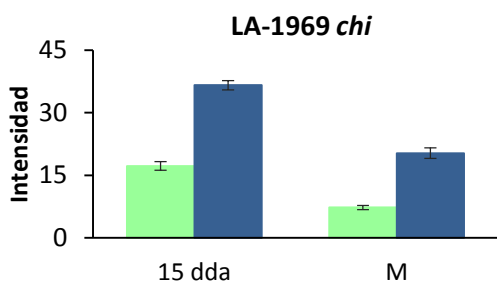
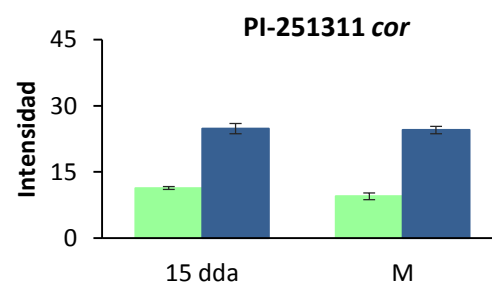
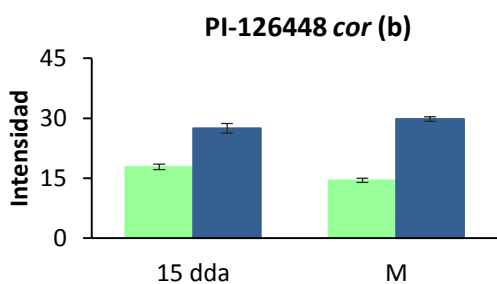
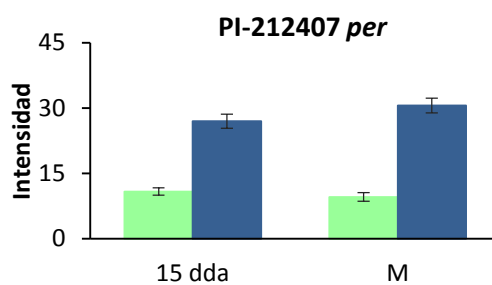
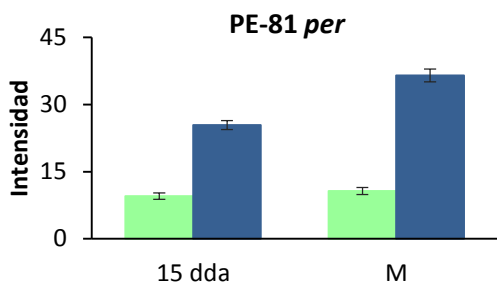
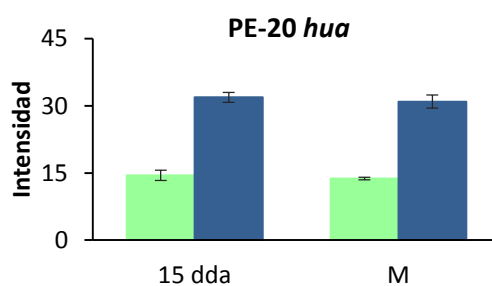
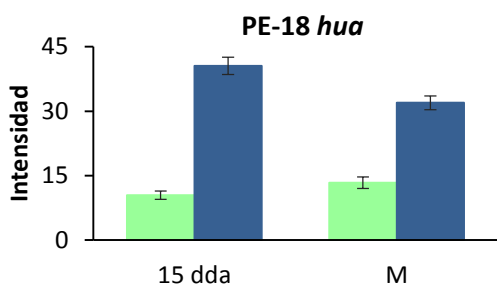
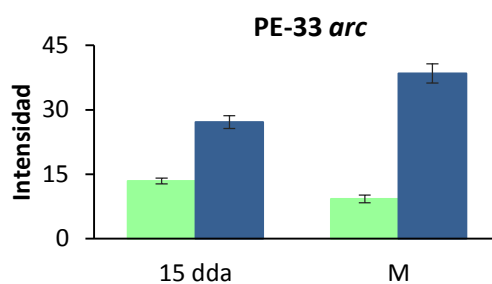
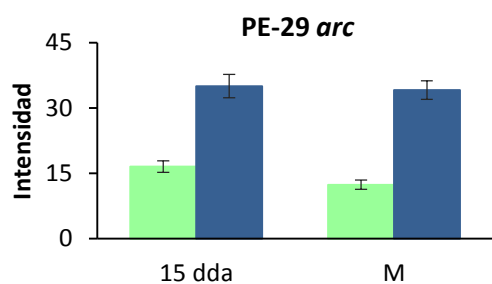


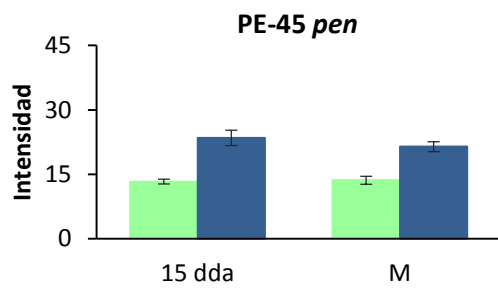
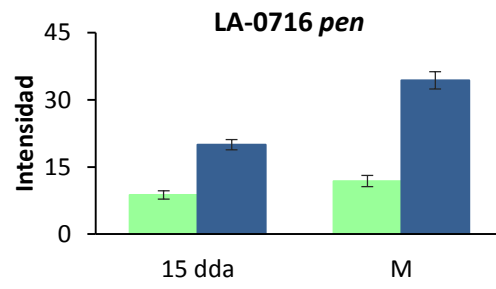
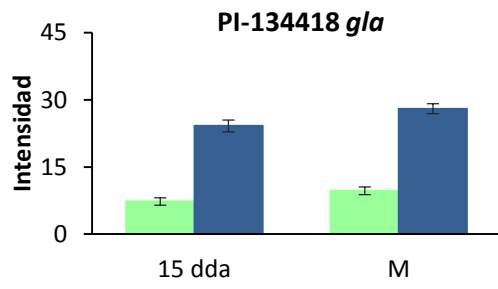
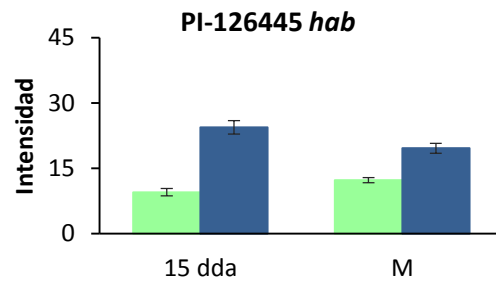
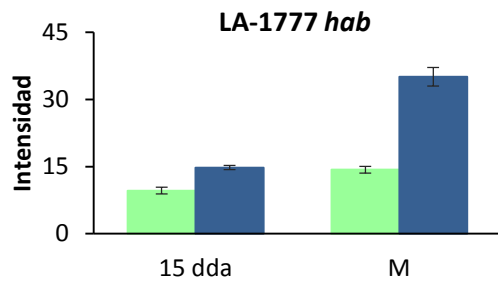


**Anexo III:** Representaciones gráficas de la intensidad total de la autofluorescencia con el filtro FITC (verde) y UV (azul) emitida por la cutícula de los frutos de tomate en los estadios de 15 dda y maduro (M). Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar.









**Anexo IV: Intensidad de la autofluorescencia correspondiente a los canales rojo (R), verde (V) y azul (A) emitida por la cutícula de los frutos de tomate de 15 dda y maduros con el filtro FITC.** Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar. (-), no hay autofluorescencia o el valor medio se sitúa por debajo del valor umbral establecido.

Entrada	15 dda			Maduro		
	R	V	A	R	V	A
MM <i>lyc</i>	-	14.1 $\pm$ 1.0	-	-	46.2 $\pm$ 3.1	-
Heinz <i>lyc</i>	-	16.7 $\pm$ 0.7	-	12.4 $\pm$ 0.3	47.5 $\pm$ 2.8	-
Mex-70 <i>cer</i>	10.1 $\pm$ 0.8	16.3 $\pm$ 1.7	-	14.3 $\pm$ 0.3	53.9 $\pm$ 3.1	-
PE-67 <i>pim</i>	13.5 $\pm$ 1.3	23.6 $\pm$ 2.3	-	11.1 $\pm$ 0.8	25.4 $\pm$ 1.8	-
LA-1589 <i>pim</i>	12.7 $\pm$ 0.4	24.1 $\pm$ 1.8	-	15.7 $\pm$ 1.0	47.0 $\pm$ 2.4	-
PE-7 <i>pim</i>	15.7 $\pm$ 1.6	19.2 $\pm$ 1.5	-	13.7 $\pm$ 1.9	50.2 $\pm$ 4.6	10.3 $\pm$ 0.6
TO-937 <i>pim</i>	12.7 $\pm$ 1.4	18.7 $\pm$ 1.4	-	14.0 $\pm$ 1.3	31.6 $\pm$ 2.3	-
LA-0429 <i>che</i>	11.9 $\pm$ 1.6	23.8 $\pm$ 2.3	-	12.1 $\pm$ 0.9	38.4 $\pm$ 1.3	-
LA-1139 <i>che</i>	-	18.8 $\pm$ 1.3	-	-	31.0 $\pm$ 2.0	-
LA-0317 <i>gal</i>	13.4 $\pm$ 0.9	19.0 $\pm$ 1.8	-	-	51.0 $\pm$ 1.8	11.5 $\pm$ 0.6
LA-0530 <i>gal</i>	-	19.3 $\pm$ 1.1	-	-	36.3 $\pm$ 3.2	-
LA-1028 <i>chm</i>	-	21.8 $\pm$ 1.3	-	-	21.0 $\pm$ 1.6	-
LA-2678 <i>chm</i>	-	20.4 $\pm$ 1.1	-	-	19.3 $\pm$ 1.0	-
LA-2695 <i>chm</i>	-	21.8 $\pm$ 1.5	-	-	35.7 $\pm$ 2.3	-
LA-3644 <i>chm</i>	13.3 $\pm$ 1.2	31.5 $\pm$ 2.1	-	10.9 $\pm$ 0.6	20.2 $\pm$ 1.8	-
LA-3654 <i>chm</i>	-	24.5 $\pm$ 2.2	-	-	21.6 $\pm$ 1.5	-
LA-2200 <i>neo</i>	-	21.7 $\pm$ 2.1	-	-	21.7 $\pm$ 1.0	-
PE-52 <i>neo</i>	-	22.1 $\pm$ 1.3	-	-	19.5 $\pm$ 1.8	-
PE-29 <i>arc</i>	12.2 $\pm$ 1.5	28.5 $\pm$ 2.0	-	-	25.7 $\pm$ 2.5	-
PE-33 <i>arc</i>	-	27.7 $\pm$ 1.5	-	-	21.6 $\pm$ 1.9	-
PE-18 <i>hua</i>	-	21.9 $\pm$ 1.4	-	-	32.5 $\pm$ 4.6	-
PE-20 <i>hua</i>	12.1 $\pm$ 0.9	27.1 $\pm$ 2.7	-	12.3 $\pm$ 1.1	22.8 $\pm$ 2.3	-
PE-81 <i>per</i>	-	15.3 $\pm$ 1.3	-	-	25.1 $\pm$ 2.3	-
PI-212407 <i>per</i>	-	20.1 $\pm$ 1.9	-	-	18.7 $\pm$ 1.5	-
PI-126448 <i>cor</i> (b)	14.9 $\pm$ 1.6	38.2 $\pm$ 1.3	-	-	30.4 $\pm$ 0.6	-
PI-251311 <i>cor</i>	-	19.3 $\pm$ 1.4	-	-	19.3 $\pm$ 1.6	-
LA-1969 <i>chi</i>	-	36.4 $\pm$ 2.3	-	-	16.6 $\pm$ 1.5	-
LA-2779 <i>chi</i>	-	15.6 $\pm$ 1.2	-	-	21.2 $\pm$ 0.8	-
LA-1777 <i>hab</i>	-	19.7 $\pm$ 1.9	-	-	35.2 $\pm$ 2.1	-
PI-126445 <i>hab</i>	-	19.7 $\pm$ 1.7	-	11.0 $\pm$ 1.4	22.5 $\pm$ 0.1	-
PI-134418 <i>gla</i>	-	20.8 $\pm$ 1.4	-	-	21.3 $\pm$ 1.9	-
LA-0716 <i>pen</i>	-	24.2 $\pm$ 1.9	-	-	26.1 $\pm$ 2.1	-
PE-45 <i>pen</i>	-	31.2 $\pm$ 1.8	-	-	30.1 $\pm$ 2.1	-





