



UNIVERSIDAD  
POLITECNICA  
DE VALENCIA



## **ESTUDIO DE LA GENÉTICA DE LA REGENERACIÓN A PARTIR DE EXPLANTES EN TOMATE E IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES ASOCIADOS.**



Autor: Carlos Trujillo Moya

Directores: Carmina Gisbert Doménech y Fernando Nuez Viñals

Tesis para la obtención del título de Máster Interuniversitario oficial en Mejora Genética Vegetal. Universidad Politécnica de Valencia. Diciembre 2009.



UNIVERSIDAD  
POLITECNICA  
DE VALENCIA



Autorización:

Dra. Carmina Gisbert Doménech, profesor del Máster Oficial Interuniversitario en Mejora Genética Vegetal en calidad de director de Trabajo Fin de Máster por la presente,

**RECONOCE:**

Que el Trabajo Fin de Máster realizado por el alumno: Carlos Trujillo Moya, con el título Estudio de la genética de la regeneración a partir de explantes en tomate e identificación de marcadores asociados y dirigido por Carmina Gisbert Doménech y Fernando Nuez Viñals, reúne las condiciones necesarias para completar la formación del alumno y por tanto

**AUTORIZA:**

La presentación del citado Trabajo Final de Máster para su defensa ante el correspondiente Tribunal. Y para que conste a los efectos oportunos así lo firma,

Dra. Carmina Gisbert Doménech  
Máster Oficial Interuniversitario en Mejora Genética Vegetal

Valencia, a 9 de Diciembre de 2009



## FORMULARIO DEPÓSITO TESIS MÁSTER

<b>AUTOR</b>	1 <sup>er</sup> APELLIDO	2 <sup>o</sup> APELLIDO	NOMBRE	DNI/NIE
	Trujillo	Moya	Carlos	53055749-Q
<b>DIRECTOR TESIS</b>	1 <sup>er</sup> APELLIDO	2 <sup>o</sup> APELLIDO	NOMBRE	
	Gisbert Fernando	Doménech Nuez Viñals	Carmina	
<b>UNIVERSIDAD</b>	<b>MÁSTER</b>			
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA	Mejora Genética Vegetal			
<b>TÍTULO DE LA TESIS</b>				
<b>Estudio de la genética de la regeneración a partir de explantes en tomate e identificación de marcadores asociados.</b>				
<b>RESUMEN</b>	<p>La regeneración de plantas a partir de explantes es la base de partida para poder aplicar tecnologías tales como la obtención de plantas haploides o la transformación genética. Este carácter presenta una amplia variabilidad inter e intraespecífica. Así, incluso dentro de la misma especie, podemos encontrarnos genotipos recalcitrantes cuya falta o escasa regeneración limita la aplicación de estas técnicas. Además del componente genético, otros factores que contribuyen a un mayor o menor desarrollo de esta capacidad son: las condiciones fisiológicas del material de partida, los componentes del medio de cultivo, las condiciones de incubación (temperatura, luminosidad), etc. Estos factores, junto con la falta de información acerca de qué factores determinan que este proceso se produzca por una u otra vía morfogénica (la vía organogénica o la embriogénica) y, la incertidumbre de cuantos genes están implicados, indica la necesidad de investigación básica de este proceso.</p> <p>El objetivo de este trabajo ha sido incrementar el conocimiento de la base genética de la capacidad de regeneración a partir de explantes y la localización de genes implicados en este proceso. En concreto, la de genes implicados en el proceso de regeneración por la vía organogénica que es la predominante en tomate. Para ello, se ha utilizado una población F<sub>2</sub> segregante para el carácter en estudio. Esta población se obtuvo en el grupo de investigación a partir de la autofecundación de una planta F<sub>1</sub> resultante del cruce de una planta de tomate (<i>S. lycopersicum</i>) con escasa capacidad regenerativa (anl27) y la accesión LA47 de <i>S. pennellii</i> con alta capacidad de regeneración. También se han utilizado plantas del retrocruce BC1 (anl 27 x F1). Con estos materiales se ha realizado una la caracterización a nivel fenotípico y a nivel genotípico.</p> <p>Para poder realizar este estudio se han obtenido clones de cada genotipo que se han mantenido en cultivo <i>in vitro</i>. El fenotipado llevado a cabo se ha realizado en condiciones de cultivo previamente seleccionadas. En el genotipado se han utilizado marcadores descritos en las bases de datos y otros, que se han obtenido para</p>			

aumentar en el número de marcadores en zonas determinadas.

En este trabajo se presentan y discuten los resultados obtenidos en el fenotipado y el genotipado de estas poblaciones y los análisis realizados.

Plant regeneration from explants is the needed in plant biotechnological breeding technologies such as haploid regeneration or genetic transformation. Interspecific and intraspecific variability has been described for this trait. Thus, even within the same species, we can find recalcitrant genotypes whose lack or little regeneration limits the application of these techniques. Besides the genetic component, other factors like the physiological conditions of the departure material, the components of culture medium and the conditions of incubation (temperature, luminosity) contribute to increase or decrease regeneration rates. The lack of information about which factors determine that this process takes place by one or the other morphogenetic route (organogenic or embriogenic) and, the uncertainty of whichever genes are implied, indicates the basic necessity of investigation of this process.

The objective of this work has been to increase the knowledge of the genetic base of regeneration capacity from explants and the mapping of genes implied in this process. In particular, genes implied in the regenerative process by the organogenic route wich is the predominant one in tomato.

As mapping population a F2 heterogeneous for the character in study has been used. This has been previously obtained from one F1 plant of a cross between the tomato cultivar (anl27) with low regeneration capacity and *S. pennellii* (LA47) with high ability for regeneration. The backcross between tomato and the F1 plant was also obtained (BC1).

Phenotypic and genotypic characterization has been carried out with the previous mentioned populations. In order to be able to do this study clones of each genotype have been obtained in vitro. The phenotypic characterization has been done using culture medium previously selected. For genotypic characterization molecular markers described in the Solanace Genomic Network (SGN) and others designed in sílico to increase the number of markers in certain zones have been employed.

In this work the results obtained in both phenotypic and genotypic characterization in the populations described were presented and discussed.

**PALABRAS CLAVE**

DESCRIPTORES EN ESPAÑOL  
 Regeneración ; organogénesis ; *Solanum pennellii*; *in vitro*; *Solanum lycopersicum*  
 DESCRIPTORES EN INGLÉS  
 Regeneration ; organogenesis ; *Solanum pennellii*; *in vitro*; *Solanum lycopersicum*

**CLASIFICACIÓN DE LA UNESCO**

URL MINISTERIO DE CIENCIA E INNOVACIÓN:  
[http://ciencia.micinn.fecyt.es/ciencia/jsp/plantilla.jsp?area=plan\\_idi&id=6&contenido=/files/portada.jsp](http://ciencia.micinn.fecyt.es/ciencia/jsp/plantilla.jsp?area=plan_idi&id=6&contenido=/files/portada.jsp)

CAMPO	DISCIPLINA	SUBDISCIPLINA
31	3107	310702
24	2409	240991
	2417	241715

(máximo tres áreas de conocimiento)



**El alumno Carlos Trujillo Moya disfruta de una beca predoctoral financiada por el Ministerio de Ciencia e Innovación, Formación Profesorado Universitario (FPU).**

### ***A mi hermano César (Japón):***

El guerrero de la luz a veces actúa como el agua, y fluye entre los obstáculos que encuentra. En ciertos momentos, resistir significa ser destruido; entonces, él se adapta a las circunstancias. Acepta sin protestar que las piedras del camino tracen su rumbo a través de las montañas. En esto reside la fuerza del agua; jamás puede ser quebrada por un martillo, ni herida por un cuchillo. La más poderosa espada del mundo es incapaz de dejar una cicatriz sobre su superficie. El agua de un río se adapta al camino más factible, sin olvidar su objetivo: el mar. Frágil en su nacimiento, lentamente va adquiriendo la fuerza de los otros ríos que encuentra. Y a partir de un determinado momento, su poder es total.

### ***A mi hermano Alejandro (Milán):***

El guerrero de la luz contempla las dos columnas que están al lado de la puerta que quiere abrir. Una se llama Miedo, la otra se llama Deseo. El guerrero contempla la columna del Miedo y allí está escrito: "Vas a entrar en un mundo desconocido y peligroso, donde todo lo que aprendiste hasta ahora no servirá para nada". El guerrero mira la columna del Deseo, y allí está escrito: "Vas a salir de un mundo conocido, donde están guardadas las cosas que siempre quisiste, y por las cuales luchaste tanto". El guerrero sonríe, porque no existe nada que lo asuste ni nada que lo retenga. Con la seguridad de quien sabe lo que quiere, él abre la puerta.

### ***A mis padres por darlo todo por sus tres guerreros de la luz:***

Los amigos del guerrero de la luz le preguntan de dónde procede su energía. Y él les responde: "Del enemigo oculto". Los amigos preguntan quién es. El guerrero responde: "Alguien a quien no pudimos herir". Puede ser un niño que lo venció en una pelea en su infancia, la noviecita que lo dejó a los once años, **el profesor que le llamaba burro**. Cuando está cansado, le guerrero se acuerda de que él aún no vio su coraje. No piensa en venganza, porque el enemigo oculto no forma ya parte de su historia. Piensa solamente en mejorar su habilidad, para que sus hazañas corran por el mundo y lleguen a los oídos de quien lo hirió en el pasado. El dolor de ayer es la fuerza del guerrero de la luz.

Paulo Coelho, *Manual del Guerrero de la luz*.

***Gracias a Fernando Nuez, por apostar en mi y ayudarme con su prestigio a lograr tan preciada beca.***

***Gracias a Carmina por la humildad y confianza que muestra en todo momento. Gracias por enseñarme a "andar" en ciencia y por darme la libertad de trabajo necesaria para mantener la motivación día a día en el laboratorio.***

***Gracias a Santi y a Belén por su implicación en el proyecto y en mi formación, pero sobretodo por transmitir en todo momento la ilusión de hacer ciencia.***

***Gracias a Nuri (y a Carla), por la alegría que contagian cada mañana y por su envidiable capacidad de trabajo que facilita siempre el camino.***

***Gracias a Sandra por apoyarme en todo momento con sus sabios consejos, sus sabrosas galletas, la arrolladora y permitirme viajar a su maravillosa cultura en miles de conversaciones. Que viva México ¡¡¡***

***Gracias a Juan Pablo Manzurp con "seta" por tener una visión crítica del mundo que muy poca gente tiene y que tan agradable resulta compartir en conversaciones, discusiones y viajes. Un gran viaje nos espera!!!***

***Gracias a Álvaro por sus visitas al laboratorio con café en mano, que te alegran la mañana, y por transmitir un positivismo y alegría permanente. Pronto surcaremos los cielos juntos.***

***Gracias a Carles, Olga y Patri por compartir esos grandes momentos en el Tranvía, templo de liberación en los días de saturación.***

***Gracias a Raimon, por mantenerse fiel a lo largo de estos dos años a nuestros lunes al sol.***

## RESUMEN

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

El objetivo de este trabajo ha sido incrementar el conocimiento de la base genética de la capacidad de regeneración a partir de explantes y la localización de genes implicados en este proceso. En concreto, la de genes implicados en el proceso de regeneración por la vía organogénica que es la predominante en tomate. Para ello, se ha utilizado una población  $F_2$  segregante para el carácter en estudio. Esta población se obtuvo en el grupo de investigación a partir de la autofecundación de una planta  $F_1$  resultante del cruce de una planta de tomate (*S. lycopersicum*) con escasa capacidad regenerativa (anl27) y la accesión LA47 de *S. pennellii* con alta capacidad de regeneración. También se han utilizado plantas del retrocruce BC1 (anl 27 x  $F_1$ ). Con estos materiales se ha realizado una la caracterización a nivel fenotípico y a nivel genotípico.

Para poder realizar este estudio se han obtenido clones de cada genotipo que se han mantenido en cultivo *in vitro*. El fenotipado llevado a cabo se ha realizado en condiciones de cultivo previamente seleccionadas. En el genotipado se han utilizado marcadores descritos en las bases de datos y otros, que se han obtenido para aumentar en el número de marcadores en zonas determinadas.

En este trabajo se presentan y discuten los resultados obtenidos en el fenotipado y el genotipado de estas poblaciones y los análisis realizados.

## SUMMARY

Plant regeneration from explants is the needed in plant biotechnological breeding technologies such as haploid regeneration or genetic transformation. Interspecific and intraspecific variability has been described for this trait. Thus, even within the same species, we can find recalcitrant genotypes whose lack or little regeneration limits the application of these techniques. Besides the genetic component, other factors like the physiological conditions of the departure material, the components of culture medium and the conditions of incubation (temperature, luminosity) contribute to increase or decrease regeneration rates. The lack of information about which factors determine that this process takes place by one or the other morphogenetic route (organogenic or embriogenic) and, the uncertainty of whichever genes are implied, indicates the basic necessity of investigation of this process.

The objective of this work has been to increase the knowledge of the genetic base of regeneration capacity from explants and the mapping of genes implied in this process. In particular, genes implied in the regenerative process by the organogenic route wich is the predominant one in tomato.

As mapping population a F2 heterogeneous for the character in study has been used. This has been previously obtained from one F1 plant of a cross between the tomato cultivar (anl27) with low regeneration capacity and *S. pennellii* (LA47) with high ability for regeneration. The backcross between tomato and the F1 plant was also obtained (BC1).

Phenotypic and genotypic characterization has been carried out with the previous mentioned populations. In order to be able to do this study clones of each genotype have been obtained in vitro. The phenotypic characterization has been done using culture medium previously selected. For genotypic characterization molecular markers described in the Solanace Genomic Network (SGN) and others designed in sílico to increase the number of markers in certain zones have been employed.

In this work the results obtained in both phenotypic and genotypic characterization in the populations described were presented and discussed.

# 1. Introducción

1.1 El cultivo del tomate. Origen e importancia económica (p 1)

1.2 Métodos de mejora en tomate y nuevas perspectivas (p 1-4)

1.3 La regeneración de plantas a partir de explantes y la regeneración en tomate (p 4-11)

1.3.1 La morfogénesis (p 5-6)

*Vía organogénica.*

*Vía embriogénica.*

1.3.2 Importancia del genotipo (p 6-7)

*Variabilidad inter e intraespecífica*

*Genotipos recalcitrantes y pérdida de la capacidad regenerativa*

1.3.3. La regeneración en tomate (p 8-11)

*Morfogénesis en tomate*

*Variabilidad intra e interespecífica.*

*Transferencia de la capacidad organogénica.*

*La genética de la regeneración*

# 2. Material y métodos

2.1 Material vegetal (p 12)

2.2 Fenotipado (p 12-14)

2.2.1 Ensayos preliminares (p 12)

2.2.2 Análisis fenotípico de las poblaciones en estudio (p 13)

2.2.3 Variables estudiadas y variabilidad observada (p 13-14)

2.2.4 Correlación entre variables (p 14)

2.2.5 Distribución de los datos (p 14)

2.3 Genotipado (p 15-20)

2.3.1 Extracción de ADN genómico (p 15)

2.3.2 Marcadores moleculares. Polimorfismo (p 16-20)

*Desarrollo de marcadores AFLPs*

*Marcadores SSR*

*Marcadores COS y COSII*

2.3.3 Mapa de ligamiento (p 20)

2.4 Análisis genético (p 21-24)

2.4.1 Prueba de escala de Mather y Jinks, análisis de los componentes de la varianza y cálculo del número de genes (p 21-23)

2.4.2 Análisis cualitativo (p 23-24)

2.4.3 Análisis cuantitativo (p 24)

## **3. Resultados y discusión**

3.1 Fenotipado (p 25-33)

3.1.1 Ensayos preliminares (p 25-26).

3.1.2 Variables estudiadas y variabilidad observada (p 26-30).

3.1.3 Correlación entre variables (p 30)

3.1.4 Distribución de los datos (p 31-33)

3.2 Genotipado (p 34-45)

3.2.1 Marcadores moleculares. Polimorfismo (p 34-43)

*Desarrollo de marcadores AFLPS*

*Marcadores SSR*

*Marcadores COS y COSII*

3.2.2 Mapa de ligamiento (p 43-45)

3.3 Análisis genético (p 46-58)

3.3.1 Análisis de medias generacionales (p 46-47)

3.3.2 Análisis de los componentes de la varianza (p 47-49)

3.3.3 Cálculo del número de genes (p 49-50)

3.3.4 Análisis cualitativo (p 50-53)

3.3.5 Análisis cuantitativo (p 53-58)

## **4. Conclusiones** (p 59-60)

## **5. Bibliografía** (p 61-75)

# 1. Introducción

## 1.1 El cultivo del tomate. Origen e importancia económica.

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) pertenece a la familia de las Solanáceas (*Solanaceae*), clasificado por Miller (1754) como *Lycopersicon esculentum* fue renombrado por Child (1990) y Peralta y Spooner (2006) como *Solanum lycopersicum*. El centro de origen del género *Solanum* es la región andina que hoy comparten Chile-Bolivia-Perú-Ecuador y Colombia (Nuez, 1995). El tomate se cultiva en todo el mundo por su fruto comestible, conocido también como jitomate en el sur y centro de México. Es una especie diploide con  $2n=2x=24$  cromosomas, con un genoma de aproximadamente 950Mb de ADN, del cual más del 75% es heterocromatina y en gran parte carece de genes (Nuez y Prohens, 2008).

La introducción y difusión del tomate en Europa estuvo acompañada por la transdomesticación que provocó el desarrollo de diferentes tipos asociados a nuevos usos y sistemas de cultivo. Como resultado, un incremento en la producción y la calidad del fruto relativa a sus nuevos usos tuvo lugar en este periodo (Nuez y Prohens, 2008). El éxito de este cultivo es evidente. El tomate ha pasado de una dudosa aceptación en su llegada en Europa a ocupar en el presente el primer puesto entre los cultivos hortícolas, con una producción mundial que alcanzó los 129 millones de toneladas en 2007. Un 17.7% de la producción europea se cultiva en España (datos FAOSTAT, 2007).

## 1.2 Métodos de mejora en tomate y nuevas perspectivas.

Los protocolos tradicionales de mejora genética vegetal, basados en la selección fenotípica y prueba de descendencia, han sido muy efectivos en la mejora de la productividad y calidad del cultivo durante décadas pasadas (Duvick, 1986; Duvick,

1996; Warren, 1998). La explotación de la heterosis (Georgiev, 1991; Scott et al., 1998), y de la variabilidad extraespecífica, especialmente aquella relacionada con la resistencia a estreses bióticos y abióticos, han dado lugar al desarrollo de las variedades actuales (Nuez y Prohens, 2008). Para muchas características agronómicas deseables, como la resistencia a plagas y enfermedades, tolerancia a estreses abióticos y calidad del fruto, los genes responsables pueden encontrarse únicamente en fondos genéticos de especies silvestres relacionadas, teniendo que eliminar por retrocruzamientos las características no deseadas incorporadas junto con las de interés. Así, la duración media de un proyecto de mejora para un cultivo hortícola, desde la hibridación y selección de nuevas combinaciones genéticas a la prueba en campo e introducción en el mercado, es de entre diez y quince años (Foolad, 2007). La aplicación de nuevas herramientas biotecnológicas ofrece la posibilidad de dirigirse hacia nuevos objetivos técnicamente inalcanzables hasta no hace mucho (Nuez y Prohens, 2008) y en algunos casos, reducir el tiempo necesario para la consecución de los objetivos de manera considerable.

De las distintas herramientas biotecnológicas que pueden servir de apoyo a la mejora genética caben destacar los marcadores moleculares y distintas técnicas relacionadas con el cultivo *in vitro* de plantas como son la obtención de haploides, la transformación genética, el rescate de embriones y la hibridación somática.

Los marcadores moleculares han supuesto toda una revolución en la mejora genética y otros campos de investigación. En mejora vegetal pueden utilizarse con fines diversos como pueden ser la estimación de distancias genéticas entre genotipos y la selección de aquellos más útiles para generar híbridos; la distinción de variedades; el establecimiento de relaciones de parentesco y la selección asistida de genes o QTLs (Quantitative Trait Loci) asociados a caracteres de interés. En tomate, se dispone de marcadores de distinto tipo como son los RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism), AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphism), RAPDs (Randomly Amplified Polymorphic DNA), CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences), SSR (Short Sequence Repeat) y los desarrollados más recientemente SNP (Single Nucleotide Polymorphism) y COS (Conserved Ortholog Set). Todos estos marcadores están registrados en la base de datos de Solanáceas Sol Genomics Network (SGN

<http://solgenomics.net/>) de La Universidad de Cornell. Una revisión completa de las aplicaciones de los marcadores moleculares en la mejora vegetal se encuentra en Nuez y Carrillo (2000). Para una revisión de marcadores moleculares en tomate, ver Foolad y Sharma (2005).

Las técnicas biotecnológicas anteriormente mencionadas y relacionadas con el cultivo *in vitro* de plantas son herramientas muy útiles para la mejora vegetal. La obtención de plantas haploides nos permite obtener líneas puras (por duplicación cromosómica) de una manera casi-directa disminuyendo de manera drástica el tiempo requerido para ello por la vía tradicional. También es una herramienta de interés para el estudio de mutaciones y para generar poblaciones para el mapeo de genes. Por otra parte, la transformación genética permite la introducción de genes de cualquier fondo genético sin arrastrar el fondo genético del parental del que proceden y es también una herramienta muy poderosa para el estudio de la función génica. Finalmente, el rescate de embriones y la hibridación somática nos permiten superar ciertas barreras de incompatibilidad pudiendo aprovechar la variabilidad interespecífica que no es aprovechable por cruzamiento sexual. La aplicación de estas tecnologías depende de varios factores según el caso, pero en todas ellas existe un punto común que es la necesidad de regenerar plantas a partir de los explantes de partida. En el primer caso el explante mayoritariamente utilizado son las anteras; en el segundo, a partir de distintos materiales previamente infectados con *Agrobacterium* o bombardeados (cotiledones, hojas, etc.) y en el tercero, embriones o protoplastos fusionados.

En el caso particular de tomate el genotipo es uno de los factores que más influye en la capacidad regenerativa, no habiéndose conseguido todavía protocolos eficientes de regeneración de plantas a partir de tejidos haploides. No obstante, y debido a la importancia de la técnica se está trabajando para su consecución (Shtereva et al., 1998; Seguí-Simarro y Nuez, 2005). En la transformación genética, sin embargo, fue el tomate 'Flavr-Savr'<sup>TM</sup> de larga duración el primer cultivar transgénico aprobado. Desde entonces son muchos los trabajos de transformación de tomate realizados con fines diversos como el retraso de la maduración y ablandamiento del fruto (Hamilton et al., 1991; Smith et al., 1998), resistencia a estrés de tipo abiótico (Gisbert et al.,

2000; Cheng et al., 2009), resistencia a estreses de tipo biótico (Ultzen et al., 1995; Nervo et al., 2003; Thipyapong et al., 2006) etc. No obstante, en todos estos trabajos queda patente la escasa capacidad regenerativa de muchos cultivares que limitan la aplicación de la técnica que no ha podido ser aplicada de manera rutinaria ni en este cultivo ni en otros de importancia económica como el pimiento (Hamza y Chapeau, 1993; Frary y Earle, 1996; Peres et al., 2001). En cuanto al rescate y la hibridación de protoplastos en tomate, no se han utilizado con mucha frecuencia pero la capacidad regenerativa es todavía más limitante si cabe que en las técnicas anteriormente mencionadas.

### **1.3 La regeneración de plantas a partir de explantes y la regeneración en tomate.**

Como se ha comentado en el punto anterior La regeneración a partir de explantes es la base de partida para poder aplicar distintas tecnologías tales como: obtención de plantas haploides (Gresshoff y Doy, 1972; Zagorska et al., 1982, 1998; Chlyah y Taarji, 1984; Shtereva et al., 1998), la transformación genética (Lipucci Di Paolo et al., 1983; Plastira y Perdirakis, 1997), la propagación masal (Novak y Maskova, 1979; Padliskikh y Yarmishin, 1990; Fari et al., 1992; Izadpanah y Khosh Khui, 1992), la regeneración de híbridos somáticos (Sink et al., 1986; Wijbrandi et al., 1988), la regeneración de variantes y o mutantes *in vitro*, y el almacenamiento de germoplasma (Engelman, 1991). En los últimos años se ha producido un gran avance en el desarrollo de las técnicas de cultivo *in vitro*, que han sido ampliamente utilizadas en más de 1000 especies cultivadas. Sin embargo todavía existe mucho desconocimiento a cerca de qué factores determinan que la regeneración se produzca por una u otra vía morfogénica y cuantos genes están implicados en la determinación de la capacidad de regeneración.

En los siguientes apartados se pretende introducir qué es la morfogénesis y la importancia del genotipo en la regeneración a nivel general y de manera más concreta

la regeneración en tomate y los estudios realizados para estudiar la genética de la regeneración en esta especie.

### **1.3.1 La morfogénesis**

La morfogénesis se define como la capacidad para regenerar plantas a partir de una célula indiferenciada que es sometida a un estímulo y como consecuencia se reorganiza para desarrollar un meristemo (vía organogénica) o un embrión (vía embriogénica).

#### ***Vía organogénica.***

Durante la organogénesis *in vitro*, las células y tejidos vegetales pasan por tres discretos y experimentalmente distinguibles estados del desarrollo definidos como “competencia morfogenética”, “determinación del desarrollo” y “diferenciación morfológica” (Christianson y Warnick, 1983, 1984, 1985; Hicks, 1994; Lakshmanan et al., 1997). Las células competentes son sensibles a la inducción, siendo capaces de reconocer señales ambientales que alteren su estado del desarrollo. A continuación las células quedan determinadas y se dirigen a la diferenciación de órganos. Es comprensible que un desarrollo correcto es el producto de una expresión genética estrictamente regulada lograda por la transducción de señales ambientales e internas como la luz, los nutrientes y principalmente los reguladores de crecimiento, detectadas por las células y difundidas por una comunicación eficiente célula a célula. Está bien establecido que, auxinas y/o citoquininas, juegan un papel clave en el cultivo *in vitro*, y que su balance determina la respuesta morfogénica de los explantes. La activación de patrones específicos de expresión génica, como consecuencia de la activación hormonal, puede dar cuenta del establecimiento de las diferentes fases del desarrollo en la organogénesis *in vitro*. La obtención de marcadores moleculares para cada estado nos permitirá ahondar en la mejor comprensión del proceso (Torelli et al., 2004 b).

### ***Vía embriogénica.***

La embriogénesis somática es el proceso de obtener embriones a partir de tejidos vegetales somáticos, sin fusión de gametos. El proceso de inducción embrionaria resulta de un delicado balance entre citoquininas y auxinas en el tejido vegetal. Es pues un proceso tan natural como la embriogénesis zigótica, con casos tan conocidos como el de los cítricos, en los que ambos tipos de embriogénesis ocurren casi simultáneamente en el interior de la semilla.

Existen dos tipos de embriogénesis somática *in vitro*: directa e indirecta. La forma directa implica la existencia de células somáticas predeterminadas a seguir la vía embriogénica y las células del explante primario se desarrollan para formar embriones (ej. nucela de cítricos). La forma indirecta implica la necesidad de una inducción para que las células sigan la vía embriogénica, tras pasar por una fase proliferativa (callo) y cambiar su competencia a la expresión de embriogénesis. El proceso ocurre en dos etapas: En la primera fase células competentes aisladas en medios ricos en auxinas forman grupos de células embriogénicas (centros embriogénicos). En siguiente fase, una vez repicados los centros embriogénicos a un medio sin auxinas, estos proliferan de forma lenta e indiferenciada. Luego se producen una serie de rápidas y sucesivas divisiones celulares en distintas zonas del centro embriogénico y se conforman embriones globulares que se desarrollan hasta la maduración y germinación dando lugar a plantas completas (Ammirato, 1983).

### **1.3.2 Importancia del genotipo**

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

En el reino vegetal existe un amplio rango de capacidades regenerativas observándose en general, una muy limitada capacidad regenerativa en las gimnospermas (excepto en estadios juveniles). Por el contrario, en angiospermas la capacidad regenerativa es más elevada, observándose variaciones significativas entre variedades, especies y géneros, que indican un control genético del carácter. De hecho, diferencias en la respuesta organogénica y su herencia genética han sido

analizadas en algunos cultivos como el trigo, girasol, cebada, maíz, alfalfa, y arroz, entre otros (Henry et al., 1994; Flores Berrios et al., 1999, 2000; Fambrini et al., 2001).

### ***Genotipos recalcitrantes y pérdida de la capacidad regenerativa***

La recalcitrancia es la incapacidad de las células vegetales, tejidos y órganos para responder al manejo en cultivo *in vitro*, siendo éste el principal factor limitante en la explotación biotecnológica de ciertas especies de importancia económica (Benson, 2000). La recalcitrancia del cultivo de tejidos está influenciada principalmente por cuatro factores: el genotipo, el estado fisiológico de la planta dadora de tejidos, la fisiología asociada a estrés de la planta en cultivo *in vitro* y las manipulaciones realizadas *in vitro*. La mayor parte de esta recalcitrancia está genéticamente dirigida y por lo tanto es difícil el control de la misma mediante una manipulación ambiental y nutricional del cultivo (McCown, 2000).

A pesar del factor genotipo, la manipulación u optimización de los factores del cultivo *per se*, puede ser una aproximación importante para superar los problemas (Hall, 1999). Es importante considerar la elección del explante, los componentes del medio de cultivo y las condiciones ambientales de cultivo. El ajuste de las concentraciones de los reguladores de crecimiento para conseguir un balance adecuado en la inducción es muy importante para evitar posibles cambios epigenéticos y genéticos, que comprometan el crecimiento y desarrollo normal, resultando en problemas de recalcitrancia e inestabilidad genética (Harding, 1996). La producción de etileno por parte de los explantes cultivados también podría promover efectos de interacciones inhibitorias entre hormonas endógenas y exógenas y ha sido relacionada con la recalcitrancia en algunos casos. Para una revisión detallada de los factores de crecimiento y hormonas usadas en el cultivo *in vitro* ver Gaspar et al., (1996).

### **1.3.3. La regeneración en tomate**

Debido al valor comercial del cultivo y su susceptibilidad de futura mejora (Evans, 1989) son numerosos los estudios de regeneración realizados a partir de una amplia variedad de tejidos y órganos procedentes de germoplasma de especies silvestres y cultivadas (Padmanabhan et al., 1974; Cassells, 1979; Novak y Maskova, 1979; Ancora y Sree-Ramulu, 1981; Zapata et al., 1981).

#### ***Morfogénesis en tomate***

El modo principal de regeneración es por la vía organogénica y este puede conseguirse directamente (Padmanabdan et al., 1974; Ohki et al., 1978; Behki y Lesley, 1980; Zelcer et al., 1984; Tan et al., 1987; Garcia-Reina y Luque, 1988; Dwivedi et al., 1990; Compton y Veilleux, 1991) o indirectamente a través de una fase intermedia de callo que es originado por desdiferenciación de explantes foliares, radicales, cotiledonares o de hipocotilo (Meredith, 1979; Koornneef et al., 1987; Locky, 1983; Geetha et al., 1998). La inducción de embriones somáticos en tomate se ha conseguido a partir de protoplastos (Chen y Adachi, 1994), hipocotilos (Newman et al., 1996) y de plántulas intactas creciendo en medio que contenía una elevada concentración de citoquinina (Gill et al., 1995; Kaparakis y Anderson, 2002). Sin embargo, protocolos eficientes de propagación a gran escala en tomate mediante la embriogénesis somática no están todavía disponibles, a pesar de la reconocida importancia y utilidad de la embriogénesis somática y las semillas sintéticas para micropropagar híbridos F1 (Redenbaugh et al., 1989; Gill et al., 1995).

De los trabajos publicados puede concluirse que el éxito de la regeneración en tomate varía con los nutrientes del medio, la concentración y combinación de reguladores de crecimiento, los regímenes de luz y temperatura en la cámara de cultivo, el genotipo y el tipo de explante (El-Farash, 1993; Bhatia et al., 2004) por lo que la estandarización de condiciones para la regeneración de plantas *in vitro* sigue siendo un proceso empírico (Ruma Devi et al., 2008). Además, es bastante común la formación de regenerantes aberrantes ausentes de yema, defecto irreparable que detiene el desarrollo normal del tallo, bloquea el establecimiento de la planta y limita

la habilidad regenerativa de la planta. El hecho de que estas estructuras, que no conducen a la formación de planta, tengan una mayor incidencia en *S. lycopersicum* que en otras especies de *Solanum*, donde es insignificante, parece indicar una componente genética en la aparición de las mismas (Steinitz et al., 2006).

### ***Variabilidad intra e interespecífica***

Diferencias genotípicas en la competencia organogénica entre genotipos de *S. lycopersicum* y especies relacionadas se han descrito en condiciones de cultivo que incluían reguladores de crecimiento (Stommel y Sinden, 1991; Koornneef et al., 1993; Peres et al., 2001; Faria et al., 2002; El-Bakry, 2002; Pratta et al., 2003; Bhatia et al., 2004, 2005) y sin incluir reguladores en el cultivo (Pozueta-Romero et al., 2001; Steinitz et al., 2006). En general se considera que muchos de los cultivares de tomate, son recalcitrantes (Frankenberger et al., 1981 a, b; Kurtz y Lineberger, 1983; Lipucci Di Paolo et al., 1983; Davis et al., 1994; Plastira y Perdirakis, 1997) mientras que las especies silvestres relacionadas como *S. peruvianum* (Koornneef, 1987), *S. pennellii* (Gisbert et al., 1999), *S. chilense* (Takashina et al., 1998; Arrillaga et al., 2001) muestran mejores capacidades regenerativas. Existiendo en todos los casos diferencias dentro de especies. Así por ejemplo no todos los genotipos de *S. hirsutum* (Stommel y Sinden, 1991) y *S. pimpinellifolium* (Tal et al., 1977; Pratta et al., 1997) muestran una elevada capacidad regenerativa.

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

El problema de potenciar la capacidad de regeneración de las plantas recalcitrantes por control genético esta aún sin resolver (Takashina, 1998). Las hibridaciones interespecíficas han supuesto una alternativa a la introducción de los alelos de regeneración en los cultivares comerciales recalcitrantes de tomate a partir de las especies silvestres relacionadas. Así por ejemplo alelos de regeneración de *S. peruvianum* (Koornneef et al., 1987), *S. chilense* (Takashina et al., 1998) y *S. pimpinellifolium* (Faria & Illg, 1996) se han transferido a tomate por cruces y retrocruces convencionales y mediante fusión de protoplastos a partir de *S. peruvianum* (Wijbrandi et al., 1988).

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

En tomate se han realizado varios estudios para conocer la genética de la regeneración observándose la heredabilidad del carácter (Frankenberger et al., 1981 b; Koornneef et al. 1987) y la dominancia del mismo (Ohki et al., 1978; Kut y Evans, 1982; Adams y Quiros, 1985; Tan et al., 1987; Wijbrandi et al., 1988; Faria y Illg, 1996). En estos estudios se han utilizado distintas especies como fuentes de alelos que incrementarían la regeneración y distintos tipos de poblaciones para su estudio. En todos los trabajos excepto el de Marchionni Basté et al. (2007) que utilizan un cultivar de tomate con alta capacidad de regeneración y *S. pimpinellifolium* como receptor, se utilizan como parentales con alta capacidad de regeneración especies silvestres emparentadas con tomate. Así pues se ha utilizado *S. peruvianum* (Koornneef et al. 1987, 1993), *S. chilense* (Takashina et al., 1998; Satoh et al., 2000) y *S. pimpinellifolium* (Faria y Illg, 1996).

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

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

morfogenética, sin intervenir en la sensibilidad al tratamiento hormonal, ni la alteración de la homeostasis de citoquininas.

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

**Dada la gran importancia del genotipo en la regeneración, el objetivo principal de este trabajo sería incrementar el conocimiento de la base genética así como la localización de genes implicados en este proceso. En concreto, genes implicados en el proceso de regeneración por la vía organogénica que es la predominante en tomate.**

## 2. Material y métodos

### 2.1 Material vegetal

Se ha utilizado como parental masculino una accesión de *S. pennellii* (LA47) previamente caracterizada como muy organogénica (Gisbert et al., 1999) y una variedad de *S. lycopersicum* (anl27) de capacidad regenerativa muy baja (Gisbert et al., 2007). A partir de la autofecundación controlada de una planta F1 resultante del cruce anterior se ha obtenido la población F2 (106 individuos). La BC1 (100 individuos, 57 fenotipados) se ha obtenido cruzando el parental recalcitrante tomate y la F1 (anl27 x F1). En este trabajo consideraremos tomate como P1 y *S. pennellii* como P2.

Las plantas de las poblaciones estudiadas se mantienen *in vitro* en medio base MS (Murashige y Skoog (1962), 4.4 g/l de sales MS; 15 g/l de sacarosa, 6 g/l de plant agar) y se subcultivan a medio fresco cada 3/4 semanas. Tanto las plantas utilizadas como parentales en el cruce inicial (Las plantas de anl27 y *S. pennellii* LA47) como la planta F1 y las plantas F2 y BC1, se han clonado para disponer de material suficiente para realizar los ensayos. Las condiciones de de la cámara de crecimiento de las plantas son  $T^{\circ}= 25^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$  y humedad relativa del 60-70%.

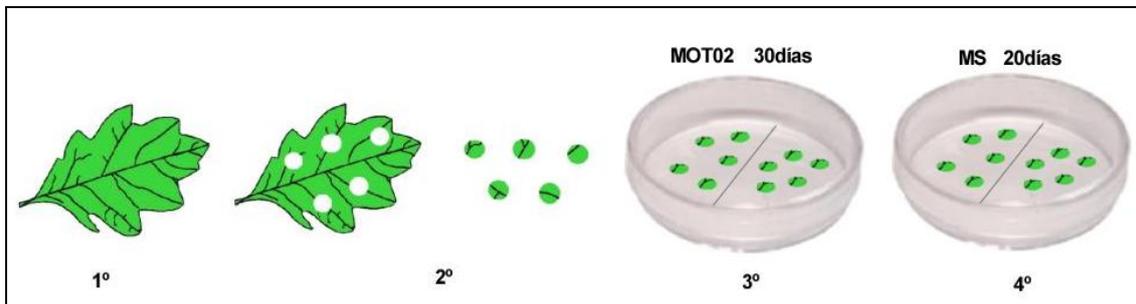
### 2.2 Fenotipado

#### 2.2.1 Ensayos preliminares

Los medios de cultivo utilizados para evaluar la respuesta en explantes de hoja y raíz en el ensayo de comparación de ambos tipos de explantes ha sido el medio MOT-02 y MOT-05: 4. 4 g/l de sales MS con vitaminas de Nitch; 30 g/l de sacarosa, 6 g/l de plant agar) medios de organogénesis de tomate con una concentración de zeatina de 0.2 mg/l y 0.5 mg/l, respectivamente. Los explantes de hoja (0.6-0.8 cm<sup>2</sup>) y de raíz (0.6-0.8 cm) se extrajeron de plantas cultivadas *in vitro* y se sembraron en placas a razón de 10 explantes por placa, con dos genotipos en cada placa. Se realizó el seguimiento visual de los explantes cultivados durante 60 días.

### 2.2.2 Análisis fenotípico de las poblaciones en estudio.

La capacidad de regeneración se ha evaluado en explantes de hoja de plantas clonadas *in vitro* mediante el procedimiento explicado a continuación y reflejado en la Figura 1. Cuando la planta ha alcanzado un tamaño aproximado de 9 cm en el tubo de vidrio, se extrae bajo campana de flujo laminar y se apoya sobre papel de filtro previamente esterilizado. A continuación se realiza un corte del brote principal y se subcultiva a medio MS fresco. A partir de las hojas que quedan en el papel se obtienen explantes de un tamaño de 0.6-0.8 cm<sup>2</sup>, con ayuda de un bisturí y unas pinzas previamente esterilizadas. Los explantes se depositan en una placa Petri (9x1.5cm) con medio de inducción MOT02 a razón de 10 explantes por placa (En cada placa 5 explantes de 2 genotipos diferentes), donde permanecen durante 30 días en la cámara de cultivo y posteriormente se subcultivan a placas Petri (9x2cm) con medio MS donde permanecen 20 días. Las condiciones de incubación son las equivalentes a las especificadas en 2.1.



**Figura 1.** Representación esquemática del ensayo de organogénesis en cuatro fases. 1º corte de las hojas. 2º corte de los explantes. 3º siembra de los explantes en medio de inducción MOT02 e incubación durante 30 días. 4º subcultivo de los explantes inducidos a medio base MS e incubación durante 20 días.

### 2.2.3 Variables estudiadas y variabilidad observada

Las variables estudiadas han sido:

- Porcentaje de explantes con yemas (PY):  $(\text{número de explantes con yemas} / \text{número total de explantes}) \times 100$ .
- Porcentaje de explantes con planta (PL):  $(\text{número de explantes con planta} / \text{número total de explantes}) \times 100$ .

-Productividad (PR): número total de plantas regeneradas/ número total de explantes

-Eficiencia de diferenciación (ED): número total de plantas regeneradas /número de explantes con planta.

A los 30 d de cultivo se obtuvo el dato de PY y a los 50 desde el inicio del cultivo se analizaron PL, PR y ED. Para los análisis de respuesta de las poblaciones P1, P2 y F1 se han utilizado 15 plantas clonadas para cada población, considerando cada una de ellas como un individuo de esa población. En la F2 se han analizado 102 plantas y en la BC1, 57 plantas. Para cada genotipo individual se han evaluado entre 10-20 explantes. Para observar la variabilidad en las distintas poblaciones, se ha calculado el promedio y la varianza para cada una de las variables estudiadas.

#### **2.2.4 Correlación entre variables**

Se analizó la correlación entre los distintos caracteres, empleando el coeficiente de correlación “r” utilizando el programa Statgraphics Plus 4.0.

#### **2.2.5 Distribución de los datos**

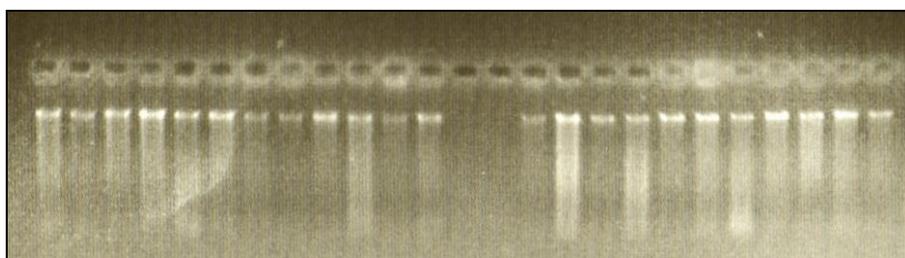
Los datos correspondientes a las variables PY y PL se han representado para las poblaciones P1, P2, F1, F2 y BC1, en un histograma en el que se representa en el eje de ordenadas el número de individuos, y en el de abscisas los intervalos de valor 10 , desde 0 a 100.

Los datos correspondientes a las variables PR y ED se han representado para las poblaciones P1, P2, F1, F2 y BC1, en un histograma en el que se representa en el eje de ordenadas el número de individuos, y en el de abscisas los intervalos de 0,5 desde 0 a 13.

## 2.3 Genotipado

### 2.3.1 Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN genómico se ha realizado mediante el protocolo estándar del bromuro del cetiltrimetilamonio (CTAB) a partir 0.1 g de tejido foliar fresco de plantas *in vitro*. La comprobación de la extracción se ha llevado a cabo en gel de Agarosa al 1%, que se ha teñido con bromuro de etidio (BrEt) y se ha visualizado en un transiluminador UV (Figura 2).



**Figura 2.** Gel de agarosa al 1% donde se observa la única banda correspondiente al ADN genómico

Mediante el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (NanoDrop Technologies, Inc.) se ha realizado la lectura espectrofotométrica de las muestras obtenidas registrando la concentración y pureza del ADN obtenido. Se ha prestado atención al cociente entre la absorbancia a 260 nm (bases púricas y pirimidínicas) y, la absorbancia a 280 nm (proteínas), el valor resultante refleja el estado de pureza del ADN. Un valor comprendido entre 1.8 – 2.0 indica que el ADN obtenido se encuentra libre de contaminantes celulares. Las muestras extraídas con valores por debajo de 1.8 se han desechado, dado que este valor indica contaminación con proteínas, fracciones de membranas o fenol, pudiendo dificultar las reacciones PCR. Finalmente todas las muestras de ADN genómico se han diluido con agua estéril hasta una concentración de 10ng/ $\mu$ l.

## 2.3.2 Marcadores moleculares. Polimorfismo

### ***Desarrollo de marcadores AFLPs***

La obtención de marcadores AFLPs se ha realizado siguiendo la metodología descrita por Vos y et al., (1995). Se han llevado a cabo 15 PCR selectivas utilizando 5 cebadores *Mse*I+3 y 6 cebadores *Eco*RI+3, marcados con los fluorocromos FAM (azul); NED (amarillo) y HEX (verde). Las combinaciones empleadas fueron las siguientes: *Mse*I CTA/*Eco*RI AAC, *Mse*I CAA/*Eco*RI ACC, *Mse*I CAA/*Eco*RI ACG , *Mse*I CAA/*Eco*RI AGC ,*Mse*I CAC/*Eco*RI ACA , *Mse*I CAC/*Eco*RI ACG , *Mse*I CAC/*Eco*RI AGC , *Mse*I CAA/*Eco*RI ACA ,*Mse*I CAA/*Eco*RI AAC , *Mse*I CTA/*Eco*RI AGC , *Mse*I CTC/*Eco*RI AGC , *Mse*I CCG/*Eco*RI AAC , *Mse*I CCG/*Eco*RI ACC , *Mse*I CCG/*Eco*RI ACG ,*Mse*I CTC/*Eco*RI AGG .Los productos de PCR amplificados se separaron mediante electroforesis capilar en un secuenciador automático ABI-Prism 3100 (Pelkin Elmer-Applied Biosystems). Los picos se han analizado utilizando el programa Genescan Analysis y se ha generado un gel virtual con el programa Genographer 1.6.0.

### ***Marcadores SSR***

#### *Marcadores utilizados*

Un total de 146 marcadores SSR se han ensayado para polimorfismo entre los parentales (P1, P2) de los cuales 85 SSR estaban previamente mapeados en tomate EXPEN-2000 (mapa realizado en base a 80 individuos F2 procedentes de cruce entre *S. lycopersicum* LA925 x *S. pennellii* LA716) y disponibles en *Solanaceae* Genomics Network (SGN: <http://solgenomics.net>). Por otra parte se utilizaron 61 marcadores SSR diseñados in silico, de los cuales 15 se diseñaron por el grupo y 46 se diseñaron por otros grupos del COMAV (Vilanova S; Julián O).

Para genotipar la población F2, se han utilizado 54 SSR polimórficos (Tabla 1)

**Tabla 1.** Marcadores SSR utilizados para genotipar la población F2.

Cromosoma	SSR
1	SSR92, SSR266, SSR316, SSR75, SSR222, SSR150, SSR288.
2	SSR586, SSR356, SSR5, SS26, CONDOR1 <sup>a</sup> , SSR2/139 <sup>b</sup> .
3	SSR22, SSR320, SR601, SSR3/30 <sup>c</sup> , SSR3/110 <sup>c</sup> .
4	SSR72, SSR593, SSR306, SSR214, SSR293, SSR4/71 <sup>b</sup> .
5	SSR325, SSR602, SSR115, SSR49, SSRB18031, SSR5/60 <sup>c</sup> .
6	SSR48, SSR578, SSR6/74 <sup>c</sup> .
7	SSR52, SSR304, COCA3 <sup>a</sup> , SSR7/73 <sup>c</sup> .
8	SSR15, SSR63, SSRB105694.
9	SSR73, SSR383, SSR599, CUSCO3 <sup>a</sup> .
10	SSR248, SSR85, SSR223, SSRB102358.
11	SSR136, SSR80, SSR46, SSR11/61 <sup>b</sup> .
12	INCA2 <sup>a</sup> , INCA5 <sup>a</sup> .

Sin letra SSRs del SNG, <sup>a</sup>Trujillo-Moya C, <sup>b</sup>Vilanova S, <sup>c</sup>Julián O.

### Desarrollo de marcadores SSR in silico

El diseño de 15 marcadores SSR in silico (Tabla 2) se ha realizado utilizando como base de partida el mapa físico del cromosoma de interés, disponible en SGN. A partir de los cromosomas artificiales bacterianos (BAC) secuenciados para el cromosoma elegido, se ha utilizado el programa on-line WEB SAT (<http://wsmartins.net/websat/>), para localizar los SSR presentes, seleccionando aquellos con un número mínimo de 6 repeticiones. Una vez localizado el SSR, se han diseñado los cebadores utilizando el programa on-line PRIMER 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>). Para ello se ha considerado: un porcentaje aproximado de guanina y citosina (GC) del 50%; una temperatura de anillamiento de los cebadores, (Ta), elevada entorno a 60 °C y se han evitado SSR cuyas secuencias flanqueantes son ricas en A y T. Finalmente se ha asegurado el anillamiento con un anclaje de GC (GC Clamp) que consiste en diseñar cebadores que comiencen por GC, lo cual proporciona un mejor anillamiento de los mismos.

Para diseñar los SSRs se seleccionó la repetición AT/TA en base a los resultados obtenidos por varios autores (Smulders et al., 1997; Areshchenkova y Ganal, 2002; Suliman-Pollatschek et al., 2002; He et al., 2003; Frary et al., 2005) que describen que los SSRs con repeticiones AT suelen presentar mayor polimorfismo en tomate.

**Tabla 2.** SSRs diseñados por el grupo.

Cr	SSR	SONDA <sup>a</sup>	Tomato Expen-2000 (cM)	Tamaño	Repetición	Cebador directo(5'-3')	Cebador reverso(5'-3')
2	CONDOR2	CT24	139,5	163	(AT)12	CCATACATGTTATAGGG AGGAGAG	CCTCTCCCATTTTGTTC
3	CUY1	T0482	137,0	152	(AT)24	CAAGTGATATATTGGG GAGCTG	GAACCTACATATCGTAGCCATC TTC
5	PISCO3	CLET-8- B23	10,0	201	(TAA)3(AT)18	AAGCATAGTATCACAAA GCTGACC	ATGGAAGCCACAACCAAATG
5	PISCO5	C2_At4g24 830	51,0	192	(AT)24	TCAATGTTAGGACTTTA GGGGTTC	AAAGCAGAGCCAGGTGAAAG
6	PUNO2	C2_At1g16 870	92,5	287	(AT)27	TATGCCCAATCGAACAC TTG	AGGAACAAACGGGCATTTAG
7	COCA3	T1329	43,0	247	(AT)23	GCAGCCAAATAGAAAT TGAAG	CACATGTTAAAAGTTGGTCAC
7	COCA4	C2_At3g15 290	63,5	250	(TA)29	AGATGTGGACCTCCTC GAC	TTCTCACCTAACCCAGTACCAC
9	CUSCO-2	cLPT-4-C24	0,0	414	(AT)37	TCCCCAATGAAGTCATT CAAC	GAAAGGTCAAGATTAGGGAAT GAG
9	CUSCO-3	T1519	90,0	254	(AT)37	GTCATGTTGTCTTGAT TCTCG	TCCCTTCTACCTTTTTGG
11	PERU4	TG46	76,0	312	(AT)25	TAAACGAATCGGGACA GAAC	CGTACACATCAAACTCAC C
11	PERU3	T1949	91,0	198	(AT)13	TGGACTCTCTCCAATA CTCACC	GAGTTTGTTCATGCAATGTGG
12	INCA5	C2_At4g03 280	12,5	227	(AT)22	CATCACAATCAGACCCC ACT	GGGGGTTTAAAATCCACCTT
12	INCA2	T1667	39,0	192	(TTA)26	ATTGCCACGTGGATTGA CTC	TGCAAGCTGTTCTTTTCAGAC
12	INCA7	T1266	71,0	236	(AT)35	CCTCGACATGACAAATC ACA	CAGAAATAGTGAATGGGATC A
12	INCA6	TG350	120,0	150	(AT)36	AAGATAGCTGGGCCTTT GGT	ACTCTCTCACACACGCACA

<sup>a</sup> Sonda que marca la posición del SSR en el mapa Tomato Expen-2000(Cm) disponible en Solanaceae Genomics Network (SGN:<http://solgenomics.net>).

### Condiciones de amplificación y visualización.

#### **Cebadores con cola M13**

Se han utilizado cebadores directos que llevan incorporada la cola M13 en la posición 5' (M13+Cebador= 5'-CACGACGTTGTAAAACGACC+Cebador 3').

El volumen total de reacción fue de 15 µl [10 ng de ADN genómico, 2 mM MgCl<sup>2</sup>, 200 µM dNTPs, 0.133 µM primer reverso y directo, 0.2 µM de cebador cola M13 marcada con fluorocromo IRDye700 ó IRDye800, 1.5 µl de tampón 10X de PCR (N.E.E.D) y 0.3 U de Taq ADN polimerasa (N.E.E.D)].

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Eppendorf 5333. Las condiciones de amplificación fueron un ciclo de 94 °C durante 3 min; seguido de 35 ciclos de amplificación con 30 s de desnaturalización a 94 °C, 45 s Ta (valor variable

dependiendo de la pareja de cebadores) y 1 min de extensión a 72 °C. Finalmente tras los 35 ciclos, 10 min de extensión a 72 °C.

Los productos de amplificación se han separado por electroforesis, en geles verticales de acrilamida utilizando un secuenciador LICOR 4300, que permite visualizar los fluorocromos IRDye700 ó IRDye800 por separado en en dos canales.

### ***Cebadores sin cola M13***

Para 9 marcadores cuyos cebadores directos no incorporan la cola M13 el volumen total de reacción fue de 23.32 µl [10 ng ADN genómico, 1.6 mM MgCl<sup>2</sup>, 171.52 µM dNTPs, 0.214 µM de primer reverso y directo, 2.5 µl of 10x PCR buffer (N.E.E.D) y 0.6 U Taq ADN polimerasa (N.E.E.D)].

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Eppendorf 5333. Las condiciones de amplificación fueron un ciclo de 94°C durante 3 min; seguido de 35 ciclos de amplificación con 45 s de desnaturalización a 94°C, 1 min 45 s Ta (varía dependiendo de la pareja de cebadores) y 45 s de extensión a 72 °C. Finalmente tras los 35 ciclos, 30 min de extensión a 72 °C.

Los productos de amplificación se han separado por electroforesis en gel de agarosa al 1 o 2 % (depende del tamaño de bandas del marcador), en Buffer TAE 1x a 100V. Finalmente se ha teñido con BrEt y visualizado en un transiluminador UV.

### ***Marcadores COS y COSII***

#### *Marcadores utilizados*

Se han ensayado 2 marcadores COS y 17 marcadores COSII (segunda generación de marcadores COS), previamente mapeados en tomate y disponibles en el mapa EXPEN-2000 de SGN, para detectar posible polimorfismo entre los parentales P1 y P2. Dada la complejidad de los nombres de algunos marcadores se ha optado por su codificación (Tabla 10, en resultados). También se ha ensayado el marcador gHS descrito en Lim et al., (2008).

Para genotipar la población F2 se han utilizado 1 COS y 9 COSII polimórficos (Tabla 3).

**Tabla 3.** Marcadores COS y COSII utilizados para genotipar la población F2.

Cromosoma	COS	COSII
3		COSII3.1
7	T1651	COSII7.3, COSII7.4, COSII7.5, At1g17201, COSII7.6.3, COSII7.8, COSII7.9, COSII7.12

Condiciones de amplificación, digestión y visualización.

El volumen de reacción fue de 12 µl [10 ng ADN genómico, 1.5 mM MgCl<sup>2</sup>, 200 µM dNTPs, 0.25 µM primer reverso y directo, 1.2 µl of 10x PCR buffer (N.E.E.D) y 0.3 U Taq ADN polimerasa (N.E.E.D)]. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Eppendorf 5333. Las condiciones de amplificación fueron un ciclo de 94 °C durante 5 min; seguido de 35 ciclos de amplificación con 30 s de desnaturalización a 94 °C, 1 min de Ta (varía dependiendo de la pareja de cebadores) y 2 min de extensión a 72 °C. Finalmente tras los 35 ciclos, 10 min de extensión a 72 °C. A continuación, el protocolo de digestión para la enzima de restricción utilizada, en los casos necesarios, fue el indicado por la casa comercial Fermentas.

Los productos de amplificación y/o digestión se han separado por electroforesis en gel de agarosa al 1 o 2 % (depende del tamaño de bandas del marcador), en Buffer TAE 1x a 100V. Finalmente se ha teñido con BrEt y visualizado en un transiluminador UV.

### 2.3.3 Mapa de ligamiento

Los grupos de ligamiento se han obtenido utilizando el software JOINMAP 3.0 (Van Ooijen y Voorrips, 2001) a partir de un total de 236 Marcadores (172 AFLP+ 54 SSR + 1 COS + 9 COSII) .Las distancias genéticas se han calculado usando la función de mapeo de Kosambi (Kosambi, 1944) con un valor de LOD de 3.0.

En primer lugar se han realizado grupos de ligamiento con los marcadores codominantes: SSRs, COS y COSII. Posteriormente se ha fijado la posición de los mismos para añadir los marcadores dominantes: AFLPs.



respectivamente.  $\alpha$  y  $\beta$  son coeficientes que dependen de las generaciones tal como se muestra en la matriz siguiente:

$$\begin{pmatrix} \overline{P1} \\ \overline{P2} \\ \overline{F1} \\ \overline{F2} \\ \overline{BC1} \\ \overline{BC2} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 1 & -1 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 1 \\ 1 & 0 & 1/2 & 0 & 0 & 1/4 \\ 1 & 1/2 & 1/2 & 1/4 & 1/4 & 1/4 \\ 1 & -1/2 & 1/2 & 1/4 & -1/4 & 1/4 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} [m] \\ [d] \\ [h] \\ [i] \\ [j] \\ [k] \end{pmatrix}$$

Dado que las varianzas dentro de cada generación no eran iguales, el análisis se realizó utilizando la inversa de la varianza, ponderación comúnmente utilizada (Mather y Jinks, 1971). En este análisis se utilizó la técnica de regresión múltiple progresiva, y se eligió el modelo que mejor se ajustara a los datos. La bondad de ajuste del modelo fue determinada mediante una prueba de  $\chi^2$  ponderada (Cavalli, 1952). La técnica de regresión de mínimos cuadrados ponderada permitió la estimación de los parámetros [m], [d] y [h] del modelo.

Los componentes de la varianza, E, D y H representan la varianza ambiental y las varianzas aditiva y dominante, respectivamente. Fueron estimadas de la siguiente manera:

$$E = \frac{1}{4}V_{P1} + \frac{1}{4}V_{P2} + \frac{1}{2}V_{F1}$$

$$D = 4V_{F2} - 2(V_{BC1} + V_{BC2})$$

$$H = 4(V_{BC1} + V_{BC2} - V_{F2} - E)$$

donde  $V_{P1}$ ,  $V_{P2}$ ,  $V_{F1}$ ,  $V_{BC1}$  y  $V_{BC2}$  son las varianzas de los parentales y las generaciones F1, F2 y retrocruzamientos.

Las heredabilidades en sentido amplio (sa) y en sentido estricto (se) fueron estimadas al nivel de la generación F2 mediante las siguientes fórmulas (Warner, 1952):

$$h_{sa}^2 = \frac{\frac{1}{2}D + \frac{1}{4}H}{\frac{1}{2}D + \frac{1}{4}H + E} \qquad h_{se}^2 = \frac{\frac{1}{2}D}{\frac{1}{2}D + \frac{1}{4}H + E}$$

El número de factores segregantes efectivos en las diferentes generaciones, es decir, el número de genes que controla un carácter dado, fue estimado por cuatro métodos. Estos métodos están basados en varias combinaciones de las varianzas observadas de los parentales, F1, F2 y retrocruzamientos:

$$a) \quad n_1 = \frac{[d]^2}{D}$$

Donde [d] es la estimación del efecto aditivo (Mather y Jinks, 1971);

$$b) \quad n_2 = \frac{(\overline{P1} - \overline{P2})^2}{8(V_{F2} - E)}$$

Donde  $(\overline{P1} - \overline{P2})$  es la diferencia entre las medias observadas de los parentales (Wright, 1968);

$$c) \quad n_3 = n_2 \times (1.5 - 2h'[1 - h'])$$

Donde  $h'$  es el "ratio" de dominancia= [h]/[d] (Wright, 1968);

$$d) \quad n_4 = \frac{(\overline{P1} - \overline{P2})^2}{8[2V_{F2} - (V_{BCr} + V_{BCs})]}$$

Donde  $(\overline{P1} - \overline{P2})$  es la diferencia entre las medias observadas de los parentales (Wright, 1968);

### 2.4.2 Análisis cualitativo

Se ha realizado una separación en clases (escasa capacidad regenerativa y alta capacidad regenerativa) mediante el siguiente procedimiento:

PY: 0-50%(anl27), 50-100%(LA47+F1)

PL: 0-50%(anl27), 50-100%(LA47+F1)

PR: 0-1 (anl27), >1 (F1+LA47)

Posteriormente se han analizado los individuos observados para PY, PL y PR y los esperados suponiendo un carácter monogénico utilizando el test  $\chi^2$ .

Finalmente, se han utilizado los grupos de ligamiento generados en JOINMAP 3.0, para realizar el análisis de la cosegregación de los marcadores moleculares utilizados en el genotipado y las variables del fenotipado relacionadas con el carácter de interés.

### **2.4.3 Análisis cuantitativo**

A partir de los grupos de ligamiento generados en JOINMAP 3.0 y los valores obtenidos para las variables estudiadas PY, PL, PR y ED, se ha realizado un mapeo de QTL mediante las opciones Kruskal Wallis y Mapeo de Intervalos del software MapQTL (Van Ooijen, 2009), previo test de permutación, en el último de éstos; usando 100 permutaciones para establecer un umbral de LOD significativo.

## **3. Resultados y discusión**

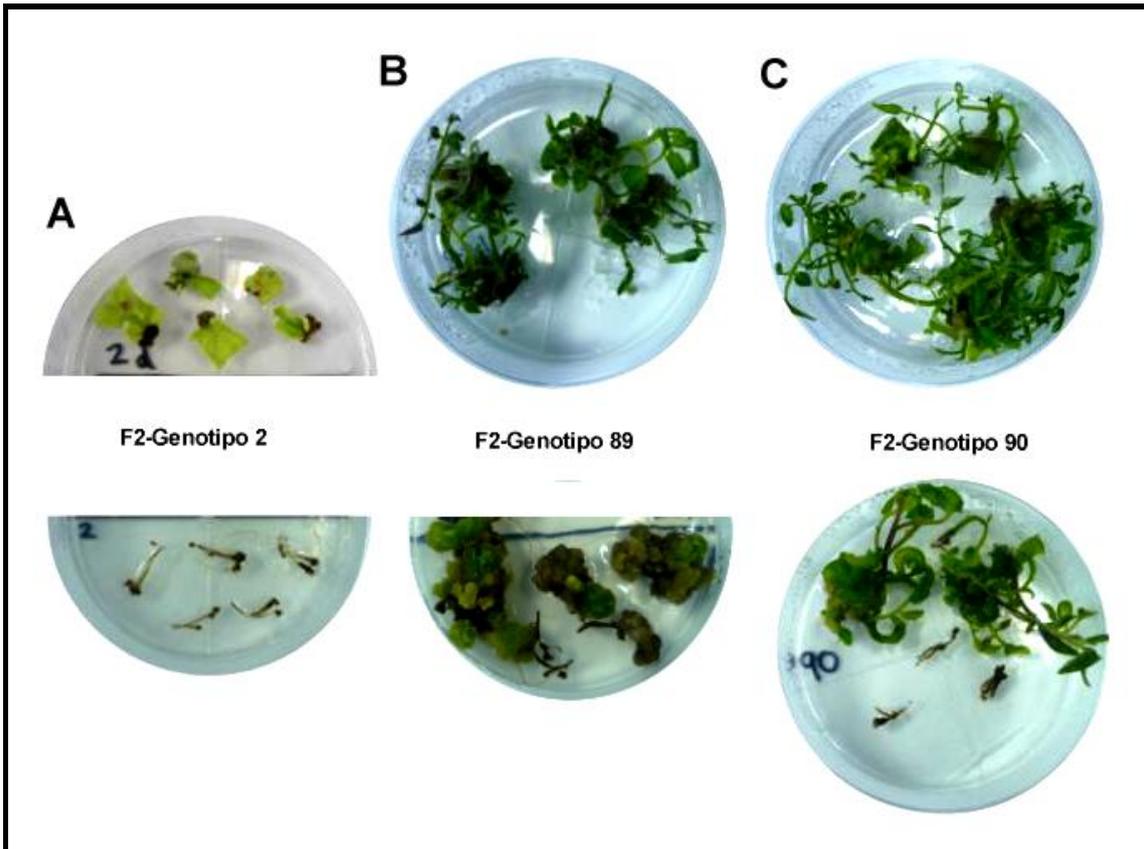
### **3.1 Fenotipado**

#### **3.1.1 Ensayos preliminares**

En un ensayo previo a este trabajo se seleccionó la concentración de regulador de crecimiento a utilizar para llevar a cabo el fenotipado (Gisbert et al., 2007). Para ello, se evaluó la respuesta de una muestra de plantas F2 en medio de cultivo con tres concentraciones del regulador de crecimiento zeatina (0.1, 0.2 y 0.5 mg/l), seleccionándose la concentración 0.2 como aquella suficiente para inducir una respuesta adecuada. Una concentración excesiva de regulador puede conducir a la malformación de las yemas. Este experimento preliminar también nos permitió observar la segregación del carácter y determinar los tiempos de lectura de las variables en estudio.

Otro estudio preliminar previo al fenotipado en el medio seleccionado ha sido la comparación de la respuesta regenerativa en explantes de hoja y en explantes de raíz, utilizando una muestra de plantas F2. El primer tipo de explante fue utilizado por Gisbert et al., (2007) para evaluar la respuesta regenerativa en distintos cultivares de tomate en distintos medios de cultivo, mientras que los explantes de raíz se han ensayado por ser los más utilizados en los estudios de genética de la regeneración en tomate (Koorneef et al., 1993; Takashina et al., 1998; Satoh et al., 2000). La respuesta obtenida en explantes de raíz en nuestros materiales fue poco uniforme, principalmente debido a la oxidación que se producía en algunos de ellos. Por una parte, plantas con escasa o nula regeneración en hojas no mostraban regeneración ni formación de callo en raíz (Figura 4-A), lo que indica una elevada correlación en la respuesta en los dos tipos de explante. Así mismo, en otros genotipos que si regeneraban en el test de hoja, se observaban callos verdes o incluso plantas en los explantes de raíz (Figura 4-B). Sin embargo, en muchos casos estos explantes ennegrecían como consecuencia del estrés oxidativo y no producían plantas (Figura 4 C). Estos resultados sugerían que no era adecuado emplear los explantes de raíz para

el fenotipado de la población definitiva. La respuesta en explantes de hoja mostraba también cierta variabilidad dentro de un mismo genotipo, pero en general, los de alta capacidad mostraban una respuesta cercana al 100% de respuesta, encontrándose en el otro extremo genotipos de respuesta prácticamente nula. Por ello, consideramos el explante de hoja más adecuado para llevar a cabo el fenotipado de las poblaciones en estudio.

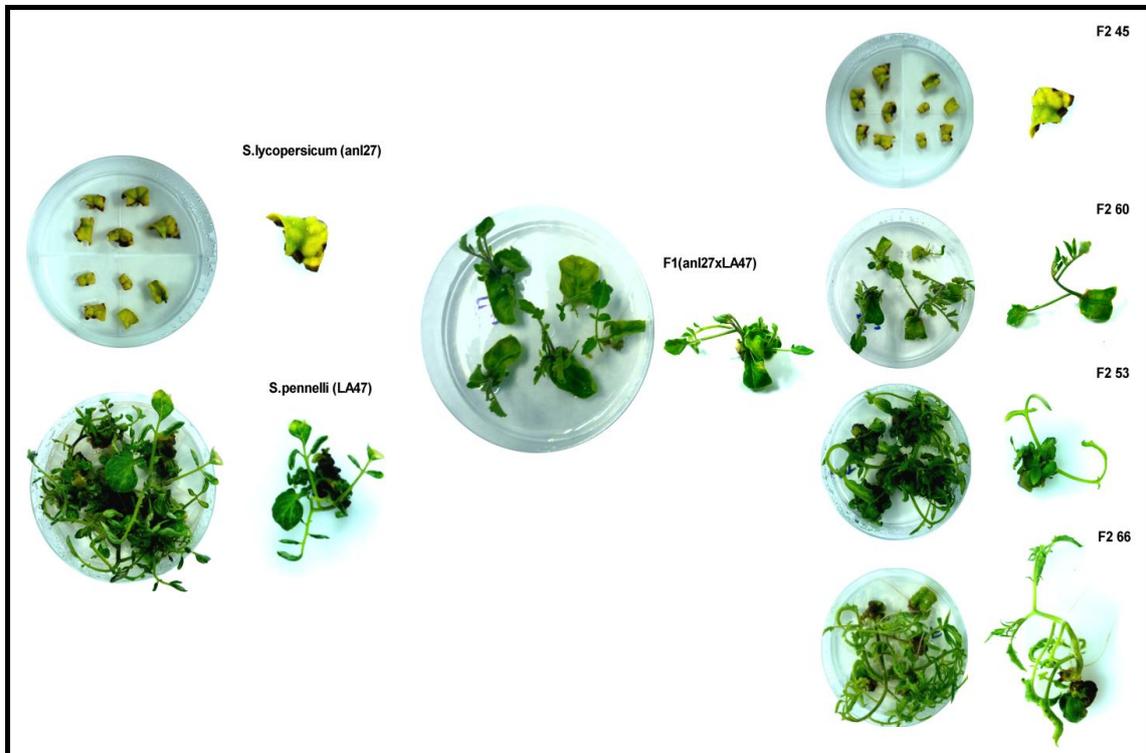


**Figura 4.** Respuesta organogénica obtenida para un mismo genotipo en explantes de raíz (placa Petri inferior) y en explantes de hoja (placa Petri superior). A) F2-Genotipo 2, con nula regeneración en hoja y raíz, muestra una elevada correlación en la respuesta para los dos tipos de explante. B) F2-Genotipo 89, con capacidad regenerativa elevada en el test de hoja, muestra callos verdes o incluso plantas en explantes de raíz. C) F2-Genotipo 90, con capacidad regenerativa elevada en el test de hoja, para raíz no muestra todo su potencial, en muchos casos estos explantes ennegrecen como consecuencia del estrés oxidativo y no producen plantas.

### 3.1.2 Variables estudiadas y variabilidad observada

La evaluación de la capacidad de regeneración se realizó cultivando explantes de hoja en medio de cultivo MOT-02. Los explantes se obtuvieron a partir de planta clonada y mantenida *in vitro*. Como puede observarse en la Figura 5 la capacidad de regeneración en el parental tomate (P1) es prácticamente nula mientras que en el

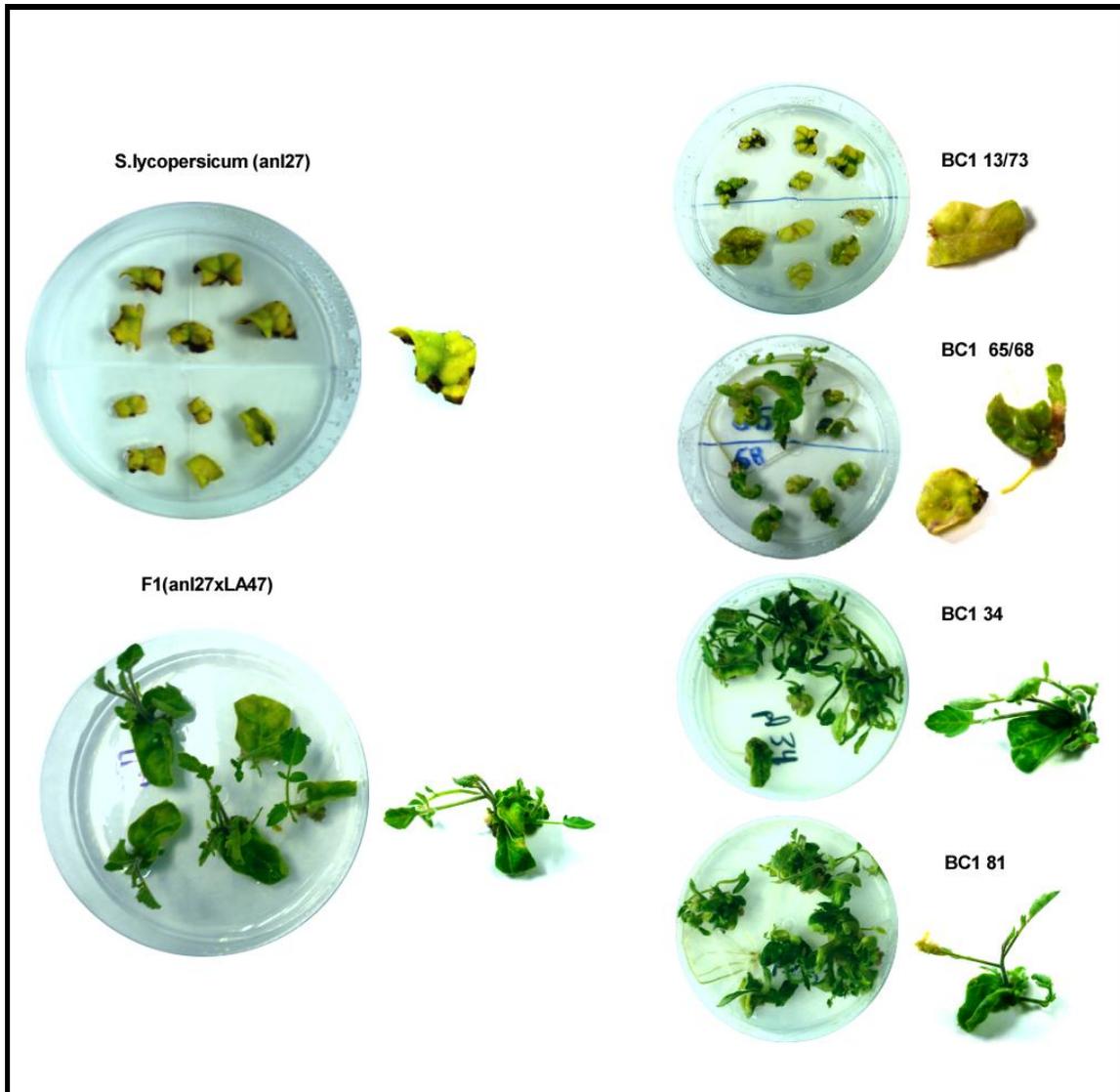
parental *S. pennellii* (P2) es muy elevada; la generación F1 muestra una alta capacidad regenerativa y se observa segregación para el carácter capacidad de regeneración en las poblaciones F2 (Figura 5) y BC1 (Figura 6).



**Figura 5.** Cruce entre parentales *S. lycopersicum* (anl27), capacidad regenerativa baja, y *S. pennellii* (LA47), capacidad regenerativa muy elevada. La generación F1 (anl27 X LA47) muestra una alta capacidad regenerativa. La F2 (F1XF1), muestra segregación para el carácter capacidad de regeneración.

La capacidad regenerativa se ha estudiado mediante 4 caracteres que evalúan la capacidad para formar yemas y el desarrollo de las mismas en plantas. En concreto, se ha medido el porcentaje de explantes con yemas (PY), el porcentaje de explantes con plantas (PL), el número medio de plantas por explante total, que hemos llamado productividad (PR), calculado como el número total de plantas/número total de explantes, y el número medio de plantas por explante con plantas que sería la eficiencia de diferenciación (ED), calculado como el número total de plantas/número total de explantes con plantas. La productividad nos indica al iniciar un experimento cuantas plantas se espera obtener en función del número de explantes cultivados, la ED nos estaría indicando si en aquellos explantes en los que se ha inducido la respuesta, el número de plantas diferenciadas es igual o no lo es, es decir dentro de una misma población si existen diferencias en cuando al número de plantas

diferenciadas entre los individuos estudiados. Según los resultados obtenidos en los estudios previos el PY se evaluó a los 30 días y PR, PL y ED 50 d tras la inducción.



**Figura 6.** Cruce entre el parental *S. lycopersicum* (anl27), capacidad regenerativa baja, y la generación F1 (anl27 X LA47), capacidad regenerativa alta. La generación BC1 (anl27 X F1) muestra segregación para el carácter capacidad de regeneración.

Para cada una de las poblaciones parentales, y la generación F1 se analizaron 15 plantas, obtenidas mediante propagación vegetativa de la misma planta parental, es decir son clones de una única planta. En las generaciones segregantes F2 y BC1 también se obtuvieron clones de cada planta individual analizándose un total de 102 genotipos en la F2 y de 57 genotipos en la BC1. Para cada genotipo individual se han evaluado entre 10-20 explantes.

En la Tabla 4 pueden observarse los valores medios y las varianzas para cada una de estas variables. Las generaciones P1, P2 y F1, presentan valores de varianza inferiores a las de las poblaciones segregantes para los caracteres PY y PL, lo cual es lógico puesto que se trata de generaciones genéticamente homogéneas. Un promedio de la varianza obtenida en estas poblaciones parentales nos daría una estima de la varianza ambiental en cada carácter. De hecho, la capacidad de regeneración está influenciada, además de por los factores ambientales principales (temperatura, humedad y luminosidad ambiental), por el tamaño del explante y las condiciones fisiológicas de las plantas de partida (Bhatia et al., 2004). Aunque se intenta que estas condiciones sean lo más homogéneas posibles se producen oscilaciones que repercuten en la inducción/manifestación del carácter. Un ejemplo de la variabilidad obtenida dentro de genotipo puede observarse en la Figura 7. Para los caracteres PR y ED la varianza del parental *S. pennellii* es mucho mayor que la del resto de generaciones segregantes y comparable a la de la población F2.

**Tabla 4.** Valores medios y varianzas para las variables de estudio PY, PL, PR y ED, en las poblaciones P1, P2, F1, F2 y BC1.

POBLACIONES	PY		PL		PR		ED	
	Media	Varianza	Media	Varianza	Media	Varianza	Media	Varianza
P1 (tomate)	16	4.1	6.66	1.5	0,08	0.38	0.267	0.352
P2 <i>(S. pennellii)</i>	99	0.3	97	0.5	7,06	6.24	7.83	4.239
F1	96	0.8	86	2.0	3,27	0.80	3.307	1.114
F2	76.91	934.99	63.92	1112.70	2.66	6.09	3.356	5.357
BC1	61.63	1102.84	42.77	888,33	0.99	0,85	1.729	1.118



**Figura 7.** Variabilidad en explantes organogénicos procedentes del mismo genotipo F1 muestran la influencia ambiental de los caracteres estudiados.

### 3.1.3 Correlación entre variables

Las variables estudiadas están muy correlacionadas entre sí (Tabla 5). Las correlaciones más altas se obtienen entre PY y PL, entre 0.88 y 0.91 en ambas poblaciones. Así mismo, las correlaciones entre PR y ED son elevadas, entre 0.87 y 0.95. Está claro que estos dos grupos de caracteres presentan un tipo de variación similar en las dos poblaciones segregantes estudiadas. Las correlaciones, aunque significativas y positivas, bajan cuando se comparan ambos grupos de caracteres, variando entre 0.59 y 0,9. En general, las correlaciones son mayores en la población BC1, población genéticamente más uniforme.

**Tabla 5.** Correlaciones entre las variables de estudio PY, PL, PR y ED para las poblaciones F2 y BC1.

Población/Variable	PY		PL		PR		ED	
	F2	BC1	F2	BC1	F2	BC1	F2	BC1
PY	-		0.883	0.917	0.597	0.787	0.566	0.721
PL			-		0.738	0.901	0.664	0.786
PR					-		0.959	0.876
ED							-	

F2(n=102) BC1(n=57). El nivel de significación en todos los casos ha sido 0.000

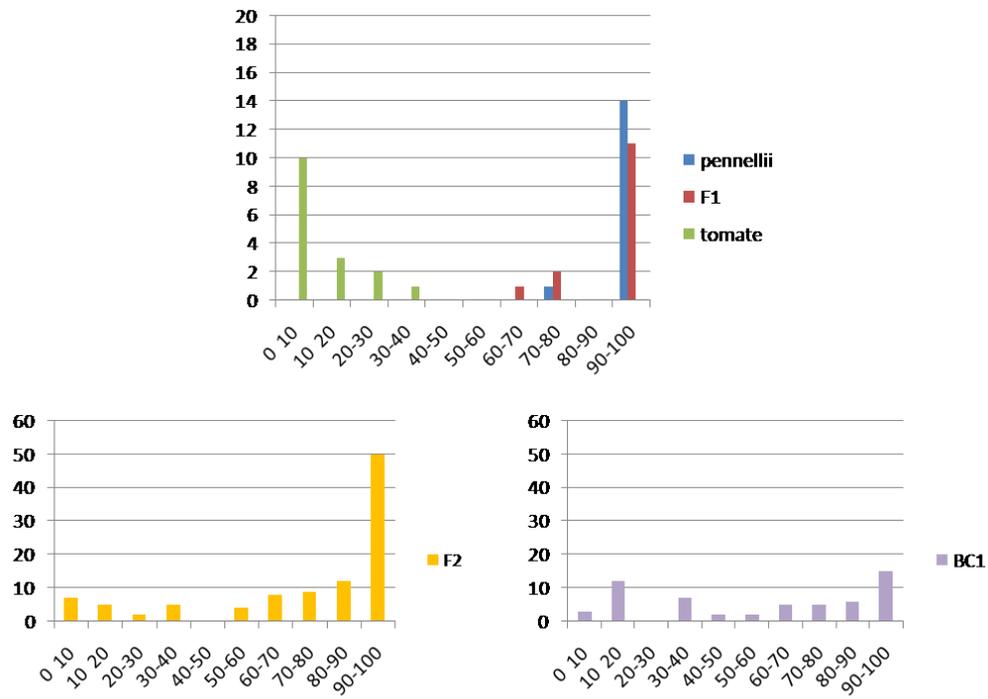
### 3.1.4 Distribución de los datos

Se construyeron histogramas de frecuencias para cada una de las generaciones y para carácter estudiado (Figuras 8 y 9). Como puede observarse las poblaciones P1 y P2 muestran valores extremos para los caracteres en estudio. El parental P1 (tomate), presenta una capacidad de regeneración muy escasa, mientras que el parental P2 (*S. pennellii*) desarrolla una elevada capacidad de regeneración.

Los cuatro caracteres estudiados pueden agruparse en dos grupos según el tipo de distribución de la variación. Como se ha sugerido anteriormente PY y PL presentan una distribución similar (Figura 8 A y B). Con la población F1 más cercana al parental *S. pennellii*, lo que sugiere dominancia de la elevada capacidad de regeneración. Se ha descrito dominancia para este carácter en otros estudios realizados en tomate utilizando otras fuentes silvestres (Koorneef et al., 1987, Faria y Illg, 1996). La ausencia de solape entre las poblaciones F1 y P2 con P1 y la estructura aparentemente bimodal de las poblaciones F2 y BC1 parece sugerir la existencia de un control genético sencillo de estos caracteres, lo que se estudiará posteriormente. De hecho las plantas podrían agruparse en dos clases: aquellas plantas con un porcentaje igual o inferior al 50% de explantes con yemas o plantas, y aquellas con un porcentaje mayor. El primer grupo se distribuye en un rango de respuesta similar al del parental tomate y el segundo, se distribuye en el rango de respuesta de la F1 y *S. pennellii*.

Los caracteres relacionados con el número de plantas PR y ED presentan una distribución diferente, con una importante variabilidad en los parentales, una distribución intermedia de la F1 entre ambos parentales, con solape entre generaciones y una distribución continua de las poblaciones segregantes F2 y BC1 (Figura 9 A y B), lo que estaría sugiriendo un fuerte efecto ambiental, herencia intermedia y/o control poligénico.

A) PORCENTAJE DE EXPLANTES CON YEMAS (PY)



B) PORCENTAJE DE EXPLANTES CON PLANTAS (PL)

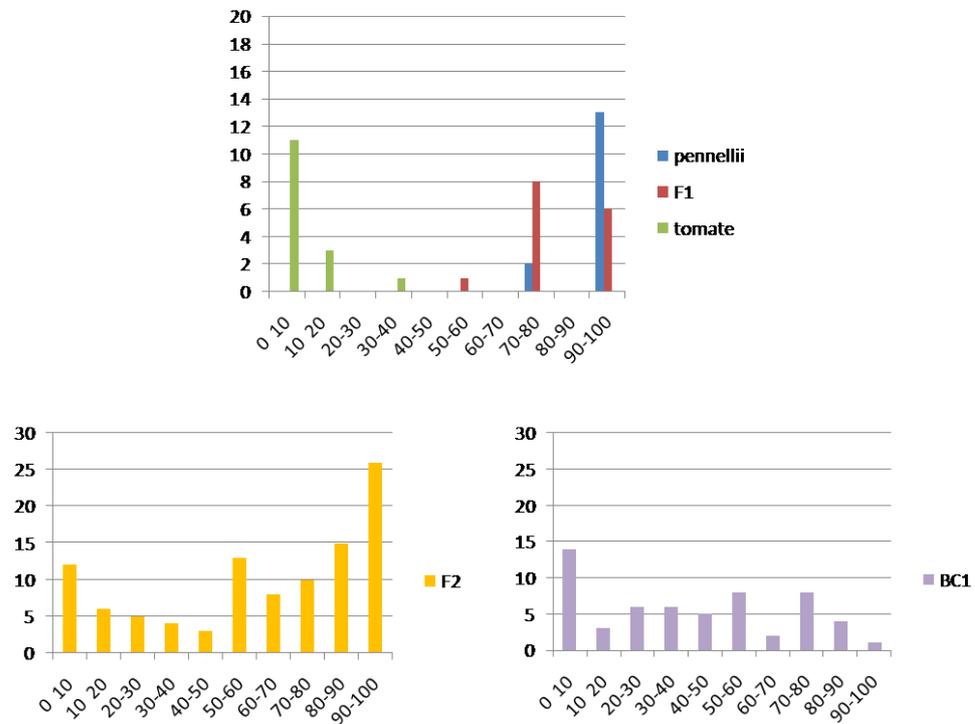
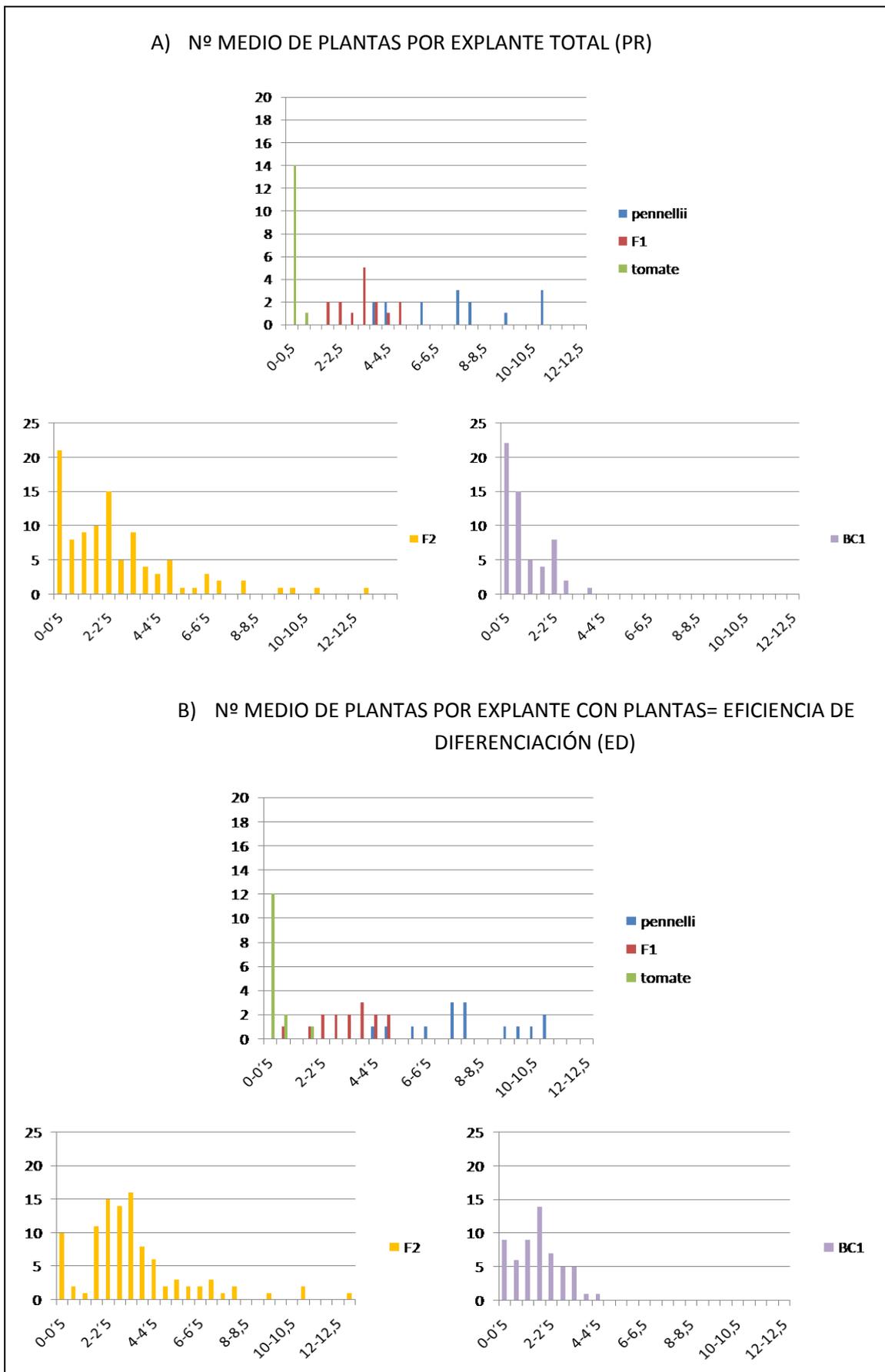


Figura 8. A) Histograma de frecuencias del carácter PY para cada una de las generaciones (P1, P2, F1, F2, BC1).  
 B) Histograma de frecuencias del carácter PL para cada una de las generaciones (P1, P2, F1, F2, BC1).



**Figura 9.** A) Histograma de frecuencias del carácter PR para cada una de las generaciones (P1, P2, F1, F2, BC1). B) Histograma de frecuencias del carácter ED para cada una de las generaciones (P1, P2, F1, F2, BC1).

## 3.2 Genotipado

### 3.2.1 Marcadores moleculares. Polimorfismo.

Para llevar a cabo el genotipado de las poblaciones en estudio se han utilizado distintos tipos de marcadores moleculares: AFLPs, SSR, COS Y COSII.

#### ***Desarrollo de marcadores AFLPS***

Para las 15 combinaciones de cebadores empleadas en la PCR selectiva, se identificaron 172 bandas polimórficas (Tabla 6) con un promedio de 11 bandas polimórficas por combinación. El tamaño de banda abarcó el rango de 61pb-441pb, estando el 61% de bandas polimórficas comprendido entre 61pb-250pb. Las combinaciones que proporcionaron un mayor número de bandas polimórficas fueron *MseI* CTA/*EcoRI* AAC y *MseI* CAA/*EcoRI* ACA, con un total de 19. Estas combinaciones se incluirán para genotipar la población BC1. En la Figura 10 se representa la visualización de las bandas en el programa Genographer 1.6.0.

**Tabla 6.** Listado de AFLPs polimórficos obtenidos, tamaño (pb) y nomenclatura asignada.

<i>MseI</i> CTA- <i>EcoRI</i> AAC		<i>MseI</i> CAA- <i>EcoRI</i> ACA		<i>MseI</i> CAC- <i>EcoRI</i> ACA	
Nombre	Tamaño	Nombre	Tamaño	Nombre	Tamaño
12	85	109	61	95	76
19	151	110	68	92	98
11	159	111	79	91	105
10	167	112	133	90	113
18	176	113	138	89	199
9	188	127	182	93	203
8	191	114	211	88	209
7	209	115	231	87	238
6	214	116	233	86	246
5	238	126	250	85	346
4	261	125	251	84	348
17	283	117	256	83	367
16	284	118	270	82	390
15	286	124	290	81	393
14	305	119	294	80	441
3	318	120	300		
2	328	121	316		

1	359	123	401		
13	374	122	425		
<b>Msel CAA-EcoRI ACC</b>		<b>Msel CAC-EcoRI ACG</b>		<b>Msel CCG-EcoRI AAC</b>	
Nombre	Tamaño	Nombre	Tamaño	Nombre	Tamaño
33	133	75	83	149	68
60	138	74	85	148	92
59	182	72	116	147	95
58	233	71	122	146	115
34	250	70	127	145	126
35	256	69	136	144	183
57	270	68	143	143	230
36	290	67	158	142	245
37	294	66	172	141	247
38	300	65	195	140	273
47	316	64	217	139	377
48	316	63	230	138	387
56	322	62	231		
39	402	61	244		
40	425				
<b>Msel CAA-EcoRI ACG</b>		<b>Msel CAA-EcoRI AGC</b>		<b>Msel CTC-EcoRIAGG</b>	
Nombre	Tamaño	Nombre	Tamaño	Nombre	Tamaño
20	70	30	85	159	78
21	73	31	99	158	83
22	79	46	217	157	90
23	142	45	230	156	133
24	157	55	260	155	138
25	194	44	266	154	153
26	204	43	269	153	201
27	219	54	271	152	213
51	321	42	276	151	277
50	333	32	360	150	401
28	336	41	374		
29	368	53	386		
49	390	52	410		
<b>Msel CAC-EcoRI AGC</b>		<b>Msel CCG-EcoRI ACG</b>		<b>Msel CAA-EcoRI AAC</b>	
Nombre	Tamaño	Nombre	Tamaño	Nombre	Tamaño
79	84	165	102	98	73
78	112	164	124	99	119
97	126	163	143	100	141
77	205	162	192	101	236
76	236	161	281	128	254
94	246	160	319		

96		299			
<i>MseI</i> CCG- <i>EcoRI</i> ACC		<i>MseI</i> CTA- <i>EcoRI</i> AGC		<i>MseI</i> CTC- <i>EcoRI</i> AGC	
Nombre	Tamaño	Nombre	Tamaño	Nombre	Tamaño
173	61	102	136	137	84
172	88	103	141	136	152
171	120	104	149	135	209
170	239	105	176	134	231
169	252	106	187	133	332
168	310	107	331	132	355
167	342	108	340	131	380
166	430	129	384	130	385

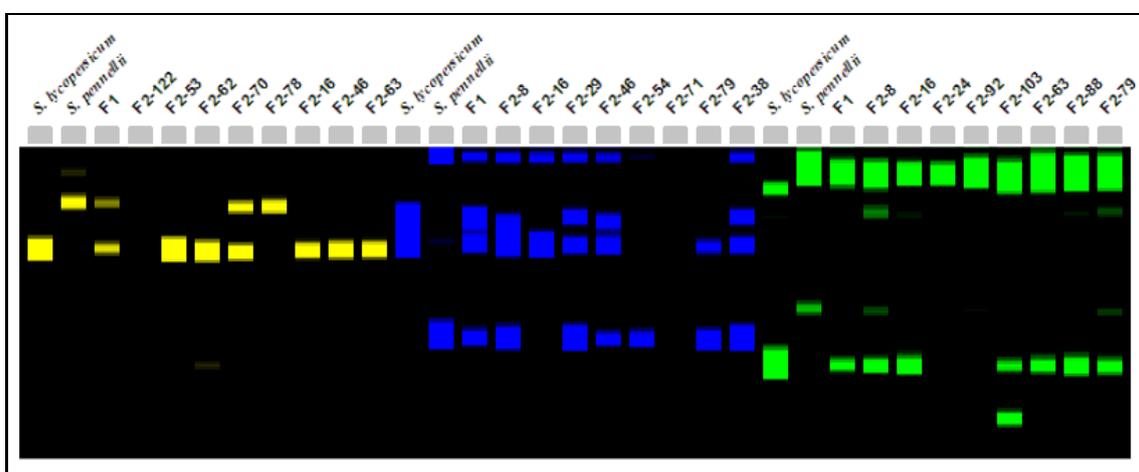


Figura 10. Visualización en el programa Genographer de la segregación de los AFLP 64, 114, 77, marcados con NED (amarillo), FAM (azul) y HEX (verde) respectivamente.

### Marcadores SSR

De un total de 146 marcadores SSR ensayados, un 64.38% han resultado polimórficos entre los parentales *S. lycopersicum* (anl27) y *S. pennellii* (LA47). De los 85 SSR que estaban previamente mapeados en tomate y disponibles en SGN (Tabla 7), se han identificado 50 polimórficos codominantes, 2 polimórficos dominantes, 16 monomórficos, 7 con muchas bandas y 10 cuyos cebadores no amplificaron. El tamaño de bandas observado en este trabajo no difiere excesivamente con el indicado en SGN que se muestra en la tabla 7.

**Tabla 7.** Marcadores SSR procedentes de la base de datos SGN, se indica el cromosoma, el nombre del marcador, su posición en el mapa Tomato Expen-2000, el tamaño de banda estimado, la repetición, la Ta ensayada, el sistema de visualización (V), y el comportamiento (C) del marcador con el siguiente código (PC: Polimórfico codominante, PD: Polimórfico dominante, M: Monomórfico, MB: Muchas bandas, NA: No amplifica o lo hace muy mal).

Cr	SSR	Tomato Expen-2000 (cM)	Tamaño <sup>a</sup>	Repetición	Ta(C°)	V	C
1	SSR92	0,0	172+173+171	(CT)11	50	Licor	PC
1	SSR478	0,0	272	(GGTG)2(CT)16	50	Licor	BI
1	SSR266	32,7	200	(TA)5(TGTA)2(TA)10	47	Licor	PC
1	SSR51	39,5	148	(ACAA)6	50	Agarosa	M
1	SSR270	46,0	231	(GAA)5(GGAGAA)7	50	Agarosa	M
1	SSR316	46,7	215	(AG)6(TTGCAG)2	55	Licor	PC
1	SSR75	53,5	155	(AAT)9	0	Licor	PC
1	SSR135	54,0	133+128	(ATT)6	50	Licor	NA
1	SSR222	97,5	163+175	(TCT)7	55	Licor	PC
1	SSR150	115,5	215	(CTT)7	50	Licor	PC
1	SSR308	121,0	293+300	(TA)12	55	Licor	BI
1	SSR9	134,0	168	(ATA)10	42	Licor	M
1	SSR156	146,0	167+150	(TCT)7	50	Licor	BI
1	SSR288	158,5	275	(TGA)7	45	Licor	PC
1	SSR65	159,0	230	(AG)5(TG)7	50	Licor	PD
2	SSR448	0,0	163	(CT)14	53	Agarosa	NA
2	SSR586	6,0	125	(AAC)6	55	Licor	PC
2	SSR66	25,0	185	(ATA)8	50	Licor	PC
2	SSR356	44,0	259	(AT)20	55	Agarosa	PC
2	SSR5	53,0	196	(CAA)6	45	Licor	PC
2	SSR26	77,5	179+173	(CGG)7	50	Licor	PC
2	SSR287	107,0	168	(TA)12	45	Licor	PC
2	SSR125	110,0	193+192+191	(CTAG)2(GT)7(CTTT)4	50	Licor	NA
3	SSR111	73,9	188	(TC)6(TCTG)6	50	Licor	M
3	SSR22	99,0	217	(AT)11	50	Licor	PC
3	SSR320	158,0	171	(AT)12	55	Licor	PC
3	SSR601	162,0	166	(ATA)9	60	Licor	PC
3	SSR300	166,0	246	(TTC)10	55	Licor	M
4	SSR72	0,0	182	(ATTC)2(AC)7	52	Licor	PC
4	SSR43	14,0	237	(TAC)7	50	agarosa	M
4	SSR593	15,0	295+285	(TAC)7	55	Licor	PC
4	SSR603	37,0	251	(GAA)8	50	Licor	M
4	SSR306	48,0	258	(ATT)7	55	Licor	PC
4	SSR450	54,5	265	(AAT)7	55	Licor	PD
4	SSR555	61,5	217	(CTT)9	41	Licor	PC
4	SSR214	95,0	221+222+224	(CTT)7	50	Licor	PC
4	SSR293	109,0	129	(GAG)6	50	Licor	PC

4	SSR188	135,5	140+148	(AT)11	50	Licor	BI
5	SSR325	17,5	132	(TAA)7	50	Licor	PC
5	SSR602	27,0	299+297+293	(AAG)6	55	Licor	PC
5	SSR115	35,0	211	(AT)16	50	Licor	PC
5	SSR49	106,0	161	(TC)6(AC)4	50	Licor	PC
5	SSRB18031	119,0	200-220	No disponible	55	Licor	PC
5	SSR162	119,0	224	(TA)14	50	Licor	M
6	SSR48	6,0	199	(CAC)7	50	Licor	PC
6	SSR128	35,0	123	(CAG)6(CAA)3(CAG)7	50	Licor	M
6	SSR578	44,0	296	(AAC)6(ATC)5	55	Licor	PC
6	SSR350	101,0	267	(AT)13	55	Licor	PC
6	SSR122	101,0	172	(AG)3(AAG)7	45	Licor	M
7	SSR52	3,0	190+202	(AAC)9	50	Licor	PC
7	SSR286	12,0	107	(CAG)8	48	Licor	M
7	SSR304	30,5	186	(CCA)7	55	Licor	PC
7	SSR276	37,0	148+177+150	(ATG)7(ATT)7	55	Licor	BI
7	SSR565	44,2	236	(GGGGAT)3	55	Licor	M
7	SSR557	45,9	239	(ATCT)7	55	Licor	NA
7	SSR45	60,0	246	(AAT)14	50	Licor	NA
8	SSR344	4,0	275	(AT)12	60	Licor	PC
8	SSR244	7,0	201	(TA)14	55	Licor	BI
8	SSR15	22,7	192	(CT)12	50	Licor	PC
8	SSR63	50,7	250	(AT)39	40	Licor	PC
8	SSR38	55,0	237	(TCT)8	55	Licor	PC
8	SSRB105694	87,0	220+210	No disponible	53	Licor	PC
9	SSR340	18,0	281	(GTTGA)2(GA)7	50	Licor	NA
9	SSR73	32,0	198	(AG)2(AGA)7(TAGTGA)2	45	Agarosa	PC
9	SSR70	42,0	120	(AT)20	50	Licor	PC
9	SSR19	51,0	188	(AT)16	50	Licor	PC
9	SSR155	55,5	152	(TAT)9	55	Licor	NA
9	SSR383	57,3	188	(AT)11	55	Licor	PC
9	SSR112	80,0	177	(AAT)7	50	Licor	M
9	SSR599	103,0	282+285+286	(TCA)6(TCATT)2	55	Licor	PC
10	SSRB102358	0,0	300	No disponible	55	Licor	PC
10	SSR4	3,0	166	(CGG)7	50	Licor	BI
10	SSR34	25,3	184	(GA)7(TCGA)2	50	Licor	M
10	SSR526	33,7	230	(AT)11(AAAAC)2	60	Licor	NA
10	SSR248	35,0	249	(TA)21	55	Agarosa	PC
10	SSR159	46,0	212	(CAA)9(CTTC)2	50	Licor	NA
10	SSR85	55,0	179	(TAA)7	50	Licor	PC
10	SSR223	75,0	198+198+193+191	(TCT)7	55	Licor	PC
10	SSR479	86,0	235	(GAGCGA)2(GC)7	52	Licor	NA
11	SSR136	11,0	148	(CAG)7	50	Licor	PC
11	SSR80	20,0	186	(TTTCAA)2(GTACAA)2(CAA)7	50	Licor	PC
11	SSR76	37,5	199	(CGG)7	50	Licor	PC
11	SSR46	40,0	163	(AT)14	50	Agarosa	PC
12	SSR20	58,2	157	(GAA)8	50	Licor	M
12	SSR345	72,5	179	(TCC)7	60	Agarosa	M

<sup>a</sup> Tamaño disponible en Solanaceae Genomics Network (SGN:<http://solgenomics.net>)

Además de estos marcadores SSR se han utilizado otros diseñados *in silico* por nuestro grupo (Tabla 8) y por otros dos grupos de investigación del COMAV (Tabla 9). De los 15 SSR que se muestran en la Tabla 8, 4 resultaron polimórficos codominantes, 6 polimórficos dominantes, 2 monomórficos, 1 con muchas bandas de difícil interpretación y 2 cuyos cebadores no amplificaron. De los 46 marcadores que se muestran en la Tabla 9, 20 fueron polimórficos codominantes, 12 polimórficos dominantes, 6 monomórficos y el resto no amplificaron (7) o mostraron un patrón con muchas bandas (1).

**Tabla 8.** Marcadores SSR diseñados *in silico* por el grupo, se indica el cromosoma, el nombre del marcador, su posición en el mapa Tomato Expen-2000, el tamaño de banda estimado, la repetición, la Ta ensayada, el sistema de visualización (V), y el comportamiento (C) del marcador con el siguiente código (PC: Polimórfico codominante, PD: Polimórfico dominante, M: Monomórfico, MB: Muchas bandas, NA: No amplifica o lo hace muy mal).

Cr	SSR	Tomato Expen-2000 (cM) <sup>a</sup>	Tamaño	Repetición	Ta(C°)	V	C
2	CONDOR2	139,5	163	(AT)12	58	Licor	BI
3	CUY1	137,0	152	(AT)24	58	Licor	PD
5	PISCO3	10,0	201	(TAA)3(AT)18	58	Licor	M
5	PISCO5	51,0	192	(AT)24	59	Licor	M
6	PUNO2	92,5	287	(AT)27	59	Licor	NA
7	COCA3	43,0	247	(AT)23	60	Licor	PC
7	COCA4	63,5	250	(TA)29	59	Licor	PD
9	CUSCO-2	0,0	414	(AT)37	59	Licor	NA
9	CUSCO-3	90,0	254	(AT)37	58	Licor	PC
11	PERU4	76,0	312	(AT)25	58	Licor	PD
11	PERU3	91,0	198	(AT)13	59	Licor	PD
12	INCA5	12,5	227	(AT)22	58	Licor	PC
12	INCA2	39,0	192	(TTA)26	59	Licor	PC
12	INCA7	71,0	236	(AT)35	58	Licor	PD
12	INCA6	120,0	150	(AT)36	59	Licor	PD

<sup>a</sup> Posición marcada por la sonda correspondiente en el mapa Tomato Expen-2000 disponible en Solanaceae Genomics Network (SGN: <http://solgenomics.net>)

**Tabla 9.** Marcadores SSR diseñados *in silico* por otros grupos, se indica el autor (V: Vilanova S, Julián O), el cromosoma, el nombre del marcador, su posición en el mapa Tomato Expen-2000, el tamaño de banda estimado, la repetición, la Ta ensayada, el sistema de visualización (V), y el comportamiento (C) del marcador con el siguiente código (PC: Polimórfico codominante, PD: Polimórfico dominante, M: Monomórfico, MB: Muchas bandas, NA: No amplifica o lo hace muy mal).

Autor	Cr	SSR	Tomato Expen-2000 (cM)	Tamaño	Repetición	Ta(c°)	V	C
V	2	CONDOR1	118,0	201	(AT)27	59	Licor	PC
V	2	SSR2/139,5	139,5	237	(TTA)10	50	Licor	PC
V	3	SSR3/44	44,0	161	(TA)7(CA)10	55	Licor	PC
V	3	SSR3/59	59,0	150	(TA)11	54	Licor	PC
V	3	SSR3/123	123,0	244	(AAT)11	55	Licor	PD
V	3	SSR3/133	133,0	189	(TAT)8	53	Licor	PD
V	3	SSR3/141	141,0	221	(CT)5	55	Licor	M
V	4	SSR4/71	71,3	175	(TA)20	51	Licor	PC
V	5	SSR5/84	84,0	202	(TA)7(GA)6(G)12	52	Licor	PD
V	5	SSR5/60	60,0	191	(AT)11	58	Licor	PD
V	5	SSR5/77	77,0	154	(ACA)6	57	Licor	M
V	6	SSR6/18,5	18,5	284	(ATA)8	52	Licor	NA
V	6	SSR6/59	59,0	250	(AT)15	53	Licor	NA
V	6	PUNO1	69,0	168	(AT)18	59	Licor	PD
V	6	SSR6/85	85,0	229	(AT)9	55	Licor	PC
V	7	SSR7/72	72,0	158	(TA)11	52	Licor	NA
V	7	COCA2	92,0	221	(TTA)10	59	Licor	NA
V	7	COCA1	104,0	244	(ATA)11	59	Licor	M
V	8	SSR8/71	71,0	238	(TA)11	52	Licor	PD
V	9	SSR9/0'	0,0	232	(TA)21	52	Licor	PC
V	11	SSR11/53	53,0	189	(TA)22	54	Licor	BI
V	11	SSR11/61	61,0	242	(TA)27(TG)17	53	Licor	PC
V	11	PERU2	74,0	246	(TA)7(GA)9	60	Licor	M
V	11	PERU1	91,5	224	(CT)9(TA)6	59	Licor	M
V	12	SSR12/12,5'	12,5	262	(TAA)14(CAA)6	52	Licor	PC
V	12	INCA3	85,7	338	(TA)10(AG)9	58	Licor	PD
V	12	INCA4	116,0	209	(TAA)19(GAA)8	58	Licor	NA
V	12	SSR12/120	120,0	150	(AT)18	58	Licor	PD
J	2	SSR2/92	92,0	196	(TA)16	52	Licor	PD
J	3	SSR3/30	30,0	250	(TACA)10	53	Licor	PC
J	3	SSR3/54,5	54,5	220	(AT)21	55	Licor	NA
J	3	SSR3/110'	110,0	242	(ATA)5	55	Licor	PC
J	4	SSR4/125'	125,0	166	(TA)13(ACAT)5	55	Licor	PD
J	5	SSR5/60'	60,0	242	(CA)6	58	Licor	PC
J	5	SSR5/84'	84,0	205	(TA)19	53	Licor	PD
J	6	SSR6/74	74,0	248	(CA)11(TA)5(CA)4 (TACA)2	55	Licor	PC

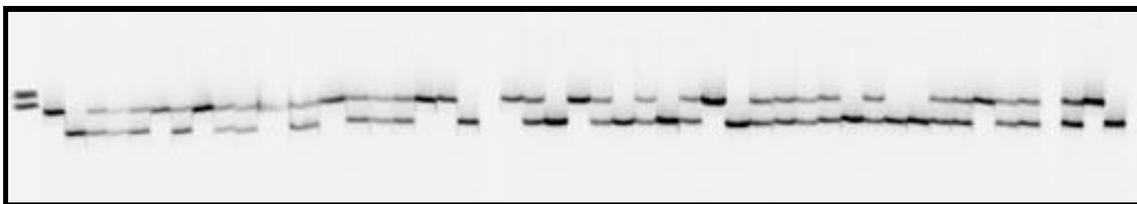
J	7	SSR7/63,5'	63,5	187	(TAT)7	53	Licor	PC
J	7	SSR7/73	73,0	205	(ATT)7	50	Licor	PC
J	7	SSR7/92'	92,0	182	(AT)24	55	Licor	NA
J	7	SSR7/104'	104,0	239	(AT)29	52	Licor	PC
J	8	SSR8/2	2,0	257	(TA)21	57	Licor	PC
J	8	SSR8/71'	71,0	195	(AT)12	55	Licor	PC
J	9	SSR9/73	73,0	222	(ATT)19	55	Licor	PC
J	11	SSR11/53,5	45,0	236	(AT)17	52	Licor	PD
J	11	SSR11/91	91,0	223	(A)12(GA)8(TAT)4	56	Licor	PC
J	12	SSR12/97'	97,0	197	(AAT)7	54	Licor	M

El porcentaje de SSRs polimórficos obtenido ha sido 61.17% en los procedentes del SGN, 66.6 % en los diseñados por el grupo y del 69.56% en los diseñados por otros grupos del COMAV. Estos porcentajes incluyen los SSRs codominantes y los dominantes. Si comparamos porcentajes de SSRs dominantes en los procedentes del SGN y los diseñados *in silico* obtenemos un 2.35 % en el primer caso y un 29.5 % en el segundo. Esto podría ser debido a que los obtenidos del SGN provienen de una población *S. lycopersicum* x *S. pennellii* mientras que el diseño de cebadores en el segundo caso se realizó en secuencias de *S. lycopersicum* y no sobre las secuencias de *S. pennellii*, por lo que los cebadores pueden no hibridar bien con este material y por lo tanto no amplificar.

Se ha descrito en varios trabajos que en los SSRs con la repetición AT/TA se suele observar mayor polimorfismo en tomate (Smulders et al., 1997; Areshchenkova y Ganal 2002; Suliman-Pollatschek et al., 2002; He et al., 2003; Frary et al., 2005), en patata (Ashkenazi et al., 2001) y en otras especies (Morgante y Olivieri 1993; Wang et al., 1994). En el diseño de los SSRs *in silico* se ha tenido en cuenta este hecho, utilizando esta repetición en 13 de los 15 SSR diseñados. En nuestro caso se ha observado un 69.15% de polimorfismo, que estaría acorde con lo anteriormente descrito, pero tan solo un 23% de marcadores resultaron codominantes y son los que se han utilizado para genotipar la población F2.

De los 94 SSR polimórficos obtenidos en este trabajo se han utilizado hasta la fecha 54 SSR para el genotipado de las plantas (Tabla 1, ver material y métodos). Los dos fluorocromos utilizados IRDye700 y IRDye800 amplificaron la mayoría de SSRs aunque con distinta eficiencia. IRDye700 ó IRDye800 se han utilizado en la misma

proporción para una mayor procesividad de las muestras. En ambos casos, la cola M13 aumenta en 20 nt el producto de amplificación esperado como puede verse en la Figura 11.



**Figura 11.** Marcador SSR26 marcado con IRDye800, tamaño de banda esperado 179+173, se observa el incremento del tamaño de banda en 20nt a causa de la Cola M13. Carril1 (Marcador de pesos moleculares 204,200pb) Carril 2(anl27), Carril 3(LA47), Carril 4(F1(anl27XLA47), Carril 5 en adelante (F2 segregante).

### Marcadores COS y COSII

Entre los marcadores COS y COSII que estaban previamente mapeados en tomate y disponibles en SGN, se han identificado 12 polimórficos, 4 monomórficos y 3 cuyos cebadores no amplificaron (Tabla 10). Se han utilizado 1 COS y 9 COSII polimórficos para genotipar la población F2. El porcentaje de polimorfismo obtenido ha sido del 63.15%, un porcentaje similar al polimorfismo obtenido en los SSRs.

**Tabla 10.** Marcadores COS y COSII procedentes de la base de datos SGN, se indica el cromosoma, el tipo de marcador, el nombre, el código utilizado, su posición en el mapa Tomato Expen-2000 de SGN, el protocolo utilizado para visualizar el polimorfismo, el tamaño de banda estimado, el enzima de restricción utilizada (ER), los fragmentos esperados derivados de la digestión, y el comportamiento (C) del marcador con el siguiente código (PC: Polimórfico codominante, M: Monomórfico, NA: No amplifica o lo hace muy mal).

C R	Tipo	Nombre	Código	Tomato Expen-2000 (cM)	Diferencia del amplicón visible mediante	Tamaño <sup>b</sup> de los fragmentos esperados PCR ( <i>S. pennellii</i> TA56/ <i>S. lycopersicum</i> TA209)	ER	Tamaño <sup>b</sup> de los fragmentos esperados polimórficos de digestión (TA56/TA209, bp)	C
3	COSII	C2_At4g18230	COSII3.1	7,0	PCR	900/850			PC
3	COSII	C2_At1g28530	COSII3.2	21,0	Digestión	600/600	DraI	400/600	PC
7	COSII	C2_At2g24090	COSII7.1	0,0	PCR	2500/2700			NA
7	COSII	C2_At5g20180	COSII7.2	6,0	Digestión	1300/1300	Alu I	430+520/1300	M
7	COSII	C2_At2g26590	COSII7.3	15,0	PCR	950/900			PC
7	COSII	C2_At3g13050	COSII7.4	27,5	PCR	400/375			PC
7	COSII	C2_At4g26680	COSII7.5	38,4	Digestión	450/450	Alu I	450/ 300	PC
7	COSII	C2_At2g42810	COSII7.6	45,0	Digestión	1200/1200	TaqI	1200/560+520	M
7	COS	T1651	T1651	45,6	Digestión	416/416	Ddel	344/416	PC

7	COS	T1756	T1756	45,7	Digestión	1200/1200	Sau96I	699+383/508 +383+191	M
7	COSII	C2_At1g 17200	At1g172 01	46,0	Digestión	800/800	Sau96I	450+350/800	PC
7	COSII	C2_At1g 53670	COSII7.6 .2	54,0	Digestión	1200/1200	AluI	1100/1200	PC
7	COSII	C2_At3g 14770	COSII7.6 .3	56,5	Digestión	425/425	Mbol	425/325	PC
7	COSII	C2_At1g 78620	COSII7.7	57,0	PCR	850/1000			M
7	COSII	C2_At3g 15290	COSII7.8	63,5	PCR	1200/1100			PC
7	COSII	C2_At5g 54310	COSII7.9	75,0	Digestión	1300/1300	DraI	480+800/480 +750	PC
7	COSII	C2_At1g 04970	COSII7.1 0	84,0	Digestión	1600/1600	Alu I	1000+425/500 +450	NA
7	COSII	C2_At1g 55840	COSII7.1 1	92,5	Digestión	1350/1350	RsaI	800+550/750 +600	NA
7	COSII	C2_At5g 56130	COSII7.1 2	108,0	Digestión	350/350	RsaI	220/300	PC
7	gHS <sup>a</sup>	gHS	gHS	45,8	PCR	450/494			M

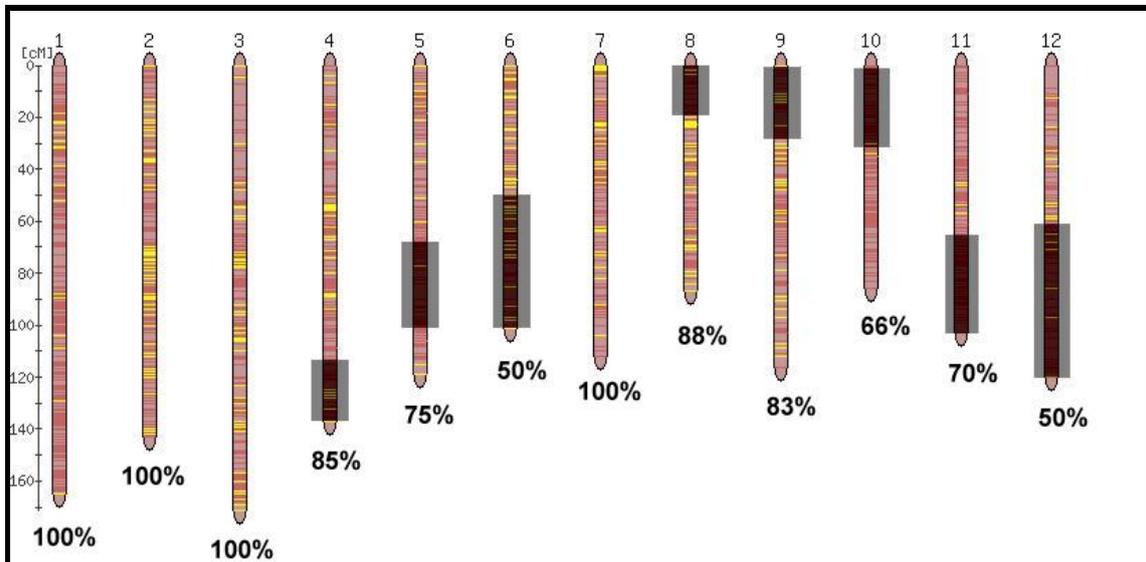
Para todos estos marcadores la Ta fue de 55C° y las amplificaciones y productos de digestión se visualizaron en Agarosa 1-2%. <sup>a</sup> Marcador procedente de (Lim et al., 2008) descrito como una secuencia genética de tomate en el BAC P049P16. <sup>b</sup> Tamaño disponible en Solanaceae Genomics Network (SGN:<http://solgenomics.net>)

Otro marcador evaluado fue el gHS, situado en el cromosoma 7 y descrito por Lim et al., (2008). Este marcador resultó ser monomórfico para nuestro material. El tamaño de bandas observado en este trabajo no difiere excesivamente con el indicado en SGN que se muestra en la tabla 10.

### 3.2.2 Mapa de ligamiento

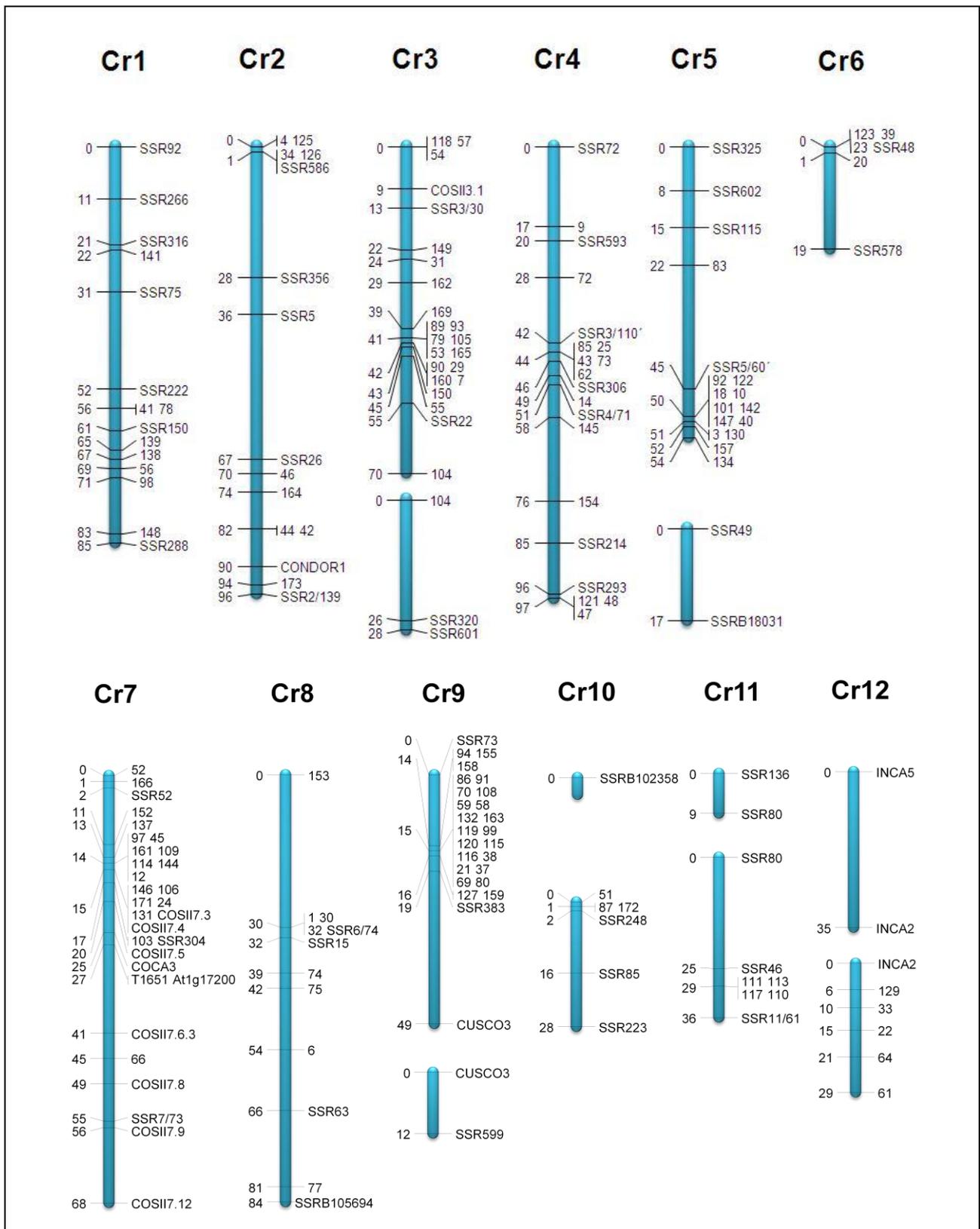
Con los marcadores utilizados se ha analizado un 83% del genoma. Como puede observarse en la Figura 12, los cromosomas 1, 2, 3 y 7 quedan representados en su totalidad. Las zonas que quedarían por cubrir en el resto de cromosomas están señalizadas en esta figura. Todos los marcadores SSR han mapeado en la posición correcta a excepción de los marcadores diseñados *in silico* SSR6/74 y SSR3/110' que han mapeado en el cromosoma 8 y 4 respectivamente y no en los cromosomas 6 y 3. En nuestro caso al realizar una comparación de secuencias nucleotídicas (BLAST) pueden encontrarse homologías entre los cebadores diseñados *in silico* para SSR6/74 y SSR3/110' y regiones de los cromosomas 8 y 4 respectivamente que podrían explicar este resultado.

20 AFLPS se excluyeron del análisis por ocupar la misma posición que otros AFLPs o bien por inducir errores en el orden de mapeo de los SSRs dada su naturaleza de marcador dominante.



**Figura 12.** Porcentaje de cada uno de los 12 cromosomas de genoma de *S. lycopersicum*, analizado con moleculares en la población F2 de estudio. Las áreas en gris señalan las zonas que no han quedado cubiertas por marcadores moleculares.

En la Figura 13 se representan los grupos de ligamiento obtenidos tras analizar los datos en el programa JOINMAP 3.0. Para calcular las distancias genéticas se ha utilizado la función de mapeo de Kosambi (Kosambi, 1944) con un valor de LOD de 3.0. En primer lugar se han realizado grupos de ligamiento con los marcadores codominantes: SSRs, COSI y COSII y posteriormente se ha fijado la posición de los mismos para añadir los marcadores AFLP.



**Figura 13.** Grupos de ligamiento generados por JOINMAP 3.0, representan los 12 cromosomas de tomate. La posición (izquierda del cromosoma) de los marcadores moleculares (derecha del cromosoma) se indica en unidades centimorgan (cM)

### 3.3 Análisis genético

Para cada carácter se realizó un análisis de medias generacionales según el modelo general de Mather y Jinks (1971), eligiendo el modelo que mejor se ajustara a los datos y determinando la bondad del ajuste mediante una prueba  $\chi^2$  de Cavalli (Cavalli, 1952). Este análisis genético nos ha permitido profundizar en la naturaleza de la variación, permitiéndonos estimar los parámetros genéticos de interés como la aditividad, grado de dominancia, y la heredabilidad. Se ha estimado, además, el número de genes implicados. Como los resultados obtenidos apuntan a un control sencillo de los caracteres estudiados, se ha llevado a cabo un análisis cualitativo, estableciendo clases discretas a partir de los datos obtenidos.

La caracterización fenotípica y molecular se ha integrado para identificar QTLs relacionados con los caracteres estudiados.

#### 3.3.1 Análisis de medias generacionales

A partir de las medias generacionales y sus varianzas se ha realizado un ajuste a un modelo aditivo dominante estimando los parámetros genéticos  $d$  y  $h$  (Mather y Jinks, 1971).

$$Y = m + \alpha[d] + \beta[h]$$

La Tabla 11 muestra la estimación por mínimos cuadrados de los parámetros genéticos significativos, junto con sus desviaciones y coeficientes de determinación ( $R^2$ ).

**Tabla 11.** Análisis generacional de las medias de los caracteres PY, PL, PR y ED. Parámetros genéticos, significación y coeficiente de determinación.

	Media ± ES	P	R <sup>2</sup>	Media ± ES	P	R <sup>2</sup>
	PY			PL		
<b>m</b>	57.48 ± 0.31	0.0000		51.82 ± 0.09	0.0000	
<b>[d]</b>	- 41.51 ± 0.31	0.0001	33.47	- 45.17 ± 0.09	0.0000	84.84
<b>[h]</b>	38.50 ± 0.41	0.0001	66.50	34.16 ± 0.20	0.0000	15.15
			99.97			99.99
$\chi^2_{gl4}$	0.57 0.97-0.90			1.26 0.85-0.90		
	PR			ED		
<b>m</b>	3.13 ± 0.60	0.0015		4.01 ± 0.09	0.0006	
<b>[d]</b>	- 3.21 ± 0.60	0.0031	94.98	- 3.76 ± 0.10	0.0007	97.79
<b>[h]</b>	ns	ns	ns	- 0.75 ± 0.13	0.0322	2.00
			94.98			99.79
$\chi^2_{gl4}$	0.39 0.99-0.97			0.23 0.95-0.99		

Estos parámetros se han obtenido tomando como peso la inversa de la varianza. R<sup>2</sup> = Coeficiente de determinación.  $\chi^2_{gl4}$  es la prueba  $\chi^2$  ponderada que determina la bondad del modelo según Mather y Jinks (1971). m= punto intermedio entre los parentales [d] efectos homocigóticos. [h] efectos dominantes.

Los resultados son coherentes con las observaciones anteriores. La variación entre las medias generacionales de los caracteres PY y PL se puede explicar mediante un mismo modelo genético. En ambos casos se ajusta un modelo aditivo-dominante, con un elevado R<sup>2</sup> y con valores de  $\chi^2$  no significativos, lo que indica un buen ajuste al modelo y sugiere la ausencia de efectos epistáticos importantes. Ambos parámetros d y h fueron altamente significativos. El elevado ratio [h]/[d] (entre 0,75 y 0,92) indica dominancia de los alelos que aumentan la capacidad de regeneración. En cambio, para los parámetros relacionados con el número de plantas (PR y ED) la aditividad sigue siendo significativa, pero no lo es la dominancia en el caso de PR o lo es a menor nivel de significación en el caso de ED. Los valores de  $\chi^2$  ponderada también indican un buen ajuste a los datos.

### 3.3.2 Análisis de los componentes de la varianza

La varianza fenotípica puede descomponerse en varianza ambiental (E) y en varianza genética. Esta a su vez está compuesta por la varianza aditiva (D), resultante de los efectos aditivos de los genes y la varianza dominante (H), debida a los efectos dominantes, aunque también pueden contribuir a la misma las interacciones epistáticas de los genes (la varianza epistática, I). La estimación de los componentes de

la varianza, E, D y H se muestra en la Tabla 12. A partir de los mismos se han calculado las heredabilidades en sentido amplio y en sentido estricto ( $H_{sa}^2$  y  $H_{se}^2$ ), que nos indican la proporción de la variación heredable.

Las estimas de E muestran que la variancia ambiental es pequeña en comparación con la variancia genética. Para que la selección sea eficaz es necesario que la variación observada no sea únicamente debida al ambiente. La variación debida a causas genéticas debe ser no sólo mayor que la ambiental, sino además debe ser importante para que la selección sea efectiva. Esta es la situación que se observa en nuestro caso. De hecho las heredabilidades obtenidas (Tabla 12) son elevadas, indicando que una alta proporción de la variación fenotípica (observada) se debe a los genes y, en concreto a la variación aditiva de los mismos. Esto indica que la selección en base a la expresión fenotípica de la capacidad de regeneración será eficaz. Para llevar a cabo esta selección seleccionaríamos de entre las variables estudiadas, PL que muestra el mayor valor de  $H_{se}$  (0.998), siendo además un parámetro que representa mejor la capacidad de regeneración que PY.

**Tabla 12.** Análisis de los componentes de la variación genética E, D y H, y las heredabilidades ( $H_{sa}^2$  y  $H_{se}^2$ ), para los caracteres estudiados PY, PL, PR y ED.

Parámetro fenotípico	E	D	H	$H_{sa}^2$	$H_{se}^2$
PY	1.5	1534.28	665.4	0.998	0.82
PL	1.5	2674.14	-903.48 ns	0.998	0.998
PR	2.0	22.66	-28.96 ns	0.849	0.849
ED	1.7	19.18	-23.76 ns	0.849	0.849

Los valores negativos de H se han considerado no significativos por no tener sentido biológicamente.

Las heredabilidades para variables relacionadas con la capacidad de regeneración van a depender de los parentales utilizados en cada caso. En el caso de tomate se han utilizado distintas fuentes para estos estudios y no se ha utilizado *S. pennellii* anteriormente. De los pocos trabajos en los que se analizan, las heredabilidades obtenidas han sido 0 para PY y 0.62 para PR utilizando tomate cultivado como parental regenerativo y *S. pimpinellifolium* como negativo (Pratta et al., 2006) y 0.46 para PY y 0.28 para PR en una población de RILS obtenida a partir de los mismos parentales que en el trabajo anterior (Marchionni Basté et al., 2007). En

estos trabajos las heredabilidades son moderadas o bajas. En otros, aunque no se ha determinado, la heredabilidad ha sido alta pues ha permitido introgresar en tomate el carácter capacidad regenerativa mediante cruzamientos y retrocruzamientos utilizado tres fuentes: *S. peruvianum* (Koorneef et al., 1987), *S. chilense* (Takashina et al., 1998) y *S. pimpinellifolium* (Faria and Illg, 1996). También se ha introgresado este carácter en tomate mediante hibridación somática con *S. peruvianum* (Wijbrandi et al., 1988).

### 3.3.3 Cálculo del número de genes

La estimación del número mínimo de factores efectivos que controlan los parámetros evaluados relacionados con la capacidad regenerativa se presentan en la Tabla 13. Los valores obtenidos con las distintas fórmulas utilizadas son en general similares para las variables PY y PL, con valores cercanos a 1. En cambio, para los parámetros PR y ED la variabilidad obtenida es mayor, con algunos valores cercanos a 1 y otros a 2. Teniendo en cuenta que al realizar esta estima se asume que no tenemos efectos epistáticos y que el efecto de todos los genes es por igual y por lo tanto es una estima por defecto, el número mínimo de genes responsable para la producción de yemas y/o plantas sería uno y en el caso del número de plantas que se producen por explante (PR y ED) podrían estar involucrados un mayor número de genes. En conjunto, los datos sugieren un control sencillo del carácter, a pesar de la influencia ambiental. Esta influencia ambiental es alta como hemos comentado previamente, pudiéndose observar una variabilidad para PR y ED casi tan elevada en el parental *S. pennellii* como en la F2 (Tabla. 4).

**Tabla 13.** Estimación del número mínimo de genes efectivos que controlan los parámetros evaluados PY,PL,PR y ED relacionados con la capacidad regenerativa, mediante las distintas fórmulas (n1,n2,n3,n4).

Parámetro	n 1	n 2	n 3	n 4
PY	1.12	0.92	1.26	1.12
PL	0.76	0.91	1.03	0.76
PR	0.53	1.48	1.90	0.53
ED	0.73	1.95	2.30	0.74

De los estudios realizados en tomate, no puede concluirse que el carácter en estudio dependa de uno o más genes, aunque los trabajos realizados utilizando como

parentales donantes distintas fuentes silvestres se inclinan por dos o más genes. Así por ejemplo Koornneef et al., (1993) propone un gen mayor (*Rg-1*) procedente de *S. peruvianum* que actuaría en combinación con alelos dominantes de uno o dos loci de *S. peruvianum* o de *S. lycopersicum*; Faria y Illg (1996) describieron que dos genes con interacción complementaria eran responsables de este carácter y Pratta et al., (2003) proponen que genes diferentes son responsables de la formación de callo, yemas y plantas. El control digénico de la regeneración también ha sido indicado en otras especies de interés agronómico como el melón (Molina and Nuez, 1990), en el que se asume un modelo genético con dos genes, dominancia parcial, segregación independiente y con efectos similares en ambos.

### **3.3.4 Análisis cualitativo**

Los datos obtenidos sugieren un control genético sencillo ya que no se observa solapamiento en las clases parentales, las generaciones segregantes parecen mostrar una distribución bimodal y se ha obtenido una elevada heredabilidad. Por ello en primer lugar se contrastó un modelo monogénico mediante una prueba  $\chi^2$  agrupando las plantas en 2 clases (escasa capacidad de regeneración y alta capacidad regenerativa). En segundo lugar, se utilizó el programa JOINMAP 3.0 para realizar el análisis de la cosegregación de los marcadores moleculares utilizados en el genotipado y las variables del fenotipado relacionadas con el carácter de interés para obtener un mapa de ligamiento.

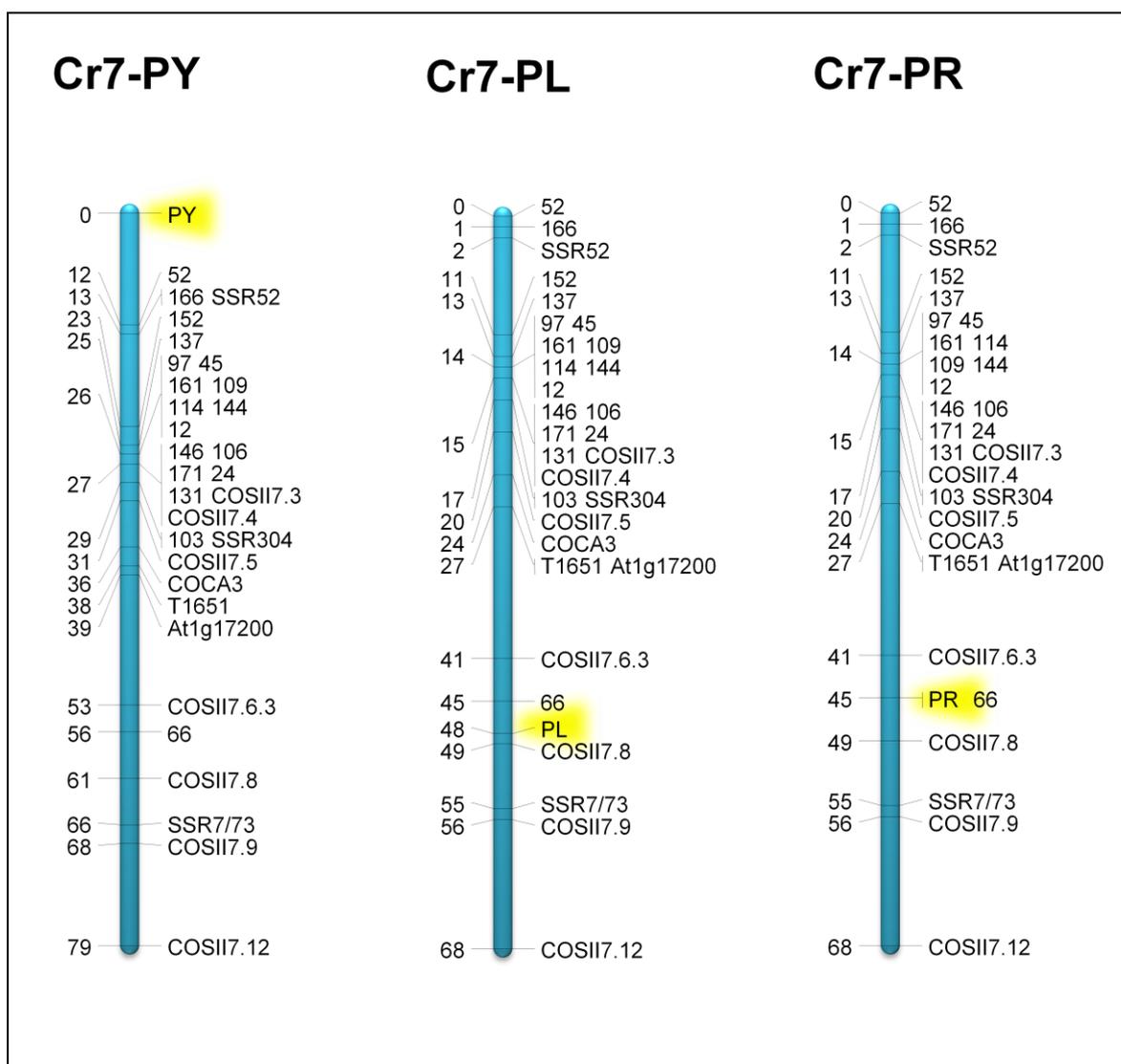
La distribución de los datos nos permite establecer dos categorías tomando como referencia de punto de corte aquel que nos separa al parental tomate (P1) del parental *S. pennellii* (P2) y la población F1. En la Tabla 14 se muestra las categorías establecidas para las variables PY, PL y PR y los valores obtenidos en la prueba  $\chi^2$ . Estos valores indican la aceptación de la hipótesis de un gen responsable del carácter para las tres variables analizadas tanto en la población F2 como en el retrocruce (BC1).

**Tabla 14.** Prueba  $\chi^2$  para testar la hipótesis de un gen responsable del carácter para las tres variables analizadas PY, PL y PR, tanto en la población F2 como en el retrocruce (BC1).

CLASES FENOTÍPICAS	PY		PL		PR	
	<50 %	>50 %	<50 %	>50 %	0-1	>1
<b>Generación F2</b>						
OBSERVADAS	19	83	30	72	29	73
ESPERADAS	25.50	76.50	25.50	76.50	25.50	76.50
$X^2_{gl=2}$	2.20		0.95		0.32	
Nivel de significación ( $\alpha$ )	0.15-0.2		0.35-0.4		0.55-0.6	
<b>Generación BC1</b>						
OBSERVADAS	25	31	30	27	22	35
ESPERADAS	28.5	28.5	28.5	28.5	28.5	28.5
$X^2_{gl=2}$	1.48		0.16		2.96	
Nivel de significación ( $\alpha$ )	0.20-0.25		0.65-0.7		0.10-0.15	

La separación en clases discretas siguiendo el mismo criterio establecido anteriormente no es clara para la variable ED pues en el mismo rango de respuesta se solapan plantas de tomate y F1 por lo que esta variable no se ha analizado en esta aproximación.

El análisis de los marcadores y de los caracteres PY, PL y PR con el programa JOINMAP 3.0, nos coloca las variables estudiadas en el cromosoma 7 de tomate como se observa en la Figura 14. Así, PY mapea en la parte superior del cromosoma 7, 13 cM por encima de SSR52 (3cM). Ésta posición es un artefacto generado por el programa, pues PY queda 10cM fuera del mapa EXPEN-2000 del SGN. Por otra parte, PL mapea entre el marcador COSII7.8 (63.5 cM) y COSII7.6.3 (56.5 cM), quedando a tan solo 7 cM del último de estos. PR mapea entre el marcador COSII7.8 (63.5 cM) y COSII7.6.3 (56.5cM), quedando a tan solo 4 cM del último de estos.



**Figura 14.** Localización mediante el programa JOINMAP 3.0 de los caracteres PY, PL y PR en grupo de ligamiento que representa el cromosoma 7 de tomate.

Con los datos obtenidos en el análisis cualitativo podemos concluir que parece haber un gen mayor dominante que sería el responsable de la capacidad de regeneración y que se ubicaría en el cromosoma 7. La presencia de otros genes que podrían influir en la respuesta no puede descartarse considerando que nos faltaría cubrir un 17% del genoma. Los trabajos publicados hasta la fecha ubican los alelos responsables de la capacidad regenerativa *Rg-1* de *S. peruvianum* (Koornneef et al., 1993) y *Rg-2* de *S. chilense* (Takashina et al., 1998) en el cromosoma 3. Este resultado podría deberse a que en este trabajo hemos utilizado otra fuente y otro tipo de explante para el estudio de la regeneración. Aunque en los estudios preliminares si se observaba una correlación entre la capacidad regenerativa en hoja y en raíz, como también se ha sugerido en otros trabajos como el de Molina y Nuez, (1995) donde la

selección de materiales de *Cucumis melo* que mostraban mayor regeneración en hoja, mostraron mayor capacidad regenerativa en otros tipos de explantes. Por lo que, el sistema genético que controla la frecuencia de regeneración en los distintos tipos de explantes parece ser al menos parcialmente común.

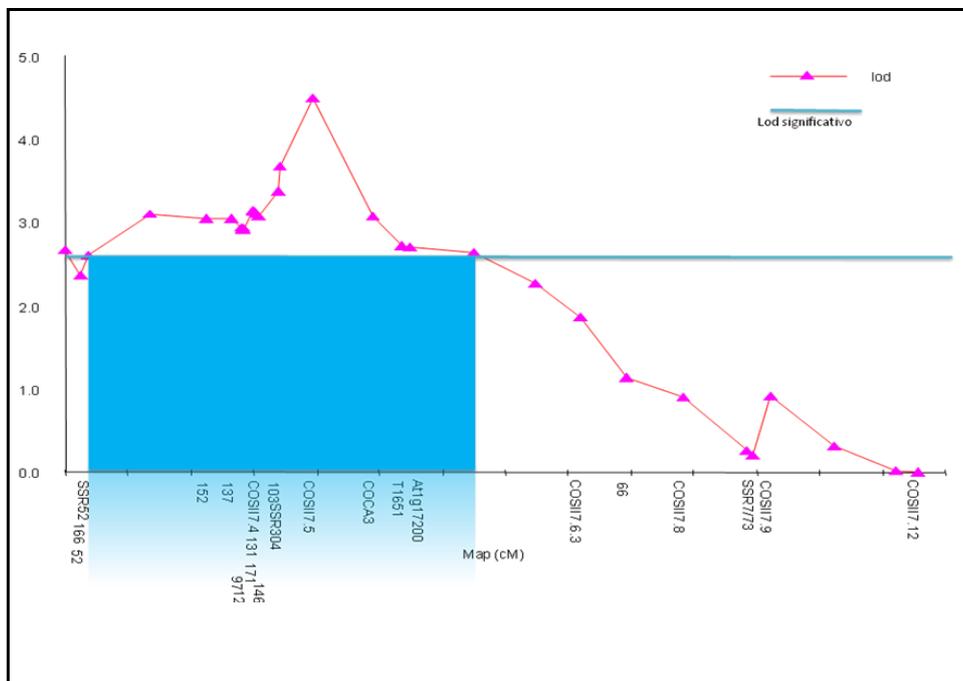
Los caracteres que se ajustan mejor a un control monogénico y con una baja influencia ambiental son PY y PL, que además presentan una elevada correlación, lo que sugiere que es un único gen o dos estrechamente ligados los que controlan estos caracteres. No se puede descartar el efecto de otros genes en PR o ED, ya que se observa un comportamiento diferencial, mayor efecto ambiental que ocasiona una elevada variabilidad en los tipos con elevada capacidad regenerativa, y una herencia intermedia, con una F1 dispersa entre ambos parentales. La variación adicional observada en el número de plantas podría ser un efecto ambiental y de fondo genético. De hecho, de cuando se representa ED (Figura 9) las plantas F1 se desplazan hacia rangos propios del parental tomate. Si analizamos la distribución de las plantas clasificadas como fenotipo F1 para PY o PL en la población BC1 (con mayor fondo genético de tomate) el desplazamiento es mayor (Figura 8). Este efecto podría explicarse por la acumulación de alelos reductores en el desarrollo de las plantas procedentes del fondo genético tomate. La capacidad de desarrollo de las yemas de tomate presenta mayor dificultad que las de las especies silvestres relacionadas habiéndose sugerido causas genéticas como responsables de este hecho (Steinitz, 2006). Pratta et al., (2006) también explican los valores más altos y más bajos de regeneración obtenidos en RILs de tomate respecto a parentales de partida como consecuencia de la recombinación de los genes en las poblaciones segregantes que producirían la acumulación de alelos reductores en la formación de tallo en algunas RILs y de alelos incrementadores en otras, resultando en genotipos extremos para la respuesta al cultivo *in vitro*.

### **3.3.5 Análisis cuantitativo**

El análisis de QTLs (regiones del genoma que contribuyen con efectos significativos a la variación) es otra herramienta que nos permite estudiar la genética

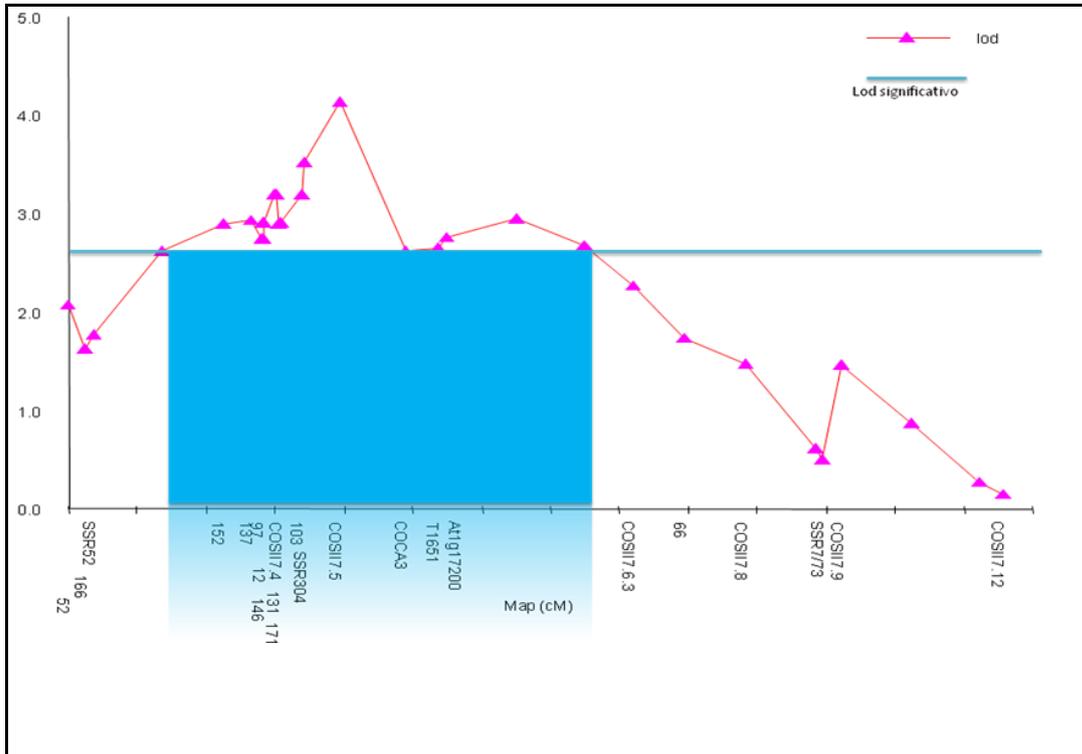
de los caracteres que dependen de varios genes o que presentan gran influencia ambiental. El test de permutación realizado con el MapQTL para establecer el mapeo de intervalos ofrece los siguientes valores de LOD significativos: 2.7 para PL, 2.7 para PY, 2.6 para PR y 2.7 para ED. Todos los caracteres estudiados PY, PL, PR y ED resultaron mapear un QTL, que superaba el LOD significativo correspondiente, en la parte superior del cromosoma 7. Por otra, parte el test Kruskal Wallis informó de una dependencia de los caracteres y los marcadores moleculares de la zona superior del cromosoma 7. Por lo tanto, este análisis más preciso que el anterior confirma la ubicación del gen/es responsables en este cromosoma.

PY ofrece el valor más alto de LOD con un valor de 4.5 (Figura 15), que se corresponde con el marcador COSII7.5 situado en la posición 38.4 cM. Esta posición se calcula teniendo en cuenta la situación del marcador en el mapa EXPEN-2000 y la obtenida en nuestro mapa. El QTL para este carácter cubre una región de aproximadamente 50 cM comprendida entre los marcadores SSR52 (3 cM) y At1g17201 (46 cM).



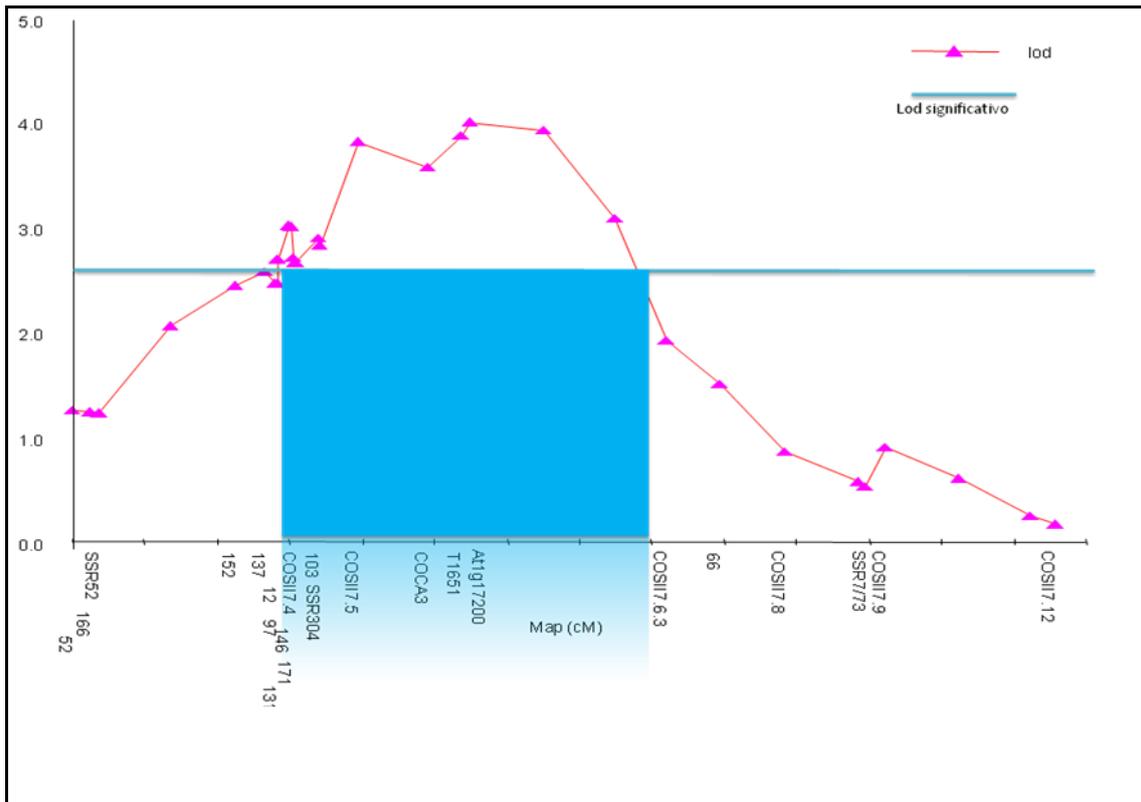
**Figura 15-** QTL asociado al carácter PY. En ordenadas se representa el valor LOD, y en abscisas se representa el cromosoma 7 [AFLP52(0cM) - COSII7.12(108cM)], generado previamente por MAPMAKER con marcadores moleculares. El valor de LOD significativo queda representado por una línea azul. El área de LOD superado por el QTL (azul) se refleja en abscisas sobre los marcadores moleculares indicando su posición en el mapa.

PL alcanza un valor de LOD máximo de 4.2 (Figura 16) y al igual que PY, coincide con la posición del marcador COSII7.5. Sin embargo, la zona de significancia se desplaza, cubriendo del mismo modo 50 cM hacia las proximidades del marcador COSII7.6.3 en la posición 56.5 cM. Por otra parte, SSR52 queda en este caso liberado y el QTL comienza próximo a AFLP152.



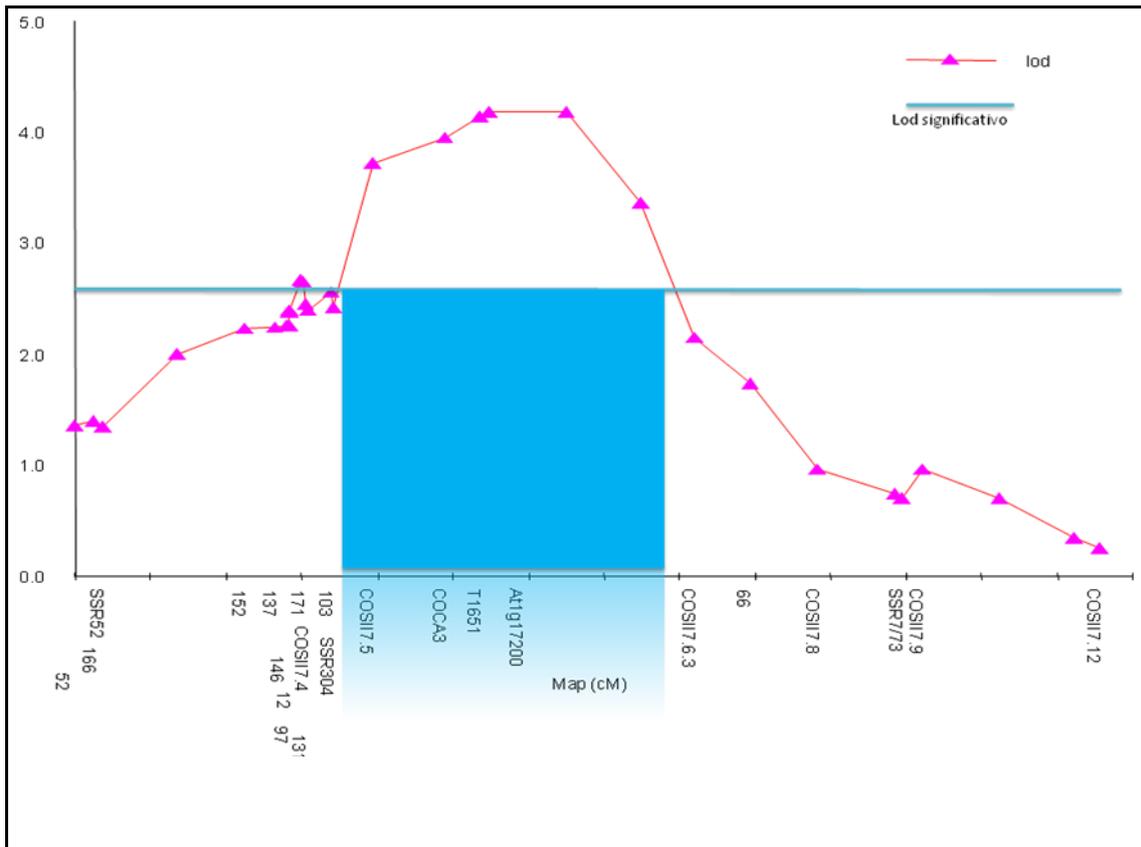
**Figura 16-** QTL asociado al carácter PL. En ordenadas se representa el valor LOD, y en abscisas se representa el cromosoma 7 [AFLP52(0cM)-COSII7.12(108cM)], generado previamente por MAPMAKER con marcadores moleculares. El valor de LOD significativo queda representado por una línea azul. El área de LOD superado por el QTL (azul) se refleja en abscisas sobre los marcadores moleculares indicando su posición en el mapa.

PR alcanza un valor de LOD máximo de 4 (Figura 17), compartido por los marcadores T1651 y At1g17201 en las posiciones 45.6 cM y 46 cM respectivamente. El QTL queda definido en una región de aproximadamente 30 cM confinada entre los marcadores COSII7.4 (27.5 cM) y COSII7.6.3 (56.5 cM).



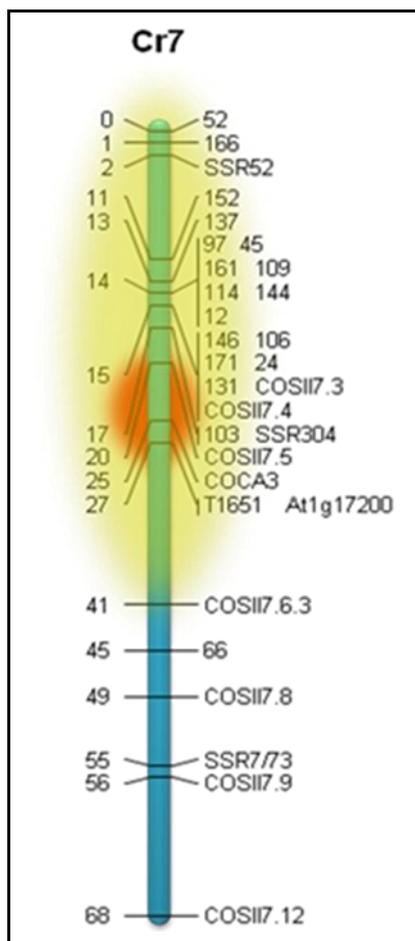
**Figura 17-** QTL asociado al carácter PR. En ordenadas se representa el valor LOD, y en abscisas se representa el cromosoma 7 [AFLP52(0cM) - COSII7.12(108cM)], generado previamente por MAPMAKER con marcadores moleculares. El valor de LOD significativo queda representado por una línea azul. El área de LOD superado por el QTL(azul) se refleja en abscisas sobre los marcadores moleculares indicando su posición en el mapa.

ED alcanza un valor de LOD máximo de 4.1 (Figura18), que al igual que en PR, es compartido por los marcadores T1651 y At1g17201. El QTL queda definido en una región de apenas 18 cM que aproximadamente va desde el marcador COSII7.5 (38.4cM) al marcador COSII7.6.3 (56.5 cM).



**Figura 18-** QTL asociado al carácter PL. En ordenadas se representa el valor LOD, y en abscisas se representa el cromosoma 7 [AFLP52(0cM) - COSII7.12(108cM)], generado previamente por MAPMAKER con marcadores moleculares. El valor de LOD significativo queda representado por una línea azul. El área de LOD superado por el QTL(azul) se refleja en abscisas sobre los marcadores moleculares indicando su posición en el mapa.

El análisis cuantitativo nos sitúa las variables estudiadas en la misma zona del cromosoma 7. Si los 4 caracteres estudiados dependen del mismo gen mayor podemos concluir que este queda confinado en la parte superior del cromosoma 7 (Figura 19. Área amarilla) entre los marcadores SSR52 (3 cM) y COSII7.6.3 (56.5 cM). Siendo la región comprendida entre COSII7.5 (38.4 cM) y At1g17201 (46 cM), que abarca los marcadores COCA3 (43 cM) y T1651 (45.6 cM), la de mayor influencia (Figura 19. Área naranja).



**Figura- 19.** Grupo de ligamiento del cromosoma 7, generado a partir del JOINMAP 3.0 con los marcadores AFLP, SSR, COS y COSII. Área amarilla) Si los 4 caracteres estudiados PY, PL, PR y ED, dependen del mismo gen mayor, este queda confinado en la parte superior del cromosoma entre los marcadores SSR52 (3 cM) y COSII7.6.3 (56.5 cM). Área naranja) la región de mayor influencia en el carácter puede estar comprendida entre COSII7.5 (38.4 cM) y At1g17201 (46 cM), que abarcando los marcadores COCA3 (43 cM) y T1651 (45.6 cM),

## 4. Conclusiones

- Los parentales utilizados para generar las poblaciones en estudio muestran como era esperable una capacidad de regeneración muy distinta siendo en el caso de tomate muy escasa y en el de *S. pennellii* muy elevada. La variabilidad observada en los parentales y las plantas F1, réplicas clonales de las plantas originales, muestran un efecto ambiental sobre el carácter en estudio. Las plantas de las poblaciones segregantes F2 y BC1 muestran una variación continua. A pesar de ello, pueden establecerse para tres de las variables estudiadas dos clases, una que correspondería a fenotipos equivalentes al mostrado por tomate y otra que incluiría las plantas con fenotipos comprendidos en el rango de respuesta de la generación F1 y el parental *S. pennellii*.

- Existe una gran correlación entre las variables estudiadas, que es muy elevada en el caso del porcentaje de explantes con yemas y el porcentaje de explantes con plantas (PY y PL), lo que indica que ambos caracteres varían de forma similar. Ambas variables presentan un componente aditivo y dominante significativo. Puesto que la heredabilidad obtenida ha sido mayor en el caso del porcentaje de explantes con plantas (PL) utilizaríamos esta variable en posteriores procesos de selección por capacidad de regeneración en materiales derivados del cruzamiento utilizado.

- Las variables relacionadas con el número de plantas (PR y ED) están también correlacionadas con las variables porcentaje de explante con yemas y porcentaje de explantes con plantas pero las correlaciones son menores que en el caso anterior. Para estas variables el componente dominante no es significativo pero sí lo es la aditividad, siendo las heredabilidades también elevadas.

- El análisis cualitativo de los datos obtenidos en el fenotipado de la población F2 y de la BC1 apuntan a un carácter monogénico. El genotipado realizado con un total de 236 marcadores moleculares (172 AFLP + 54 SSR + 1 COS + 9 COSII), también parece apuntar a un gen mayor que se situaría en la parte superior del cromosoma 7. La presencia de otro gen ligado u otros genes que pudieran influir en la respuesta no puede descartarse. Por una parte la distribución del nº medio de plantas por explante

y la eficiencia de diferenciación sugieren un efecto de fondo genético. Por otra, se observa una variabilidad tanto en PR como en ED en el parental *S. pennellii*, equiparable a la observada en la F2 y por lo tanto debida al efecto del ambiente que podría explicar la continuidad del carácter.

-El análisis cuantitativo de todas variables corrobora los datos obtenidos en el análisis cualitativo. Las cuatro variables estudiadas dependen del mismo gen mayor, o de varios genes ligados que estaría/n confinado/s en la parte superior del cromosoma 7 entre los marcadores SSR52 (3 cM) y COSII7.6.3 (56.5 cM).

## 5. Bibliografía

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

Ammirato PV (1983) Embryogenesis. Handbook of Plant Cell Culture. Techniques for Propagation and Breeding, Macmillan 1:582–123.

Ancora G, Sree Ramulu K (1981) Plant regeneration from *in vitro* cultures of stem internodes in self-incompatible triploid *Lycopersicon peruvianum* Mill. and cytogenetic analysis of regenerated plants. *Plant Science Letters* 22: 197-204.

Areshchenkova T, Ganai MW (2002) Comparative analysis of polymorphism and chromosomal location of tomato microsatellite markers isolated from different sources. *Theoretical and Applied Genetics* 104:229–235.

Arrillaga I, Gisbert C, Sales E, Roig L, Moreno V (2001) In vitro plant regeneration and gene transfer on the wild tomato *Lycopersicon chesmanii*. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 76: 413-418.

Ashkenazi V, Chani E, Lavi U, Levy D, Hillel J, Veilleux RE (2001) Development of microsatellite markers in potato and their use in phylogenetic and fingerprinting analyses. *Genome* 44:50–62.

Behki RM, Lesley SM (1980) Shoot regeneration from leaf callus of *Lycopersicon esculentum*. *Z. Pflanzenphysiol* 98: 83-87.

Benson EE (2000) In vitro plant recalcitrance: An introduction. *In Vitro Cell and Developmental Biology—Plant* 36:141–148.

Bhatia P, Ashwath N, Midmore DJ (2005) Effects of genotype, explant orientation, and wounding on shoot regeneration in tomato. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 41:457–464.

Bhatia P, Ashwath N, Senaratna T, David M (2004) Tissue culture studies of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 78: 1–21.

Boiten H, Azmi A, Dillen W, De Schepper S, Debergh P (2004) The *Rg-1* encoded regeneration capacity of tomato is not related to an altered cytokinin homeostasis. *New Phytologist* 161:761–771.

Cassells A (1979) The effect of 2,3,5-triiodobenzoic acid on calogenesis in callus cultures of tomato and pelargonium. *Physiologia Plantarum* 37: 239-246.

Cavalli LL (1952) An analysis of linkage in quantitative inheritance. Quantitative inheritance. HMSO 135-144.

Chen LZ, Adachi T (1994) Plant regeneration via somatic embryogenesis from cotyledon protoplasts of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Breeding Science* 44: 337-338.

Cheng L, Zou Y, Ding S, Zhang J, Yu X, Cao J, Lu G (2009) Polyamine Accumulation in Transgenic Tomato Enhances the Tolerance to High Temperature Stress. *Journal of integrative plant biology* 2009 51 5:489-499.

Child A (1990) A synopsis of *Solanum* subgenus *Potatoe* (G. Don) D'Arcy [*Tuberarium* (Dun.) Bitter (s.l.)]. *Feddes Repertorium* 101: 209-235.

Chlyah A, Taarji H (1984) Androgenesis in tomato. Plant tissue and cell culture application to crop improvement. *Czechoslovak Ac* 241-242.

Christianson ML, Warnick DA (1983) Competence and determination in the process of in vitro shoot morphogenesis. *Developmental Biology* 95:288–293.

Christianson ML, Warnick DA (1984) Phenocritical times in the process of in vitro shoot organogenesis. *Developmental Biology* 101:382–390.

Christianson ML, Warnick DA (1985) Temporal requirements for phytohormone balance in the control of organogenesis in vitro. *Developmental Biology* 112:494–497.

Compton ME, Veilleux RE (1991) Shoot, root and flower morphogenesis on tomato inflorescence explants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 24: 223-231.

Davis DG, Breiland KA, Frear DS, Secor GA (1994) Callus initiation and regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum*) cultivars with different sensitivities to metribuzin. *Plant Growth Regulation Society of America Quart* 22: 65-73.

Duvick DN (1986) Plant breeding: past achievements and expectations for the future. *Economic Botany* 40(3):289–297.

Duvick DN (1996) Personal perspective plant breeding, an evolutionary concept. *Crop Science* 36(3):539–548.

Dwivedi K, Srivastava P, Verma HN, Chaturvedi HC (1990) Direct regeneration of shoots from leaf segments of tomato (*Lycopersicon esculentum*) cultured *in vitro* and production of plants. *Indian Journal of Experimental Biology* 28: 32-35.

El-Bakry AA (2002) Effect of genotype, growth regulators, carbon source, and pH on shoot induction and plant regeneration in tomato, *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 38:501–507.

El-Farash EM, Abdalla HI, Taghian AS, Ahmad MH (1993) Genotype, explant age and explant type as effecting callus and shoot regeneration in tomato. *Assiut journal for Agricultural Science* 24: 3-14.

Engelmann F (1991) *In vitro* conservation of tropical plant germplasm. *Euphytica* 57: 227–243.

Evans DA (1989) Somaclonal variation - genetic basis and breeding applications. *Trends in Genetics* 5: 46-50.

Fambrini M, Fisichella M, Pugliesi C (2001) Enhanced morphogenetic potencial from in vitro regenerated plants of genus *Helianthus*: an overview. *Recent Research on Developmental Plant Biology* 1:35–54.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS  
<http://faostat.fao.org/>)

Fari M, Szasz A, Mitkyo J, Nagy I, Csanyi M, Andrasfalvy A (1992) Induced organogenesis via the seedling decapitation method (SDM) in three Solanaceous vegetable species. VIIIth Meeting “Genetics and Breeding on Capsicum and Eggplant” Rome, Italy, 7-10 September 1992: 243-248.

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

Faria RT, Illg RD (1996) Inheritance of *in vitro* plant regeneration ability in the tomato. *Brazilian Journal of Genetics* 19: 113-116.

Flores Berrios E, Gentzbittel L, Kayyal H, Alibert G, Sarrafi A (2000) AFLP mapping of QTLs for in vitro organogenesis traits using recombinant inbred lines in sunflower *Helianthus annus* L. *Theoretical and Applied Genetics* 101:1299–1306.

Flores Berrios EF, Gentzbittel L, Alibert G, Griveau Y, Bervillé A, Sarrafi A (1999) Genetic control of in vitro organogenesis in recombinant inbred lines of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Breeding* 118:359–361.

Foolad MR (2007) Genome Mapping and Molecular Breeding of Tomato. *International Journal of Plant Genomics*.

Foolad MR , Sharma A (2005) Molecular markers as selection tool in tomato breeding. *Acta Horticulturae* 695:225-240

Frankenberger EA, Hasegawa PM, Tigchelaar EC (1981a) Influence of environment and developmental state on the shoot-forming capacity of tomato genotypes. *Z. Pflanzenphysiol* 102: 221-232.

Frankenberger EA, Hasegawa PM & Tigchelaar EC (1981b) Diallel analysis of shoot-forming capacity among selected tomato genotypes. *Z. Pflanzenphysiol* 102: 233-242.

Frary A, Earle ED (1996) An examination of factors affecting the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato. *Plant Cell Reports* 16: 235-240.

Frary A, Xu YM, Liu JP, Mitchell S, Tedeschi E, Tanksley S (2005) Development of a set of PCR-based anchor markers encompassing the tomato genome and evaluation of their usefulness for genetics and breeding experiments. *Theoretical and Applied Genetics* 111:291–312.

Garcia-Reina G, Luque A (1988) Analysis of the organogenetic potential of calli of three Canary Island *Lycopersicon esculentum* land races. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 12:279–283.

Gaspar TH, Kevers C, Penel C, Greppin H, Reid DM, Thorpe TA (1996) Plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cell and Developmental Biology—Plant* 32:272–289.

Geetha N, Venkatachalam P, Reddy PS, Rajaseger G (1998) *In vitro* plant regeneration from leaf callus cultures of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Advances in Plant Science* 11: 253-257.

Georgiev H (1991) Heterosis in tomato breeding. *Genetic Improvement of Tomato* (14)83–98.

Gill R, Malik KA, Sanago MHM, Saxena PK (1995) Somatic embryogenesis and plant regeneration from seedling cultures of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Journal of Plant Physiology* 147: 273-276.

Gisbert C, Arrillaga I, Roig LA, Moreno V (1999) Acquisition of a collection of *Lycopersicon pennellii* (Corr. D'Arcy) transgenic plants with *uidA* and *nptII* marker genes. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 74(1): 105-109.

Gisbert C, Nuez F (2007) Selección de cultivares de tomate con distinta aptitud organogénica para su uso como material de partida en la identificación de genes implicados en este proceso. VII reunión “Sociedad Española de Cultivo In Vitro de Tejidos Vegetales” Alcalá de Henares, España, 25-27 junio 2007. Libro de resúmenes 133-134.

Gisbert C, Rus AM, Bolarín MC, López-Coronado JM, Arrillaga I, Montesinos C, Caro M, Serrano R, Moreno V (2000) The yeast *HAL1* gene improves salt tolerance of transgenic tomato. *Plant Physiology* 123: 393-402.

Gresshoff PM, Doy CH (1972) Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum*. *Planta* 107:161-170.

Hall RD (1999) Plant cell culture protocols. Methods in molecular biology, II. Humana Press.

Hamilton AJ, Bouzayen M, Grierson D (1991) Identification of a tomato gene for the ethylene-forming enzyme by expression in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88:7434–7437.

Hamza S, Chupeau Y (1993) Re-evaluation of conditions for plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation from tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Journal of Experimental Botany* 44: 1837-1845.

Harding K (1996) Approaches to assess the genetic stability of plants recovered from *in vitro* cultures. *In vitro conservation of plant genetic resources* 135–168.

He C, Poysa V, Yu K (2003) Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers and their use in determining relationships among *Lycopersicon esculentum* cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 106:363–373.

Henry Y, Vain P, De Buyser J (1994) Genetic analysis of *in vitro* plant tissue culture responses and regeneration capacities. *Euphytica* 79:45–58.

Hicks GS (1994) Shoot induction and organogenesis *in vitro*: a developmental Perspective. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 30:10–15.

Izadpanah M, Khosh-Khui M (1992) Comparisons of *in vitro* propagation of *tomato* cultivars. *Iran Agriculture Research* 8: 37–47.

Kaparakis G, Alderson PG (2002) Influence of high concentrations of cytokinins on the production of somatic embryos by germinating seeds of tomato, aubergine and pepper. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 77: 186-190.

Koornneef M, Bade J, Hanhart C, Horsman K, Schel J, Soppe W, Vekerk R, Zabel P (1993) Characterization and mapping of a gene controlling shoot regeneration in tomato. *Plant Journal* 3: 131-141.

Koornneef M, Hanhart CJ, Martinelli L (1987) A genetic analysis of cell culture traits in tomato. *Theoretical and Applied Genetics* 74:633–641.

Kosambi DD (1944) The estimation of map distance from recombination values. *Annals of Eugen* 12:172-175.

Kurtz SM, Lineberger RD (1983) Genotypic differences in morphogenetic capacity of cultured leaf explants of tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 108, 710–714.

Kut SA, Evans DA (1982) Plant regeneration from cultured leaf explants of eight wild tomato species and two related *Solanum* species. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 8:593-598.

Lakshmanan P, Siew KN, Chiang SL, Chong JG (1997) Auxin, cytokinin and ethylene differentially regulate specific developmental states associated with shoot bud morphogenesis in leaf tissues of mangosteen (*Garcinia mangostana* L) cultured in vitro. *Plant Cell Physiology* 38 1:59–64.

Lim GTT, Wang GP, Hemming MN, McGrath DJ, Jones DA (2008) High resolution genetic and physical mapping of the *I-3* region of tomato chromosome 7 reveals almost continuous microsynteny with grape chromosome 12 but interspersed microsynteny with duplications on *Arabidopsis* chromosomes 1 , 2 and 3. *Theoretical and Applied Genetics* 118 1:57-75.

Lipucci Di Paolo M, Collina Greci F, Scala A (1983) Shoot forming ability of *Lycopersicon esculentum* Mill. varieties by in vitro cultured cotyledons. *Acta Horticulturae* 131:111–116.

Locky, RD (1983) Callus formation and organogenesis by explants of six *Lycopersicon* species. *Canadian Journal of Botany* 61: 1072-1079.

Marchionni Basté E, Pratta GR, Zorzoli R (2007) Genetic analysis of the in vitro culture response in tomato. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 88(2):233-239.

Mather K, Jinks JL (1971) Biometrical Genetics: The Study of Continuous Variation, Chapman and Hall, London.

McCown BH (2000) Recalcitrance of woody and herbaceous perennial plants: Dealing with genetic predeterminism. *In Vitro Cell and Developmental Biology—Plant* 36:149–154.

Meredith CP (1979) Shoot development in established callus cultures of the cultivated tomato *Lycopersicon esculentum* Mill. *Z. Pflanzenphysiol* 95:405–411.

Miller P (1754) The gardeners dictionary, abridged 4th ed. London.

Morgante M, Olivieri AM (1993) PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant Journal* 3:175–182.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473–497.

Nervo G, Cirillo C, Accotto GP, Vaira AM (2003) Characterization of two tomato lines highly resistant to *Tomato spotted wilt virus* following transformation with the viral nucleoprotein gene. *Journal of Plant Pathology* 85:139-144.

Newman PO, Krishnaraj S, Saxena PK (1996) Regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.): somatic embryogenesis and shoot organogenesis from hypocotyl explants induced with 6-benzyladenine. *International Journal of Plant Sciences* 157: 554-560.

Novak FJ y Maskova I (1979) Apical shoot tip culture of tomato. *Scientia Horticulturae* 10: 337-344.

Nuez F (1995) El cultivo del tomate. Mundi-Prensa.

Nuez F, Carrillo JM (2000) Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Universidad Politécnica de Valencia.

Nuez F, Prohens J (2008) Fabaceae, Liliaceae, Solanaceae, and Umbelliferae, Vegetables 2. Handbook of Plant Breeding. Springer.

Ohki S, Bigot C, Mousseau J (1978) Analysis of shootforming capacity *in vitro* in two lines of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and their hybrids. *Plant Cell Physiology* 19: 27-42.

Padliskikh VL y Yarmishin AP (1990) Features of microclonal propagation in tomato. *Vestsi Akademii Navuk BSS, Reryya Biyalagichnykh Navuk* 6: 52-54.

Padmanabhan V, Paddock EF, Sharp WR (1974) Plantlet formation from *in vitro* from *Lycopersicon esculentum* leaf callus. *Canadian Journal of Botany* 52: 1429-1432.

Peralta IE, Knapp S, Spooner DM (2006) Nomenclature for Wild and Cultivated Tomatoes. *Report of the Tomato Genetics Cooperative* 56:6-12.

Peres LEP, Morgante PG, Vecchi C, Kraus JE, Sluys MAV (2001) Shoot regeneration capacity from roots and transgenic hairy roots of tomato cultivars and wild related species. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 65: 37-44.

Plastira VA, Perdikaris A (1997) Effect of genotype and explant type in regeneration frequency of tomato in vitro. *Acta Horticulturae* 447:231–234.

Pozueta-Romero J., Houlné G, Cañas L, Schantz R, Chamarro J, (2001) Enhanced regeneration of tomato and pepper seedling explants for *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 67:173–180

Pratta G, Cánepa LN, Zorzoli R, Picardi LA (2003) Diallel analysis of in vitro culture traits in the genus *Lycopersicon*. *HortScience* 38:110–112.

Pratta G, Zorzoli R, Picardi LA (1997) Intra and interspecific variability of in vitro culture response in *Lycopersicon* tomatoes. *Brazilian Journal of Genetics* 20:75–78.

Pratta G, Zorzoli R, Picardi LA, Valle EM (2006) Variability for the in vitro culture response in a set of tomato genotypes. *Biologia Plantarum* 50:4214–424.

Redenbaugh MK, Slade D, Fujii J (1989) Desiccated analogs of botanic seed. US Patent 762: 111

Ruma Devi, Dhaliwal MS, Ajinder Kaur, Gosal SS (2008) Effect of growth regulators on *in vitro* morphogenic response of tomato. *Indian Journal of Biotechnology* 7:526-530.

Satoh H, Takashina T, Escalante A, Egashira H, Imanishi S (2000) Molecular markers mapped around the high shoot regeneration capacity gene Rg-2 in *Lycopersicon chilense*. *Breeding science* 50 4:251-256.

Scott JW, Angell FF (1998) Tomato. *Hybrid Cultivar Development* 451–475.

Seguí-Simarro JM, Nuez F (2005) Meiotic metaphase I to telophase II as the most responsive stage during microspore development for callus induction in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Acta Physiologiae Plantarum* 27 4: 675-685.

Shtereva L, Zagorska N, Dimitrov B, Kruleva M, Oanh H (1998) Induced androgenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) II: Factors affecting induction of androgenesis. *Plant Cell reports* 18:312-317.

Sink KC, Handley LW, Niedz RP, Moore PP (1986) Protoplast culture and use of regeneration attributes to select tomato plants. *Genetic Manipulation In Plant Breeding*. 405-413.

Smith DL, Starrett DA, Gross KC (1998) A gene coding for tomato fruit  $\beta$ -galactosidase II is expressed during fruit ripening. *Plant Physiol* 117: 417-423

Smulders MJ, Bredemeijer G, Rus-Kortekaas W, Arens P, Vosman B (1997) Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species. *Theoretical and Applied Genetics* 97: 264–272.

Statgraphics®. 1985–1989. Statgraphics Statistical Graphics Systems, Version 4.0, STSC Inc. & Statistical Graphics Cooperation, Rockville, MD.

Steinitz B, Amitay A, Gaba V, Tabib Y, Keller M, Levin I (2006) A simple plant regeneration-ability assay in a range of *Lycopersicon* species. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 84: 269–278.

Stommel JR, Sinden SL (1991) Genotypic differences in shootforming capacity of cultured leaf explants of *Lycopersicon hirsutum*. *HortScience* 26: 1317-1320.

Suliman-Pollatschek S, Kashkush K, Shats H, Hillel J, Lavi U (2002) Generation and mapping of AFLP, SSRs and SNPs in *Lycopersicon esculentum*. *Cellular and Molecular Biology Letters* 7:583–597.

Takashina T, Suzuki T, Egashira H, Imanishi S (1998) New molecular markers linked with the high shoot regeneration capacity of the wild tomato species *Lycopersicon chilense*. *Breeding Science* 48: 109-113.

Tal M, Dehan K, Heiken H (1977) Morphogenetic potential of cultured leaf sections of cultivated and wild species of tomato. *Annals of Botany* 41:937–941.

Tan MMC, Colijn-Hooymans CM, Lindhout WH, Kool AJ(1987) A comparison of shoot regeneration from protoplasts and leaf discs of different genotypes of the cultivated tomato. *Theoretical and Applied Genetics* 75:105–108.

Thipyapong P, Mahanil S, Bhonwong A, Attajarusit J, Stout MJ, Steffens JC (2006) Increasing resistance of tomato to Lepidopteran insects by overexpression of polyphenol oxidase. Proceedings of the Ninth International Symposium on the Processing Tomato. *Acta Horticulturae* 724:29–38.

Torelli A, Borinato M, Francia S, Carra A, Ricci A, Branca C (2006) Adeninic and ureidic cytokinins: Primary response events in in vitro tomato caulogenesis. *Plant Science* 171:60-73.

Torelli A, Soragni E, Borinato M, Branca C (2004a) The expression of LESK1 morphogenetic marker along the tomato hypocotyl axis is linked to a position-dependent competence for shoot regeneration. *Plant Science*, 166 1:179-190.

Torelli A, Borinato M, Soragni E, Bolpagni R, Bottura C, Branca C (2004b)The delay in hormonal treatment modulates the expression of LESK1, a gene encoding a putative serine-threonine kinase, marker of in vitro caulogenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) *Plant Science*, 167 3:607-620.

Torelli A, Soragni E, Bolchi A, Petrucco S (1996) New potential markers of *in vitro* tomato morphogenesis identified by mRNA differential display. *Plant Molecular Biology* 32: 891–900.

Ultzen T, Gielen J, Venema F, Westerbroek A, De Haan P, Tan M-L (1995) Resistance to tomato spotted wilt virus in transgenic tomato hybrids. *Euphytica* 85: 159-168.

Van Ooijen JW (2009) MapQTL® 6, Software for the mapping of quantitative trait loci in experimental populations of diploid species. Kyazma B.V., Wageningen, Netherlands.

Van Ooijen JW, Voorrips RE (2001) JoinMap® 3.0, Software for the calculation of genetic linkage maps. Plant Research International, Wageningen, the Netherlands.

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23:4407-4414.

Wang Z, Weber JL, Zhong G, Tanksley SD (1994) Survey of plant short tandem DNA repeats. *Theoretical and Applied Genetics* 88:1-6.

Warner JN (1952) A method for estimating heritability. *Agronomy Journal* 44:427-430.

Warren GF (1998) Spectacular increases in crop yields in the United States in the twentieth century. *Weed Technology* 12(4):752-760.

Wijbrandi J, Vos JGM, Koornneef M (1988) Transfer of regeneration capacity from *Lycopersicon peruvianum* to *L. esculentum* by protoplast fusion. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 12: 193-196.

Wright S (1968) The genetics of quantitative variability. *Genetics and Biometric Foundations*, 1 15:373-420.

Zagorska NA, Abadjieva MD, Georgiev HA (1982) Inducing regeneration in anther cultures of tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences* 35: 97-100.

Zagorska NA, Shtereva A, Dimitrov BD, Kruleva MM (1998) Induced androgenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). I. Influence of genotype on androgenetic ability. *Plant Cell Reports* 17: 968-973.

Zapata FJ, Sink KC, Cocking EC (1981) Callus formation from leaf mesophyll protoplasts of three *Lycopersicon* species: *L. esculentum*, cv. Walter, *L. pimpinillifolium* and *L. hirsutum* F. *glabratum*. *Plant Science Letters* 23: 41-46.

Zelcer A, Soferman O, Izhar S (1984) An *in vitro* screening for tomato genotypes exhibiting efficient shoot regeneration. *Journal of Plant Physiology* 115: 211-215.