

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto De Conservación y Mejora de la Agrodiversidad
Valenciana (COMAV)

Máster en Mejora Genética Vegetal



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Instituto de Conservación y Mejora
de la Agrodiversidad Valenciana

**Análisis de marcadores moleculares
para la diferenciación varietal en
semillas de tomate (*Solanum
lycopersicum* L.)**

TRABAJO FINAL DE MÁSTER

Elena García Marín

Tutor: Dr. Santiago Vilanova Navarro

València, 24 de noviembre de 2020

Análisis de marcadores moleculares para la diferenciación varietal en semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.)

Elena García Marín

Tutor: Dr. Santiago Vilanova Navarro

Resumen

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es la hortaliza más consumida a nivel mundial, tanto en consumo fresco o procesado industrialmente, por lo que no es de extrañar que haya más de 10.000 especies cultivadas en todo el mundo. A lo largo de los años se ha buscado poder diferenciar las variedades en estadios tempranos del desarrollo e incluso mediante sus semillas. Es por ello que el estudio de marcadores moleculares en el genoma del tomate es una tarea imprescindible para diferenciación a nivel genético.

Un marcador molecular es un segmento de DNA ubicado físicamente en un cromosoma, pudiendo ser desde un gen hasta una sola base. En tomate se trabaja, en general, con marcadores microsatélites o SSR (*simple sequence repeat*), que es un fragmento de tamaño variable que se repite de manera consecutiva. La ventaja que presenta este tipo de marcador es que permite diferenciar alelos gracias a la variación en el número de repeticiones, es decir, diferentes variedades de tomate pueden contener el mismo microsatélite, pero con diferente número de repeticiones, lo que permitiría diferenciarlas en un análisis genético conjunto.

El estudio se enmarca dentro de un objetivo de un proyecto europeo (BRESOV; <https://bresov.eu/>) en el que se pretende poder diferenciar la potencial contaminación en lotes de semillas de tomate. Este trabajo consta en la diferenciación de, en concreto, cuatro variedades de tomate (*valenciano*, *Ty-12 F2*, *rosada ALTEA* y *estrella*) mediante el uso de marcadores moleculares de tipo SSR a partir de semilla.

Tras la extracción del DNA de semillas de cuatro variedades de tomate, se realiza una búsqueda "*in silico*" para determinar los marcadores moleculares con mayor número de alelos. Para comprobar dicho polimorfismo se prueba, en primer lugar, los marcadores mediante PCR para verificar que funcionan, y después se manda a secuenciar los resultados. Los resultados del trabajo fueron que sólo un marcador de 22 utilizados mostraba polimorfismo para las cuatro variedades. Es por ello que se decidió analizar 128 accesiones del Banco de Germoplasma del COMAV con nuevos marcadores de un anterior trabajo, y así obtener nuevas accesiones que presenten una mayor variabilidad genética y poder continuar con la optimización de un método de detección de contaminación varietal de semillas de tomate.

Palabras clave: Tomate, variedad, marcador molecular, PCR, SSR.

**Analysis of molecular markers for varietal differentiation in tomato seeds
(*Solanum lycopersicum* L.)**

Elena García Marín

Tutor: Dr. Santiago Vilanova Navarro

Abstract

Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is the most consumed vegetable worldwide, both in fresh consumption or industrially processed, so it is not surprising that there are more than 10.000 species cultivated around the world. Over the years, it has been sought to be able to differentiate the varieties in the early stages of development and even through their seeds. That is why the study of molecular markers in the tomato genome is an essential task for differentiation at the genetic level.

A molecular marker is a segment of DNA physically located on a chromosome, and can be from a gene to a single base. In tomato work, in general, with microsatellite markers or SSR (simple sequence repeat), which is a fragment of variable size that is repeated consecutively. The advantage of this type of marker is that it allows alleles to be differentiated thanks to the variation in the number of repetitions, that is, different tomato varieties may contain the same microsatellite, but with different number of repetitions, which would allow them to be differentiated in an analysis genetic set.

The study is framed within an objective of a European project (BRESOV; <https://bresov.eu/>) in which it is intended to be able to differentiate the potential contamination in tomato seed lots. This work consists in the differentiation of, specifically, four tomato varieties (*valenciano*, *Ty-12 F2*, *rosada ALTEA* and *estrella*) through the use of molecular markers of the SSR type from seed.

After DNA extraction from the seeds of four tomato varieties, an "*in silico*" search is carried out to determine the molecular markers with the highest number of alleles. To verify this polymorphism, the PCR markers are first tested to verify that they work, and then the results are sent to sequence. The results of the work show that only a marker out of 22 used were polymorphic for the four varieties. For this reason we decided to analyze 128 accessions from the COMAV Germplasm Bank with new markers from a previous study, and thus obtain new accessions that present greater genetic variability and be able to continue with the optimization of a method for detecting varietal contamination of seeds of tomato.

Key words: Tomato, variety, molecular marker, PCR, SSR.

Abreviaturas

Cro.	Cromosoma
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
DNA	Deoxyribonucleic Acid
PCR	Polymerase chain reaction
SSR	Simple Sequence Repeat
µL	Microlitro
ng	Nanogramo
T(°C)	Temperatura en grados centígrados
Nº	Número de
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA
CAPS	Cleaved Amplified Polymorphic Sequences
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
InDels	Inserción/Delección
QTL	Quantitative Trait Loci

Agradecimientos

Al doctor Santiago Vilanova Navarro por acompañarme en mis inicios en el mundo del laboratorio y a la doctora Mariola Plazas y a Loles por su paciencia conmigo en el laboratorio.

Tabla de contenido

1	Introducción	1
1.1	Importancia económica del tomate.....	1
1.2	Clasificación botánica, taxonómica, origen, domesticación y difusión del tomate.....	1
1.3	Genoma del tomate: características y peculiaridades	3
1.4	Variedades de tomate	4
1.5	Marcadores moleculares en tomate	8
1.6	Proyecto BRESOV	9
2	Objetivos	10
3	Materiales y métodos	10
3.1	Material vegetal.....	10
3.2	Optimización método de extracción DNA de semillas	10
3.3	Búsqueda “ <i>in silico</i> ” de marcadores	11
3.4	Selección de marcadores.....	14
3.4.1.	Extracción DNA de las variedades de tomate.....	14
3.4.2.	Pruebas con los marcadores seleccionados	14
3.4.3.	Marcaje de los marcadores seleccionados	15
3.4.4.	Selección final de los marcadores	16
3.5	Análisis de accesiones del Banco de Germoplasma	17
4	Resultados	17
4.1	Optimización método de extracción DNA de semillas	17
4.2	Búsqueda “ <i>in silico</i> ” de los marcadores.....	19
4.3	Selección de marcadores.....	22
4.3.1.	Extracción DNA de las variedades de tomate.....	22
4.3.2.	Pruebas con los marcadores seleccionados	22
4.3.4.	Marcaje de los marcadores seleccionados	26
4.3.4.	Selección final de los marcadores	28
4.4	Análisis de accesiones del Banco de Germoplasma	33
5	Discusión	36
6	Conclusión y perspectivas futuras	38
7	Bibliografía	38
8	Anexo: Protocolo de extracción de DNA de semilla de tomate (<i>Mixed CTAB Silica DNA extraction</i>)	49

Índice de figuras

Figura 1. Planta de tomate de la variedad <i>Valenciano</i> (Fuente: COMAV)	6
Figura 2. Planta de tomate de la variedad <i>Ty-12 F2</i> (Fuente: COMAV)	6
Figura 3. Planta de tomate de la variedad <i>rosada de Altea</i> (Fuente: COMAV)..	7
Figura 4. Planta de tomate de la variedad <i>Estrella</i> (Fuente: COMAV).....	7
Figura 5. Perlas mecánicas usadas para triturar las semillas de tomate (SSUFO 35 3,5mm UFO Stainless Steel Beads - Next Advance LOT E-6525)	11
Figura 6. Comparativa de las extracciones de DNA de las muestras T1, T2, T3 y T4 en un gel agarosa al 2% (18 de junio de 2019).....	18
Figura 7. Ejemplo del visor de la base de datos de <i>Sol Genomics Network</i> , con la versión del genoma " <i>Tomato genome Cro.omosomes (build SL2.50)</i> ", para la posición del genoma del marcador SSR117 (Cro. 1)	19
Figura 8. Producto de la PCR 58°C en un gel agar 2% (10 de julio de 2019) ..	23
Figura 9. Producto de la PCR 55°C y de la PCR 50°C en un gel agar 2% (22 de julio de 2019)	23
Figura 10. Producto de la PCR 55°C en un gel agar 2% (4 de noviembre de 2019)	24
Figura 11. Producto de la PCR 58°C en un gel agar 2% (5 de noviembre de 2019)	25
Figura 12. Producto de la PCR 60°C en un gel agar 2% (21 de febrero de 2020)	25
Figura 13. Productos de las PCR marcadas de 58°C y 55°C en un gel agar 2% (25 de julio de 2019)	26
Figura 14. Productos de las PCR marcadas de 55°C y 58°C (6 de marzo de 2020) y de 60°C (9 de marzo de 2020) en un gel agar 2%	27
Figura 15. Producto de PCR marcada del marcador SSR241 a 55°C en un gel agar 2% (11 de marzo de 2020)	28
Ilustración 16. Polimorfismo visto en el programa <i>Genotyper</i> para el marcador SSR70, donde muestra un pico a 130 en la muestra T6 y otro a 136 en las muestras T5, T7 y T8.....	31
Figura 17. Polimorfismo visto en el programa <i>Genotyper</i> para el marcador SSR70, donde muestra un pico a 130 para la muestra T6 y otro a 136 para las muestras T5, T7 y T8	33

Ilustración 18. Representación del PCoA, donde se presenta la distancia entre las 127 accesiones pertenecientes al banco de germoplasma del COMAV, remarcando las accesiones elegidas en color rojo..... 35

Índice de tablas

Tabla 1. Listado de marcadores utilizados para la búsqueda “ <i>in silico</i> ”, donde se detalla el cebador, la secuencia y su referencia	12
Tabla 2. Volúmenes utilizados (V_i) de las extracciones de DNA para llegar a la concentración final (C_f) de 20 ng	17
Tabla 3. Medición de la calidad del DNA extraído para las muestras T1 y T2 a fecha de 17 de junio de 2019.....	18
Tabla 4. Medición de la calidad del DNA extraído para las muestras T3 y T4 a fecha de 18 de junio de 2019.....	18
Tabla 5. Marcadores moleculares seleccionados, indicando el Cro.mosoma al que se les asocia, la secuencia de los cebadores, la posición en el genoma, el número de alelos diferenciados en la búsqueda “ <i>in silico</i> ”, el tamaño y la secuencia repetida	20
Tabla 6. Medición de la calidad del DNA extraído para las muestras T5, T6, T7 y T8 a fecha de 3 de julio de 2019.....	22
Tabla 7. Temperaturas finales para cada marcador tras las seis reacciones PCR que se realizaron para el primer conjunto de marcadores moleculares, especificando la temperatura de anillamiento ($T(^{\circ}C)$) y el termociclador usado	22
Tabla 8. Temperaturas finales para cada marcador tras las seis reacciones PCR que se realizaron para el segundo conjunto de marcadores moleculares, especificando la temperatura de anillamiento ($T(^{\circ}C)$) y el termociclador usado	24
Tabla 9. Reacciones de PCR marcada para el primer conjunto de marcadores a temperaturas $58^{\circ}C$ y $55^{\circ}C$, en la que se indica el tamaño del amplicón, el fluoróforo adjudicado, el termociclador utilizado y el resultado (+: éxito; -: fallo) (25 de julio de 2019)	26
Tabla 10. Reacciones de PCR marcada a temperaturas $58^{\circ}C$ y $55^{\circ}C$ (6 de marzo de 2020) y a $60^{\circ}C$ (9 de marzo de 2020), en la que se indica el tamaño del amplicón, el fluoróforo adjudicado, el termociclador utilizado y el resultado (+: éxito; -: fallo).....	27
Tabla 11. Diluciones utilizadas según la intensidad de las muestras con los fluoróforos para el primer conjunto de marcadores.....	28
Tabla 12. Grupos diseñados para secuenciar el primer conjunto de marcadores	29
Tabla 13. Análisis informático de la secuenciación del primer conjunto de marcadores, donde se indica la altura (tamaño de pico) que se ha observado,	

remarcando con “-” cuando no se ha obtenido resultado y con el color rojo el marcador que presenta polimorfismo (15 de octubre de 2020) 30

Tabla 14. Diluciones utilizadas según la intensidad de las muestras con los fluoróforos para el segundo conjunto de marcadores 31

Tabla 15. Grupos diseñados para secuenciar el segundo conjunto de marcadores (21 de julio de 2020) 32

Tabla 16. Marcadores moleculares seleccionados del trabajo de Zuriaga (2009) por sus números de alelos diferentes, junto con la secuencia de los cebadores, el tamaño de amplicón teórico y la repetición de la secuencia 34

1 Introducción

1.1 Importancia económica del tomate

El tomate es la hortaliza que mayor producción tiene en el mundo, haciendo que sea uno de los cultivos de mayor comercialización y valor económico. El incremento en su producción es debido a que su demanda es continua y a que el rendimiento de las cosechas ha aumentado sin la necesidad de una mayor superficie de cultivo (*El cultivo del tomate*, s. f.; FAOSTAT, 2018). Otro de los motivos es que es el vegetal que más variedades comerciales tiene, ya que, pese a ser una planta tropical, puede cultivarse en cualquier punto del mundo (bien al aire libre o en invernaderos) (Foolad, 2007) gracias a su gran adaptabilidad.

Además, es una fuente de moléculas bioactivas (en especial los carotenoides), aportándole un alto valor nutricional, y que cuenta con propiedades benéficas para la salud por su actividad antioxidante y su contenido en vitamina A y C. Todo ello le aporta un valor añadido por el consumidor, lo que se traduce en un alto valor económico para productores e industrias (Colle *et al.*, 2010; He *et al.*, 2003; Todorovska *et al.*, 2014).

La producción mundial de tomate, en el año 2018, fue de más de 182 millones de toneladas, con una superficie de cultivo de 4,7 millones de ha y con un valor de producción bruta de 88 millones de USD (dólar estadounidense). Los principales países productores de tomate son: China, Estados Unidos de América, India, Turquía, Egipto, Italia, Irán y España (FAOSTAT, 2018). España, el noveno productor de tomate mundial, produjo en 2019 más de 5 millones de toneladas, con una superficie de cultivo de 57 mil ha (*Superficies y producciones anuales de cultivos*, 2020).

1.2 Clasificación botánica, taxonómica, origen, domesticación y difusión del tomate

El tomate pertenece a la familia *Solanaceae*, que cuenta con más de 3.000 especies, muchas de ellas de gran importancia económica, como son la patata, el tabaco y el pimiento (Van der Hoeven *et al.*, 2002; Bergougnoux, 2014). En ella se encuentra tres subfamilias, en la que destaca *Solanoideae*, a la que pertenece la especie *Solanum lycopersicum*, el tomate cultivado (Nee *et al.*, 1991; Knapp *et al.*, 2004).

Linnaeus (1753) denominó al tomate cultivado *S. lycopersicum*, pero poco después fue cambiado por *S. esculentum* por Miller en 1754. Finalmente, los estudios de Peralta y Spooner (2005) concluyeron que la denominación correcta para el tomate es el dado por Linnaeus, pero que la especie se encontraba dentro del grupo *Solanum* sec. *Lycopersicon*, el cual consta de 13 taxones: el tomate cultivado (como planta silvestre y domesticada) y 12 especies silvestres (como

son, por ejemplo, *S. chilense*, *S. pennellii*, *S. peruvianum* y *S. pimpinellifolium* (Peralta *et al.* 2005; Spooner *et al.* 2005; Peralta *et al.* 2008).

Es una planta anual y perenne de tipo arbustiva (con desarrollo rastrero, erecto o semi-erecto), con tallos peludos (debido a la presencia de tricomas), hojas bipinnadas y flores con 5 pétalos. Su principal atractivo (aunque fue tratada de ornamental en un principio) es su fruto carnoso, el cual es uno de los frutos con mayor cantidad de minerales y vitaminas, y es muy solicitado por los consumidores al tener licopeno, un bajo valor calórico y un elevado contenido en agua y en azúcares solubles (Diez, 1995; Fernández-Ruiz *et al.*, 2004). Es una especie diploide (2n) con 24 cromosomas y un genoma de 950Mb (Nuez y Prohens, 2008), siendo además una especie modelo en el estudio de la edición genómica. Presenta una reproducción autógena y alto grado de homocigosidad (Diez, 1995).

El género *Solanum* tiene como centro de origen la región andina del continente americano, una zona que actualmente está compartida por Bolivia, Chile (incluyendo las Islas Galápagos), Colombia, Ecuador y Perú (Jeckins, 1948; Rick, 1976; Nuez, 1995; Knapp *et al.*, 2004; Blanca *et al.*, 2012) y que presenta una gran diversidad de hábitats ecológicos (desde la costa del Pacífico hasta a los 3.300 metros del Altiplano Andino) y climas (tanto áridos –desierto– como lluviosos –selva tropical húmeda–), lo cual ha contribuido a la gran adaptabilidad que presenta el tomate (Bergougnoux, 2014).

El tomate es un cultivo transdomesticado, es decir, ha sido domesticado fuera de su lugar de origen. Según el estudio de Blanca y colaboradores (2012), el origen del tomate cultivado se encuentra en la domesticación de *S. lycopersicum* cerasiforme (la cual se originó a partir de *S. pimpinellifolium*), primero en la zona andina (donde aumentó el tamaño del fruto) y después en la mesoamericana (donde existen evidencias etimológicas, como son las palabras "tomatl" (Van der Hoeven *et al.*, 2002) y "jitomate" (Peralta *et al.*, 2006)), donde se crearon diferentes variedades tradicionales de tomate cultivado y fueron encontrados por los españoles tras la conquista de México en 1523 (Rick, 1978), quienes lo expandieron por todo el mundo (Blanca *et al.*, 2012).

Pero, no fue hasta 1847 cuando se comenzó a producir de forma comercial a pequeña escala en Lafayette College en Easton, Pensilvania (EE.UU.), donde creció hasta convertirse en uno de los cultivos más importantes a nivel mundial en el siglo XX (Foolad, 2007).

En cuanto al síndrome de domesticación que sufrió el tomate, destaca el aumento del tamaño del fruto, la variedad de formas (achatada, de pera, redonda, de campana y de torpedo) y el aumento de tamaño y uniformidad en las semillas (Doganlar *et al.*, 2000; Tanksley, 2004; Bai y Lindhout, 2007).

1.3 Genoma del tomate: características y peculiaridades

El tomate es uno de los principales modelos en la investigación vegetal debido a su pequeño tamaño de genoma, su alta homocigosidad (Arumuganathan y Earle, 1991; Peterson *et al.*, 1998), su gran gama de mutantes (Menda *et al.*, 2004), su facilidad de regeneración (Hobson y Grierson, 1993), su falta de duplicación de genes (McCormick *et al.*, 1986; Fillatti *et al.*, 1987) y la gran cantidad de reservas genéticas que hay por todo el mundo en bancos de germoplasma pues, como estiman Ebert y Chou (2015), se estima que hay 84.300 accesiones, tanto de especies silvestres como cultivadas. Los bancos de germoplasma más importantes en cuanto a esta especie se encuentran en Taiwán (Centro Asiático de Investigación y Desarrollo de Vegetales (AVRDC)), China, EE.UU. (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) y Centro de Recursos Genéticos del Tomate CM Rick (TGRC) de la Universidad de California), Ginebra (Unidad de Recursos Fitogenéticos en Ginebra (PGRU)) (Rossi *et al.*, 1998) y España (Banco de Germoplasma de Especies Hortícolas del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA) de Aragón y en el banco del Instituto Universitario de Conservación y mejora de la Agrodiversidad Valenciana de la Universitat Politècnica de València (COMAV-UPV) (INNOVA, 2008)).

Pero, a pesar de hay un gran reservorio de especies silvestres de tomate, el genoma del cultivado es muy pobre, estimando que sólo contienen un 5% de la variación genética de sus parientes silvestres (Miller y Tanksley, 1990). Esta poca variabilidad fue causada por los diferentes cuellos de botella por los que ha pasado la especie (cuando fue llevada desde la región de los Andes hasta la zona de Mesoamérica, y de ahí a Europa), ya que la selección de un cultivo hortícola se realiza en base a un número muy pequeño de plantas de un mismo tipo, por lo que la deriva génica reduce en gran medida su variación genética (Rick 1976; Miller y Tanksley 1990; Williams y St. Clair 1993; Bai y Lindhout, 2007). De ahí que se hayan identificado un pequeño número de polimorfismos en el acervo genético del tomate cultivado (Park *et al.*, 2004; García-Martínez *et al.*, 2005; Tam *et al.*, 2005).

El mapeo de los caracteres controlados por un solo gen en el tomate (caracteres morfológicos, fisiológicos y resistencia a enfermedades) comenzaron en 1930 (MacArthur, 1934), mucho antes que en muchas otras especies de cultivos (Tanksley, 1983; Tanksley *et al.*, 1992), logrando construir un mapa con 12 grupos de ligamiento mediante marcadores RFLP (Restriction Fragment Length Polimorfism) (Linkage Committee, 1973; Tanksley *et al.*, 1992). Pero, debido al bajo polimorfismo de las especies de tomate cultivado, la mayoría de las poblaciones de mapeo fueron cruces interespecíficos (Chen y Foolad, 1999).

En 2003, científicos de diez países promovieron el Proyecto Internacional de Secuenciación del Tomate, también conocido como el Proyecto Internacional

de Genómica de Solanáceas (SOL) (Mueller *et al.*, 2005b), un análisis del genoma estructural del tomate de los 12 cromosomas (secuenciado cada uno por un país: China (Cro. 3), Francia (Cro. 7), India (Cro. 5), Italia (Cro. 12), Japón (Cro. 8), Corea (Cro. 2), Países Bajos (Cro. 6), España (Cro. 9), Reino Unido (Cro. 4) y EE. UU. (Cro. 1, 10 y 11)) mediante la generación de secuencias de alta calidad a partir de cromosomas artificiales bacterianos (BAC). El Proyecto se inició en 2005 con la secuenciación del genoma de la variedad de tomate domesticado Heinz 1706 (Rajan *et al.*, 2012) y está generando una gran cantidad de datos, como son bases de datos de genes, base de datos de expresión génica, base de datos de metabolitos y anotaciones del genoma, que se mantienen en la red SOL Genomics Network (SGN) (<http://solgenomics.net/>; Mueller *et al.* 2005).

El genoma secuenciado completo se publicó en 2012, estando actualmente en su versión 4.0 (Sol Genomics Network International, s. f.). El resultado comprende 12 cromosomas y aproximadamente 950 Mbp de DNA, con un 59% de secuencias no codificantes, 28% de secuencias codificantes, 11% de transposones, 2% de secuencias orgánicas (Wang *et al.*, 2006) y 35.000 genes (Khush and Rick, 1968; Peterson *et al.*, 1998; van der Hoeven *et al.*, 2002).

Los miembros de la sección *Lycopersicon* son transformados fácilmente mediante el co-cultivo con *Agrobacterium tumefaciens*, siendo los tomates transgénicos producidos de forma rutinaria (McCormick *et al.*, 1986; Patil *et al.*, 2002). Además, el primer cultivo alimenticio transgénico de EE. UU. fue el tomate, al que se le insertó posicionalmente un gen de resistencia a enfermedades (Martin *et al.*, 1993a; Martin *et al.*, 1993b; Breuning y Lyons, 2000).

1.4 Variedades de tomate

El tomate, como producto fresco, es vendido en todo el mundo en una gran gama de tamaños, formas y colores. Esto es debido a que los mejoradores optimizan continuamente sus líneas mediante la realización de nuevos cruces con su propio material o usando los cultivares competidores (bajo el amparo de la Ley de obtentores (UPOV Breeders Rights, 1961)), usando así recombinaciones que ocurren naturalmente para producir cultivares que combinan caracteres favorables.

Debido a su historia de domesticación, el tomate cultivado ha sufrido diversos cuellos de botella a lo largo de los siglos, lo que derivó en una drástica reducción de diversidad genética. Pese a ello, su diversidad taxonómica y ecológica lo ha convertido en una especie modelo para estudios evolutivos (Bauchet & Causse, 2012). La explotación de la heterosis (Georgiev, 1991; Scott y Angell, 1998) y de la variabilidad extraespecífica que poseen las diferentes especies de tomate, en especial toda la relacionada con resistencia a estreses abióticos y bióticos, han dado lugar al desarrollo de las variedades que se conocen actualmente (Nuez y Prohens, 2008).

Actualmente, existen numerosas variedades diferentes de tomate que se comercializan a lo largo y ancho del mundo. Algunas de las más cultivadas y consumidas son Applause, Angela, Baladre, Bella rosa, Carbón, Cherry, Colgar en rama, Montserrat y Muchamiel (*El tomate y sus variedades*, s. f.).

Las cuatro variedades que se han utilizado en este trabajo son variedad *Valenciano*, variedad *Ty-12 F2*, variedad *Estrella* y variedad *Rosa Altea*.

Empezando por la variedad *Valenciano* (Figura 1), es una variedad tradicional valenciana (localizado en las comarcas de l'Horta Sud y l'Horta Nord) de verano, con porte indeterminado, hojas lobuladas e inflorescencia ramificada o bifurcada acabando en brote vegetativo. Además, es frecuente encontrar en una misma planta variabilidad en la forma de los frutos (como puede apreciarse en la Figura 1) desde el tipo codiforme al achatado, el cual presenta un cuello verde muy marcado que desaparece en la madurez, quedando el fruto de color rojo muy intenso, ligeramente acostillado con una cicatriz pistilar estriada y peduncular cubierta por el cáliz, textura carnosa y jugosa, un gran tamaño y es muy aromático con un sabor intenso (Roselló, 2010). Presenta dos subvariedades diferentes entre sí:

- Subvariedad "*Masclet*": se caracteriza por tener una forma longitudinal del fruto cordiforme, acabado en un pico muy prominente y propio, tener un interior muy sólido con lóculos desorganizados, muy carnoso, y suele tener más cantidad de pulpa que el valenciano blanco. Se cultiva al aire libre y en invernadero en algunos pueblos de La Ribera Baixa (Conselleria de Agricultura, Medio ambiente, Cambio climático y Desarrollo Rural (Generalitat Valenciana), s. f. a).
- Subvariedad "*Blanca o bombo*": cultivada tanto al aire libre como en invernadero en pueblos de La Ribera Baixa (como El Perelló), de La Ribera Alta y de L'Horta. Se distingue del subtipo *Masclet* por presentar frutos más gordos y con menos punta, un interior muy sólido con lóculos desorganizados muy carnoso y con poca cantidad de pulpa con semillas. Destaca por su baja acidez, su sabor equilibrado y su carnosidad (Conselleria de Agricultura, Medio ambiente, Cambio climático y Desarrollo Rural (Generalitat Valenciana), s. f. b).



Figura 1. Planta de tomate de la variedad *Valenciano* (Fuente: COMAV)

En segundo lugar, la variedad *Ty-12 F2* (Figura 2), es un tomate beef multilocular rosado. Es cultivado en primavera/verano dentro de invernaderos y cuenta con un sabor muy aromático. Además, es resistente al virus del mosaico del tomate (ToMV) y al *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) (*TY 12 RZ F1* (73-882), s. f.).



Figura 2. Planta de tomate de la variedad *Ty-12 F2* (Fuente: COMAV)

En tercer lugar, la variedad *rosada de Altea* (Figura 3) es también una variedad tradicional valenciana, en concreto, del municipio de Altea (comarca La Marina Baixa). Se caracteriza por sus frutos de color rosa ligeramente achatados y una calidad organoléptica muy alta, con frutos muy sólidos, carnosos y de gran tamaño, que cuentan con una suave acidez y un sabor equilibrado. Funciona muy bien en invernaderos y al aire libre durante la primavera/verano (Conselleria de Agricultura, Medio ambiente, Cambio climático y Desarrollo Rural (Generalitat Valenciana), s. f. c).



Figura 3. Planta de tomate de la variedad *rosada de Altea* (Fuente: COMAV)

En cuarto, y último, lugar, la variedad *Estrella* (Figura 4) es propia de ambientes secos y salinos de los huertos mediterráneos, además de estar adaptada a condiciones de invernadero y de al aire libre. Presenta grandes producciones de frutos uniformes y de buena calidad culinaria (Agromática, 2019; *El tomate y sus variedades*, s. f.).



Figura 4. Planta de tomate de la variedad *Estrella* (Fuente: COMAV)

1.5 Marcadores moleculares en tomate

Un marcador de DNA se origina de una pequeña región de DNA con polimorfismo de secuencia entre individuos dentro o entre especies. Durante las últimas dos décadas, se han desarrollado y evolucionado diferentes tipos de marcadores moleculares., como son RFLP, RAPD, AFLP, SSR, CAPS, SNP e InDels.

El desarrollo y uso de marcadores basados en PCR ha aumentado en tomate, pues son más fáciles de usar, más baratos, más rápidos y menos laboriosos de desarrollar (Fulton *et al.*, 1999; Ganal *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2000; Zhang & Stommel, 2001; Frary *et al.*, 2005). Sin embargo, la mayoría de los marcadores de DNA disponibles no detectan polimorfismo dentro y entre las especies cultivadas (Miller & Tanksley, 1990; Foolad *et al.*, 1993; Williams & Clair, 1993; Saliba-Colombani *et al.*, 2000; Ruiz *et al.*, 2005), lo que restringe su uso en muchos programas de genética y de mejora de tomates. Es por ello que ahora se trabaje en descubrir marcadores genéticos de alta resolución, como son SNP e InDels (Suliman-Pollatschek *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2004; Labate & Baldo, 2005).

Para que estos marcadores genéticos sean útiles, han de cumplir los siguientes requisitos:

- El polimorfismo fenotípico y genético y la segregación han de existir para el rasgo de interés en la población reproductora.
- Se ha de determinar la asociación de ligamiento genético entre genes o QTL de interés y marcadores genéticos.
- Ha de haber polimorfismo en la población para los marcadores genéticos asociados.

Esto es un problema en el caso del tomate, ya que presenta una baja frecuencia de polimorfismo en las poblaciones de mejora (Stevens y Robbins, 2007).

Entre los diferentes marcadores, los SSR muestran un alto nivel de polimorfismo intraespecífico en *S. lycopersicum*, en concreto, aquellos con la repetición AT/TA (Smulders *et al.*, 1997; Areshchenkova y Ganal, 2002; Bredemeijer *et al.*, 2002; Suliman-Pollatschek *et al.*, 2002; He *et al.*, 2003; Frary *et al.*, 2005; Tam *et al.*, 2005; García-Martínez *et al.*, 2006). Estos marcadores son un sistema importante para la identificación de variedades, pues presentan herencia codominante, permitiendo la distinción de individuos homocigotos de los heterocigotos, es decir, permitiendo determinar la configuración de los alelos de cada genotipo y sus frecuencias alélicas (Powell *et al.*, 1996; Parmar *et al.*, 2013). Además, son económicos de desarrollar, altamente reproducibles, de fácil detección (Smulders *et al.*, 1997; He *et al.*, 2003; Frary *et al.* (2005) *et al.*, 2005;

Tam *et al.*, 2005; Varshney *et al.*, 2005) y se prefiere a los SNPs (que suelen ser bialélicos) por su tendencia a presentar más de dos alelos.

1.6 Proyecto BRESOV

El Proyecto BRESOV (*Breeding for Resilient, Efficient and Sustainable Organic Vegetable production*) busca abordar los desafíos nutricionales de una población mundial en crecimiento y las condiciones climáticas cambiantes mediante la mejora de la productividad de diferentes cultivos de hortalizas en una infraestructura agrícola orgánica y sostenible. Aglutina a 22 socios de diez países europeos, así como a China, Túnez y a Corea del Sur. Está financiado por el Programa Marco de Investigación de la Comisión Europea Horizonte 2020, la Fundación Nacional de Investigación de Corea y el Ministerio de Ciencia y Tecnología de China, con un presupuesto de 6 millones de euros (Comunicación, 2018; *Proyecto europeo para conseguir hortalizas con resistencia a plagas y al cambio climático*, s. f.; *Shaping the future of organic breeding & farming | BRESOV*, s. f.; User, s. f.).

Además, está reforzado con la participación activa de servicios de asesoramiento, institutos de investigación, compañías de semillas y procesadores de alimentos de diversos contextos geográficos y climáticos en Europa y países no pertenecientes a la UE (*Proyecto europeo para conseguir hortalizas con resistencia a plagas y al cambio climático*, s. f.).

En el proyecto se trabaja con brócoli, judías verdes y tomates, cultivos hortícolas básicos con un destacado papel en el cumplimiento del objetivo mundial de seguridad alimentaria y nutricional, ya que, en condiciones orgánicas, pueden contribuir a almacenar carbono e introducir nitrógeno, mejorando así la calidad orgánica del suelo. Los resultados que se esperan alcanzar se indican en la web del proyecto, y son (*Shaping the future of organic breeding & farming | BRESOV*, s. f.):

- Ampliar la base genética del mejoramiento orgánico de brócoli, judías verdes y tomates.
- Mejorar las variedades existentes y las desarrolladas recientemente para la producción de hortalizas orgánicas.
- Mejorar la competitividad de tres cultivos hortícolas importantes en la producción ecológica.
- Incrementar la tolerancia de las plantas al estrés abiótico y biótico.

En España participan tres entidades: el Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV-UPV), el Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA) y la Universidad de Almería.

Por un lado, el COMAV-UPV lidera el WP3, llevando a cabo actividades de selección y mejora para el desarrollo de nuevos materiales vegetales específicamente adaptados a la agricultura ecológica. El equipo realiza, en especial, trabajos en tomate, actividades de divulgación y participa en el fenotipado de múltiples rasgos y genotipado de una colección de materiales seleccionados del proyecto BRESOV y en el diseño de métodos para garantizar la calidad de las semillas ecológicas.

Por otro lado, el Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA) de Asturias es el encargado de fenotipar y genotipar paneles de judía roja y del mapeo poblacional para identificar los mejores genotipos adaptados a la producción orgánica y genes o QTL importantes en la producción orgánica de judías.

2 Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es encontrar marcadores moleculares, a ser posible uno por cromosoma, que permita distinguir diferentes variedades de tomate a partir de un análisis de un conjunto de semillas.

Por tanto, los objetivos que se buscan cumplir en la investigación son:

- Optimización del método de extracción de DNA de semillas de diferentes variedades de *Solanum lycopersicum* L.
- Selección de los 12 SSRs más polimórficos (uno por cromosoma) de los 48 que se disponen.

3 Materiales y métodos

3.1 Material vegetal

Se utilizaron cuatro variedades diferentes de tomate, las cuales fueron denominadas con la letra T y un número. Las variedades fueron: tomate variedad *valenciano* (T1, T2, T3, T4 y T8), tomate variedad *Ty-12 F2* (T5), tomate variedad *rosada ALTEA* (T6) y tomate variedad *estrella* (T7).

3.2 Optimización método de extracción DNA de semillas

Se aplicaron dos técnicas de extracción de DNA de semilla de tomate para determinar cuál era más efectivo: mediante bolsas de extracción y mediante perlas mecánicas.

Para el primer método, se realizó la extracción de DNA de semilla de tomate variedad *valenciano*. Se utilizaron 10 semillas por extracción, haciendo dos réplicas a las que se denominan T1 y T2, que fueron machacadas con mortero

en el interior de bolsas de extracción (*Extraction Bags 12x12*). Tras esto, se siguió el protocolo “*Mixed CTAB Silica DNA extraction*” (Vilanova et al., 2020) desde el paso 6 (el protocolo entero se encuentra en el apartado “Anexo: Protocolo de extracción de DNA de semilla de tomate (*Mixed CTAB Silica DNA extraction*)”). Llegados al paso 12, se recogieron 400 µL de la fase acuosa al no haber suficiente como para coger 800 µL.

Para el segundo método, se gastaron de nuevo semillas de tomate variedad *valenciano*, usando 10 semillas para la réplica T3 y 15 para la T4. Se colocaron cada grupo de semillas en un Eppendorf junto con una perla mecánica (SSUFO 35 3,5mm UFO Stainless Steel Beads - Next Advance LOT E-6525) (Figura 5), y se sumergieron en nitrógeno líquido. Tras esto, se introdujeron en el machacador (Retsch MM400) y se volvieron a sumergir en nitrógeno líquido hasta que se les adicionó el buffer CTAB y el β-mercaptoethanol. A partir de ahí, se siguió el protocolo “*Mixed CTAB Silica DNA extraction*” (Vilanova et al., 2020) desde el paso 6. Llegados al paso 12, se recogieron de nuevo 400 µL de la fase acuosa al no haber suficiente para 800 µL.



Figura 5. Perlas mecánicas usadas para triturar las semillas de tomate (SSUFO 35 3,5mm UFO Stainless Steel Beads - Next Advance LOT E-6525)

Una vez obtenido el DNA de las muestras para ambos métodos, se midió su calidad mediante el espectrofotómetro UV-Vis NanoDrop y su integridad mediante geles de agarosa al 0,8%.

3.3 Búsqueda “*in silico*” de marcadores

A partir de un listado de 48 marcadores de tomate ya descritos por diversos autores (Tabla 1), se realizó una búsqueda “*in silico*” de los marcadores moleculares más polimórficos para cada uno de los 12 cromosomas. Para ello se utilizó la base de datos de *Sol Genomics Network* y la versión del genoma “*Tomato genome chromosomes (build SL2.50)*”, donde hay genotipadas 54 entradas de *Solanum lycopersicum*, las cuales se usaron para determinar el número de alelos.

Para determinar la posición en el genoma de los 48 marcadores se realizó una búsqueda mediante BLASTn (donde se compara nucleótidos con una base de datos de nucleótidos) utilizando el cebador reverso a excepción de cuando no se encontró en la base, recurriendo también al cebador directo. Para tener un único alineamiento de la secuencia del marcador con la posición en el genoma del tomate, se dio el valor de 1 al parámetro *E-value*.

Además, se determinó el tamaño del amplicón de cada marcador para poder después formar los grupos de marcaje y poder diferenciarlos en el análisis.

Tabla 1. Listado de marcadores utilizados para la búsqueda “*in silico*”, donde se detalla el cebador, la secuencia y su referencia

Cro.	Marcador	Cebador	Secuencia (5'-3')	Referencia
1	SSR117	F	AATTCACCTTTCTTCCGTCG	Frary <i>et al.</i> (2005)
		R	GCCCTCGAATCTGGTAGCTT	
	SSR9	F	CCCTTTGCAAGTTCTTCTTCA	Kwon <i>et al.</i> (2009)
		R	TTCATGAGCCAACATAGGAGG	
	SSR92	F	AAGAAGAAGGATCGATCGAAGA	Kwon <i>et al.</i> (2009)
		R	TCATGACCACGATACTACATGTTTC	
	SSR65	F	GGCAGGAGATTGGTTGCTTA	Kwon <i>et al.</i> (2009)
		R	TTCCTCCTGTTTCATGCATTC	
2	SSR40	F	TGCAGGTATGTCTCACACCA	Frary <i>et al.</i> (2005)
		R	TTGCAAGAACACCTCCCTTT	
	SSR96	F	GGGTTATCAATGATGCAATGG	Frary <i>et al.</i> (2005)
		R	CCTTTATGTCAGCCGGTGTT	
	SSR26	F	CGCCTATCGATACCACCACT	Kwon <i>et al.</i> (2009)
		R	ATTGATCCGTTTGGTTCTGC	
	SSR50	F	CCGTGACCCTCTTTACAACG	Kwon <i>et al.</i> (2009)
		R	TTGCTTTCTTCTTCGCCATT	
3	SSR22	F	GATCGGCAGTAGGTGCTCTC	Kwon <i>et al.</i> (2009)
		R	CAAGAAACACCCATATCCGC	
	SSR86	F	AGGGCAACAAATCCCTCTTT	Kwon <i>et al.</i> (2009)
		R	GGAGACGAGGCTGCTTACAC	
	SSR27	F	CCCAAATCAAGGTTTGTGGT	Frary <i>et al.</i> (2005)
		R	TCAGATGCCACCACTCTCAG	
	SSR320	F	ATGAGGCAATCTTCACCTGG	Frary <i>et al.</i> (2005)
		R	TTCAGCTGATAGTTCCTGCG	
4	LEat018	F	CGGCGTATTCAAACCTTTGG	He <i>et al.</i> (2003)
		R	GCGGACCTTTGTTTTGGTAA	
	SSR94	F	AATCAGATCCTTGCCCTTGA	Kwon <i>et al.</i> (2009)
		R	AGCTGAGAAAGAGCAGCCAT	
	SSR214	F	AAATTCCCAACACTTGCCAC	Kwon <i>et al.</i> (2009)
		R	CCCACCACTATCCAAACCC	
	SSR310	F	GCGATGAGGATGACATTGAG	Kwon <i>et al.</i> (2009)
		R	TTTACAGGCTGTCGCTTCT	

5	LEMDDNa	F	TAAATACAAAAGCAGGAGTCG	Mazzucato <i>et al.</i> (2008)
		R	GAGTTGACAGATCCTTCAATG	
	SSR115	F	CACCCTTTATTTCAGATTCCTCT	Frary <i>et al.</i> (2005)
		R	ATTGAGGGTATGCAACAGCC	
5	SSR13	F	GGGTCACATACTCATACTAAGGA	Kwon <i>et al.</i> (2009)
		R	CAAATCGCGACATGTGTAAGA	
5	SSR602	F	GGGTCACATACTCATACTAAGGA	Kwon <i>et al.</i> (2009)
		R	GGCAATCATAGCCACTTGGT	
6	SSR326	F	TTAGGCAGCTTACGACTGGA	Kwon <i>et al.</i> (2009)
		R	GAGCCAGAGGTCCTTCAGTG	
	Lea019	F	TGTAGATAACTTCCTAGCGACAATC	He <i>et al.</i> (2003)
		R	ACGGACGGATGGACAAATG	
6	SSR47	F	TCCTCAAGAAATGAAGCTCTGA	Frary <i>et al.</i> (2005)
		R	CCTTGGAGATAACAACCACAA	
6	SSR350	F	GGAATAACCTCTAACTGCGGG	Frary <i>et al.</i> (2005)
		R	CGATGCCTTCATTTGGACTION	
7	SSR241	F	TCAACAGCATAGTGGAGGAGG	Frary <i>et al.</i> (2005)
		R	TCCTCGGTAATTGATCCACC	
	SSR557	F	GCCACAAGAAACATTGCTGA	Frary <i>et al.</i> (2005)
		R	TACGCGCACGTGCATAAATA	
7	TGS540	F	GCAAATCCACCTTGTCCAGT	solgenomics.net
		R	AGCAACATGAGAGTTCGCTGA	
7	TGS2586	F	GGTTACCCCCAAAACAATCA	solgenomics.net
		R	TTCTCCCATGTTTGTGGGAT	
8	LELEUZIP	F	CGTCTGCATCAATTTCTC	Mazzucato <i>et al.</i> (2008)
		R	GTGTTCTTACATTTTCAGCTCC	
	SSR63	F	CCACAAACAATTCATCTCA	Kwon <i>et al.</i> (2009)
		R	GCTTCCGCCATACTGATACG	
8	SSR344	F	TGTTGCTCGAACTCTCCAAA	Frary <i>et al.</i> (2005)
		R	CATAGGAGAGGTAACCCGCA (1)	
8	SSR244	F	GCGATGGTCTGAGACACTGA	Frary <i>et al.</i> (2005)
		R	CAGCTGGTGATCCTCCTCTT	
9	SSR70	F	TTTAGGGTGTCTGTGGGTCC	Frary <i>et al.</i> (2005)
		R	GGAGTGCGCAGAGGATAGAG	
	SSR19	F	CCGTTACCTTGGTCCATCAC	Frary <i>et al.</i> (2005)
		R	GGGAGATGCCACATCACATA	
9	SSR99	F	GCCTCGGATTCAATAGCATT	Kwon <i>et al.</i> (2009)
		R	CACAAAGAAGCAAACAACCTCCA	
9	SRR28	F	ACCAAATGGAAATGGGTCAA	Kwon <i>et al.</i> (2009)
		R	CCCTAAGACTAACGACAACCAA	

10	SSR34	F	TTCGGATAAAGCAATCCACC	Frary <i>et al.</i> (2005)
		R	TCGATTGTGTACCAACGTCC	
	SSR248	F	GCATTGCTGTAGCTCGTTT	Kwon <i>et al.</i> (2009)
		R	GGGAGCTTCATCATAGTAACG	
SSR218	F	GTGGTTATCCCAAGACCCAA	Frary <i>et al.</i> (2005)	
	R	CGCCAGTCTTCCTCTGACTT		
	SSR223	F	TGGCTGCCTCTTCTCTGTTT	Frary <i>et al.</i> (2005)
		R	TTTCTTGAAGGGTCTTTCCC	
11	LE20592	F	CTGTTTACTTCAAGAAGGCTG	Mazzucato <i>et al.</i> (2008)
		R	ACTTTAACTTTATTATTGCCACG	
	SSR46	F	CCGAGGCGAATCTTGAATAC	Frary <i>et al.</i> (2005)
		R	GCACCATCTCTTGTGCCTCT	
SSR76	F	ACGGGTCGTCTTTGAAACAA	Kwon <i>et al.</i> (2009)	
	R	CCACCGGATTCTTCTTCGTA		
	TGS188	F	GTTTGGTTATGTTTTCGTTGGC	solgenomics.net
		R	CTAGTATGGTTCGCAAATGTTCA	
12	SSR44	F	TCATCTGCAATTCATGGCTC	Frary <i>et al.</i> (2005)
		R	AGGTCAAGGATGTGCTTCCC	
	SSR20	F	GAGGACGACAACAACAACGA	Kwon <i>et al.</i> (2009)
		R	GACATGCCACTTAGATCCACAA	
TES1420	F	GCAGCTCGTCATTTCTTCAA	solgenomics.net	
	R	AGTGGCTGAAGAAGAACGGAA		
	TGS1002	F	GTGTGGCTGTGATGCTTGAT	solgenomics.net
		R	TCACTCCAAACCAAACCCTC	

3.4 Selección de marcadores

3.4.1. Extracción DNA de las variedades de tomate

Se extrajo DNA de las muestras T5, T6, T7 y T8 siguiendo el protocolo de extracción descrito en el apartado 3.2 mediante perlas mecánicas, pero utilizando 15 semillas de cada variedad.

Una vez obtenido el DNA, se diluyeron las extracciones para trabajar con una concentración de DNA de 20 ng. Para ello, se calculó el volumen a añadir de agua según la concentración inicial del DNA extraído, y así tener un volumen final de 100 μ L.

3.4.2. Pruebas con los marcadores seleccionados

En primer lugar, se prepararon las diluciones de los marcadores elegidos para que estuvieran a una concentración de 10 μ M (10 μ L de stock de cada marcador más 90 μ L de H₂O pura).

En segundo lugar, se comprobó que los marcadores funcionaran mediante una prueba de PCR, a una temperatura de anillamiento de 58°C. Para ello, se

preparó un mix PCR de 15 μ L para cinco muestras: 7,5 μ L de Mixtaq (2x *PCRBIO Taq Mix* contiene: *PCRBIO Taq* DNA polimerasa, 6mM MgCl, 2mM dNTPs, amplificadores (*enhancers*) y estabilizadores), 0,15 μ L de cebador directo, 0,15 μ L de cebador reverso, 6,2 μ L de H₂O ultrapura y 1 μ L de DNA (20 ng/ μ L).

El protocolo de PCR que se siguió consta de los siguientes pasos: 2 minutos a 94°C para la activación enzimática, 35 ciclos (amplificación por desnaturalización a 94°C durante 15 segundos, 30 segundos a 58°C para el anillamiento y 30 segundos a 72°C para la extensión) y una extensión final a 72°C durante 10-20 minutos.

Y, en tercer lugar, el producto de PCR se comprobó en un gel de agarosa 2% (el cual estaba compuesto de 80 mL de tampón TAE y 1,60 g de agar) mediante electroforesis (a 120 vatios durante 30 minutos).

Para aquellos marcadores que no funcionaron (no se visualizaban de forma clara en el gel) a 58°C, se probaron a diferentes temperaturas de anillamiento (55°C, 50°C y 60°C) y en un termociclador diferente (Mastercycler Nexus Gradient), modificando así los programas de PCR según la temperatura media.

3.4.3. Marcaje de los marcadores seleccionados

Los marcadores que funcionaron correctamente se agruparon según su tamaño de amplicón y su temperatura de anillamiento para formar los grupos de marcaje.

Con el primer conjunto de marcadores que se utilizó, los marcajes que se usaron fueron los fluoróforos FAM (azul), NED (amarillo) y VIC (verde), que se asignaron de manera que los marcadores con menor intensidad se marcaron con FAM y el resto, con NED y VIC. El mix de PCR marcada de 15 μ L que se preparó para 5 muestras es el siguiente: 6,20 μ L de H₂O ultrapura, 0,15 μ L de cebador directo, 0,15 μ L de cebador reverso, 0,15 μ L de marcaje de color (M13), 7,5 μ L de mixTaq y 1 μ L de DNA.

Los programas del termociclador (Mastercycler Nexus Gradient) que se usaron para la reacción PCR fueron los utilizados anteriormente para la temperatura de anillamiento de 58°C y de 55°C.

Para el segundo conjunto de marcadores, se utilizó, además de los otros tres, el fluoróforo PET (rojo). En cuanto al mix de PCR marcada de 15 μ L para 5 muestras, se preparó el siguiente: 2,55 μ L de H₂O ultrapura, 0,05 μ L de cebador directo, 0,2 μ L de cebador reverso, 0,2 μ L de marcaje de color (M13), 5 μ L de mixTaq y 2 μ L de DNA.

El programa que se usó en el termociclador (Mastercycler Nexus Gradient) para la reacción PCR fue el indicado anteriormente para la temperatura de anillamiento de 55°C, mientras que los de las temperaturas de 58°C y 60°C fueron los siguientes:

- Temperatura de anillamiento de 58°C: 5 minutos a 94°C para la activación enzimática, 27 ciclos (amplificación por desnaturalización a 94°C durante 20 segundos, 20 segundos a 58°C para el anillamiento y 10 segundos a 72°C para la extensión), 8 ciclos de extensión (30 segundos a 94°C, 30 segundos a 53°C y 10 segundos a 72°C) y una extensión final a 72°C durante 10-20 minutos.
- Temperatura de anillamiento de 60°C: 1 minuto a 94°C para la activación enzimática, 27 ciclos (amplificación por desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, 30 segundos a 60°C para el anillamiento y 10 segundos a 72°C para la extensión), 8 ciclos de extensión (30 segundos a 94°C, 30 segundos a 53°C y 10 segundos a 72°C) y una extensión final a 72°C durante 10-20 minutos.

Por último, para comprobar que la PCR se desarrolló de forma correcta, se utilizó un gel de agarosa 2% y se preparó de la siguiente forma: 5 µL de H₂O miliQ, 2 µL de gel red y 3 µL de producto de PCR marcada.

3.4.4. Selección final de los marcadores

Para la visualización de los marcadores moleculares, se mandaron los productos de las diferentes PCR marcadas al servicio de secuenciación del IBMCP.

En primer lugar, se preparó una dilución del producto de PCR marcada para cada marcador dependiendo de la intensidad que presentan en los geles y del fluoróforo, de la siguiente forma:

- Marcadores marcados con FAM: si la intensidad era fuerte se realizó una dilución 1:100; si la intensidad era baja, una dilución 1:50.
- Marcadores marcados con VIC: si la intensidad era fuerte se realizó una dilución 1:100; si la intensidad era baja, una dilución 1:50.
- Marcadores marcados con NED: si la intensidad era fuerte se realizó una dilución 1:20; si la intensidad era baja, una dilución 1:40.
- Marcadores marcados con PET: si la intensidad era fuerte se realizó una dilución 1:20; si la intensidad era baja, una dilución 1:10, y si era muy floja, una dilución 1.

Una vez se tuvieron las diluciones, se preparó el siguiente mix de secuenciación:

- Mix grupo: 4 µL.

Para este “mix grupo” se preparó una segunda dilución 1/50 por cada muestra (T5, T6, T7 y T8) de los marcadores seleccionados para cada grupo según la dilución que se le había adjudicado para realizar la PCR marcada previamente.

- Formamida: 10 µL.

- GeneScan™ 500 LIZ®: 1/25: 4 µL.

Una vez se tuvo preparada la placa de secuenciación, se llevó al *Servicio de secuenciación de DNA y Análisis de la expresión génica* del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP), el cual devolvió los resultados en forma de fragmentos de DNA.

Dichos fragmentos se analizaron con dos programas informáticos: *GeneScan Analysis* y *Genotyper (ROCHE)*. Los fragmentos, en primer lugar, se pasaron por el programa *GeneScan Analysis* para ver el tamaño de los picos (que es el tamaño del amplicón de los marcadores), y, en segundo lugar, por el programa *Genotype* para ver si había diferentes tamaños de pico para cada muestra.

Con ello, se seleccionaron, de forma definitiva, los marcadores que muestren diferentes picos, es decir, que permitían diferenciar las cuatro muestras con las que se trabajó.

3.5 Análisis de accesiones del Banco de Germoplasma

Se utilizaron los marcadores analizados por Zuriaga (2009) para realizar un nuevo análisis para hallar polimorfismo entre las accesiones del banco de germoplasma del COMAV. Con ello, en primero lugar, se contaron el número de alelos diferentes para cada marcador. En segundo lugar, se analizaron 128 accesiones (pertenecientes al banco de germoplasma del COMAV) mediante el programa informático GenAlEx 6.5. (Peakall y Smouse, 2012), obteniendo una matriz de distancia en primera instancia y, en tercer lugar, un PCoA (Análisis de Coordenadas Principales) para determinar qué accesiones eran más lejana.

4 Resultados

4.1 Optimización método de extracción DNA de semillas

Una vez acabado el protocolo de extracción para las muestras T1 y T2 mediante el método *extracción mediante bolsa*, se utilizaron los correspondientes volúmenes de las extracciones de DNA para llegar a la concentración de 20 ng (Tabla 2) y, después, se midió la calidad del DNA extraído en el Nanodrop (Tabla 3).

Tabla 2. Volúmenes utilizados (V_i) de las extracciones de DNA para llegar a la concentración final (C_f) de 20 ng

Muestra	V_i (µL)	C_i (ng)	V_f (µL)	C_f (ng)
T5	10,70	186,98	100,00	20,00
T6	20,00	99,48	100,00	20,00
T7	5,16	388,61	100,00	20,00
T8	15,06	132,78	100,00	20,00

Tabla 3. Medición de la calidad del DNA extraído para las muestras T1 y T2 a fecha de 17 de junio de 2019

Muestra	ng/ μ L	A260	A280	260/280	260/230
T1	42,38	0,848	0,441	1,92	0,75
T2	14,35	0,287	0,155	1,85	0,60

Debido a que el ratio A_{260}/A_{230} era menor de 1,8 en ambas muestras, se había producido una contaminación por compuestos orgánicos, probablemente de fenoles.

Una vez acabado el protocolo de *extracción mediante perlas mecánicas* para las muestras T3 y T4, se midió la calidad del DNA extraído en el Nanodrop (Tabla 4).

Tabla 4. Medición de la calidad del DNA extraído para las muestras T3 y T4 a fecha de 18 de junio de 2019

Muestra	ng/ μ L	A260	A280	260/280	260/230
T3	96,57	1,931	0,967	2,00	1,44
T4	155,62	3,112	1,489	2,09	1,63

La extracción a través de las perlas mecánicas permitió obtener una mayor cantidad de DNA y de una mejor calidad (parámetros de contaminación dentro de los ratios). Por tanto, se eligió continuar las extracciones de DNA de semillas necesarias mediante el uso de las perlas mecánicas.

La Figura 6 muestra la comparación de la calidad del DNA extraído para las muestras T1, T2, T3 y T4 en un gel de agarosa al 2%, donde se observó una mayor concentración de DNA en las extracciones realizadas con el *método de extracción mediante perlas mecánicas* (T3 y T4).

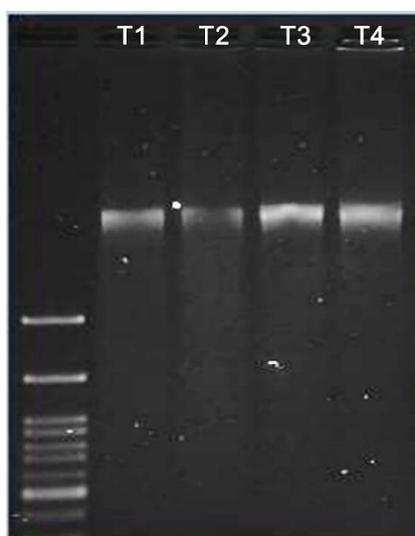


Figura 6. Comparativa de las extracciones de DNA de las muestras T1, T2, T3 y T4 en un gel agarosa al 2% (18 de junio de 2019)

4.2 Búsqueda “*in silico*” de los marcadores

Tras la determinación del polimorfismo de la mayoría de los marcadores de la lista, se seleccionaron un total de 22 marcadores moleculares, los cuales se indican en la Tabla 5, junto con la secuencia de los cebadores, la posición en el genoma, el número de alelos y el número de pares de bases del marcador vistos durante la búsqueda “*in silico*” en la base de datos de *Sol Genomics Network*, donde hay 54 accesiones resecuenciadas de *Solanum lycopersicum*.

En la Figura 7 se puede ver un ejemplo del visor de la base de datos, con la versión del genoma “*Tomato genome chromosomes (build SL2.50)*”, en concreto, de la posición del genoma del marcador SSR117 para determinar el número de alelos que presenta.

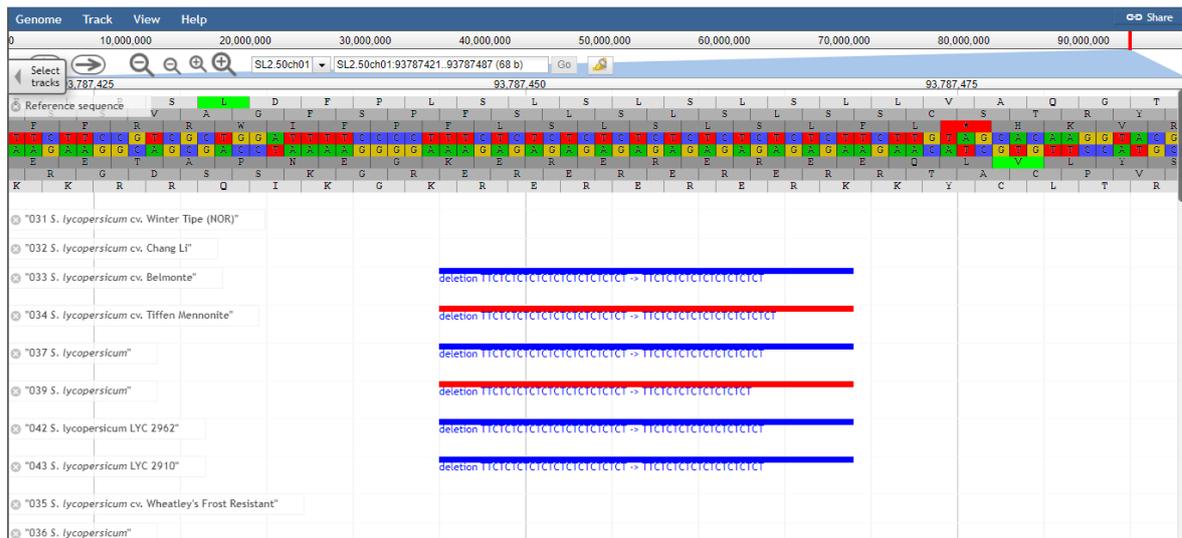


Figura 7. Ejemplo del visor de la base de datos de *Sol Genomics Network*, con la versión del genoma “*Tomato genome chromosomes (build SL2.50)*”, para la posición del genoma del marcador SSR117 (Cro. 1)

Tabla 5. Marcadores moleculares seleccionados, indicando el cromosoma al que se les asocia, la secuencia de los cebadores, la posición en el genoma, el número de alelos diferenciados en la búsqueda “*in silico*”, el tamaño y la secuencia repetida

Cro.	Marcador	Cebador	Secuencia (5'-3')	Posición (pb)	Nº alelos	Nº pb	Repetición
1	SSR117	F	AATTCACCTTTCTTCCGTCG	93787411	4	240	(CT) ₁₁
		R	GCCCTCGAATCTGGTAGCTT	93787651			
	SSR65	F	GGCAGGAGATTGGTTGCTTA	96768534	4	229	(TC) ₆ +(AC) ₆
		R	TTCCTCCTGTTTCATGCATTC	96768305			
	SSR92	F	AAGAAGAAGGATCGATCGAAGA	1223529	3	171	(GA) ₁₀
		R	TCATGACCACGATACTACATGTTTC	1223358			
SSR9	F	CCCTTTGCAAGTTCTTCTTCA	93020940	4	167	(ATA) ₁₀	
	R	TTCATGAGCCAACATAGGAGG	93021107				
2	SSR50	F	CCGTGACCCTCTTTACAACG	44281402	5	206	(AGAGAAG) ₄
		R	TTGCTTTCTTCTTCGCCATT	44281196			
	SSR26	F	CGCCTATCGATACCACCACT	46214589	2	178	(CCG) ₇
		R	ATTGATCCGTTTGGTTCTGC	46214411			
3	SSR320	F	ATGAGGCAATCTTCACCTGG	69163650	5	170	(AT) ₁₂
		R	TTCAGCTGATAGTTCCTGCG	69163820			
	SSR22	F	GATCGGCAGTAGGTGCTCTC	63457919	4	209	(AT) ₈
		R	CAAGAAACACCCATATCCGC	63458128			
4	SSR214	F	AAATTCCCAACACTTGCCAC	62470013	2	220	(CTT) ₇
		R	CCCACCACTATCCAAACCC	62470233			
	SSR310	F	GCGATGAGGATGACATTGAG	42768055	2	147	(ATC) ₉
		R	TTTACAGGCTGTGCTTCCT	42767908			
5	SSR602	F	GGGTCACATACACTCATACTAAGGA	2529204	4	296	(TTC) ₆
		R	GGCAATCATAGCCACTTGGT	2528908			
	SSR115	F	CACCCTTTATTCAGATTCCTCT	2732360	3	268	(TA) ₁₉
		R	ATTGAGGGTATGCAACAGCC	2732628			

6	SSR350	F	GGAATAACCTCTAACTGCGGG	49676938	6	266	(AT) ₁₃
		R	CGATGCCTTCATTTGGACTT	49676672			
	SSR326	F	TTAGGCAGCTTACGACTGGA	41898109	4	299	(CT) ₁₀
		R	GAGCCAGAGGTCCTTCAGTG	41897810			
7	TGS540	F	GCAAATCCACCTTGTCCAGT	7375768	6	214	(GAA) ₈
		R	AGCAACATGAGAGTTCGCTGA	7375554			
	SSR241	F	TCAACAGCATAGTGGAGGAGG	1876614	5	199	(AAT) ₁₃
		R	TCCTCGGTAATTGATCCACC	1876813			
9	SSR70	F	TTTAGGGTGTCTGTGGGTCC	3628939	3	137	(AT) ₂₉
		R	GGAGTGCGCAGAGGATAGAG	3629076			
10	SSR248	F	GCATTCGCTGTAGCTCGTTT	56820000	4	240	(TA) ₅
		R	GGGAGCTTCATCATAGTAACG	56819760			
	SSR223	F	TGGCTGCCTCTTCTCTGTTT	64412272	4	190	(AAG) ₇
		R	TTTCTTGAAGGGTCTTTCCC	64412082			
11	LE20592	F	CTGTTTACTTCAAGAAGGCTG	14565287	5	168	(ATT) ₁₃
		R	ACTTTAACTTTATTATTGCCACG	14565455			
	TGS188	F	GTTTGGTTATGTTTTCGTTGGC	5222826	3	162	(ATT) ₁₆
		R	CTAGTATGGTCGCAAATGTTCA	5222664			
	SSR76	F	ACGGGTCGTCTTTGAAACAA	5004337	2	198	(CGG) ₇
		R	CCACCGGATTCTTCTTCGTA	5004139			
12	SSR20	F	GAGGACGACAACAACAACGA	6759549	5	150	(GAA) ₆
		R	GACATGCCACTTAGATCCACAA	6759699			
	TGS1202	F	GTGTGGCTGTGATGCTTGAT	54618837	3	164	(CT) ₈
		R	TCACTCCAACCAAACCCTC	54618673			

4.3 Selección de marcadores

4.3.1. Extracción DNA de las variedades de tomate

Una vez extraído el DNA de las semillas de las muestras T5, T6, T7 y T8 mediante el protocolo de *extracción mediante perlas mecánicas*, se midió la calidad del DNA extraído en el Nanodrop (Tabla 6).

Tabla 6. Medición de la calidad del DNA extraído para las muestras T5, T6, T7 y T8 a fecha de 3 de julio de 2019

Muestra	ng/ μ L	A260	A280	260/280	260/230
T5	186,98	3,740	1,782	2,10	1,48
T6	99,48	1,990	0,955	2,08	1,32
T7	388,61	7,772	3,658	2,12	1,81
T8	132,78	2,656	1,258	2,11	1,74

El ratio A_{260}/A_{280} fue mayor de 1,8 en todas las muestras; mientras que, en A_{260}/A_{230} , las muestras T5 y T6 fueron menores de 1,8, por lo que se produjo una contaminación por compuestos orgánicos, probablemente de fenoles, aunque esto no supuso ningún problema a la hora de amplificar las muestras con éxito, ni se observaron diferencias entre ellas y las otras dos muestras a la hora de amplificar los marcadores.

4.3.2. Pruebas con los marcadores seleccionados

Para el primer conjunto de marcadores moleculares seleccionados se realizaron un total de seis PCRs para conseguir la temperatura de anillamiento óptima a la que funcionan los marcadores, las cuales se indican en la Tabla 7.

Tabla 7. Temperaturas finales para cada marcador tras las seis reacciones PCR que se realizaron para el primer conjunto de marcadores moleculares, especificando la temperatura de anillamiento ($T(^{\circ}C)$) y el termociclador usado

Cro.	Marcador	T($^{\circ}C$)	Termociclador
1	SSR117	55	Mastercycler Nexus Gradient
	SSR65	55	
2	SSR50	58	
3	SSR320	55	
4	SSR214	55	
5	SSR602	58	
6	SSR350	58	
7	TGS540	58	
9	SSR70	58	
10	SSR248	55	
11	LE20592	50	
12	SSR20	58	

Se utilizaron dos termocicladores debido a que se observaban diferencias en los resultados en los geles, por lo que se decidió utilizar como principal el termociclador Mastercycler Nexus Gradient, dejando Mastercycler Eppendorf sólo para cuando el primero no estuviera disponible.

A continuación, se exponen los geles de agarosa 2% con los productos de las PCR indicadas en la Tabla 7. En la Figura 8 se observa como los marcadores SSR117, SSR65, SSR320, SSR248 y LE20592 no funcionaron a 58°C, mientras que el resto sí que mostraron amplificación.

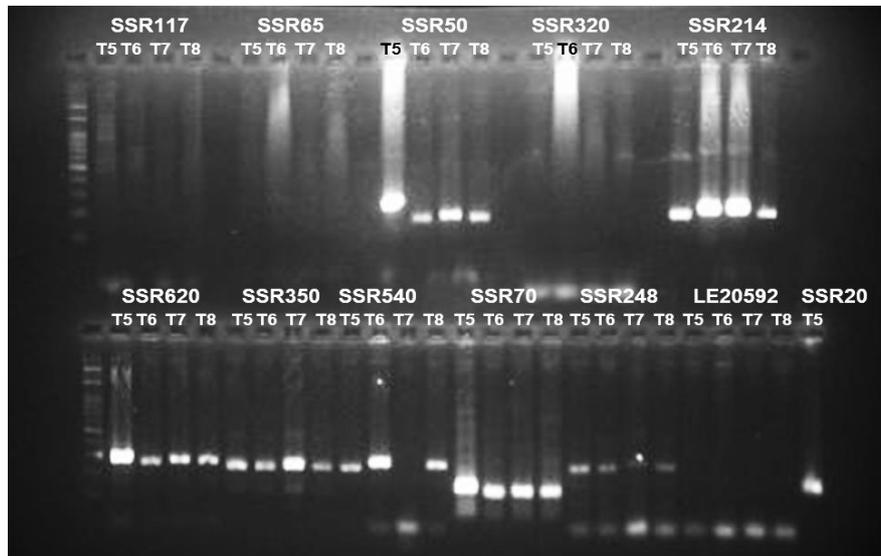


Figura 8. Producto de la PCR 58°C en un gel agar 2% (10 de julio de 2019)

En la Figura 9, se observa que, por un lado, los marcadores SSR65, SSR9 (marcador del cromosoma 1 que decide probarse), SSR320 (aunque un poco flojo), SSR214, SSR248 y TGS188 funcionaron correctamente en la PCR realizada a 55°C. Por otro lado, se vio que el marcador LE20592 funcionó bien en la PCR a 50°C y se descartó de forma definitiva el marcador SSR117, al no funcionar a ninguna de las tres temperaturas probadas (58°C, 55°C y 50°C).



Figura 9. Producto de la PCR 55°C y de la PCR 50°C en un gel agar 2% (22 de julio de 2019)

Por tanto, los marcadores moleculares definitivos que se usaron para el primer conjunto fueron: SSR9 (Cro. 1), SSR65 (Cro. 1), SSR50 (Cro. 2), SSR320 (Cro. 3), SSR214 (Cro. 4), SSR602 (Cro. 5), SSR350 (Cro. 6), TGS540 (Cro. 7), SSR70 (Cro. 9), SSR248 (Cro. 10), LE20592 (Cro. 11) y SSR20 (Cro. 12).

Para el segundo conjunto de marcadores, tras ver que sólo el marcador SSR70 mostró polimorfismo para las accesiones de tomate que se utilizaron, se realizaron un total de tres pruebas PCR para determinar la temperatura de anillamiento óptima con los marcadores, estando recogidas en la Tabla 8.

Tabla 8. Temperaturas finales para cada marcador tras las seis reacciones PCR que se realizaron para el segundo conjunto de marcadores moleculares, especificando la temperatura de anillamiento (T(°C)) y el termociclador usado

Cro.	Marcador	T(°C)	Termociclador
1	SSR92	55	Mastercycler Nexus Gradient
2	SSR26	60	
3	SSR22	58	
4	SSR310	58	
5	SSR115	55	
6	SSR326	55	
7	SRR241	55	
10	SSR223	55	
11	SSR76	55	
12	TGSS1202	55	

En la Figura 10 se observa que los marcadores SSR26, SSR22 y SSR310 no funcionaron una temperatura de 55°C, por lo que se probaron a 58°C. Además, se decidió probar el marcador SSR115 a una mayor temperatura (58°C) debido a que no se apreciaba una banda única clara, es decir, que presentaba inespecificidad.



Figura 10. Producto de la PCR 55°C en un gel agar 2% (4 de noviembre de 2019)

A la temperatura de 58°C se apreció una fina banda en el marcador SSR26, por lo que se decidió repetir, al igual que el marcador SSR115, ya que se seguía observando inespecificidad. Los marcadores SSR22 y SSR310 funcionaron mejor a 58°C (Figura 11).

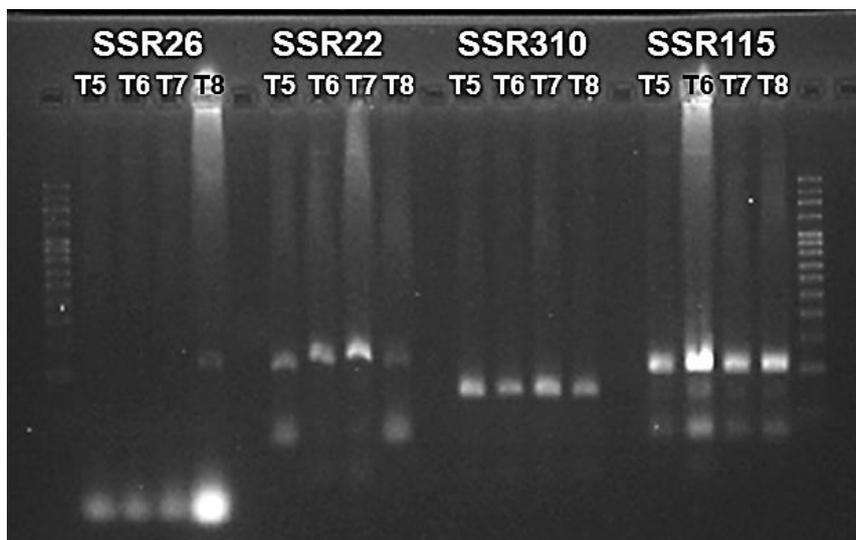


Figura 11. Producto de la PCR 58°C en un gel agar 2% (5 de noviembre de 2019)

Por lo que, se repitió la PCR de los marcadores SSR115 y SSR26 a una temperatura de 60°C. El marcador SSR26 sí funcionó correctamente a esta temperatura, pero se decidió mantener la temperatura de 55°C el marcador SSR115 (Figura 12).

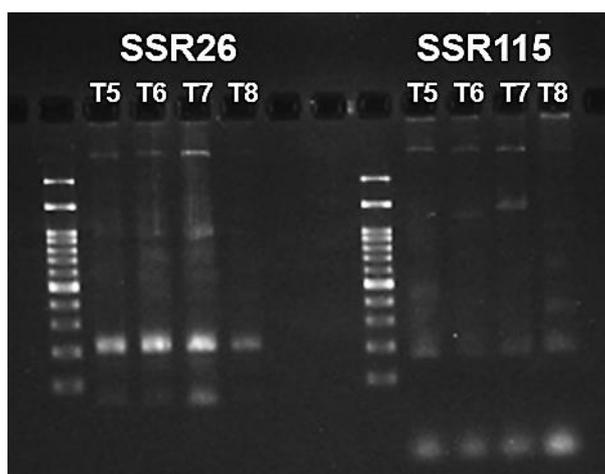


Figura 12. Producto de la PCR 60°C en un gel agar 2% (21 de febrero de 2020)

Por tanto, los marcadores moleculares definitivos que se usaron para el segundo fueron: SSR92 (Cro. 1), SSR26 (Cro. 2), SSR22 (Cro. 3), SSR310 (Cro. 4), SSR115 (Cro. 5), SSR326 (Cro. 6), SRR241 (Cro. 7), SSR70 (Cro. 9), SSR223 (Cro. 10), SSR76 (Cro. 11) y TGSS1202 (Cro. 12).

4.3.4. Marcaje de los marcadores seleccionados

Los marcadores seleccionados fueron optimizados para ser mezclados en el secuenciador en base a su tamaño de amplicón y a su intensidad. Así, para ambos conjuntos de marcadores, se siguió el protocolo explicado en el punto 3.4.4.

Para el primer conjunto de marcadores, se adjudicó el fluoróforo FAM (azul) a los marcadores SSR350, SSR20, SSR320 y SSR214; el fluoróforo VIC (verde), a TGS5540, SSR65, SSR248 y TGS188, y el fluoróforo NED (amarillo), a SSR50, SSR620, SSR70 y SSR9. Con ello, se prepararon dos PCR marcadas, una a 58°C y otra a 55°C (Tabla 9).

Tabla 9. Reacciones de PCR marcada para el primer conjunto de marcadores a temperaturas 58°C y 55°C, en la que se indica el tamaño del amplicón, el fluoróforo adjudicado, el termociclador utilizado y el resultado (+: éxito; -: fallo) (25 de julio de 2019)

T(°C)	Cro.	Marcador	Nº pb	Fluoróforo	Termociclador	Resultado
58	2	SSR50	206	NED	Mastercycler Eppendorf	+
	5	SSR602	296	NED		+
	6	SSR350	266	FAM		+
	7	TGS540	214	VIC		+
	9	SSR70	137	NED		+
	12	SSR20	150	FAM		+
55	1	SSR65	229	VIC	Mastercycler Nexus Gradient	+
		SSR9	168	NED		+
	3	SSR320	170	FAM		-
	4	SSR214	220	FAM		+
	10	SSR248	240	VIC		-
	11	TGS188	162	VIC		-

En la Figura 13 destaca que los marcadores SSR320 y SSR248 no funcionaron de forma correcta, por lo que se decidió no utilizarlos para la secuenciación.

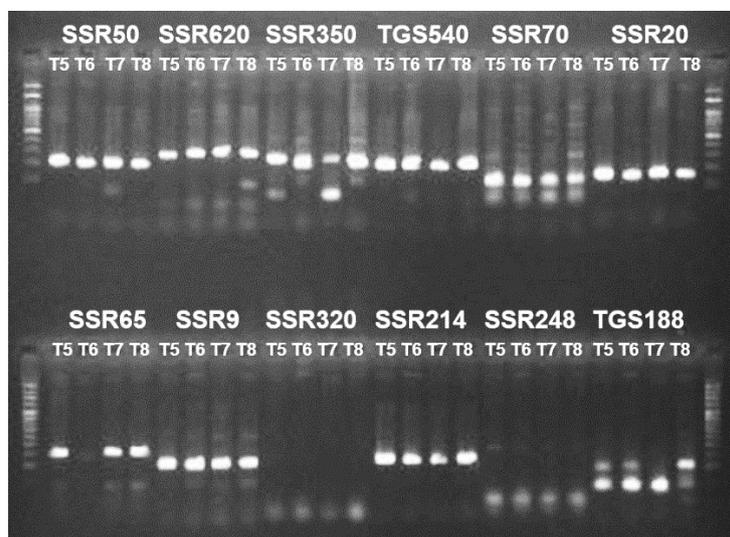


Figura 13. Productos de las PCR marcadas de 58°C y 55°C en un gel agar 2% (25 de julio de 2019)

Para el segundo conjunto de marcadores, se adjudicó el fluoróforo FAM (azul) a los marcadores SSR22 y SSR310; el fluoróforo VIC (verde), a SSR92, SSR115 y SSR326; el fluoróforo NED (amarillo), a SSR26, SSR241, SSR76 y SSR70, y el fluoróforo PET (rojo), a SSR223 y TGS1202. A continuación, se realizaron las correspondientes PCR en el termociclador Mastercycler Nexus Gradient (Tabla 10).

Tabla 10. Reacciones de PCR marcada a temperaturas 58°C y 55°C (6 de marzo de 2020) y a 60°C (9 de marzo de 2020), en la que se indica el tamaño del amplicón, el fluoróforo adjudicado, el termociclador utilizado y el resultado (+: éxito; -: fallo)

T(°C)	Cro.	Marcador	Nº pb	Fluoróforo	Termociclador	Resultado
55	1	SSR92	171	VIC	Mastercycler Nexus Gradient	+
	5	SSR115	268	VIC		+
	6	SSR326	299	VIC		+
	7	SRR241	199	NED		-
	10	SSR223	190	PET		+
	11	SSR76	198	NED		+
	12	TGS1202	164	PET		+
58	3	SSR22	209	FAM	+	
	4	SSR310	147	FAM	+	
	9	SSR70	137	NED	+	
60	2	SSR26	178	NED	-	

En la Figura 14 destaca que los marcadores SSR26 y SSR241 no funcionaron, por lo que fueron descartados, y que la muestra T5 de SSR76 falló. El resto de marcadores funcionaron correctamente.

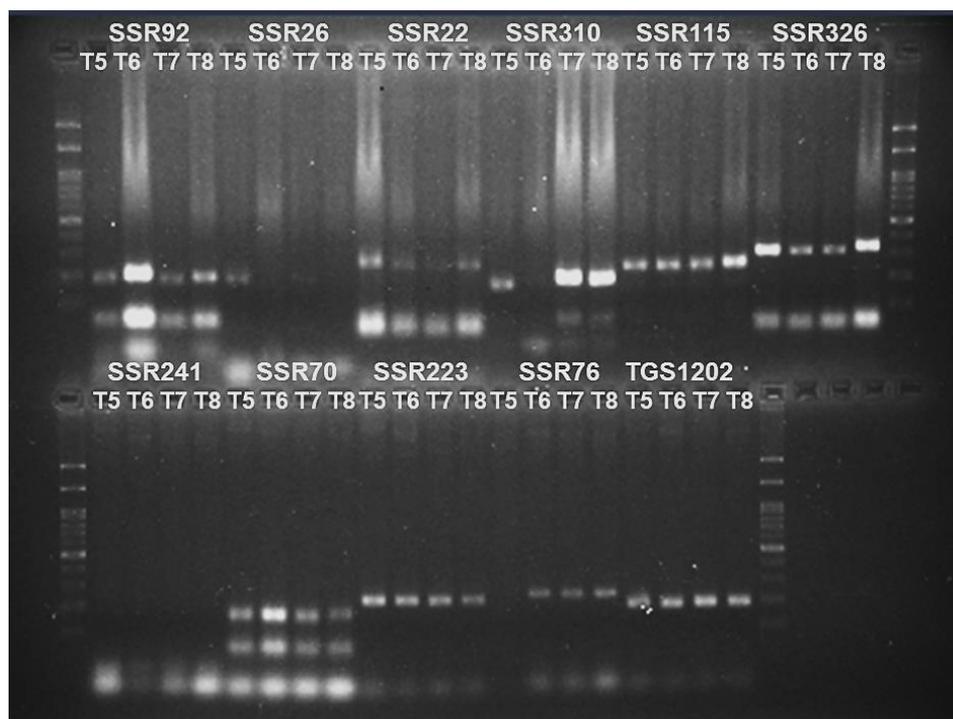


Figura 14. Productos de las PCR marcadas de 55°C y 58°C (6 de marzo de 2020) y de 60°C (9 de marzo de 2020) en un gel agar 2%

Como falló el marcador SSR241, se repitió su PCR marcada en el termociclador Mastercycler Nexus Gradient a 55°C, y funcionó (Figura 15).



Figura 15. Producto de PCR marcada del marcador SSR241 a 55°C en un gel agar 2% (11 de marzo de 2020)

4.3.4. Selección final de los marcadores

Para el primer conjunto de marcadores, se enviaron al servicio de secuenciación del IBMCP los marcadores recogidos en la Tabla 11, donde se indica las diluciones realizadas (que dependen de la intensidad que muestran las muestras en el gel de agar de las Figuras 8 y 9) según lo explicado en el punto 3.4.4.

Tabla 11. Diluciones utilizadas según la intensidad de las muestras con los fluoróforos para el primer conjunto de marcadores

Cro.	Marcador	Nº pb	Fluoróforo	Muestra	Dilución
1	SSR65	229	VIC	T5	1/50
				T6	1/50
				T7	1/50
				T8	1/50
1	SSR9	167	NED	T5	1/50
				T6	1/50
				T7	1/50
				T8	1/50
2	SSR50	206	NED	T5	1/50
				T6	1/50
				T7	1/50
				T8	1/50
4	SSR214	220	FAM	T5	1/50
				T6	1/50
				T7	1/50
				T8	1/50
5	SSR620	296	NED	T5	1/50
				T6	1/50
				T7	1/50
				T8	1/50

6	SSR350	266	FAM	T5	1/50
				T6	1/50
				T7	1/50
				T8	1/50
7	TGS540	214	VIC	T5	1/50
				T6	1/50
				T7	1/50
				T8	1/50
9	SSR70	137	NED	T5	1/50
				T6	1/50
				T7	1/50
				T8	1/50
11	TGS188	162	VIC	T5	1/20
				T6	1/20
				T7	1/20
				T8	1/20
12	SSR20	150	FAM	T5	1/50
				T6	1/50
				T7	1/50
				T8	1/50

Una vez preparadas las diluciones, se diseñaron cuatro grupos de marcadores para llevar a secuenciar (Tabla 12).

Tabla 12. Grupos diseñados para secuenciar el primer conjunto de marcadores

Grupo 1				Grupo 2			
Cro.	Marcador	Nº pb	Fluoróforo	Cro.	Marcador	Nº pb	Fluoróforo
1	SSR65	229	VIC	1	SSR9	167	NED
1	SSR9	167	NED	2	SSR50	206	NED
2	SSR50	206	NED	5	SSR602	296	NED
4	SSR214	220	FAM	9	SSR70	137	NED
5	SSR602	296	NED				
6	SSR350	266	FAM				
7	TGS540	214	VIC				
9	SSR70	137	NED				
11	TGS188	162	VIC				
12	SSR20	150	FAM				
Grupo 3				Grupo 4			
Cro.	Marcador	Nº pb	Fluoróforo	Cro.	Marcador	Nº pb	Fluoróforo
1	SSR65	229	VIC	4	SSR214	220	FAM
7	TGS540	214	VIC	6	SSR350	266	FAM
11	TGS188	162	VIC	12	SSR20	150	FAM

Una vez diseñados los grupos, se prepararon las diluciones de cada marcador según el fluoróforo utilizado para preparar el “mix grupo” del mix de secuenciación:

- Grupo 1 (para las muestras T5, T6, T7 y T8): (1 µL SSR65 + 1 µL SSR9 + 1 µL SSR50 + 1 µL SSR214 + 1 µL SSR602 + 1 µL SSR350 + 1 µL SSR540 + 1 µL SSR70 + 2,5 µL TGS188 + 1 µL SSR20) + 38,5 H₂O.
- Grupo 2 (para las muestras T5, T6, T7 y T8): (1 µL SSR9 + 1 µL SSR50 + 1 µL SSR602 + 1 µL SSR70) + 46 µL H₂O.
- Grupo 3 (para las muestras T5, T6, T7 y T8): (1 µL SSR65 + 1 µL SSR540 + 2,5 µL TGS188) + 45,5 µL H₂O.
- Grupo 4 (para las muestras T5, T6, T7 y T8): (1 µL SSR214 + 1 µL SSR350 + 1 µL SSR20) + 47 µL H₂O.

El resultado del análisis informático (resumido en la Tabla 13) es que sólo un marcador molecular permitió diferenciar, al menos, una muestra de las otras tres: el marcador SSR70 (para el cromosoma 9 y con una altura teórica de 137) mostró un pico a 130 para la muestra T6 y otro a 136 para las muestras T5, T7 y T8 (en la Figura 16 se puede ver el resultado del análisis en el programa *Genotyper*). El resto de marcadores presentan un único alelo y un tamaño de amplicón mayor al observado durante el estudio “*in silico*”, en concreto, una media de 20 pares de bases mayor.

Tabla 13. Análisis informático de la secuenciación del primer conjunto de marcadores, donde se indica la altura (tamaño de pico) que se ha observado, remarcando con “-” cuando no se ha obtenido resultado y con el color rojo el marcador que presenta polimorfismo (15 de octubre de 2020)

Cro.	Marcador	Alturas observadas							
		Muestras Grupo 1				Muestras Grupo 4			
		T5	T6	T7	T8	T5	T6	T7	T8
4	SSR214	241/241	241/241	241/241	241/241	241/241	241/241	241/241	241/241
6	SSR350	291/291	291/291	291/291	291/291	291/291	291/291	291/291	291/291
12	SSR20	171/171	171/171	171/171	171/171	171/171	171/171	171/171	171/171
Cro.	Marcador	Muestras Grupo 1				Muestras Grupo 2			
		T5	T6	T7	T8	T5	T6	T7	T8
		1	SSR9	185/185	185/185	185/185	185/185	185/185	185/185
2	SSR50	223/223	223/223	-	223/223	223/223	223/223	223/223	-
5	SSR602	315/315	315/315	-	315/315	315/315	315/315	315/315	-
9	SSR70	136/136	130/130	136/136	136/136	136/136	130/130	136/136	136/136
Cro.	Marcador	Muestras Grupo 1				Muestras Grupo 3			
		T5	T6	T7	T8	T5	T6	T7	T8
		1	SSR65	277/277	277/277	277/277	277/277	277/277	277/277
7	TGS540	252/252	252/252	252/252	252/252	252/252	252/252	252/252	
11	TGS188	183/183	183/183	183/183	183/183	183/183	183/183	183/183	

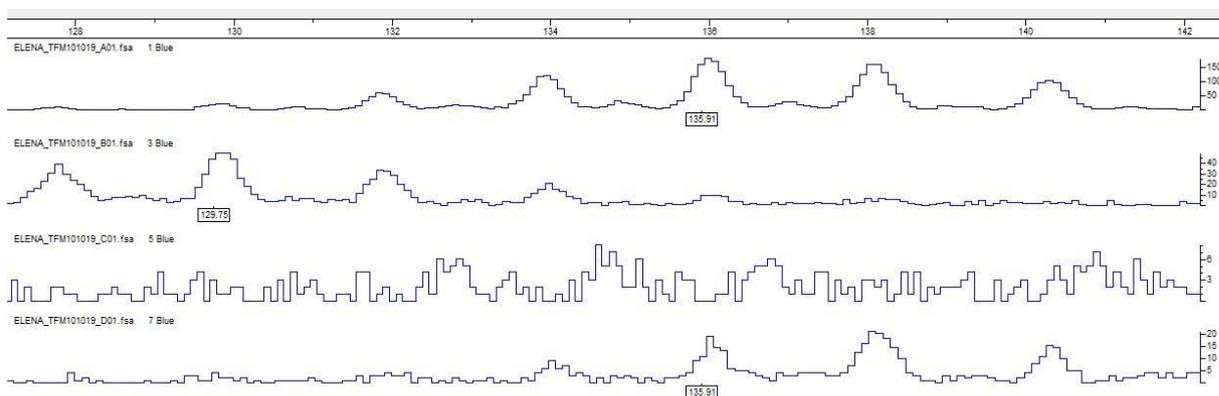


Ilustración 16. Polimorfismo visto en el programa *Genotyper* para el marcador SSR70, donde muestra un pico a 130 en la muestra T6 y otro a 136 en las muestras T5, T7 y T8

Por ello, se preparó un segundo conjunto de marcadores (en el que se mantiene el marcador SSR70), cuyas diluciones (que dependen de la intensidad que muestran las muestra en los geles de agarosa de las Figuras 14 y 15) se recogen en la Tabla 14, según lo explicado en el punto 3.4.4.

Tabla 14. Diluciones utilizadas según la intensidad de las muestras con los fluoróforos para el segundo conjunto de marcadores

Cro.	Marcador	Nº pb	Fluoróforo	Muestra	Dilución
1	SSR92	171	VIC	T5	1/50
				T6	1/100
				T7	1/50
				T8	1/50
3	SSR22	209	FAM	T5	1/50
				T6	1/50
				T7	1/50
				T8	1/50
4	SSR310	147	FAM	T5	1/50
				T6	1/50
				T7	1/100
				T8	1/100
5	SSR115	268	VIC	T5	1/50
				T6	1/50
				T7	1/50
				T8	1/50
6	SSR326	299	VIC	T5	1/50
				T6	1/50
				T7	1/50
				T8	1/50
7	SSR241	199	NED	T5	1/40
				T6	1/40
				T7	1/20
				T8	1/20
9	SSR70	137	NED	T5	1/20
				T6	1/20
				T7	1/20
				T8	1/20

10	SSR223	190	PET	T5	1/10
				T6	1/10
				T7	1/10
				T8	1/10
11	SSR76	198	NED	T5	1/20
				T6	1/20
				T7	1/20
				T8	1/20
12	TGS1202	164	PET	T5	1/10
				T6	1/10
				T7	1/10
				T8	1/10

Una vez preparadas las diluciones, se diseñaron cuatro grupos de marcadores para llevar a secuenciar (Tabla 15).

Tabla 15. Grupos diseñados para secuenciar el segundo conjunto de marcadores (21 de julio de 2020)

Grupo 1				Grupo 2			
Cro.	Marcador	Nº pb	Fluoróforo	Cro.	Marcador	Nº pb	Fluoróforo
3	SSR22	209	FAM	1	SSR92	171	VIC
6	SSR326	299	VIC	3	SSR22	209	FAM
11	SSR76	198	NED	7	SSR241	199	NED
12	TGS1202	164	PET	10	SSR223	190	PET
Grupo 3				Grupo 4			
Cro.	Marcador	Nº pb	Fluoróforo	Cro.	Marcador	Nº pb	Fluoróforo
4	SSR310	147	FAM	10	SSR223	190	PET
5	SSR115	268	VIC	12	TGS1202	164	PET
9	SSR70	137	NED				
12	TGS1202	164	PET				

Una vez diseñados los grupos, se prepararon las diluciones de cada marcador según el fluoróforo utilizado para preparar el “mix grupo” del mix de secuenciación:

- Grupo 1:
 - T5: (1 µL SSR326 + 2,5 µL SSR76 + 5 µL TGS1202 + 1 µL SSR22) + 40,5 µL H₂O.
 - T6: (1 µL SSR326 + 2,5 µL SSR76 + 5 µL TGS1202 + 1,0 µL SSR22) + 40,5 µL H₂O.
 - T7: (1 µL SSR326 + 2,5 µL SSR76 + 5 µL TGS1202 + 1 µL SSR22) + 40,5 µL H₂O.
 - T8: (1 µL SSR326 + 2,5 µL SSR76 + 5 µL TGS1202 + 1 µL SSR22) + 40,5 µL H₂O.
- Grupo 2:
 - T5: (1 µL SSR92 + 1 µL SSR22 + 1,25 µL SRR241 + 5 µL SSR10) + 41,75 µL H₂O.

- T6: (0,5 µL SSR92 + 1 µL SSR22 + 1,25 µL SRR241 + 5 µL SSR10) + 42,25 µL H₂O.
- T7: (1 µL SSR92 + 1 µL SSR22 + 2,5 µL SRR241 + 5 µL SSR10) + 40,5 µL H₂O.
- T8: (1 µL SSR92 + 1 µL SSR22 + 2,5 µL SRR241 + 5 µL SSR10) + 40,5 µL H₂O.
- Grupo 3:
 - T5: (1 µL SSR115 + 1 µL SSR310 + 2,5 µL SRR70 + 5 µL TGS1202) + 40,5 µL H₂O.
 - T6: (1 µL SSR115 + 1 µL SSR310 + 2,5 µL SRR70 + 5 µL TGS1202) + 40,5 µL H₂O.
 - T7: (1 µL SSR115 + 0,5 µL SSR310 + 2,5 µL SRR70 + 5 µL TGS1202) + 41 µL H₂O.
 - T8: (1 µL SSR115 + 0,5 µL SSR310 + 2,5 µL SRR70 + 5 µL TGS1202) + 41 µL H₂O.
- Grupo 4:
 - T5: (5 µL SSR223 + 5 µL TGS1202) + 40 µL H₂O.
 - T6: (5 µL SSR223 + 5 µL TGS1202) + 40 µL H₂O.
 - T7: (5 µL SSR223 + 5 µL TGS1202) + 40 µL H₂O.
 - T8: (5 µL SSR223 + 5 µL TGS1202) + 40 µL H₂O.

De nuevo, tras el análisis informático, sólo el marcador SSR70 (Cro. 9) muestra tener polimorfismo (Figura 17), donde se volvió a observar que las muestras T5, T7 y T8 presentaban un pico a 136 y T6 un pico a 130. El resto de marcadores presentaron un solo alelo y, también, tamaños de amplicón diferentes a los vistos en el análisis “*in silico*”.

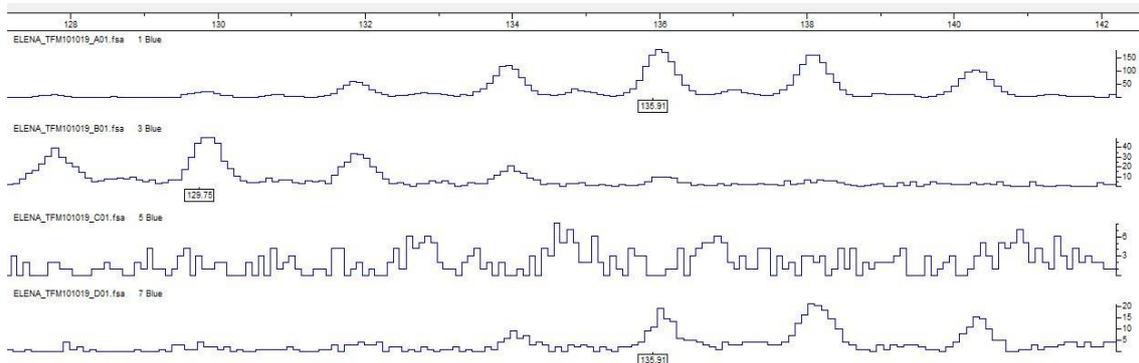


Figura 17. Polimorfismo visto en el programa Genotyper para el marcador SSR70, donde muestra un pico a 130 para la muestra T6 y otro a 136 para las muestras T5, T7 y T8

4.4 Análisis de accesiones del Banco de Germoplasma

Debido a que sólo un marcador de los 22 estudiados a lo largo de la investigación muestra polimorfismo, y de por sí solo no sirve para diferenciar de forma individual las cuatro variedades de tomate utilizadas, se decidió elegir nuevos marcadores a partir de los analizados por Zuriaga (2009) para poder

continuar con la detección de la contaminación varietal. De los 24 marcadores utilizados por Zuriaga (2009), se eligieron los siete con mayor número de alelos distintos (indicados en la Tabla 16): TMS9, TMS33, LE20592, LELEUZIP, LELE25, LELE25, LEILV1 y LESSF.

Tabla 16. Marcadores moleculares seleccionados del trabajo de Zuriaga (2009) por sus números de alelos diferentes, junto con la secuencia de los cebadores, el tamaño de amplicón teórico y la repetición de la secuencia

Marcador	Cebador	Secuencia (5'-3')	Nº alelos	Nº pb	Repetición
TMS9	F	TTGGTAATTTATGTTCCGGGA	3	344	(GATA) ₂₆
	R	TTGAGCCAATTGATTAATAAGTT			
TMS33	F	AGCATGGGAAGAAGACACGT	3	267	(GA) ₂₆
	R	TTGAGCAAACATCGCAATC			
LE20592	F	CTGTTTACTTCAAGAAGGCTG	2	166	(TAT) ₁₅₋₁ (TGT) ₄
	R	ACTTTAACTTTATTATTGCCACG			
LELEUZIP	F	GGTGATAATTTGGGAGGTTAC	2	105	(AAG) ₆₋₁ TT(GAT) ₇
	R	CGTAACAGGATGTGCTATAGG			
LELE25	F	TTCTTCCGTATGAGTGAGT	3	225	(TA) ₁₁
	R	CTCTATTACTTATTATTATCG			
LEILV1	F	GATCGACACATTTGAATTTGT	2	143	(T) ₈ (TA) ₁₀ (T) ₅
	R	GGTCACTAATTAATTGATTCC			
LESSF	F	TACGCTCTCAAGTACCGTAAG	5	216	(CCCCA) ₄
	R	CCTACATTGACATGACCAAAT			

Tras esto, se realizó el análisis mediante el programa informático GenAIEx 6.5. (Peakall y Smouse, 2012), y el resultado del PCoA se representa en la Figura 18.

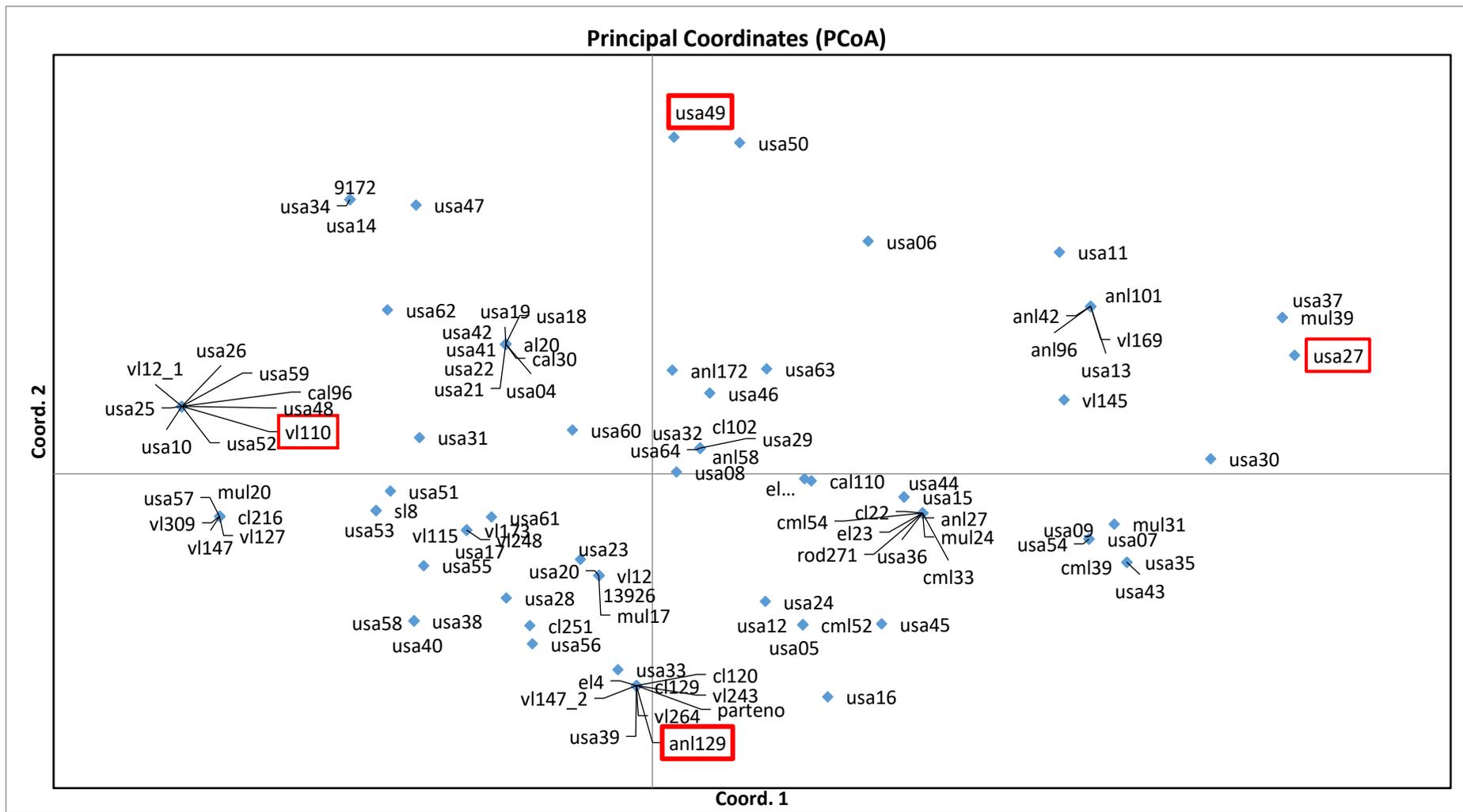


Ilustración 18. Representación del PCoA, donde se presenta la distancia entre las 127 accesiones pertenecientes al banco de germoplasma del COMAV, remarcando las accesiones elegidas en color rojo

Por tanto, como se muestra en la anterior figura, se eligieron las cuatro accesiones más alejadas, y eran: vl110 (a la izquierda), anl129 (abajo), usa27 (a la derecha) y usa49 (arriba). Además de estas cuatro accesiones (las cuales se han solicitado al banco de germoplasma), se decidió añadir también las variedades *Microtom* y *Heinz*, ya que se ha visto que la primera es muy variable y la segunda, por ser la utilizada para el genoma de referencia.

Analizando la anterior figura, la componente uno explica el 22,35% de la variabilidad; mientras que, la componente dos, el 16,31%.

Una vez elegidos los nuevos marcadores y las nuevas accesiones, se precederá a repetir de nuevo los análisis para seguir con la detección de contaminación varietal.

5 Discusión

Para la discusión de los resultados de este trabajo, se exponen en primer lugar los datos en los diferentes protocolos de extracción de DNA de semilla de tomate y, en segundo lugar, los obtenidos en la selección de marcadores moleculares de tipo SSR para la detección de contaminación varietal.

En primer lugar, el uso de las perlas mecánicas en las extracciones de DNA de semillas de tomate ha demostrado su eficacia, ya que se obtienen extracciones de mejor calidad y con menor tasa de contaminación, frente al uso de bolsas de extracción. Se han encontrado estudios sobre análisis cromatográficos (Marsili y Callahan, 1993), análisis de DNA de helechos (Yi *et al.*, 2018) o en estudios para transgénesis con tomate (Rodríguez-Concepción y Welsch, 2019) en los que se ha utilizado las perlas mecánicas, además de varios en análisis de DNA a partir de semillas de *Tapiscia sinensis* (Zhou *et al.*, 2015), coníferas (Bashalkhanov y Rajora, 2008) y de remolacha azucarera (Wang y Wu, 2012). En todos ellos se ha probado su eficacia en los diferentes estudios.

En segundo lugar, sólo el marcador SSR70 permite diferenciar las cuatro variedades utilizadas (T6 por un lado, T5, T7 y T8 por otro lado), pese a que las cuatro variedades de tomate utilizadas durante el estudio presentan un fenotipo muy distinto y que los marcadores SSR son unos marcadores moleculares muy útiles por su polimorfismo. Es decir, solo ha funcionado, parcialmente, un 4,55% de los marcadores seleccionados (1 de 22). Este bajo porcentaje de éxito también fue visto en el estudio de Garcia-Martinez y colaboradores (2006), donde tampoco pudieron identificar los tres cultivares (de diferente fenotipo) seleccionados usando 19 SSR, y en el estudio de Kumar y colaboradores (2016), donde únicamente 11 de los 50 marcadores SSR (un 22%) utilizados en el estudio mostraron polimorfismo entre 19 genotipos de tomate.

Pese a haber elegido los marcadores con mayor número de alelos, 21 marcadores SSR se vieron monomórficos tras las diferentes PCR marcadas. No siendo este el resultado que se esperaba, queda comprobado el bajo polimorfismo del acervo genético de las diferentes variedades de tomate cultivado, como ya se ha visto en multitud de trabajos (Van der Beek *et al.*, 1992; Villand *et al.*, Rus-Kortekaas *et al.*, 1994; 1998; Park *et al.*, 2004; García-Martínez *et al.*, 2005; Tam *et al.*, 2005). Con ello se constata que el tomate cultivado es genéticamente pobre (Rick, 1976; Williams y St. Clair, 1993) y difícil de trabajar para la diferenciación varietal exclusivamente a partir de su genoma.

Es por ello que se decidió empezar de nuevo el estudio con diferentes materiales, tanto en variedades de tomate como marcadores moleculares.

Por un lado, se eligieron los 7 marcadores moleculares más polimórficos (entre 2 y 5 alelos diferentes) diseñados en el trabajo de Zuriaga (2009), que fueron: TMS9, TMS33, LE20592, LELEUZIP, LELE25, LELE25, LEILV1 y LESSF. De nuevo se pudo observar que los marcadores en tomate cultivado son muy poco polimórficos, ya que sólo un marcador (LESSF) de los 24 con los que se trabajó en el estudio de Zuriaga (2009) presenta más de 3 alelos diferentes.

Por otro lado, para elegir las nuevas variedades se realizó un PCoA con las 128 accesiones del Banco de Germoplasma del COMAV y se eligieron las cuatro más alejadas (vl110, anl129, usa27 y usa49), además de seleccionar las variedades *Microtom* (muy variable) y *Heinz* (genoma de referencia). En este análisis también se pudo comprobar el bajo polimorfismo del acervo genético del tomate cultivado, destacando que las accesiones americanas (como son usa27 y usa49) fueron las que mayor distancia, en otras palabras, diferencia, presentaban frente al resto de accesiones. Esto puede deberse a que las accesiones americanas, al pertenecer al centro de origen y diversidad del tomate, tengan un mayor número de polimorfismos en su genoma al estar en contacto con las especies silvestres.

En cuanto al marcador que ha presentado polimorfismo entre las cuatro variedades utilizadas durante la realización del trabajo, SSR70, presenta la repetición (AT), respondiendo a los estudios de diversos autores donde se indica que los marcadores con esta repetición presentan mayor polimorfismo (Smulders *et al.*, 1997; Areshchenkova y Ganal, 2002; Bredemeijer *et al.*, 2002; Suliman-Pollatschek *et al.*, 2002; He *et al.*, 2003; Frary *et al.*, 2005; Tam *et al.*, 2005; García-Martínez *et al.*, 2006). Es por ello que se espera que los marcadores LELE25 y LEIZV1, ambos con la repetición AT/TA, también presenten polimorfismo y puedan utilizarse para la determinación de la contaminación varietal, el objetivo principal del estudio.

En conclusión, se recomienda el uso del protocolo de extracción de DNA de semillas de tomate mediante las perlas mecánicas, ya que se obtiene una extracción de mejor calidad y con mayor concentración de DNA. En cuanto al análisis de los cuatro marcadores de tipo SSR con las seis nuevas variedades seleccionadas se disponen de los cebadores necesarios para repetir el estudio para la detección de contaminación varietal, por lo que los resultados se publicarán próximamente.

6 Conclusión y perspectivas futuras

El presente trabajo ha obtenido una parte de los resultados esperados, en concreto, el referente a mejorar la extracción de DNA de semilla de tomate mediante el protocolo de extracción por perlas mecánicas. Por el contrario, no se ha podido seleccionar marcadores moleculares de tipo SSR para diferenciar variedades de tomate cultivado y poder desarrollar un modelo de detección de contaminación varietal. Es por ello que se realiza la nueva selección de marcadores y de variedades, para dar un nuevo planteamiento al estudio y poder lograr el segundo objetivo de este estudio.

Por tanto, este trabajo da paso al desarrollo de un nuevo protocolo de extracción de DNA de semillas de tomate mediante perlas mecánicas, y plantea una nueva hipótesis para el desarrollo de un protocolo de detección de contaminación varietal, pues la inicial no ha presentado los resultados esperados.

7 Bibliografía

- AGROINFORMACIÓN (s. f.). *El cultivo del tomate*. Recuperado 6 de octubre de 2020 de <https://www.infoagro.com/hortalizas/tomate.htm>
- AGROMÁTICA, J. (2019). *Variedades de tomates*. Agromática. Recuperado el 9 de octubre de 2020 de <https://www.agromatica.es/variedades-de-tomates/>
- ARESHCHENKOVA, T. & GANAL, M.W. (2002). Comparative analysis of polymorphism and Chromosomal location of tomato microsatellite markers isolated from different sources. *Theoretical and Applied Genetics* 104, 229–235.
- ARUMUGANATHAN, K. & EARLE, E.D. (1991). Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 9(3), 208–218.

- BAI, Y., & LINDHOUT, P. (2007). Domestication and Breeding of Tomatoes: What have We Gained and What Can We Gain in the Future? *Annals of Botany*, *100*(5), 1085-1094. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm150>.
- BASHALKHANOV, S., & RAJORA, O. P. (2008). Protocol: A high-throughput DNA extraction system suitable for conifers. *Plant Methods*, *4*(1). <https://doi.org/10.1186/1746-4811-4-20>.
- BAUCHET, G., & CAUSSE, M. (2012). Genetic Diversity in Tomato (*Solanum lycopersicum*) and Its Wild Relatives. En M., Caliskan (Ed.), *Genetic Diversity in Plants* (133-162). IntechOpen.
- BERGOUGNOUX, V. (2014). The history of tomato: From domestication to biopharming. *Biotechnology Advances*, *32*(1), 170-189. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.11.003>.
- BLANCA, J., CAÑIZARES, J., CORDERA, L., PASCUAL, L., DIEZ, M.J. & NUEZ, F. (2012). Variation revealed by SNP genotyping and morphology provides insight into the origin of the tomato. *PLoS ONE*, *7*(10), e48198. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.004819>
- BREDEMEIJER, G., COOKE, R., GANAL, M., PEETERS, R., ISAAC, P., NOORDIJK, Y., RENDELL, S., JACKSON, J., RÖDER, M.S., WENDEHAKE, K., DIJCKS, M., AMELAINE, M., WICKAERT, V., BERTRAND, L. & VOSMAN B. (2002). Construction and testing of a miCro.satellite database containing more than 500 tomato varieties. *Theor Appl Genet*, *105*, 1019–1026.
- BRESOV (s. f.). Shaping the future of organic breeding & farming | BRESOV. Recuperado 7 de octubre de 2020, de <https://bresov.eu/>
- BREUNING, G. & LYONS, J. M. (2000). The case of the FLAVR SAVR tomato. *California Agriculture*, *54*, 6–7.
- CHEN, F. Q. & FOOLAD, M. R. (1999). A molecular linkage map of tomato based on a Cro.ss between *Lycopersicon esculentum* and *L. pimpinellifolium* and its comparison with other molecular maps of tomato. *Genome*, *42*(1), 94–103.
- COLLE, I., LEMMENS, L., TOLESA, G., VAN-BUGGENHOUT, S., DEVLEESCHOUWER, K., VAN-LOEY, A., & HENDRICKX, M. (2010). Lycopene degradation and isomerization kinetics during thermal processing of an olive oil/tomato emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*, 12784-12789.
- COMUNICACION, G. (2018). *La UAL participa en el proyecto europeo BRESOV para hacer más sostenible el cultivo de tomate en condiciones adversas*. UALNEWS. Recuperado el 12 de octubre de 2020 de

<https://news.ual.es/ciencia/la-ual-participa-en-el-proyecto-europeo-bresov-para-hacer-mas-sostenible-el-cultivo-de-tomate-en-condiciones-adversas/>

CONSELLERIA DE AGRICULTURA, MEDIO AMBIENTE, CAMBIO CLIMÁTICO Y DESARROLLO RURAL (GENERALITAT VALENCIANA). (s. f. a). *Tomate valenciano masclat* (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Recuperado 7 de octubre de 2020, de <http://www.agroambient.gva.es/documents/163228750/169681163/tomate+valenciano+masclat.pdf/bf331eb4-74b1-4548-8ccf-1f2a2ae1ded3>

CONSELLERIA DE AGRICULTURA, MEDIO AMBIENTE, CAMBIO CLIMÁTICO Y DESARROLLO RURAL (GENERALITAT VALENCIANA). (s. f. b). *Tomate valenciano blanco* (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Recuperado 7 de octubre de 2020, de <http://www.agroambient.gva.es/documents/163228750/169681163/tomate+valenciano+blanco.pdf/c34d9dce-d980-43ac-b6cd-0907feac0d70>

CONSELLERIA DE AGRICULTURA, MEDIO AMBIENTE, CAMBIO CLIMÁTICO Y DESARROLLO RURAL (GENERALITAT VALENCIANA). (s. f. c). *Tomate rosa de Altea* (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Recuperado 7 de octubre de 2020, de <http://www.agroambient.gva.es/documents/163228750/169681163/tomate+rosa+de+altea.pdf/ffc215d2-3835-470a-b393-0def564249b9>

DIEZ, M. (1995) Tipos varietales. En F., Nuez (Ed.), *El cultivo del tomate* (pp. 93–129). Madrid: Mundi-Prensa.

DOGANLAR, S., FRARY ET AL. (2005), A., & TANKSLEY, S.D. (2000). The genetic basis of seedweight variation: tomato as a model system. *Theoretical and Applied Genetics*, 100, 1267–1273.

EBERT, A. W., & CHOU, Y. Y. (2015). The tomato collection maintained by AVRDC – The World Vegetable Center: composition, germplasm dissemination and use in breeding. *Acta Horticulturae*, 1101, 169-176. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2015.1101.26>

FAOSTAT. (2018). FAO. Recuperado el 7 de octubre de 2020, <http://www.fao.org/faostat/es/>

FERNÁNDEZ RUIZ, V., GALIANA, L. & SÁNCHEZ MATA, M.C. (2004). Internal quality characterization of fresh tomato fruits. *Hort Science*, 39(2), 339-345.

FILLATTI, J. J., KISER, J., ROSE, R. & COMAI, L. (1987). Efficient transfer of glyphosate tolerance gene into tomato using binary *Agrobacterium tumefaciens* vector. *Bio/Technology*, 5(7), 726–730.

- FOOLAD, M. R. (2007). Genome Mapping and Molecular Breeding of Tomato. *International Journal of Plant Genomics*, 1-52. <https://doi.org/10.1155/2007/64358>
- FOOLAD, M. R., JONES, R. A., & RODRIGUEZ, R. L. (1993). RAPD markers for constructing intraspecific tomato genetic maps. *Plant Cell Reports*, 12(5), 293-297. <https://doi.org/10.1007/bf00237139>
- FRARY, A., XU, Y., LIU, J., 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(2), 291-312. <https://doi.org/10.1007/s00122-005-2023-7>
- FULTON, T. M., XU, Y., SIEW, F. L. & TANKSLEY, S. D. (1999). Efficiency of using CAPS as an alternative and potentially automatable mapping system. *Report of the Tomato Genetics Cooperative*, 49, 15–17.
- GANAL, M. W., CZIHAL, R., HANNAPPEL, U., KLOOS, D.-U., POLLEY, A., & LING, H. Q. (1998). Sequencing of cDNA Clones from the Genetic Map of Tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Genome Research*, 8(8), 842-847. <https://doi.org/10.1101/gr.8.8.842>
- GARCÍA-MARTÍNEZ, S., ANDREANI, L., GARCÍA-GUSANO, M., GEUNA, F. & RUIZ, J.J. (2006). Evaluation of amplified fragment length polymorphism and simple sequence repeats for tomato germplasm fingerprinting: utility for grouping closely related traditional cultivars. *Genome*, 49, 648–656.
- GEORGIEV, H. (1991). Heterosis in tomato breeding. *Genetic Improvement of Tomato*, 14, 83–98.
- 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(2), 363-373. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-1076-0>
- HOBSON, G., & GRIERSON, D. (1993). Chapter 14. Tomato. En J. E. Taylor, G. A. Tucker, & G. B. Seymour (Eds.), *Biochemistry of Fruit Ripening* (pp. 405-442). Springer.
- HORTOINFO (s. f.). *Proyecto europeo para conseguir hortalizas con resistencia a plagas y al cambio climático*. Recuperado 7 de octubre de 2020, de <http://www.hortoinfo.es/index.php/7200-proy-bresov-060718>
- HUANG, C. C., CUI, Y.-Y., WENG, C. R., ZABEL, P., & LINDHOUT, P. (2000). Development of diagnostic PCR markers closely linked to the tomato powdery mildew resistance gene *OI-1* on Chromosome 6 of tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 101(5-6), 918-924. <https://doi.org/10.1007/s001220051562>

- INNOVA, A. (2008). *Innova.- El CITA cuenta en su Banco de Germoplasma con la mayor colección de variedades de tomate de España.* europapress.es. Recuperado el 8 de Octubre de 2020, de <https://www.europapress.es/aragon/innova-00241/noticia-innova-cita-cuenta-banco-germoplasma-mayor-coleccion-variedades-tomate-espana-20081021131656.html#:~:text=Innova.-,%2D%20El%20CITA%20cuenta%20en%20su%20Banco%20de%20Germoplasma%20con%20la,variedades%20de%20tomate%20de%20Espa%C3%B1a&text=El%20Banco%20de%20Germoplasma%20de,Valencia%2C%20el%20mayor%20de%20Espa%C3%B1a>
- JENKINS, J.A. (1948). The origin of the cultivated tomato. *Economic Botany*, 2: 379-392.
- KHUSH, G. S. & RICK, C. M. (1968). Cytogenetic analysis of the tomato genome by means of induced deficiencies. *Chromosoma*, 23, 452–484.
- KNAPP, S., BOHS, L., NEE, M. & SPOONER, D. M. (2004). “Solanaceae-a model for linking genomics with biodiversity,” *Comparative and Functional Genomics*, 5(3), 285–291.
- KUMAR, D., SHUKLA, N., SAHU, V., SHARMA, D. & CHANDEL, G. (2016). Assessment of genetic variation in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) genotypes using SSR molecular markers. *Eco. Env. & Cons.*, 22, S317-S325.
- KWON, Y. S., PARK, S. G., & YI S. I. (2009). Assessment of genetic variation among commercial tomato (*Solanum lycopersicum*) varieties using SSR markers and morphological characteristics. *Genes & Genomics* 3, 1-10.
- LABATE, J. A., & BALDO, A. M. (2005). Tomato SNP Discovery by EST Mining and Resequencing. *Molecular Breeding*, 16(4), 343-349. <https://doi.org/10.1007/s11032-005-1911-5>
- LINKAGE COMMITTEE (1973). *Tomato Genetics Cooperative*, 23, 9-11.
- LINNAEUS, C. (1753). *Species Planatarium*, Holmiae, Stockholm, Sweden.
- MACARTHUR, J. W. (1934). Linkage groups in the tomato. *Journal of Genetics*, 29, 123–133.
- MARSILI, R., & CALLAHAN, D. (1993). Comparison of a Liquid Solvent Extraction Technique and Supercritical Fluid Extraction for the Determination of - and -Carotene in Vegetables. *Journal of Chromatographic Science*, 31(10), 422-428. <https://doi.org/10.1093/Cro.omsci/31.10.422>
- MARTIN, G. B., BROMMONSCHENKEL, S. H., CHUNWONGSE, J., FRARY ET AL. (2005), A., GANAL, M. W., SPIVEY, R., WU, T., EARLE, E. D. &

- TANKSLEY, S. D. (1993a). Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science*, 262(5138), 1432–1436.
- MARTIN, G. B., VICENTE, M. C. & TANKSLEY, S. D. (1993b). High resolution linkage analysis and physical Characterization of the *Pto* bacterial resistance locus in tomato. *Molecular Plant-Microbiology Interactions*, 6, 26–34.
- MAZZUCATO, A., PAPA, R., BITOCCHI, E., MOSCONI, P., NANNI, L., NEGRI, V., PICARELLA, M. E., SILIGATO, F., SORESSI, G. P., TIRANTI, B., & VERONESI, F. (2008). Genetic diversity, structure and marker-trait associations in a collection of Italian tomato (*Solanum lycopersicum* L.) landraces. *Theor Appl Genet* 116, 657–669.
- MCCORMICK, S., NIEDERMEYER, J., FRY, J., BARNASON, A., HORSCH, R. & FRALEY, R. (1986). Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports*, 5(2), 81–84.
- MENDA, N., SEMEL, Y., PELED, D., ESHED, Y. & ZAMIR, D. (2004). *In silico* screening of a saturated mutation library of tomato. *Plant Journal*, 38(5), 861–872.
- MILLER, J. C., & TANKSLEY, S. D. (1990). RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. *Theoretical and Applied Genetics*, 80(4), 437-448. <https://doi.org/10.1007/bf00226743>
- MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN. GOBIERNO DE ESPAÑA (2020). Superficies y producciones anuales de cultivos. Recuperado el 5 de octubre de 2020, de <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/superficies-producciones-anuales-cultivos/>
- MUELLER, L.A., SOLOW, T.H., TAYLOR, N., SKWARECKI, B., BUELS, R., BINNS, J., LIN, C., WRIGHT, M.H., AHRENS, R., WANG, Y., HERBST, E.V., KEYDER, E.R., MENDA, N., ZAMIR, D. & TANKSLEY, S.D. (2005a). The SOL Genomics Network: a comparative resource for Solanaceae biology and beyond. *Plant Physiol*, 138, 1310–1317.
- MUELLER, L. A., TANKSLEY, S. D., GIOVANNONI, J. J., VAN ECK, J., STACK, S., CHOI, D., KIM, B. D., CHEN, M., CHENG, Z., LI, C., LING, H., XUE, Y., SEYMOUR, G., BISHOP, G., BRYAN, G., SHARMA, R., KHURANA, J., TYAGI, A., CHATTOPADHYAY, D., SINGH, N. K., STIEKEMA, W., LINDHOUT, P., JESSE, T., LANKHORST, R. K., BOUZAYEN, M., SHIBATA, D., TABATA, S., GRANELL, A., BOTELLA, M. A., GIULIANO, G., FRUSCIANTE, L., CAUSSE, M. & ZAMIR, D. (2005b). The Tomato Sequencing Project, the first cornerstone of the International Solanaceae

- Project (SOL). *Comparative and functional genomics*, 6(3), 153–158.
<https://doi.org/10.1002/cfg.468>
- NEE, M., HAWKES, J. G., LESTER, R. N. & ESTRADA, N. (1991). *Solanaceae III: Taxonomy, Chemistry, Evolution*, The Royal Botanic Garden, Kew, UK.
- NUEZ, F. (1995) El cultivo del tomate. Mundi-Prensa.
- NUEZ, F. & PROHENS, J. (2008) Fabaceae, Liliaceae, Solanaceae, and Umbelliferae, Vegetables 2. Handbook of Plant Breeding. Springer.
- PARK, Y. H., WEST, M. A. L. & ST CLAIR, D. A. (2004) Evaluation of AFLPs for germplasm Wngerprinting and assessment of genetic diversity in cultivars of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Genome*, 47, 510–518.
- PARMAR, P., SUDHIR, A., PREETHI, R., DAVE, B., PANCHAL, K., SUBRAMANIAN, R. B., PATEL, A. & KATHIRIA, K. B. (2013). Identification of a SSR marker (TOM-144) linked to *Fusarium* wilt resistance in *Solanum lycopersicum*. *American Journal of Molecular Biology*, 3(4), 241–247.
<https://doi.org/10.4236/ajmb.2013.34031>
- PATIL, R. S., DAVERY, M. R., POWER, J. B. & COCKING, E. C. (2002). Effective protocols for *Agrobacterium*-mediated leaf disc transformation in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Indian Journal of Biotechnology*, 1(4), 339–343.
- PEAKALL, R. y SMOUSE P.E. (2012) GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28, 2537-2539.
- PERALTA, I. E., KNAPP, S., & SPOONER, D. M. (2005). New species of wild tomatoes (*Solanum* section *Lycopersicon*: Solanaceae) from Northern Peru. *Systematic Botany*, 30(2), 424-434.
- PERALTA, I.E. & SPOONER, D.M. (2005). Morphological characterization and relationships of wild tomatoes (*Solanum* L. Section *Lycopersicon*). *Monogr Syst Bot.*, 104, 227–57.
- PERALTA, I. E., KNAPP, S. & SPOONER, D. M. (2006). Nomenclature for wild and cultivated tomatoes. *Report of the Tomato Genetics Cooperative*, 56, 6-12.
- PERALTA, I.E., SPOONER, D.M. & KNAPP, S. (2008) Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (*Solanum* sections *Lycopersicoides*, *Juglandifolia*, *Lycopersicon*; Solanaceae). *Syst. Bot. Monogr.*, 84, 1–186.
- PETERSON, D. G., PEARSON, W. R. & STACK, S. M. (1998). Characterization of the tomato (*Lycopersicon esculentum*) genome using in vitro and in situ DNA reassociation. *Genome*, 41(3), 346–356.

- PLANETA HUERTO (s. f.). *El tomate y sus variedades*. Recuperado 7 de octubre de 2020 de https://www.planetahuerto.es/revista/el-tomate-y-sus-variedades_00263
- POWELL, W., MORGANTE, M., ANDRE, C., HANAFEY, M., VOGEL, J., TINGEY S. AND RAFALSKI, A. (1996). A comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR markers for germplasm analysis. *Mol. Breed.*, 2, 225-238.
- RICK, C. M. (1976). "Tomato, *Lycopersicon esculentum* (Solanaceae)," En N. W. Simmonds (Ed.), *Evolution of Crop Plants* (pp. 268– 273), Longman, London, UK.
- RICK, C. M. (1978). The tomato. *Science American*, 23, 76–87.
- RIJK ZWAAN ES (s. f.). *TY 12 RZ F1 (73-882)*. Recuperado 7 de octubre de 2020, de <https://www.rijkszwaan.es/busca-tu-variedad/tomate/ty-12-rz>
- RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M. & WELSCH, R. (2019). Plant and Food Carotenoids: Methods and Protocols. *Humana*.
- ROSELLÓ, J. (2010). *El tomate valenciano*. Revista Ae (N.º 0). Recuperado el 9 de octubre de 2020 de http://www.agroecologia.net/recursos/Revista_Ae/Ae_a_la_Practica/fichas/No.0/revista_Ae_n0-Ficha-semilla.pdf
- ROSSI, M., GOGGIN, F. L., MILLIGAN, S. B., KALOSHIAN, I., ULLMAN, D. E. & WILLIAMSON, V. M. (1998). The nematode resistance gene *Mi* of tomato confers resistance against the potato aphid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(17), 9750–9754.
- RUIZ, J. J., GARCÍA-MARTÍNEZ, S., PICÓ, B., GAO, M., & QUIROS, C. F. (2005). Genetic Variability and Relationship of Closely Related Spanish Traditional Cultivars of Tomato as Detected by SRAP and SSR Markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130(1), 88-94. <https://doi.org/10.21273/jashs.130.1.88>
- RUS-KORTEKAAS, W., SMULDERS, M.J.M., ARENS, P. & VOSMAN, B. (1994). Direct comparison of levels of genetic variation in tomato detected by a GACA-containing microsatellite probe and by random amplified polymorphic DNA. *Genome*, 37, 375-381.
- SALIBA-COLOMBANI, V., CAUSSE, M., GERVAIS, L., & PHILOUZE, J. (2000). Efficiency of RFLP, RAPD, and AFLP markers for the construction of an intraspecific map of the tomato genome. *Genome*, 43(1), 29-40. <https://doi.org/10.1139/g99-096>
- SCOTT, J.W. & ANGELL, F.F. (1998) Tomato. *Hybrid Cultivar Development*, 451–475.

- SMULDERS, M. J., 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.
- SOL GENOMICS NETWORK INTERNATIONAL (s. f.). *Tomato Genome Sequencing Project*. Recuperado el 29 de octubre de 2020 de https://solgenomics.net/organism/Solanum_lycopersicum/genome
- SOL GENOMICS NETWORK. Solgenomics.net. Recuperado de <https://solgenomics.net/>
- SPOONER, D. M., PERALTA, I. E. & KNAPP, S. (2005) Comparison of AFLPs to other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes [*Solanum* L. section *Lycopersicon* (Mill.) Wettst. subsection *Lycopersicon*]. *Taxon.*, 54, 43–61.
- STEVENS, M. R. & ROBBINS, M. D. (2007). Molecular markers in selection of tomato germplasm. En M. K. Razdan & A. K. Mattoo (Eds.), *Genetic Improvement of Solanaceous Crops. Vol 2: Tomato* (pp. 239–260). Science Publishers, Enfield, NH, USA.
- SULIMAN-POLLATSCHEK, S., KASHKUSH, K., SHATS, H., HILLEL, J. & LAVI, U. (2002). Generation and mapping of AFLP, SSRs and SNPs in *Lycopersicon esculentum*. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 7, 583–597.
- TAM, S. M., MHIRI, C., VOGELAAR, A., KERKVELD, M., PEARCE, S. R. & GRANDBASTIEN, M-A. (2005). Comparative analyses of genetic diversities within tomato and pepper collections detected by retrotransposon-based SSAP, AFLP and SSR. *Theor. Appl. Genet.*, 110, 819–831.
- TANKSLEY, S. D. (1983). Molecular markers in plant breeding. *Plant Molec. Biol. Rep.*, 1, 3–8.
- TANKSLEY, S. D., GANAL, M. W., PRINCE, J. P., DE VICENTE, M. C., BONIERBALE, M. W., BROUN, P., FULTON, T. M., GIOVANNONI, J. J., GRANDILLO, S., & MARTIN, G. B. (1992). High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics*, 132(4), 1141–1160.
- TANKSLEY, S.D. (2004). The genetic, developmental and molecular bases of fruit size and shape variation in tomato. *The Plant Cell*, 16, S181–S189.
- TODOROVSKAA, E., IVANOVAA, A., GANEVAB, D., PEVICHAROVAB, G., MOLLEC, E., BOJINOVD, B., RADKOVAA, M. & DANAILOVE, Z. (2014). Assessment of genetic variation in Bulgarian tomato (*Solanum lycopersicum* L.) genotypes, using fluorescent SSR genotyping platform. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 28(1), 68–76.

- UPOV (1991). International convention for the protection of new varieties in plants. 2 December 1961, as revised at Geneva on 10 November 1972, on 23 October 1978, and on 19 March 1991. https://www.upov.int/edocs/mdocs/upov/en/upov_dc_91/upov_dc_91_130.pdf
- USER, S. (s. f.). *Comienza el Proyecto BRESOV para encontrar nuevas variedades hortícolas resistentes a condiciones extremas*. Fitosoil. Recuperado 7 de octubre de 2020 de <https://www.fitosoil.com/index.php/de/noticias/290-comienza-el-proyecto-bresov-para-encontrar-nuevas-variedades-hortícolas-resistentes-a-condiciones-extremas>
- VAN DER BEEK, J.G., VERKERK, R., ZABEL, P. & LINDHOUT, P. (1992). Mapping strategy for resistance genes in tomato based on RFLPs between cultivars: Cf 9 (resistance to *Cladosporium fulvum*) on Chromosome 1. *Theoretical and Applied Genetics*, 84, 106–112.
- VAN DER HOEVEN, R. S., RONNING, C., GIOVANNONI, J. J., MARTIN, G. & TANKSLEY, S. D. (2002). Deductions about the number, organization and evolution of genes in the tomato genome based on analysis of a large expressed sequence tag collection and selective genomic sequencing. *The Plant Cell*, 14(7), 1441–1456.
- VARSHNEY, R. V., GRANER, A. & SORELLS, M. E. (2005). Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trend in Biotechnology*, 23, 48-55.
- VILLAND, J., SKROCH, P. W., LAI, T., HANSON, P., KUO, C. G. & NIENHUIS, J. (1998). Genetic variation among tomato accessions from primary and secondary centers of diversity. *Crops Science*, 38, 1339–1347.
- WANG, P. P., & WU, X. H. (2012). First Report of Sugar Beet Seedling Damping-Off Caused by Binucleate *Rhizoctonia* AG-A in China. *Plant Disease*, 96(11), 1696. <https://doi.org/10.1094/pdis-05-12-0492-pdn>
- WANG, Y., VAN DER HOEVEN, R. S., NIELSEN, R., MUELLER, L. A. & TANKSLEY, S. D. (2005). Characteristics of the tomato nuclear genome as determined by sequencing undermethylated EcoRI digested fragments. *Theoretical and Applied Genetics*, 112(1), 72–84.
- WILLIAMS, C. E., & CLAIR, D. A. S. (1993). Phenetic relationships and levels of variability detected by restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA analysis of cultivated and wild accessions of *Lycopersicon esculentum*. *Genome*, 36(3), 619-630. <https://doi.org/10.1139/g93-083>

- YANG, W., BAI, X., KABELKA, E., EATON, C., KAMOUN, S., & VAN DER KNAAP, E. (2004). Discovery of single nucleotide polymorphisms in *Lycopersicon esculentum* by computer aided analysis of expressed sequence tags. *Molecular Breeding*, 14(1), 21-34. <https://doi.org/10.1023/b:molb.0000037992.03731.a5>
- YI, S., JIN, W., YUAN, Y., & FANG, Y. (2018). An Optimized CTAB Method for Genomic DNA Extraction from Freshly-picked Pinnae of Fern, *Adiantum capillus-veneris* L. *BIO-PROTOCOL*, 8(13), 1-6. <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.2906>
- ZURIAGA GARCÍA, E. (2009). Análisis de la variabilidad en poblaciones naturales de *Solanum*, secciones *Lycopersicon* y *Basarthurum* [Tesis doctoral no publicada]. Universitat Politècnica de València. <https://doi.org/10.4995/Thesis/10251/6362>
- ZHANG, Y. & STOMMEL, J. R. (2001). Development of SCAR and CAPS markers linked to the *Betas* gene in tomato. *Crop Science*, 41(5), 1602–1608.
- ZHOU, X. J., YAN, R. S., XU, Y. N., ZOU, D. W., ZHAO, P., & LIU, W. Z. (2015). Simple DNA extraction method for SSR-PCR analysis from different tissues of *Tapiscia sinensis*, an endangered plant species. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding (The)*, 75(3), 393. <https://doi.org/10.5958/0975-6906.2015.00063.2>

8 Anexo: Protocolo de extracción de DNA de semilla de tomate **(Mixed CTAB Silica DNA extraction)**

1. Encender el termobloque (controlar que la temperatura alcance los 65°C).
2. Dos tipos de paso 2:
 - a. Triturar las muestras durante unos 30/60 segundos en bolsas de extracción y comprobar que las muestras están bien trituradas.
 - b. Colocar 1 perla mecánica (5 mm) en cada tubo Eppendorf de 2 mL, etiquetar los tubos y meter los tubos en nitrógeno líquido. Moler las muestras en el *shaker* (Restch MM2000 Mixer Mill).
3. Volver a colocar la muestra en nitrógeno líquido para transportarla al laboratorio.
4. En campana de humo, añadir a cada muestra 1.000 µL de tampón de extracción CTAB + 14 µL de β-mercaptoetanol. Vortex durante 30 segundos o hasta una completa homogeneización.
5. Agregar 2 µL de RNasa (1 mg/mL) en cada muestra cambiando la punta cada vez. Incubar en el termobloque durante 30-60 min a 65°C.
6. Mantener en hielo durante 5 min.
7. Agregar 700 µL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1).
8. Mezclar bien con el vórtice hasta que las dos fases desaparezcan y se vea una nube blanca (aproximadamente 30 segundos a 1 minuto).
9. Centrifugar a 11.000 rpm durante 5 minutos.
10. Recuperar 800 µL de la fase acuosa sin alterar la interfase y transferir a un nuevo tubo Eppendorf de 2 mL previamente etiquetado.
11. Añadir 1,5 volúmenes de solución aglutinante (1.200 µL). Primero agregar 480 µL de NaCl 2,5 M + PEG al 20% y agitar suavemente con la mano. A continuación, agregar 720 µL de etanol absoluto y vuelva a agitar suavemente con la mano.
12. Agregar 20 µL de matriz de sílice.
13. Remover suavemente con el agitador durante 5 min.
14. Centrifugar la sílice durante 5 a 6 segundos (*spin corto*).
15. Desechar el sobrenadante por decantación y agregar 700 µL de EtOH al 70%.

- 16.** Vuelva a suspender completamente el gránulo de sílice agitando suavemente con la mano (sin vórtice).
- 17.** Centrifugar la sílice durante 5 a 6 segundos (*spin corto*).
- 18.** Desechar el sobrenadante por decantación y dejar secar 10 min.
- 19.** Agregar 50-100 μL de TE pH 8, remover suavemente con la mano aproximadamente 30 segundos e incubar 10 min a 65°C usando el termobloque.
- 20.** Centrifugar a 14.000 rpm durante 5 minutos.
- 21.** Recolectar 40-80 μL de sobrenadante y transferir a nuevos tubos Eppendorf (1,5 mL).