



## MASTER INTERUNIVERSITARIO OFICIAL EN MEJORA GENÉTICA VEGETAL



### Desarrollo y utilización de marcadores moleculares para el genotipado de la colección de líneas de introgresión de *Solanum lycopersicoides* en el fondo genético del tomate cultivado



María Florencia Cocaliadis

Directora: Ana María Pérez de Castro

## FORMULARIO DEPÓSITO TESIS MÁSTER

<b>AUTOR</b>	1 <sup>er</sup> APELLIDO	2 <sup>o</sup> APELLIDO	NOMBRE	DNI/NIE
	Cocaliadis		María Florencia	x3728421y
<b>DIRECTOR TESIS</b>	1 <sup>er</sup> APELLIDO	2 <sup>o</sup> APELLIDO	NOMBRE	
	Pérez	de Castro	Ana María	
<b>UNIVERSIDAD</b>		<b>MÁSTER</b>		
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA		Mejora genética vegetal		
<b>TÍTULO DE LA TESIS</b>				
Desarrollo y utilización de marcadores moleculares para el genotipado de la colección de líneas de introgresión de <i>Solanum lycopersicoides</i> en el fondo genético del tomate cultivado				
<b>RESUMEN</b>	<p>Con objeto de ensanchar la base genética de las especies cultivadas se recurre a las especies silvestres relacionadas. <i>Solanum lycopersicoides</i> es la especie silvestre más alejada genéticamente del tomate cultivado (<i>S. lycopersicum</i>), a partir de la cual, ha sido posible obtener descendencia fértil a través del híbrido interespecífico. Se han realizado numerosos estudios que demuestran su potencial como fuente de variación en programas de mejora. Un grupo de investigadores desarrolló una colección de líneas de introgresión (ILs) de <i>S. lycopersicoides</i> en el fondo genético de la especie cultivada. Dada la isogenicidad entre líneas con respecto al genoma recurrente, toda la variación genética que se distingue entre ellas puede ser directamente asociada al segmento introgresado. Esta población de premejora constituye, por tanto, una herramienta muy útil para el cartografiado de genes de interés así como la incorporación rápida de dichas características en programas de mejora.</p> <p>Un importante porcentaje de líneas de la colección, por problemas de esterilidad, no se puede mantener en homocigosis. Para el manejo y evaluación de la colección es necesario disponer de marcadores moleculares que permitan determinar o confirmar la presencia de la introgresión en las líneas. Incrementar la densidad de los marcadores disponibles facilita, por una parte, la identificación de recombinación en los fragmentos grandes mantenidos en heterocigosis y, por otra parte, aumenta la definición en la determinación del tamaño de las introgresiones.</p> <p>El objetivo del presente trabajo fue desarrollar marcadores de tipo CAPS (<i>Cleaved Amplified Polymorphic Sequence</i>) para permitir el manejo de la colección de ILs. Además, se pretendía utilizar los marcadores desarrollados para genotipar líneas homocigotas para la introgresión, con objeto de conocer la longitud de dicho fragmento, así como estudiar la segregación de la</p>			

descendencia de líneas heterocigotas con la finalidad de reproducir la semilla disponible.

Para la consecución del primer objetivo, se emplearon marcadores CAPS descritos como polimórficos entre tomate y otras especies silvestres relacionadas, fundamentalmente derivados de marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) o COS (*Conserved Ortholog Set*). Se realizó la amplificación mediante PCR de los parentales de la colección ILs, así como, del híbrido interespecífico entre ambos. Para la búsqueda de polimorfismo se utilizó una batería compuesta por diez endonucleasas. En 25 de los 44 marcadores probados se obtuvo producto de amplificación para *S. lycopersicoides* y *S. lycopersicum*, así como en el híbrido interespecífico. Se desarrollaron un total de 14 marcadores polimórficos, 3 de los cuales proceden de polimorfismo hallado en PCR, mientras que en los 11 restantes el polimorfismo surge tras la digestión enzimática.

En el genotipado de líneas de la colección se emplearon marcadores polimórficos desarrollados en este trabajo y algunos identificados en estudios previos. Se genotiparon nueve líneas de la colección de ILs. Se estudió la longitud de la introgresión en los fragmentos mantenidos en homocigosis., En el caso de las líneas mantenidas en heterocigosis, se analizó la segregación en su descendencia. Se confirmó la distorsión de la segregación asociada a la presencia de determinadas introgresiones. En algunos casos se detectó recombinación, mientras que en otros se identificó la pérdida del fragmento. Estos resultados ponen en evidencia la importancia del incremento en la densidad de marcadores polimórficos para el manejo de la colección de ILs.

Wild relatives are frequently used with the aim of widening the genetic basis of cultivated species. *Solanum lycopersicoides* is the most distant tomato relative that has been possible to cross with tomato to obtain fertile progeny. Several research works showed the potential of this species as a variation source in breeding programs.

A group of researchers developed a collection of introgression lines (ILs) derived from *S. lycopersicoides* in genetic background of the cultivated species. Given the isogenicity between these lines and the recurrent genome, all the genetic variation identified between them can be directly associated to the introgressed segment. This pre-breeding population represents, therefore, a very useful tool for interesting genes mapping, as well as for the rapid incorporation of those characteristics in breeding programs.

A high percentage of introgression lines cannot be maintained as homozygotes, given sterility problems. Availability of molecular markers to determine or confirm the presence of a concrete fragment is necessary for the management and evaluation

of the collection. Increasing the density of available markers would facilitate, on one hand, the identification of recombination in large fragments maintained in heterozygous state and, on the other hand, increase the definition in the determination of introgression sizes.

The objective of the work here presented was to develop CAPS markers (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) to allow the handling of the collection. Besides, another objective was the use of the markers developed in order to analyze homozygotes to determine the introgressions size, as well as to study segregation in progenies from heterozygotes to reproduce them.

To achieve the first objective, CAPS markers previously reported as polymorphic between tomato and other wild relatives were used; these were mainly PCR-markers derived from RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism) or COS (Conserved Ortholog Set). Both parental lines and the interspecific hybrid between them were analyzed by PCR amplification. Polymorphism was searched using ten restriction enzymes. Amplification product was obtained for *S. lycopersicoides*, *S. lycopersicum* the interspecific hybrid for 25 out of the 44 markers tested. A total of 14 polymorphic markers were developed: 3 of them provided polymorphism at the PCR level, while for the other 11 restriction was necessary to reveal polymorphism.

Polymorphic markers developed in this work as well as some other previously identified were used in the genotyping assay. Nine ILs were analyzed. Introgression length was studied in the homozygous ILs. In the case of heterozygous ILs, segregation in their progenies was evaluated. Segregation distortion was confirmed as associated to the presence of concrete introgressions. Recombination was detected in some cases, as well as the loss of some fragments. These results highlight the importance of increasing markers density for the management of the ILs collection.

<b>PALABRAS CLAVE</b>	DESCRIPTORES EN ESPAÑOL												
	tomate, <i>Solanum lycopersicoides</i> , líneas de introgresión, CAPS												
	DESCRIPTORES EN INGLÉS												
	tomato, <i>Solanum lycopersicoides</i> , introgression lines, CAPS												
<b>CLASIFICACIÓN DE LA UNESCO</b>	URL MINISTERIO DE CIENCIA E INNOVACIÓN:  <a href="http://ciencia.micinn.fecyt.es/ciencia/jsp/plantilla.jsp?area=plan_idi&amp;id=6&amp;contenido=/files/portada.jsp">http://ciencia.micinn.fecyt.es/ciencia/jsp/plantilla.jsp?area=plan_idi&amp;id=6&amp;contenido=/files/portada.jsp</a>												
	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 33%;">CAMPO</th> <th style="width: 33%;">DISCIPLINA</th> <th style="width: 33%;">SUBDISCIPLINA</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>24</td> <td>2417</td> <td>241714</td> </tr> <tr> <td>31</td> <td>3107</td> <td>310706</td> </tr> <tr> <td>24</td> <td>2415</td> <td>241502</td> </tr> </tbody> </table>	CAMPO	DISCIPLINA	SUBDISCIPLINA	24	2417	241714	31	3107	310706	24	2415	241502
	CAMPO	DISCIPLINA	SUBDISCIPLINA										
	24	2417	241714										
31	3107	310706											
24	2415	241502											
(máximo tres áreas de conocimiento)													

## **AGRADECIMIENTOS**

Detrás de cada gran logro siempre hay personas que nos respaldan y confían en nosotros.

En primer lugar quiero agradecer a mi tutora, Ana María Pérez de Castro, por su perseverancia y dedicación en este trabajo.

También me gustaría reconocer el apoyo brindado por mis padres y mi novio. Ellos permiten que conciba la vida sin imposibles.

## ÍNDICE.

1. Introducción .....	1
1.1. El tomate .....	1
1.1.1. Importancia económica .....	1
1.1.2. Clasificación taxonómica .....	2
1.1.3. Origen del tomate .....	4
1.1.4. Descripción botánica .....	5
1.1.5. Recursos fitogenéticos .....	6
1.1.6. Especies silvestres y relaciones de cruzabilidad .....	7
1.1.7. <i>Solanum lycopersicoides</i> .....	10
1.2. Mejora genética del tomate .....	12
1.2.1. Principales objetivos .....	12
1.2.2. Poblaciones de premejora .....	14
1.2.2.1. Líneas recombinantes consanguíneas .....	15
1.2.2.2. Retrocruzamientos avanzados.....	16
1.2.2.3. Líneas de introgresión .....	17
1.2.2.4. Colección de líneas de introgresión de <i>S. lycopersicoides</i> en el fondo genético de tomate cultivado. ....	19
2. Objetivos .....	21
3. Materiales y métodos .....	22
3.1. Desarrollo de marcadores polimórficos entre <i>S. lycopersicum</i> y <i>S.</i> <i>lycopersicoides</i> .....	22
3.1.1. Material vegetal.....	22
3.1.2. Metodología .....	23
3.1.2.1. Extracción de ADN .....	24
3.1.2.2. Cuantificación de ADN .....	25
3.1.2.3. PCR.....	26

3.1.2.4. Electroforesis .....	32
3.1.2.5. Digestión .....	33
3.2. Genotipado de líneas de la colección de ILS.....	34
3.2.1. Material vegetal.....	34
3.2.2. Metodología .....	35
3.2.2.1. Germinación de las ILS utilizadas en este ensayo .....	35
3.2.2.2. Protocolo de genotipado .....	37
4. Resultados .....	38
4.1. Desarrollo de marcadores polimórficos entre <i>S. lycopersicum</i> y <i>S. lycopersicoides</i> .....	38
4.1.1. Amplificación .....	38
4.1.2. Fallo en la amplificación .....	42
4.1.3. Tamaño del producto de PCR .....	44
4.1.4. Búsqueda de polimorfismo .....	47
4.1.4.1. Polimorfismo en PCR .....	47
4.1.4.2. Polimorfismo por enzima de restricción.....	48
4.1.4.3. Secuenciación del producto de PCR .....	51
4.1.5. Puesta a punto de protocolos CAPS .....	55
4.2. Genotipado de líneas de la colección ILS .....	56
4.2.1. Longitud de la introgresión .....	57
4.2.2. Líneas segregantes .....	60
5. Conclusiones.....	64
6. Bibliografía .....	66
7. Anexos .....	75

## 1- INTRODUCCIÓN

### 1.1 El tomate

#### 1.1.1 Importancia económica

El tomate es la hortaliza más cultivada en todo el mundo y la de mayor valor económico. Su demanda aumenta continuamente y con ella su cultivo, producción y comercio. La producción de tomates representa cerca del 33% de la producción hortícola mundial.

El incremento anual de la producción en los últimos años se debe principalmente al aumento en el rendimiento, y en menor proporción al aumento de la superficie cultivada. En el año 2000 la producción mundial de tomate alcanzó un volumen total de 107.316.000 toneladas, mientras que en el año 2010 fue de 151.699.405 toneladas, lo que corresponde a un incremento de 41,35%. Sin embargo, el área de cultivo se incrementó en un 9,36%, pasando de 4.035.185 hectáreas a 4.412.757 hectáreas en el periodo anteriormente mencionado (Figura 1).

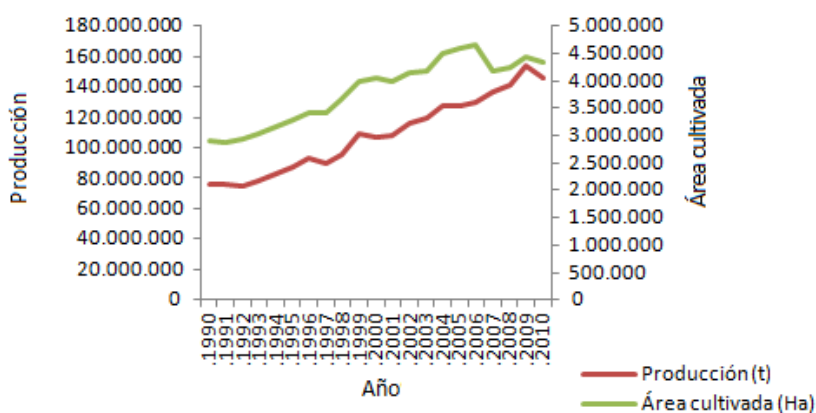


Figura 1: Evolución en la producción y área cultivada del tomate para un período de 20 años. Fuente: FAOSTAT (2012).

El principal continente productor es Asia con un 56,7% de la producción, seguido del continente Europeo con un 16,24%. España se sitúa en el puesto octavo del ranking mundial de países productores (Tabla 1) (FAOSTAT, 2012).



Tabla 1: Principales países productores de tomate. Fuente: FAOSTAT (2012).

País	Producción (t)
China	41.879.684
EEUU	12.902.000
India	11.979.700
Turquía	10.052.000
Egipto	8.544.990
Italia	6.024.800
Irán	5.256.110
España	4.312.700
Brasil	3.691.320
México	2.997.640

### 1.1.2 Clasificación taxonómica

De acuerdo con Heiwood (1993), la taxonomía generalmente aceptada para el tomate y las especies silvestres relacionadas es: clase *Magnoliopsidae*, subclase *Asteridae*, orden *Polemoniales*, familia *Solanaceae* y tribu *Solaneae*. Sin embargo, la clasificación genérica y específica ha sido considerada de diversas formas por diferentes autores a lo largo de la historia.

Desde su introducción en Europa en el siglo XVI y principios del siglo XVII los botánicos reconocieron las estrechas relaciones del tomate con el género *Solanum* y comúnmente se referían a esta planta como *Solanum pomiferum* o “Apple-bearing nightshade”. Tournefort (1694) fue el primero en considerar al tomate cultivado como una entidad distinta a nivel de género, utilizando el término griego *Lycopersicon*; colocó las plantas con gran espacio multilocular en el grupo denominado *Lycopersicon* y mantuvo las plantas con fruto bilocular en el grupo *Solanum*. Actualmente se sabe que algunos tomates (y muchas otras solanáceas) tienen dos o más lóculos. Basándose en el color y tamaño del fruto, Tournefort reconoció siete taxones que corresponden a nuestro actual concepto de cultivar dentro de la especie cultivada (Peralta y col., 2008).

Müller (1940) y Luckwill (1943) desarrollaron las dos taxonomías más completas para la clasificación de tomates silvestres, basándose en conceptos morfológicos. El género

*Lycopersicon* se dividió en dos subgéneros *Eulycopersicon* y *Eriopersicon*. La clasificación continuó cambiando con el curso de la historia; “complejo *Esculentum* y complejo *Peruvianum*” (Rick y col., 1979); “subsección *Lycopersicon* series *Lycopersicon*, *Neolycopersicon* y *Eriopersicon*” (Child, 1990); y “sección *Lycopersicon* grupos *Lycopersicon*, *Neolycopersicon*, *Eriopersicon* y *Arcanum*” (Peralta y col., 2008).

La situación taxonómica del tomate entre las Solanáceas ha resultado siempre clara, si bien como se ha explicado previamente, esto no ha sido así en cuanto a su ubicación genérica. Los estudios moleculares más recientes han colocado al tomate, previamente denominado *Lycopersicon esculentum* Mill., dentro del género *Solanum*, pasándose a denominar *Solanum lycopersicum* L. (Peralta y col., 2006) (Tabla 2).

**Tabla 2:** Lista de especies de *Solanum* sección *Lycopersicon*, con los equivalentes en el género previamente reconocido *Lycopersicon*, que ahora forma parte del género monofilético *Solanum*. Fuente: Peralta y col. (2006).

Nombre en <i>Solanum</i>	Equivalente en <i>Lycopersicon</i>
<i>S. arcanum</i> Peralta	<i>L. peruvianum</i> (L.) Miller.
<i>S. cheesmaniae</i> (L. Riley) Fosberg	<i>L. cheesmaniae</i> L. Riley
<i>S. chilense</i> (Dunal) Reiche	<i>L. chilense</i> (Dunal)
<i>S. corneliomuelleri</i> J. F. Macbr	<i>L. peruvianum</i> (L.) Miller; también conocido como <i>L. glandulosum</i> C.F. Mull.
<i>S. chmielewskii</i> (C.M. Rick, Kesicki, Fobes y M. Holle) D.M. Spooner, G.J. Anderson y R.K. Jansen	<i>L. chmielewskii</i> C.M. Rick, Kesicki, Fobes y M. Holle
<i>S. huaylasense</i> Peralta	<i>L. peruvianum</i> (L.) Miller
<i>S. habrochaites</i> S. Knapp y D.M Spooner	<i>L. hirsutum</i> Dunal
<i>S. pennellii</i> Correll	<i>L. pennellii</i> (Correll) D’Arcy
<i>S. peruvianum</i> L.	<i>L. peruvianum</i> (L.) Miller
<i>S. lycopersicum</i> L.	<i>L. esculentum</i> Miller
<i>S. neorickii</i> (C.M. Rick, Kesicki, Fobes y M. Holle) D.M. Spooner, G.J. Anderson y R.K. Jansen	<i>L. parviflorum</i> C.M. Rick, Kesicki, Fobes y M. Holle
<i>S. pimpinellifolium</i> L.	<i>L. pimpinellifolium</i> (L.) Miller
<i>S. galapagense</i> S. Darwin y Peralta.	<i>L. cheesmaniae</i> L. Riley.

Las especies taxonómica y genéticamente relacionadas con el tomate se agrupan dentro del género *Solanum* en las secciones *Lycopersicon*, *Juglandifolia* y *Lycopersicoides* (Peralta y col., 2008).

La sección *Lycopersicon* incluye el tomate cultivado y 12 especies silvestres; a este grupo se le denomina “clado de tomate”. Las secciones *Lycopersicoides* y *Juglandifolium* incluyen especies más alejadas del tomate (Tabla 3).

**Tabla 3: Clasificación de las especies relacionadas con el tomate dentro del género *Solanum*. Fuente: Peralta y col. (2008).**

<b>Sección <i>Lycopersicon</i></b>	
<b>Grupo <i>Lycopersicon</i></b>	<i>S. lycopersicum</i>
	<i>S. pimpinellifolium</i>
	<i>S. cheesmaiae</i>
	<i>S. galapagense</i>
<b>Grupo <i>Neolycopersicon</i></b>	<i>S. pennellii</i>
<b>Grupo <i>Eriopersicon</i></b>	<i>S. corneliomuelleri</i>
	<i>S. peruvianum</i>
	<i>S. habrochaites</i>
	<i>S. huaylasense</i>
	<i>S. chilense</i>
<b>Grupo <i>Arcanum</i></b>	<i>S. Arcanum</i>
	<i>S. chmielewskii</i>
	<i>S. neorickii</i>
<b>Sección <i>Lycopersicoides</i></b>	
	<i>S. lycopersicoides</i>
	<i>S. sitiens</i>
<b>Sección <i>Juglandifolium</i></b>	
	<i>S. juglandifolium</i>
	<i>S. ochrantum</i>

### 1.1.3 Origen del tomate

El tomate cultivado tiene su origen en la región Andina de Perú, Ecuador, Bolivia, el norte de Chile (aproximadamente de 0 a 23° latitud sur) y las islas Galápagos. Su antepasado más cercano es *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*, que crece espontáneamente en las regiones tropicales y subtropicales de América (Warnock, 1991).

El tomate es un cultivo transdomesticado. El lugar es incierto pero las evidencias más importantes señalan a México (Jenkins, 1948; Larry y Joanne, 2007), donde se cita a la planta como “tomatl” refiriéndose a los verdaderos tomates o a las especies de *Physalis* (en este país se emplea el término “tomate” o “tomatillo” para *Physalis philadelphica*, mientras que “jitomate” es el nombre común para cultivos de *S. lycopersicum*) (Peralta y col., 2006).

Generalmente el síndrome de domesticación en plantas incluye hábitat de crecimiento más compacto, frutos más precoces, reducción o pérdida de dispersión de semillas y dormancia, gigantismo e incremento de diversidad morfológica (Frary y Doganlar, 2003). En tomate, el proceso de transdomesticación disminuyó la variabilidad genética, ocurriendo el primer cuello de botella en el cultivo. Los principales cambios que acarrió el proceso de domesticación fueron la reducción de la base genética y expresión de genes que aumentan el número de carpelos y lóculos y por consiguiente el tamaño del fruto (Figura 2) (Bai y Lindhout, 2007).



**Figura 2:** El tomate de fruto grande “gigante Heirloom”, común en la agricultura moderna (Derecha) y el fruto típico de una especie silvestre relacionada (*S. pimpinellifolium*). Fuente: Bai y Lindhout (2007).

#### 1.1.4 Descripción botánica

El tomate, como miembro de la familia de las solanáceas, presenta haces bicolaterales y sus flores son radiales y con cinco estambres. El ovario es súpero y bicarpelar; contiene numerosos primordios seminales, produciendo bayas polispermas. Los carpelos se presentan en posición oblicua con respecto al plano mediano de la flor (Esquinas Alcázar y Nuez, 1995).

Con la domesticación y cultivo es frecuente observar flores con mayor número de pétalos y sépalos, así como ovarios multiloculares, en adición al bilocular que se podría considerar normal. Posee una semilla discoidal comprimida y con embrión enrollado, de

diámetro más o menos uniforme. Todos los miembros de esta familia tienen el mismo número de cromosomas básico ( $x=12$ ).

La tomatera es una planta perenne de porte arbustivo que se cultiva como anual (Figura 3). Puede desarrollarse de forma rastrera, semierecta o erecta, y el crecimiento es limitado en las variedades determinadas e ilimitado en las variedades indeterminadas, pudiendo llegar, en estas últimas, a 10 m en un año (Rick, 1978).



**Figura 3: Representación de la planta de tomate. Fuente: Plenck (1788).**

La ramificación es generalmente simpodial, con lo que los ejes sucesivos se desarrollan a partir de la yema axilar del eje precedente y la yema terminal da lugar a la inflorescencia o a ramas abortivas. Las hojas son compuestas imparipinadas con siete a nueve folíolos, los cuales generalmente son peciolados, lobulados y con borde dentado, y recubiertos de pelos glandulares. La inflorescencia está constituida de 4 a 12 flores; el fruto es una baya de forma globular, ovoide o aplastada cuyo peso oscila, según variedades, entre 5 y 500 g. La planta se desarrolla en un amplio rango de latitudes, tipos de suelos, temperaturas y métodos de cultivo, y es moderadamente tolerante a la salinidad.

#### 1.1.5 Recursos fitogenéticos

Durante la domesticación y el proceso de mejora del tomate cultivado se produjo una disminución severa de la variación genética (Rick y Fobes, 1975; Rick, 1995). En contraste,

dentro de las especies relacionadas con el tomate cultivado se halla una gran diversidad, reflejo de la amplia gama de entornos donde habitan. Se han desarrollado estudios para facilitar el uso de especies silvestres como material vegetal en programas de mejora; como ejemplo se puede citar la identificación de resistencias a más de 42 enfermedades (Chetelat y col., 1995) y el desarrollo de mapas moleculares de alta resolución (Tanksley y col., 1992).

Por lo tanto, las especies silvestres de tomate constituyen recursos genéticos de gran valor en el desarrollo de nuevas variedades (Rick, 1986). La colección pionera en semillas de especies silvestres relacionadas con el tomate, llevada a cabo por el Dr. Charles M. Rick y su grupo de investigación en Perú, establece el inicio del empleo de este material como importante fuente de variación vegetal en programas de mejora (Chetelat y col., 2009). El Dr. Rick organizó 17 expediciones entre los años 1948 y 1995, incluyendo zonas de Colombia, Ecuador, Perú y Chile. Las investigaciones de Rick describieron gran variación en la reproducción de las distintas especies recolectadas (Rick, 1951).

Actualmente existen distintos bancos de germoplasma que conservan recursos genéticos para la mejora de esta especie. Uno de ellos corresponde al “United States Department of Agriculture” (USDA), en la base de recursos “Tomato Germoplasm Conservation at the Plant Genetic Resources Unit”, de la Universidad de Cornell; esta colección almacena un total de 6556 entradas (USDA, 2012). Otro centro a destacar es el “Tomato Genetic Resources Center” (TGRC), de la Universidad de California (Davis), que conserva 3662 entradas de este género (TGRC, 2012). También cabe mencionar el banco germoplasma del Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV), de la Universidad Politécnica de Valencia, con 4513 entradas de tomate y especies relacionadas (COMAV, 2012).

#### 1.1.6 Especies silvestres y relaciones de cruzabilidad

Las especies silvestres de tomate posibilitan el desarrollo de programas de mejora en este cultivo, ya que aportan la fuente de variación genética necesaria para alcanzar los objetivos planteados. El conocimiento de los hábitats de las entradas disponibles aporta información acerca del valor de las mismas en programas de mejora genética (Rick, 1976). La diversidad de ambientes en los que se desarrollan parientes silvestres del tomate expone la plasticidad de este importante recurso genético y al mismo tiempo sugiere una amplia variabilidad a la adaptación de diversos factores bióticos y abióticos. Es aceptado que la

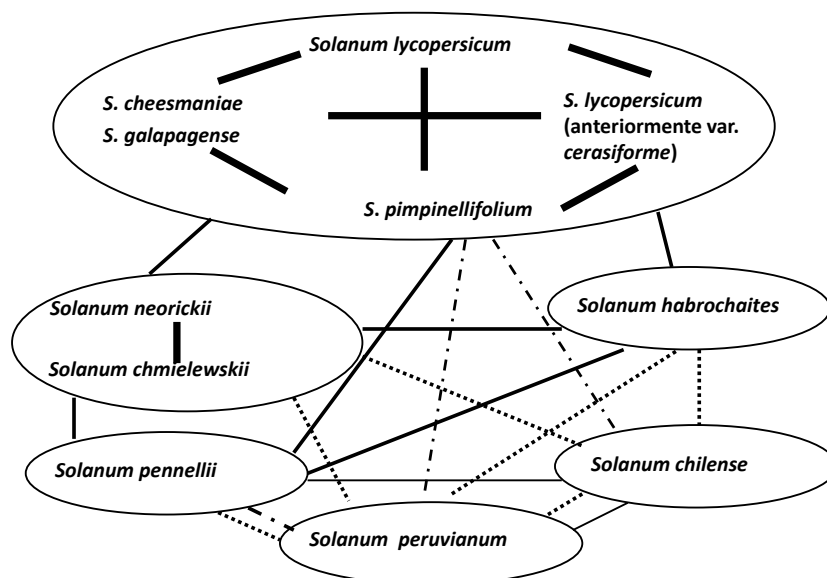
variabilidad biológica de las especies en muchos de los casos está directamente relacionada con la variabilidad geográfica y ambiental en la que se desarrollan estas poblaciones (Hoyt, 1992; Rao y Hodgkinn, 2002). Entre las especies silvestres relacionadas con el tomate se han observado hábitats de crecimiento de 0 a 3.700 m de altitud, así como un intervalo de temperaturas definido entre los 10 y 23°C (Warnock, 1991) (Tabla 4). Las especies silvestres pertenecen, en general, a zonas áridas, con la excepción de los miembros de la sección *Juglandifolium*. *S. juglandifolium* y *S. ochranthum* crecen en bosques nublados o a lo largo de arroyos y carreteras, donde la intensidad de luz es mayor. El hábitat de una entrada proporciona información acerca de su posible utilidad en mejora; como ejemplo, dentro de la especie *S. habrochaites*, entre las entradas que crecen en zonas elevadas y con bajas temperaturas, se han identificado materiales con resistencia al frío y a las heladas (Esquinas-Alcázar y Nuez, 1995).

**Tabla 4: Hábitat de diversas especies silvestres de tomate con interés en programas de mejora. Fuente: Warnock (1991).**

Especies	Elevación (m)	Temperatura (°C)
<i>S. pimpinellifolium</i>	0-1450	18-21
<i>S. cheesmanii</i>	0-1000	22-23
<i>S. habrochaites</i>	200-3700	10-21
<i>S. pennellii</i>	0-2300	18-20
<i>S. chmielewskii</i>	1900-3100	12-18
<i>S. neorickii</i>	1700-2800	13-19
Especies	Elevación (m)	Temperatura (°C)
<i>S. peruvianum</i>	0-3300	11-21
<i>S. chilense</i>	0-2900	12-20

En la zona comprendida entre Chile, Perú y Bolivia existen especies silvestres de tomate de alto valor en mejora genética del cultivo. Un claro ejemplo lo constituyen *S. peruvianum* y *S. chilense*, encontradas en desiertos costeros de Perú y norte de Chile. Estas especies presentan tolerancia a la sequía, frío y diversos patógenos. También cabe destacar a *S. pimpinellifolium* y *S. lycopersicoides*, especies que poseen diversos grados de tolerancia al estrés hídrico, salino y resistencia a patógenos (Warnock, 1991).

Las relaciones de parentesco en el género *Solanum*, clásicamente se han determinado sobre la morfología, citogenética y cruzabilidad. Otros métodos como la estructura de la cubierta seminal o el empleo de marcadores moleculares citoplasmáticos o nucleares, han permitido precisar estas relaciones (Nuez, 2001). El estudio de dichas relaciones proporciona conocimiento acerca de la capacidad de cruce entre las distintas especies del género (Figura 4).



**Figura 4: Diagrama de cruzabilidad del tomate con sus especies silvestres relacionadas. Las barras sólidas conectan líneas entre las que se producen cruces compatibles. Su grosor indica el grado de cruzabilidad. Las barras discontinuas indican cruces que pueden superarse por el cultivo de embriones, y las líneas de puntos indican cruces fallidos. Fuente: Díez y Nuez (2008).**

Las especies autógamas, como *S. neorickii*, *S. cheesmaniae* y *S. galapagense*, tienen rasgos florales que promueven la autopolinización, y consecuentemente bajos niveles de diversidad genética, mientras que las especies alógamas; *S. chilense*, *S. juglandifolium*, *S. ochranthum*, *S. lycopersicoides*, y *S. sitiens* son totalmente autocompatibles, poseen flores grandes y vistosas, y son altamente heterocigotas (Aldana y col., 2007, Chetelat y Wentao., 2009).

*S. lycopersicum* cruza con todas las especies dentro de su sección, sin embargo en muchos casos se requiere rescate de embriones debido a la existencia de barreras postcigóticas (Chen y Adachi, 1996). Los híbridos para cuya obtención suele resultar necesario el empleo del cultivo de embriones son los resultantes del cruce de tomate con *S. chilense* y *S. peruvianum*. A menudo las polinizaciones interespecíficas son solo exitosas en una dirección;



este fenómeno es conocido como incongruencia unilateral o incompatibilidad (UI). En el clado de tomate (Sección *Lycopersicon*), los pistilos de la especie cultivada aceptan el polen de todos los miembros, mientras que los pistilos de las especies silvestres *S. arcanum*, *S. chmielewskii*, *S. habrochaites*, *S. pennellii*, *S. chilense* y *S. peruvianum* rechazan el polen procedente de la especie cultivada (Bedinger y col., 2009).

Los híbridos entre tomate y la sección *Juglandifolia* no se pueden obtener por cruzamiento. En la sección *Lycopersicoides* han sido susceptibles de hibridación *S. lycopersicoides* y, en menor medida, *S. sitiens* (Chetelat y col., 2000; Pertuzé y col., 2003).

Cabe mencionar que mediante hibridación somática se han logrado híbridos con diferentes niveles de ploidía con especies relacionadas con el tomate y otras más lejanas como la patata (Gavrilenko y col., 1992; Kobayashi y col., 1996), si bien para los fines de la mejora estos híbridos aún no han sido útiles.

#### 1.1.7 *Solanum lycopersicoides*

Esta especie está organizada en pequeñas poblaciones muy fragmentadas, cuyo único hábitat natural es el desierto de Atacama, sur de Perú y norte de Chile (Chetelat y Wentao, 2009). Es una especie inusual, cuyo hábitat de crecimiento comprende laderas áridas, rocosas y secas. Crece en alturas aproximadas de 3.700 m, la mayor altura encontrada en cualquier especie relacionada con el tomate; por lo tanto, también resiste temperaturas muy frías (Rick, 1988; Smith y Peralta, 2002; Peralta y col., 2008; Chetelat y Wentao, 2009).

Además de la tolerancia que presenta a estreses abióticos, también es un importante recurso genético como fuente de resistencia a enfermedades que afectan al cultivo del tomate (Rick, 1988; Chetelat y col., 1997). Entre ellas se encuentran las enfermedades causadas por el virus del mosaico del tomate (*Tomato mosaic virus*, ToMV) y el virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV) (Phills y col., 1977a), marchitamiento por *Fusarium* (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*) (Phills y col., 1977b), chancro bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*) (Chetelat y col., 1997), pudrición de la raíz (*Phytophthora parasitica*) y pudrición gris *Botrytis cinerea* (Gradziel y Robinson, 1989). *S. lycopersicoides* tiende además a ser resistente frente al ataque del minador (*Liriomyza trifolii*) y gusanos lepidópteros, estando relacionado este carácter con el elevado contenido de glicoalcaloides en hoja (Oleszek y col., 1986).

*S. lycopersicoides* es una planta arbustiva, pubescente y glandular en todo el follaje, que alcanza una altura comprendida entre 1,5 y 2,5 m (Figura 5A). Presenta tallos leñosos, erectos o tortuosamente ascendentes muy ramificados en la base. Las hojas son asimétricamente imparipinnadas, de 13 a 15 cm de longitud, con numerosos foliolillos intersticiales dentados. La inflorescencia es terminal o subterminal, en racimos laterales cimosos con numerosas flores, las cuales son amarillas y vistosas. Los frutos son en baya de textura pastosa, sin pelos, de 1 a 1,5 cm de diámetro, negruzcos-morado con manchas verdes (Figura 5B). Produce abundantes bayas que se mantienen por varias semanas en la planta aun después de la madurez; cada fruto presenta de 2 a 5 semillas (Zegarra, 2005).

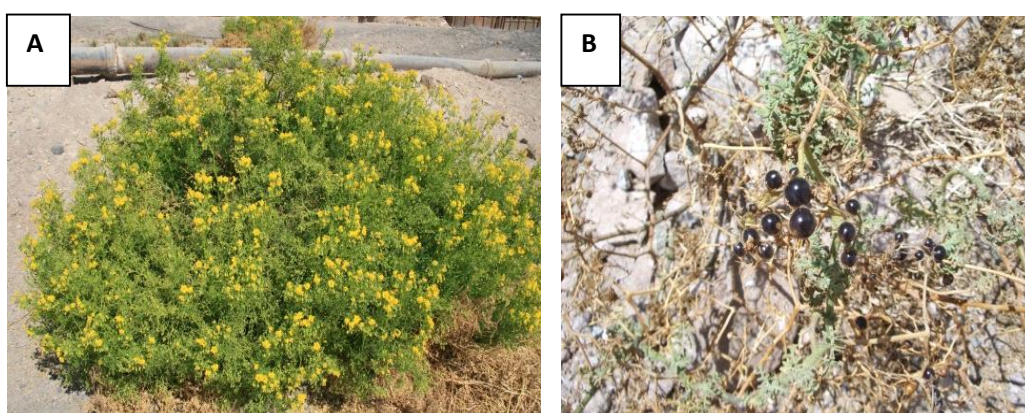


Figura 5: A) Planta de *Solanum lycopersicoides* en su hábitat natural. B) Detalle de los frutos de *Solanum lycopersicoides*. Fuente: Fotos cedidas por la Dra. M.J. Díez.

*S. lycopersicoides* es un diploide con el mismo número de cromosomas que el tomate y la mayoría de las especies de *Solanum*. El genoma de *S. lycopersicoides* es esencialmente colineal con el de tomate, a excepción de una inversión paracéntrica en el brazo largo del cromosoma 10 (Pertuzé y col., 2002).

Los cruces entre *S. lycopersicum* y *S. lycopersicoides* solo tienen éxito cuando la silvestre es utilizada como parental masculino, debido a la incompatibilidad unilateral en la dirección contraria (Chetelat y col., 1997).

Los primeros híbridos entre *S. lycopersicum* y *S. lycopersicoides* fueron obtenidos por Rick (1951), quien concluyó que el desarrollo de dichos híbridos mediante cultivo de embriones presenta mayor facilidad que los resultantes del cruce intraespecífico entre tomate

y *S. peruvianum*. Los híbridos obtenidos, sin embargo, presentaron incompatibilidad unilateral y no pudieron retrocruzarse con tomate (Rick, 1951).

Diversos ensayos posteriores estudiaron la posibilidad de superar estas barreras reproductivas, modificando la técnica de polinización (Gradziel y Robinson, 1989), mediante el uso de especies puente, con el empleo de líneas mejoradas de *S. pennellii* (Chetelat y col., 1989), o a través de hibridación somática, mediante fusión de protoplastos (Handley y col., 1986; Hossain y col., 1994; Levi y col., 1988; Moore y Sink, 1988). Ninguna de estas técnicas generó híbridos lo suficientemente fértiles. Chetelat en 1997 obtuvo un inusual híbrido, mediante rescate y cultivo de embriones inmaduros, que presentó fertilidad masculina (Chetelat y col., 1997). Este material vegetal permitió un retrocruce directo con tomate; a partir del híbrido fértil se desarrolló una colección de líneas de introgresión, con segmentos cromosómicos de *S. lycopersicoides* en el fondo genético del tomate cultivado (Canady y col., 2005).

## 1.2 Mejora Genética del tomate

### 1.2.1 Principales objetivos

Los objetivos que rigen los programas de mejora en tomate están condicionados por las necesidades de los distintos sectores implicados: industria alimentaria, casas de semillas, consumidores y agricultores. No se puede establecer, por tanto, un ideotipo generalista que englobe las necesidades de todos los mercados que afectan al fruto. Sin embargo, puede mencionarse una serie de requisitos que son sumamente importantes en el cultivo de esta planta.

La mejora de resistencia a enfermedades es un objetivo clave en los programas de mejora. Se han identificado una serie de genes que confieren resistencia a algunas de las enfermedades que más afectan al cultivo (Soler y Nuez, 2004) (Tabla 5). El mejorador cuenta actualmente con muchos genes descritos; sin embargo, hay muchas enfermedades, sobre todo virosis, que siguen siendo un factor limitante del cultivo y por ello muchos grupos de investigación continúan buscando fuentes de resistencia.

Tabla 5: Genes de resistencia a patógenos de importancia en el cultivo de tomate. Fuente: Soler y Nuez (2004).

	Patógenos	Gen	
<b>Hongos</b>	<i>Verticillium dahliae</i>	<i>Ve</i>	
	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis lycopersici</i>	<i>I, I-2</i>	
	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis lycopersici</i>	<i>Frl</i>	
	<i>Pyrenochaeta lycopersici</i>	<i>Pyl</i>	
	<i>Alternaria alternata</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	<i>Asc</i>	
	<i>Fulvia fulva</i> = <i>Cladosporium fulvum</i>	<i>Cf (series)</i>	
	<i>Stemphylium</i>	<i>Sm</i>	
	<i>Phytophthora infestans</i>	<i>Ph-2</i>	
	<i>Leveillula taurica</i>	<i>Lv</i>	
	<i>Oidium lycopersicum</i>	<i>oligogenico</i>	
	<b>Bacterias</b>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	<i>Pto</i>
		<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>oligogenico</i>
<b>Virus</b>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	<i>Pto</i>	
	<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>oligogenico</i>	
	<i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV)	<i>Tm- 2<sup>2</sup></i>	
	<i>Tomato spotted wilt</i> virus (TSWV)	<i>Sw- 5</i>	
	<i>Tomato yellow leaf curl</i> virus (TYLCV)	<i>Ty -1</i>	
<b>Nemátodos</b>	<i>Meloidogyne</i> spp.	<i>Mi</i>	

Otro de los objetivos prioritarios es la mejora de la calidad interna. Los programas de mejora, realizados en las últimas décadas, se centraron en aportar mayor uniformidad (aspecto externo) e incrementar el rendimiento, así como aumentar la vida postcosecha; sin embargo, el consumidor actual exige frutos de adecuado valor organoléptico. Por otro lado, la

mejora en componentes nutricionales (vitaminas, carotenoides y compuestos fenólicos) es una tendencia que ha adquirido un importante mercado.

Se han identificado numerosas especies relacionadas como fuente genética de variación, con objeto de alcanzar dichos objetivos. Para incrementar la intensidad de sabor se ha utilizado, por ejemplo, a *S. pimipinellifolium* por su elevado contenido en sólidos solubles (Rodríguez y col., 2008) y *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (Jones, 1999), así como *S. habrochaites* para incrementar la relación sólidos solubles-acidez. Por otro lado, se ha estudiado *S. pennellii* como recurso genético para aumentar el contenido en flavonoles (quercetina) (Rousseaux y col., 2005) y *S. habrochaites* con el fin de incrementar contenido en  $\beta$ -caroteno (Zhang y Stommel, 2000).

El incremento en rendimiento continúa siendo en la actualidad de gran importancia. La mayor parte de las variedades comerciales son híbridos que explotan la heterosis o vigor híbrido que al mismo tiempo representa, para las casas de semillas, una venta segura al agricultor año tras año.

#### 1.2.2 Poblaciones de premejora

La premejora es considerada a menudo como una actividad entre la conservación de germoplasma y su utilización (Cooper y col., 2001). Se puede definir como un proceso de larga duración y coste elevado, donde el germoplasma exótico y variedades locales son adaptados y posteriormente utilizados, junto con materiales de élite para iniciar un programa de mejora con objetivos definidos.

Para ensanchar la base genética de las especies cultivadas, hay que recurrir a las especies silvestres relacionadas. El principal problema es la falta de adaptación de dichos materiales y el esfuerzo que supone su modificación en un recurso fitogenético útil para comenzar un programa de mejora. En muchas ocasiones, se requiere introducir genes concretos y el éxito de la operación se ve comprometido por el arrastre de material genético indeseable. La premejora se basa en la incorporación, en los materiales adaptados, de genes o grupos de genes de interés provenientes de genotipos silvestres. El material resultante, “genéticamente valorizado”, es posteriormente incorporado en los programas de mejora como líneas parentales para el desarrollo de cultivares. Este proceso es una inversión en tiempo y dinero a recuperar a medio y largo plazo, que desde la perspectiva de los mejoradores, se

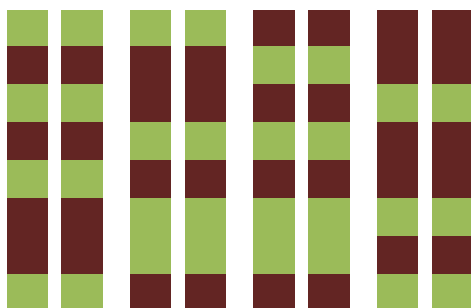
considera ampliamente justificada. La incorporación de los genes procedentes de especies silvestres en el fondo genético de la especie cultivada se ha realizado tradicionalmente desarrollando en primer lugar el híbrido interespecífico y llevando a cabo las generaciones de retrocruzamiento necesarias para recuperar el fondo genético de la especie cultivada. Este proceso requiere mucho tiempo y dinero; desde hace unos años, con objeto de aprovechar el esfuerzo realizado, es frecuente el desarrollo de poblaciones de premejora como alternativa a los programas de retrocruzamiento tradicionales. Inicialmente, fueron las generaciones  $F_2$ ,  $F_3$  y las poblaciones de retrocruzamientos sucesivos las que se emplearon para detectar genes involucrados en la expresión de caracteres de interés. Sin embargo, presentan el inconveniente principal de no ser autoperpetuables, además de un importante desequilibrio de ligamiento. Por lo tanto, en el transcurso de generaciones pueden perderse asociaciones entre genes y caracteres de interés. Con la finalidad de solucionar estos inconvenientes los mejoradores han recurrido al desarrollo de otro tipo de poblaciones de premejora, más útiles.

Se trata fundamentalmente de poblaciones autoperpetuables, por lo tanto el mejorador puede emplearlas cuando sea requerido y sin arrastrar material genético indeseable. Las poblaciones de premejora se desarrollan a partir de un cruce inicial, con un parental donante (especie silvestre) y otro recurrente (genotipo de élite). Se obtienen, por tanto, poblaciones con fondo genético de la especie cultivada y genes introgressados de la especie silvestre. Según el procedimiento empleado en su desarrollo se distinguen distintos tipos de poblaciones. A continuación se detallan algunas de ellas.

#### 1.2.2.1 Líneas recombinantes consanguíneas

Las líneas recombinantes consanguíneas, comúnmente denominadas RILs (*Recombinant Inbred Lines*) se construyen mediante múltiples generaciones de cruzamientos consanguíneos a partir de individuos heterocigóticos, hasta conseguir la homocigosis de la mayor parte de sus *loci* (Bailey, 1971). El desarrollo de estas poblaciones se inicia a partir de un híbrido  $F_1$ , a partir del cual se obtiene una población  $F_2$  y, mediante autofecundaciones sucesivas, se van generando plantas cuya homocigosis aumenta gradualmente hasta obtener RILs (en la práctica, a partir de la octava o novena generación). La población final estará formada por líneas homocigotas para prácticamente todos sus *loci* (Figura 6). La homocigosidad alcanza el 99,6% en la novena generación (Nuez, 2000).

El empleo de las RILs resulta muy eficaz, tanto para el mapeo de marcadores como para la asociación de un carácter a un marcador. Las poblaciones de RILs pueden perpetuarse en el tiempo, por lo que pueden ser utilizadas indefinidamente para el mapeo de nuevos *loci* sobre un mapa de referencia.



**Figura 6: Representación esquemática del genoma de poblaciones RILs. Cada barra representa un cromosoma. Las parejas de cromosomas homólogos representan a una planta de la población e incluyen regiones en diferente color que definen los fragmentos heredados por cada parental.**

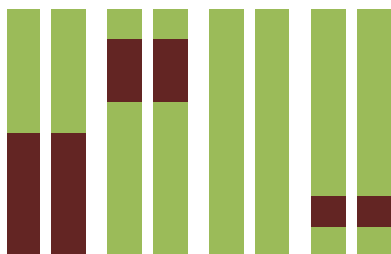
En tomate se han desarrollado RILs derivadas de cruces de la especie cultivada con *S. cheesmaniae* (Paterson y col., 1990) y con *S. pimpinellifolium* (Ashrafi y col., 2009).

#### 1.2.2.2 Retrocruzamientos avanzados

En las poblaciones de retrocruzamiento avanzado el híbrido obtenido es retrocruzado con el parental recurrente, obteniendo la primera generación de retrocruces ( $BC_1$ ) y este proceso continúa las generaciones necesarias hasta obtener el fondo genético deseado.

Tanksley y Nelson (1996) propusieron el análisis de caracteres cuantitativos (*Quantitative Trait Loci*, QTLs) mediante la técnica de retrocruzamientos avanzados. Este método se considera de gran utilidad para el descubrimiento de QTLs valiosos en material donante sin adaptación y su transferencia a líneas puras de élite. El análisis de QTLs no puede realizarse hasta la segunda ( $BC_2$ ) o tercera ( $BC_3$ ) generación de retrocruzamientos. Durante el transcurso de este proceso se ejerce una selección negativa en la descendencia, reduciendo los alelos desfavorables del donante. Los retrocruzamientos avanzados han sido empleados con éxito en tomate para identificar QTLs de importancia agronómica en la especie silvestre *S. habrochaites* (Bernacchi y col., 1998). Fulton y col. (2000) utilizaron esta técnica para estudiar el potencial de *S. neorickii*, encontrando QTLs para 19 caracteres de interés.

Una modalidad de poblaciones de retrocruzamiento avanzado, se constituye por las generaciones de retrocruces avanzados con autofecundaciones (*Backcross Inbred Lines*, BILs). En este caso, se obtiene un híbrido que se retrocruza con el parental recurrente hasta recuperar aproximadamente entre el 75% y el 90% del genoma. Posteriormente se autofecunda para fijar las introgresiones en homocigosis por línea (Figura 7).



**Figura 7: Representación esquemática del genoma de poblaciones BILs. Cada barra representa un cromosoma. Las parejas de cromosomas homólogos representan a una planta de la población e incluyen regiones en diferente color que definen los fragmentos heredados por cada parental.**

Una colección de BILs cubre en su totalidad el genoma del donante con un alto grado de homocigosis (Jeuken y Lindhout, 2004). La primera colección de BILs que se desarrolló en tomate la llevaron a cabo Eshed y Zamir (1994a). Se introgresaron segmentos cromosómicos de *S. pennellii* en un fondo homogéneo de *S. lycopersicum*, representando la totalidad del genoma de la especie silvestre.

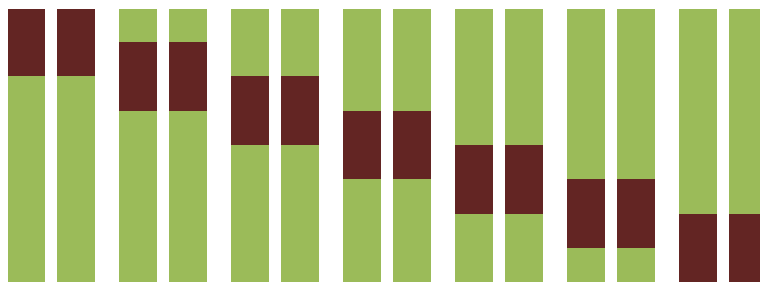
#### 1.2.2.3 Líneas de introgresión (ILs)

Una colección de líneas de introgresión (*Introgression Lines*, ILs) se caracteriza porque cada línea contiene un fragmento cromosómico claramente definido del donante silvestre (Zamir, 2001) y puede ser definida como una librería genómica de introgresiones solapantes del genoma donante sobre el genoma receptor o recurrente (Eshed y Zamir, 1995). Dada la isogenicidad entre líneas con respecto al genoma recurrente, toda la variación genética que se distingue entre ellas puede ser directamente asociada al segmento introgresado. Además, por este motivo se trata de líneas casi isogénicas o NILs (*Near isogenic lines*).

Como las BILs, las ILs se obtienen mediante sucesivos retrocruzamientos entre el individuo híbrido y su parental recurrente hasta obtener individuos con un único segmento cromosómico introgresado. Estos individuos finalmente se autofecundan hasta conseguir la



homocigosis completa del genoma (Figura 8). Debido a que cada línea contiene únicamente una introgresión, la mayor parte de los problemas de fertilidad asociados a poblaciones interespecíficas convencionales (en las que los individuos poseen una gran fracción del genoma una especie generalmente silvestre) son eliminados, de manera que los caracteres de interés agronómico pueden ser evaluados correctamente.



**Figura 8: Representación esquemática del genoma de una colección de ILs. Cada barra representa un cromosoma. Cada par de cromosomas homólogos representa una planta e incluye regiones en diferente color que definen los fragmentos heredados por cada parental.**

Las líneas de introgresión fueron establecidas básicamente por los trabajos de Zamir y sus colaboradores en tomate (Eshed y col., 1992; Eshed y Zamir, 1994b; 1995) con intención de solucionar el arrastre de fragmentos cromosómicos indeseables.

La primera colección de ILs en tomate de Eshed y Zamir (1995) constaba de 50 líneas procedentes de un cruzamiento entre *S. pennellii* y tomate cultivado (cv M82) y permitió la detección de un total de 104 QTLs: 16 para el peso de la planta, 22 para el peso del fruto inmaduro, 18 para la masa del fruto, 23 para el contenido en azúcares, 14 para el contenido en sólidos solubles y 11 para el rendimiento de la planta; una cifra nunca antes alcanzada para un estudio de caracteres cuantitativos en plantas.

Las colecciones de ILs, tras los trabajos descritos, se han desarrollado con éxito empleando otras especies relacionadas, como *S. habrochaites* (Monforte y Tanksley, 2000; Brouwer y St. Clair, 2004) y *S. lycopersicoides* (Canady y col., 2005).

#### 1.2.2.4 Colección de líneas de introgresión de *S. lycopersicoides* en el fondo genético de tomate cultivado.

Del híbrido entre *S. lycopersicum* (VF36) y *S. lycopersicoides* (LA2951), que obtuvieron Chetelat y col. (1997) mediante rescate y cultivo de embriones inmaduros, deriva la colección de ILs de Canady y col. (2005). Para el desarrollo de la colección se utilizó el primer retrocruce ( $BC_1$ ) hacia tomate de este híbrido interespecífico. Treinta y dos plantas seleccionadas de este primer retrocruce se retrocruzaron nuevamente durante una o dos generaciones. Con este material inicial se desarrollaron 272 líneas consanguíneas, que constituyeron el material de partida para la colección de ILs. En el desarrollo de la colección se utilizaron marcadores RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), 10 de tipo morfológico y 19 aloenzimas para la identificación de los fragmentos de *S. lycopersicoides*.

Los criterios de selección de las ILs en este ensayo fueron la preferencia por fragmentos de *S. lycopersicoides* introgresados en homocigosis, así como la presencia de fragmentos únicos frente a introgresiones múltiples. La mayor parte líneas se seleccionaron en la generación  $BC_2F_{2-7}$ . Sin embargo unas pocas líneas se seleccionaron antes ( $BC_1F_{6-7}$ ) o después ( $BC_4F_6$ ).

De las 272 líneas iniciales muchas no eran fértiles o contenían más de un segmento de *S. lycopersicoides*. Se seleccionaron las ILs que representaban los 12 cromosomas de *S. lycopersicoides* con introgresiones solapantes. Se dividieron en dos grupos: el primero conteniendo 56 líneas, con una máxima cobertura del genoma en homocigosis y mínimo número de fragmentos por línea; el segundo constituido por 34 líneas, que contenían recombinantes en ciertas regiones del genoma. El primer grupo permite la búsqueda inicial de caracteres de interés, mientras que el segundo se puede emplear para mejorar la resolución del mapa en algunas regiones, confirmando la localización de QTLs con segmentos solapantes.

Solo el 66% de las ILs primarias y el 32% de las secundarias fueron homocigotas para los segmentos introgresados en cada línea. Las ILs heterocigotas fueron autofecundadas y la progenie de la  $F_2$  genotipada para identificar homocigotos. Sin embargo, se observó que en la segregación se producía una distorsión a favor de alelos de *S. lycopersicum*, de forma que algunas introgresiones, por lo tanto, podrían llegar a perderse en las siguientes generaciones.

Las líneas homocigotas son susceptibles a replicarse, presentando la ventaja de un sencillo mantenimiento por autopolinización. Por otro lado, los heterocigotos permiten recuperar en la progenie los diferentes genotipos, lo que permite realizar estudios de cosegregación entre un QTL y un segmento introgresado.

## 2- OBJETIVOS

El conjunto de líneas de introgresión (ILs) de *Solanum lycopersicoides* en el fondo genético de la especie cultivada resulta de gran interés para la mejora del tomate: constituye una herramienta muy útil para el cartografiado de características de interés y permite la incorporación rápida de estas características en los programas de mejora por encontrarse en el fondo genético de la especie cultivada.

Para el manejo y evaluación de la colección es necesario disponer de marcadores moleculares que permitan determinar o confirmar la presencia de la introgresión en las líneas. La colección de ILs se construyó inicialmente utilizando marcadores RFLPs y marcadores morfológicos. Los investigadores que desarrollaron las ILs transformaron 16 de los marcadores RFLPs en marcadores CAPS. Para un manejo más eficiente de la colección es necesario disponer de un mayor número de marcadores basados en la PCR polimórficos entre *S. lycopersicum* y *S. lycopersicoides*.

En este contexto, los objetivos de este trabajo son:

- Desarrollo de un conjunto de marcadores CAPS polimórficos entre los parentales de la colección de ILS, *Solanum lycopersicum* VF36 y *Solanum lycopersicoides* LA2951, a partir de marcadores descritos como polimórficos entre tomate y otras especies silvestres relacionadas.

- Utilización de parte de los marcadores identificados en este trabajo, así como de otros desarrollados previamente en el grupo de investigación, para determinar el tamaño de la introgresión en líneas proporcionadas como homocigotas por el "Tomato Genetics Resource Center".

- Utilización de parte de los marcadores identificados en este trabajo, así como de otros disponibles previamente, para el genotipado de líneas segregantes, con objeto de seleccionar las portadoras del fragmento de *S. lycopersicoides* para su reproducción.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron dos ensayos en este trabajo. En primer lugar se desarrollaron un conjunto de marcadores polimórficos entre los parentales de *Solanum lycopersicum* y *S. lycopersicoides*, VF36 y LA2951 respectivamente, empleados en la obtención de las líneas de introgresión de Canady y col. (2005). Posteriormente se emplearon estos marcadores y otros previamente descritos para genotipar algunas de las líneas de introgresión pertenecientes a la colección de Canady y col. (2005).

Se describen a continuación los materiales y métodos empleados en cada uno de los ensayos.

#### 3.1 Desarrollo de marcadores polimórficos entre *S. lycopersicum* y *S. lycopersicoides*

##### 3.1.1- Material vegetal

En la búsqueda de marcadores moleculares se partió de tejido vegetal congelado de cuatro plantas de *S. lycopersicum* (VF36), cuatro plantas de *S. lycopersicoides* (LA2951) y cuatro réplicas clonales del híbrido interespecífico entre *S. lycopersicum* y *S. lycopersicoides* (LA4178) obtenido por Chetelat y col. (1997). Todos los materiales fueron proporcionados por el "Tomato Genetics Resource Center" (TGRC); las entradas VF36 y LA2951 en forma de semilla, y el híbrido interespecífico como réplicas clonales del original mantenidas *in vitro*.

La entrada VF36 (LA0490) es un cultivar introducido en 1959 (Figura 9). Deriva de la variedad Pearson, si bien el fruto es de mayor tamaño y presenta una calidad superior. Es una variedad de crecimiento determinado (*gen sp, self pruning*) y portadora de resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y a *Verticillium dahliae*.



**Figura 9: Entrada LA0490. Fuente: TGRC (2012).**

La entrada LA2951 se recolectó en la localidad de Quistagama, provincia de Tarapacá (Chile) en el año 1988. Es alógama y crece a 2.200 m de altitud. Esta entrada presenta resistencia a la enfermedad del moho gris (*Botrytis cinerea*) (Davis y col. 2009). En el TGRC se combina con la entrada LA2954 para producir suficiente semilla.

LA4178 es el híbrido interespecífico entre VF36 y 2951 a partir del cual se desarrolló la colección de líneas de introgresión de Canady y col. (2005).

### 3.1.2 Metodología

En la búsqueda de marcadores polimórficos entre tomate y *S. lycopersicoides* se utilizaron principalmente marcadores de tipo CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*, secuencia polimórfica amplificada y cortada). En la base de datos de *SOL Genomics Network* (SGN, 2012) se obtuvo la información referida a cada cebador: secuencia, cromosoma y temperatura de hibridación aproximada en muchos casos. Prácticamente todos los marcadores proceden de transformar marcadores RFLP en marcadores CAPS. Los restantes provienen de un set de genes ortólogos conservados (*Conserved Ortholog Set*, COS). En concreto, según la denominación en la base de datos del SGN, se trata de marcadores del set COSII: COS correspondientes a secuencias conservadas entre muchas especies de Asteridas, entre ellas muchas solanáceas.

Los marcadores COSII C2-24 y C2-34 son del tipo dCAPS (*derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences*).

En el caso de cebadores en los que no se disponía de información acerca de la temperatura de hibridación para la amplificación, el primer paso fue poner a punto el protocolo de PCR. Siempre se partió de la temperatura de 55°C y se bajo o subió en función de los resultados obtenidos. También se recurrió a modificaciones de la PCR para establecer estas temperaturas, como la PCR *touchdown* y PCR en gradiente, que se explicaran con detalle en el apartado correspondiente.

Para buscar polimorfismo entre *S. lycopersicum* y *S. lycopersicoides* se empleo la batería de 10 endonucleasas de Canady y col. (2005). En algunos casos no fue necesario digerir porque se observó polimorfismo en PCR.

Para los productos de PCR donde ninguna enzima de la batería generó polimorfismo se secuenciaron los fragmentos obtenidos de una planta de VF36 y otra de LA2951 con objeto de identificar fácilmente posibles enzimas que generasen polimorfismo. La secuenciación se encargó al “Servicio de secuenciación” del “Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas” (IBMCP, UPV-CSIC). Los resultados de la secuenciación para ambos parentales fueron visualizados y analizados empleando el programa *Chromas* (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>).

El protocolo establecido para la detección de marcadores polimórficos fue en todos los casos el siguiente: Extracción de ADN del tejido vegetal, cuantificación del ADN extraído, amplificación mediante PCR, electroforesis en gel de agarosa para comprobar que la PCR ha funcionado correctamente, digestión enzimática con la batería de endonucleasas en los casos donde no se observó polimorfismo en PCR, electroforesis en gel de agarosa para visualizar los fragmentos de la digestión.

#### 3.1.2.1 Extracción de ADN

La extracción se realizó a partir de tejido de hoja joven siguiendo el protocolo de Doyle y Doyle (1990) con modificaciones:

- 1) Recoger aproximadamente 75 mg (tres folíolos pequeños) de material vegetal en un tubo de 1,5 ml.

- 2) Introducir los tubos con muestra en nitrógeno líquido (temperatura  $-196^{\circ}\text{C}$ ). Esto posibilita de forma sencilla la rotura del tejido y la congelación del material es rápida, de manera que no se forman cristales de hielo que puedan dañar las células.
- 3) Triturar el material vegetal con un mortero de plástico.
- 4) Añadir 500  $\mu\text{l}$  de tampón CTAB (Anexo I) precalentado ( $65^{\circ}\text{C}$ ). Mezclar el contenido del tubo por agitación e incubar a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos.
- 5) Añadir 450  $\mu\text{l}$  de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). A continuación, agitar la mezcla hasta que se obtiene una emulsión verdosa. Este paso se realiza en campana extractora de gases.
- 6) Centrifugar durante 10 minutos a 15.800 xg.
- 7) Recuperar de la fase acuosa, que contiene el ADN, y transferir a un tubo nuevo (aproximadamente 400  $\mu\text{l}$ ).
- 8) Añadir de 1 volumen de isopropanol frío.
- 9) Mantener durante 5 minutos en hielo.
- 10) Centrifugar durante 10 minutos a 15.800 xg.
- 11) Eliminar el sobrenadante y añadir 100  $\mu\text{l}$  de etanol al 70% para lavar el precipitado.
- 12) Centrifugar durante 2 minutos a 15.800 xg. Eliminar el etanol y dejar secar el precipitado.
- 13) Resuspender el precipitado en 50  $\mu\text{l}$  de tampón TE (Anexo I) al que se ha añadido ARNasa y conservar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.1.2.2. Cuantificación de ADN

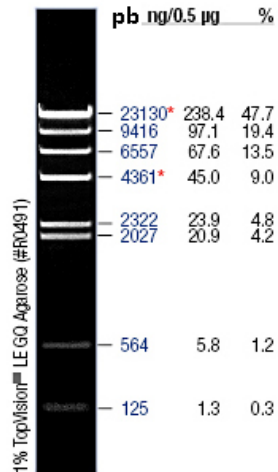
Con objeto de comprobar la integridad del ADN y cuantificarlo, se separó el ADN extraído mediante electroforesis en gel de agarosa.

La muestra que se cargó en un gel de agarosa al 0,8% en tampón TBE (Anexo II), consistió en 1  $\mu\text{l}$  de la extracción, 9  $\mu\text{l}$  de agua y 2  $\mu\text{l}$  de tampón LB 6X (Anexo II). La separación se llevó a cabo con un voltaje de 120 V en una cubeta de electroforesis con tampón TBE 1X.

El marcador empleado para cuantificar la cantidad de ADN de la muestra fue “Lambda DNA/*HindIII*” en todos los casos (Figura 10). En el gel se cargó una mezcla de 0,5  $\mu\text{l}$  de marcador, 9,5  $\mu\text{l}$  de agua milliQ y 2  $\mu\text{l}$  de tampón LB 6X.

La tinción del gel se realizó en una solución de bromuro de etidio a una concentración de 0,5  $\mu\text{g/ml}$ , durante 20 minutos.





0,5 µg/carril, 8 cm de longitud del gel, 1x  
TAE, 7 V/cm, 45 min.

**Figura 10: Marcador “Lambda DNA/HindIII” (Fermentas).**

### 3.1.2.3 PCR

Se realizó una PCR para cada marcador con 4 plantas de cada uno de los parentales (VF36 y LA2951) y del híbrido (LA4178). En cada reacción se añadió un control negativo, donde se sustituyó la muestra por agua; en este control nunca debe producirse amplificación y permite comprobar que no hay contaminación en los reactivos.

La reacción de amplificación se realizó en un volumen total de 25 µl:

- 2,5 µl de buffer 10X con una concentración de 15mM de MgCl<sub>2</sub>
- 1 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM
- 1 µl de cebador directo a 10 µM
- 1 µl de cebador reverso a 10 µM
- 1 µl de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) a 10 mM
- 0,16 µl de *Taq* polimerasa a una concentración de 5 unidades/µl
- 1 µl de ADN molde a una concentración de entre 40 y 100 ng/µl

La mezcla se completó hasta su volumen final de 25 µl con agua purificada y desionizada (agua MilliQ).

Todos los reactivos fueron suministrados por Roche.

El perfil térmico de la reacción fue el siguiente:

- Desnaturalización inicial de 10 minutos a 94°C

-35 ciclos de:

-Desnaturalización a 94°C, 30 segundos

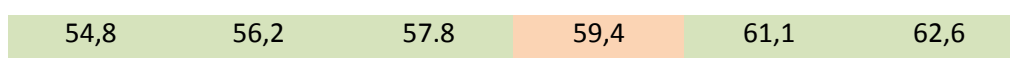
- Hibridación 30 segundos (Las temperaturas empleadas según el cebador se encontraron entre 42°C y 59°C. En la tabla 6 se detallan las temperaturas proporcionadas por SGN)

- Extensión a 72°C, de 30" a 1' 30", según la longitud del fragmento a amplificar (cada 500 pb se adicionan 30")

- Extensión final de 10 minutos a 72°C

En algunos casos se realizaron modificaciones de la PCR estándar. Estas técnicas fueron necesarias cuando ninguna temperatura de las probadas se adaptaba a una amplificación correcta con el cebador empleado. En estos casos los reactivos empleados fueron los mismos y en igual cantidad que los descritos en el protocolo de la PCR.

Por una parte, en ocasiones, para determinar las condiciones térmicas óptimas de la reacción se utilizó la PCR en gradiente. Con esta técnica es posible probar hasta 12 temperaturas de hibridación distintas. Se escogió la temperatura central en función de los resultados obtenidos previamente, y se utilizó un gradiente de  $\pm 6^\circ\text{C}$  con respecto a la temperatura central. En este trabajo se consideró suficiente llevar a cabo 6 reacciones en cada caso y cada una de ellas se realizó a una temperatura distinta en el rango especificado. Se puede citar como ejemplo de aplicación de esta técnica la necesidad de amplificar con una pareja de cebador que a 55°C generan producto de PCR inespecífico. En este caso se probaría la PCR en gradiente con una temperatura central de aproximadamente 59°C; de tal forma que las 6 temperaturas ensayadas comprenderían el intervalo de 54,8-62,6 °C (Figura 11).



**Figura 11: Ejemplo de una PCR en gradiente con 6 temperaturas ensayadas. La temperatura central se representa sobreada en naranja.**

Por otra parte, para obtener una correcta amplificación con ciertos cebadores se utilizó la variante de PCR denominada PCR *touchdown*. Fue en el caso de parejas de cebadores para las que temperaturas de hibridación elevadas impedían obtener producto de PCR, mientras que temperaturas menores daban lugar a amplificaciones inespecíficas. La finalidad de la PCR

*touchdown* es disminuir el fondo inespecífico bajando gradualmente la temperatura de hibridación a lo largo del progreso de la PCR. Como ejemplo para una pareja de cebadores que no generase producto de PCR a 53°C y a 50°C diese lugar a amplificación inespecífica, se hubiese empleado el siguiente perfil térmico: Disminución de 1°C por cada 10 ciclos. Produciéndose la hibridación inicial a un temperatura de 53°C y tras la disminución gradual, la hibridación final a 43°C.

**Tabla 6: Cebadores utilizados en la búsqueda de marcadores polimórficos y la información proporcionada para cada uno de ellos en SGN (2012).**

Cromosoma	Cebador	Secuencia D/R	Tª de hibridación PCR (SGN)
1	CT67	TAGGGTTTACAGGAATAGCCAA	58
		CCAAGCAAGCAAGGGGTTA	
1	CT137	CTCTTGGTGATTCCCTCTACTTGA	58
		TTGTGACTGGATTTGGAAGAA	
1	TG51	GGCTATGAAATCGGTGAGTCAG	58
		TGAAGGCTAATGTAAGACATGAAG	
1	TG59	TCAGCGTTATGTTGCTCCAG	
		TGGAAGTGCTTCACGCTCTA	
1	TG184	TTGTTGGGATAACGAGTCCA	55
		ATTTGTCATGCCCGAGCTTA	
2	CD37	CATCAACATCCATCCATCATT	58
		AGCAACAAGTGCGGATGGGTC	
2	CT24	ACCAGCTAGGATTTTCACTTCAG	58
		ACATCACAGCAACCCAATCCTC	
3	CT115	CAAGCAAAGAAACAGGGTAAAG	58
		CCTGGACGATTCTGCGATTTC	
3	TG74	CATGCTTGAAAAGCAGTGGA	55
		GATTATACGAGGCCTCAAGGA	
3	TG244	GCGATGACTAAGGCCATTCT	55
		ATAAAGCATGCCACCAAAG	
4	C2_At1g78230 (C2-4)	ACTCTGGGATCACTACCAAAGGGTC	55
		AGAGAATTGTAGTTTGCCACAAGCTG	

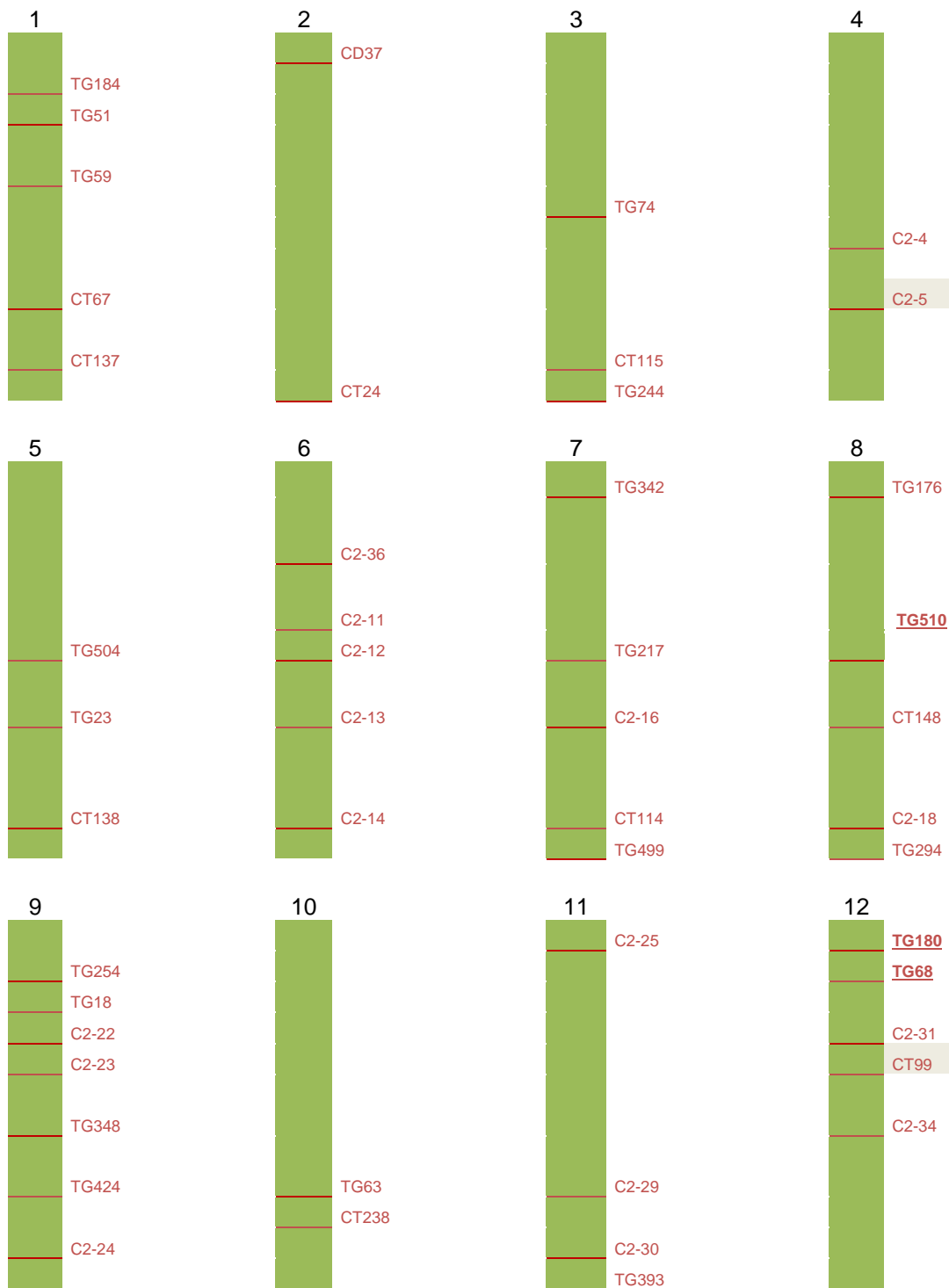
Tabla 6 (continuación).

Cromosoma	Cebador	Secuencia D/R	Tª de hibridación PCR (SGN)
5	CT138	CTCAGGCGTCGGAATCAAAG	58
		CAAGAGCAAACCTGAACCTGAGC	
5	TG23	GGTGGTTCAAATCCTTATTGG	
		AAAGTGTGGGGTAACGCAC	
5	TG504	TAATGTTCTTGACCGAGCTTC	58
		ATGGACTAAAATATGGCCTTAG	
6	C2_At1g21640 (C2-11)	AGAAAAGTCATCCATGGAAACAACAC	55
		TGGCCACAATGACACCATCACCTTG	
6	C2_At1g73885 (C2-12)	TGGTGATGCTTTTGTGATGCCGAAG	55
		TATGTGGCCACAGCAATACCACATGC	
6	C2_At1g12060 (C2-13)	ATCGGTCCCAGTCAGCTCGCC	55
		AGCGTCTCATTACCCGCAAC	
6	C2_At3g51630 (C2-14)	TGGGAAAAGGGGCAATGAAAACAG	
		AATTTGGCGTGCCCAAATCTTTAC	
6	C2_At4g32560 (C2-36)	TAAAGCAAATAGAAGAAAAAATTGAGT	55
		TGCACCTAGATTGGAGTTCAGATTC	
7	CT 114	ATTGAAGAATGGCGGTGAAG	58
		ATGCCAACTTCTTGGCAAAC	
7	TG217	CGTTGCTTCTGATCCTACC	50
		AGCTAGTGATGATCCTGGCG	
7	TG342	ATAACCATTCCACTCCCACTAAAC	
		ATCCATGGGTGTATTAACAATCTG	
7	TG499	ATGTCGAGCTTCCCAAACCTG	
		TCAGGGAAGCAGCAGGTAGT	
7	C2_At1g02180 (C2-16)	TTTCTTCATCTCAGCTTCTGCTGCTA	55
		AGATACCAGCTCATCAGCAGGATT	
8	CT148	AGTCCTCCTTCAGCTCTTCATA	58
		ATTCGGCAAGGCCAGCAGATA	
8	TG176	AGTAATAGCACTGCCCCACA	
		TTCGGCAAGTTTAGCCAAATA	
8	TG294	ATTGGCTGCAATGATGGATT	
		CTAAGCAGGACGGCCATCTA	
8	C2_At1g64550 (C2-18)	AGCTTCAACCAATTTAGGGACTGTT	55
		TTGAGGACAGATCCAGCCATCAAC	
9	C2_At2g38025 (C2-23)	ATGGGCGCTGCATGTTTCGTG	55
		ACACCTTTGTTGAAAGCCATCCC	
9	C2_At1g16590 (C2-24)	ATTCTTCTGTCAATGGACTTCTTCC	58
		TTACATTTATCTTGAAAACAATCTCC	

Tabla 6 (continuación)

Cromosoma	Cebador	Secuencia D/R	Tª de hibridación PCR (SGN)
9	TG18	AAGGGTTGTTGATTCCGTCA	
		GCACCAGGTTTTCCATCTGT	
9	TG254	GACTTCGGGGCAATTATCTG	55
		AAACGAGCACTGCATTCATG	
9	TG348	CTCACACCTGCTCCACAAAA	
		ACATGCATTTTGCATTTGGA	
9	TG424	GAGTTGCTTATCGCTTTAGCC	
		TTTTATGTCAAGTCAAAGGTGTCA	
9	C2_At3g10070 (C2-22)	ATGGCAACAGCCTTACCTTTTCAAC	
		ATTCCCATCCCATGCATTCCTTG	
10	CT238	CGGATAAGGCGTTTCTGTC	58
		CAGACGATGAAAGCACAAAAAACC	
10	TG63	CTCGATCTGCATCAACTGGA	
		ACACTGTTGCCGAGATGTTG	
11	TG393	TGGATTTGATTAGCCGAAGG	
		CCAAGAATCCCAGAAGGAGA	
11	C2_At5g64730 (C2-25)	TGAAGTCCGCGATGTCCATGTCAC	55
		ACATGAACAAAGTTTTGAATTGTCC	
11	C2_At5g25760 (C2-29)	TCCTTATGATGGTGGAGTTTTCCAG	55
		AAAGCAATTATAGCTCGACAAACAG	
11	C2_At5g58490 (C2-30)	TGGTGTTTTTCATCTTGCTTCTCC	50
		ATACAATCAGCTGGCCAATTAGG	
12	C2_At4g26180 (C2-31)	TCTCCCTATGCTGGGCTGAAAT	58
		TAACAAGAGTATCTGCTGTTCTTTCA	
11	C2_At5g04590 (C2-34)	ATCACCACAGTCCTTGACAGGG	58
		AGGACAAAGTGAAAAAGCTGGG	

La figura 12 muestra la localización de los marcadores empleados en este trabajo.



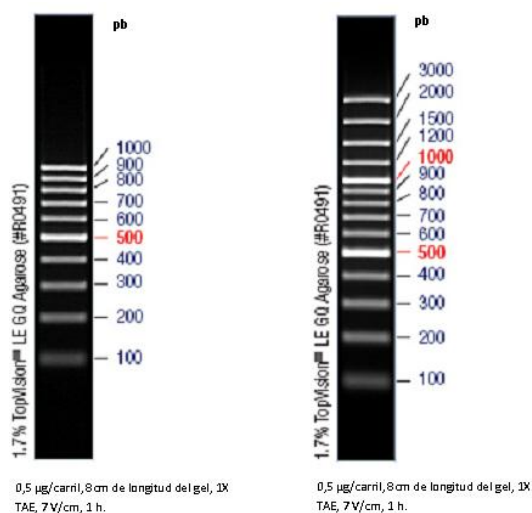
**Figura 12: Localización cromosómica de los marcadores empleados en este trabajo. Subrayados aparecen los marcadores que proceden del estudio de Canady y col. (2005). Sombreados en gris se muestran los marcadores desarrollados por este grupo de investigación (Palomino, 2011).**

### 3.1.2.4 Electroforesis

Se empleo un gel de agarosa de concentración entre el 1 y el 2,5% en tampón TBE 1X para visualizar los productos de PCR.

Se añadieron 5  $\mu$ l del producto de la PCR a una mezcla de 2  $\mu$ l de tampón de carga LB 6X y 5  $\mu$ l de agua milliQ. La separación se llevó a cabo con un voltaje de 120 V en una cubeta de electroforesis con tampón TBE 1X.

Para conocer el tamaño de los fragmentos se emplearon dos marcadores de la casa comercial Fermentas: “GeneRuler 100 bp DNA ladder (0,5 $\mu$ g/ $\mu$ l)” que permite determinar el tamaño de fragmentos de hasta 1000 pb y “GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus (0,5 $\mu$ g/ $\mu$ l)”, que posibilita la determinación del tamaño de fragmentos de hasta 3.000 pb (Figura 13).



**Figura 13: “GenRuler 100 bp DNA ladder” (izquierda) y “GenRuler 100bp DNA ladder plus” (derecha) (Fermentas).**

La tinción se realizó en las mismas condiciones detalladas en el apartado 3.1.2.2.

### 3.1.2.5- Digestión

Una vez confirmado que la amplificación se había producido correctamente, se procedió a la digestión enzimática en busca de polimorfismo. Para ello, se llevó a cabo una reacción conteniendo en cada caso:

- 2  $\mu$ l de tampón 10X para la enzima

- 0,2 µl de la enzima correspondiente a una concentración de 10 unidades/µl
- 7 µl del producto de la PCR

Se enrasó hasta el volumen total de 20 µl con agua milliQ.

La digestión se llevó a cabo para cada producto de amplificación que no reveló polimorfismo a nivel de PCR. La reacción se realizó en un termociclador Eppendorf Mastercycler durante 3 horas, a la temperatura correspondiente según la enzima. Las enzimas empleadas corresponden a la batería de Canady y col. (2005) (Tabla 7).

**Tabla 7: Batería de enzimas utilizadas en este trabajo. Se detalla la secuencia de la diana de restricción y la temperatura de actuación de cada enzima.**

Enzima	Diana	Temperatura	Enzima	Diana	Temperatura
<i>HapII</i>	C/ CG G	37°C	<i>DpnI</i>	GA-CH3 /TC	37°C
	G GC C			CT /A-CH3 G	
<i>HhaI</i>	G CG /C	37°C	<i>DdeI</i>	C / TNA G	37°C
	C/ GC G			G ANT / C	
<i>AluI</i>	AG / CT	37°C	<i>MseI</i>	T/TA A	65°C
	TC / GA			A AT/T	
<i>AfaI</i>	GT / AC	37°C	<i>MboI</i>	GATC	37°C
	CA / TG			CTAG	
<i>HaeIII</i>	GG / CC	37°C	<i>HinfI</i>	G./ ANT C	37°C
	CC / GG			C TNA / G	

La visualización del producto de la digestión se realizó mediante una electroforesis en gel de agarosa, según lo descrito anteriormente (apartados 3.1.2.2 y 3.1.2.4). Se cargaron en el gel 10 µl de digestión y 2 µl de tampón LB 6X en cada caso. El marcador empleado se seleccionó en función del tamaño de los fragmentos de la PCR.



### 3.2- Genotipado de líneas de la colección ILS

#### 3.2.1 Material vegetal

Se genotipó un número variable de plantas pertenecientes a nueve líneas de introgresión de la colección de Canady y col. (2005) (Tabla 8).

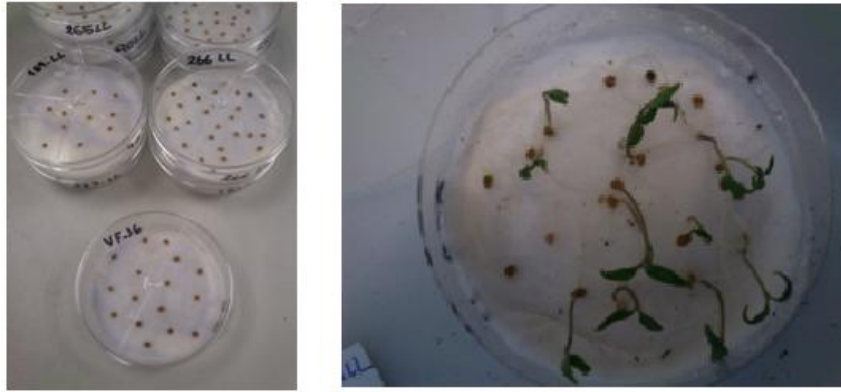
**Tabla 8: Líneas de introgresión genotipadas en este trabajo y número de plantas analizadas para cada una de ellas.**

Línea	Nº plantas
LA4233	9
LA4245	9
LA4246	7
LA4266	13
LA3345	9
LA4270	5
LA4279	4
LA3892	5
LA4282	11

Las semillas de las distintas ILS empleadas fueron proporcionadas inicialmente por el TGRC, si bien algunas de las descendencias ensayadas proceden de reproducciones realizadas posteriormente en el COMAV.

Los fragmentos de *S. lycopersicoides* introgresados en cada una de las líneas de la colección que se analizaron en este trabajo se detallan en la Figura 14.





**Figura 15: Germinación en placa petri de las líneas de introgresión.**

Posteriormente las plantas se trasladaron a macetas de 9 x 7 x 7 cm y se mantuvieron en cámara con luz y temperatura controlada, hasta que alcanzaron el tamaño apropiado para la recogida del tejido vegetal (cuando la planta tenía 2-3 hojas verdaderas) (Figura 16). El tejido así recogido y congelado en nitrógeno líquido fue el que se empleó para el genotipado de las líneas.



**Figura 16: Plantas mantenidas en cámara de cultivo hasta la recogida del tejido vegetal.**

### 3.2.2.2 Protocolo de genotipado

La metodología establecida para el genotipado de las líneas seleccionadas en este estudio fue extracción de ADN de todas las plantas dentro de cada línea, cuantificación del ADN obtenido, amplificación mediante PCR con los marcadores apropiados para cada una de las líneas (Tabla 9) y digestión con la enzima generadora de polimorfismo.

La extracción del ADN se llevó a cabo según lo descrito en el apartado 3.1.2.1. y la cuantificación del mismo según lo descrito en el apartado 3.1.2.2.

Tanto los reactivos empleados en la reacción de PCR como sus cantidades se describen en el 3.1.2.3. Para el genotipado se utilizaron marcadores polimórficos provenientes estudios previos (Canady y col., 2005; Palomino, 2011) y desarrollados en la primera parte de este trabajo (Tabla 9).

**Tabla 9: Marcadores polimórficos empleados en el genotipado e información previa disponible de los que proceden de trabajos anteriores. Los marcadores que no se desarrollaron en la primera parte de este trabajo se muestran sombreados. En verde los pertenecientes al estudio de Canady y col. (2005) y en gris los que proceden del ensayo de Palomino (2011).**

Cromosoma	Marcador	T <sup>a</sup> de hibridación	Tamaño de PCR (pb)	Enzima	Tamaño (pb) <sup>*2</sup>
1	CT137*				
4	C2-4*				
4	C2-5	55	500	<i>AluI</i>	400/300
7	C2-16*				
8	TG510	55	1500	<i>HpaII</i>	1400/1100
9	TG18*				
9	C2-23*				
11	C2-29*				
11	TG393*				
12	TG68	55		<i>MboI</i>	650/500
12	TG180	59		<i>MboI</i>	650/600+500
12	CT99	55	Polimorfismo		1000/900
12	C2-31*				

\* Marcadores polimórficos desarrollados en este trabajo (Véase apartado de resultados 4.1.6). <sup>\*2</sup> La barra separa los alelos de ambos parentales en el orden *S. lycopersicum*/*S. lycopersicoides*.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Desarrollo de marcadores polimórficos entre *S. lycopersicum* y *S. lycopersicoides*

#### 4.1.1 Amplificación

Se emplearon un total de 44 marcadores CAPS. De estos marcadores, 27 provenían de transformar un marcador RFLP en un marcador de PCR y los 17 restantes eran COSII. A su vez, dentro del conjunto de marcadores procedentes de transformar RFLPs se pueden distinguir los marcadores TG, CT y CD. Los denominados TG, han sido derivados de secuencias de clones de ADN genómico de tomate, mientras que los marcadores CT y CD son marcadores desarrollados a partir de clones de ADNc de tomate.

Para 25 de los 44 marcadores probados en este ensayo se obtuvo producto de amplificación para los parentales tomate y *S. lycopersicoides*, así como para el híbrido interespecífico (Tabla 10).

**Tabla 10: Marcadores que amplificaron correctamente y tamaño del fragmento obtenido (pb).**

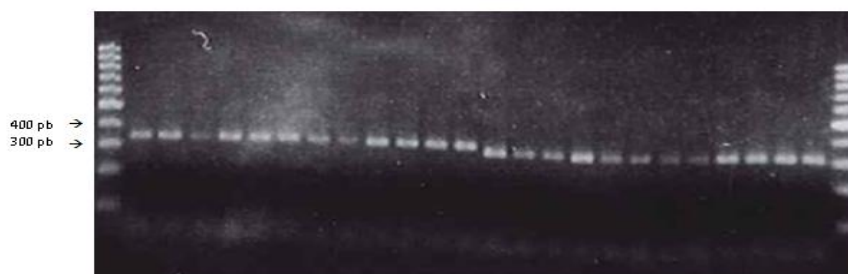
Cromosoma	Cebador	Tamaño obtenido (pb)*
1	CT67	500
1	CT137	1500
1	TG18	500
2	CT24	400
3	CT115	300
3	TG244	300
4	C2-4	500
6	C2-11	450
6	C2-13	400
7	C2-16	1300
7	CT114	1200
8	C2-18	450
8	TG176	350/450
9	C2-22	1300
9	C2-23	1200
9	C2-24	450
9	TG254	1200-500/2000-1200

**Tabla 10 (continuación)**

Cromosoma	Cebador	Tamaño obtenido (pb)*
10	CT238	300
10	TG63	600-700
11	C2-29	1200
11	C2-30	500/1031
11	C2-34	1200
11	CT138	800
11	TG393	700
12	C2-31	350

\* El guión separa el tamaño de fragmentos obtenidos en una misma especie, mientras que la barra separa el tamaño de los alelos obtenidos para las dos especies (se exponen en el orden *S. lycopersicum* y *S. lycopersicoides*).

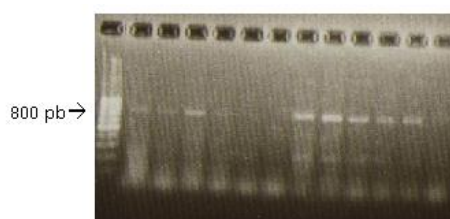
Para 15 de los 25 marcadores (CT67, TG18, CT115, C2-4, C2-13, C2-16, CT114, C2-18, C2-23, C2-24, CT238, C2-29, C2-34, TG393, C2-31) (Figura 17) la amplificación se produjo correctamente con la condiciones establecidas en SGN (2012). Sin embargo, en el caso de los marcadores CT137, CT24, TG244, C2-11, TG176, TG254, C2-30 y CT138 fue necesario modificar las condiciones descritas en la información previa disponible. En todos los casos se probó en primer lugar la temperatura de hibridación aportada por el SGN y no se obtuvo producto de PCR; el siguiente paso fue disminuir la temperatura de hibridación de partida con objeto de identificar una temperatura que permitiese obtener amplificación específica en ambas especies. Este procedimiento fue suficiente para los siguientes marcadores, utilizando la temperatura de hibridación que se indica entre paréntesis en cada caso: C2-11 (53°C), CT137 (53°C), TG244 (53°C), CT24 (50°C), Y TG254 (50°C) (Figura 17).



**Figura 17: Producto de PCR visualizado en gel de agarosa al 2%. En ambos extremos se incluye el marcador “GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus” Las primeras 12 carreras corresponden al marcador C2-31 y las siguientes 12 a TG244**

En el caso de C2-30 y CT138 no se observó una correcta amplificación en el rango de temperatura de hibridación utilizado (50-55°C).

Respecto al marcador CT138 se probó temperaturas de hibridación desde los 55 hasta los 50°C, obteniéndose únicamente amplificación poco eficiente de VF36 a 50°C. Con objeto de conocer las condiciones adecuadas para la amplificación de ambas especies se recurrió a modificaciones de la PCR (apartado 3.1.2.3, materiales y métodos). Se estableció el protocolo de PCR mediante la técnica de PCR en gradiente; optándose por un rango de temperaturas entre los 43 y 50°C. En tomate se observó producto de PCR para las temperaturas de hibridación comprendidas entre 42,8 y 49,1°C; en el caso de *S. lycopersicoides* las temperaturas oscilaron entre los 42,8 y 45,8°C. Se concluyó por tanto que la temperatura adecuada de hibridación para ambas especies oscila entre 43 y 45,8°C y en este trabajo se escogió como óptima la temperatura de 44,2°C (Figura 18).



**Figura 18:** PCR en gradiente para el marcador CT138 visualizada en gel de agarosa al 1,5%. En el extremo izquierdo “100 bp DNA Ladder Plus”. Las primeras 6 muestras corresponden a LA2951 y las siguientes 6 a VF36. Las temperaturas probadas para cada especie son, en este orden, 42,8-44,2-45,8-47,4-49,1-50,6°C.

Por otro lado, en el marcador C2-30 se probaron en primer lugar las temperaturas de hibridación de 55°C y 53°C, obteniéndose producto de PCR únicamente para *S. lycopersicum*; posteriormente se bajó la temperatura a 50°C dando como resultado una amplificación inespecífica. En este caso, las condiciones idóneas se hallaron con el uso de la PCR *touchdown*. Se encontró polimorfismo en PCR para este marcador, estableciéndose un protocolo CAPS con las temperaturas de 53/43°C.

En el caso de los marcadores C2-22 y TG63 no se disponía de información previa proporcionada por el SGN, por lo tanto se comenzó probando la temperatura de hibridación de 55°C en ambos marcadores. Al no obtenerse amplificación se continuó disminuyendo la

temperaturas de hibridación hasta obtener producto de PCR en ambas especies, estableciéndose como idóneas las temperaturas de 50 y 53°C respectivamente.

Cabe mencionar que el producto de PCR obtenido en los marcadores TG63 y C2-34 no fue suficiente para hallar polimorfismo mediante enzimas de restricción. En estos marcadores deberían probarse temperaturas menores de hibridación con objeto de favorecer la amplificación.

De los 25 marcadores, que amplificaron correctamente, 6 son de tipo TG, 7 CT y 12 COSII. El mayor porcentaje de amplificaciones se obtuvo en marcadores de tipo CT/CD seguido de marcadores COSII (Tabla 11). Bai y col. (2004) realizaron un estudio similar con el objetivo de establecer un protocolo CAPS para 33 RFLPs (10 TG, 21 CT y 2 CD) polimórficos entre tomate y distintas especies silvestres. Los RFLPs habían sido previamente desarrollados por Tanksley y col. (1992) y se localizaban en los cromosomas 9, 10, 11 y 12 de tomate. Este grupo de investigación obtuvo producto de PCR para el 100% de marcadores tipo TG y un 79% en marcadores CT o CD. El éxito en el trabajo de Bai y col. (2004) fue, por tanto, muy elevado, principalmente en el caso de los marcadores TG, ya que su estudio incluía el diseño de los cebadores a partir de las secuencias de las sondas RFLPs.

**Tabla 11: Número y porcentaje de marcadores que amplificaron correctamente, en función del tipo de marcador.**

Tipo de marcador	Total probados	Amplifican	No amplifican
TG	18	6 (33,3%)	12 (66,6%)
CD o CT	9	7 (77,7%)	2 (22,2%)
COSII	17	12 (70,5%)	5 (29,5%)

En este trabajo, por el contrario, los cebadores habían sido diseñados previamente por otros investigadores y la secuencia depositada en la base de datos del SGN (2012). Por este motivo, se esperaba un mayor éxito en la amplificación. Sin embargo, en muchos casos el SGN únicamente proporciona información acerca de la secuencia de los cebadores y el tamaño del fragmento amplificado. Es posible que el tamaño de la PCR proporcionado por el SGN sea el predicho a partir de la secuencia de la sonda y que ningún grupo de investigación haya probado a amplificar empleando estos marcadores. Además, los marcadores escogidos para este trabajo proceden de estudios anteriores de este grupo de investigación, correspondiendo



a marcadores para los que no fue posible obtener amplificación en la PCR o identificar enzimas generadoras de polimorfismo entre tomate y *S. lycopersicoides* (Palomino, 2011). Es decir, que se trata de marcadores para los que ya se había comprobado que la amplificación en tomate y *S. lycopersicoides* planteaba dificultades. En este sentido, se puede considerar que el porcentaje de amplificación obtenido en el ensayo resulta satisfactorio.

#### 4.1.2 Fallo en la amplificación

En los casos donde no se obtuvo producto de PCR, las causas fueron diferentes según el marcador empleado. En algunos de ellos no se produjo amplificación en ninguna de las dos especies, en otros únicamente se amplificó *S. lycopersicum*, en algún caso se observó amplificación inespecífica de las dos especies y en ocasiones se observó amplificación a temperaturas de hibridación distintas en cada una de las especies (Tabla 12).

**Tabla 12: Causa del fallo en la amplificación en función del tipo de marcador. Los datos de expresan en número y porcentaje.**

Tipo de marcador	*Causa de la amplificación errónea				Total
	1	2	3	4	
TG	9 (69,2%)	3 (30,8%)			12
CT y CD	1 (50%)			1 (50%)	2
COSII	2 (40%)	2 (40%)	1 (20%)		5
Total	12 (63,2%)	5 (26,3%)	1 (5,3%)	1 (5,3%)	

\*1: No amplifica en ambas especies. 2: No amplifica en una de las especies 3: Inespecífico. 4: Amplifica cada especie a una temperatura diferente.

De los 19 marcadores que presentaron fallo en la amplificación 12 no generaron producto de PCR en ninguna de las dos especies ensayadas: CT148, TG184, TG217, TG342, TG348, TG424, TG51, TG49, TG23, TG294 C2-14 y C2-25. Se probaron para todos ellos diversas temperaturas; comprendidas entre los 50 y 58°C. En los casos donde se disponía de información previa se partió de la temperatura propuesta y posteriormente se probaron otras menores. En estos cebadores se deberá continuar el ensayo combinando los factores de temperatura y concentración de MgCl<sub>2</sub> para disminuir la especificidad de la reacción.

Para 5 parejas de cebadores (TG74, TG499, TG504, C2-12 y C2-36) únicamente se obtuvo amplificación en *S. lycopersicum*. En estos casos se probó disminuir la temperatura, y como

resultado se generaron múltiples bandas en la PCR. Es decir, para temperaturas menores se dieron reacciones inespecíficas y para temperaturas mayores no se obtuvo producto de PCR para *S. lycopersicoides*. En estos casos, la presencia de distintas bandas como consecuencia de disminuir la especificidad de la reacción puede implicar que se esté amplificando más de un *locus*. Estos marcadores no resultan útiles en estas condiciones, ya que la interpretación de los resultados se ve dificultada al no ser posible identificar con seguridad el *locus* de interés. Ninguno de los marcadores empleados en este trabajo había sido diseñado para amplificar en la especie *S. lycopersicoides*. Es posible que la mayor distancia genética existente entre esta especie y las especies para las que se diseñaron estos marcadores sea la causa del fallo en la amplificación; fundamentalmente para los marcadores correspondientes a regiones del genoma que no se expresan y, por tanto, están menos conservadas.

Por otra parte, en el caso del marcador C2-34 únicamente se obtuvo amplificación de tomate y del híbrido interespecífico a las temperaturas de hibridación de 55 y 53°C. Se probó, por lo tanto, 50°C y el resultado fue una reacción inespecífica. En el caso concreto de este marcador el siguiente paso sería probar la PCR touchdown 53/43°C.

El marcador CD37 amplificó pero en diferentes condiciones para cada una de las especies. Se obtuvo producto de PCR para tomate a una temperatura de hibridación de 55°C, generando un fragmento de 1500 pb. Por otro lado, en *S. lycopersicoides* se amplificó correctamente a una temperatura de 50°C y el tamaño obtenido fue de 400 pb. En estas condiciones no es posible emplear este marcador. Sería de interés conocer las condiciones idóneas de amplificación para ambas especies, de forma que se confirme el polimorfismo en PCR obtenido. Además, tendría que comprobarse que, para las condiciones identificadas, la amplificación en el heterocigoto se produce correctamente, es decir, que no se amplifique preferentemente uno de los alelos. El problema de amplificación preferencial de uno de los alelos fue descrito por Konieczky y Ausubel (1993) al proponer los marcadores CAPS como método de transformación de los RFLPs en marcadores de PCR. La inclusión en el ensayo de plantas heterocigotas para los alelos de las dos especies entre las que se pretende identificar polimorfismo ha sido la estrategia empleada en este trabajo para detectar este problema.

Respecto al porcentaje de error en función del tipo de marcador, los marcadores TG fueron los que plantearon mayores problemas en la amplificación. En este trabajo se probaron un total de 18 marcadores de tipo TG y el 66,6% no presentó producto de PCR; en un 69,2% de los casos la causa del fallo fue una amplificación nula en las dos especies. En lo referente a

marcadores COSII, fueron 17 los ensayados en este trabajo y mostraron una tasa de fallo del 29,5%. El mayor porcentaje de éxito en la PCR se obtuvo para los marcadores CT/CD, ya que únicamente en 2 de 9 probados no se obtuvo amplificación. Los marcadores CT/CD han sido diseñados a partir de ANDc y por tanto, cuando se amplifica el ADN genómico, es frecuente la presencia de intrones. En este sentido, se hubiese esperado un mayor porcentaje de fallo en la amplificación, debido al incremento del tamaño del fragmento a amplificar como consecuencia de la presencia de intrones. (Bai y col., 2004). En el estudio realizado por Bai y col. (2004) todos los marcadores para los que no se obtuvo amplificación derivaban de ADNc.

Entre las posibles causas de fallo en la amplificación se puede citar la presencia del triplete AGG en la secuencia del cebador (Bai y col., 2004), dado que este triplete puede corresponder a un sitio de unión de dos exones adyacentes en el lugar donde se ha eliminado un intrón (Long y col., 1998). En este trabajo los marcadores con triplete AGG representan un 54,3% del total. Prácticamente el doble de los fallos en amplificación se corresponden a marcadores que contienen dicho triplete (42,3% frente al 25%) (Tabla 13) Estos resultados podrían respaldar la hipótesis planteada por Bai y col. (2004), si bien los resultados obtenidos en su trabajo no permitieron concluir que, para los marcadores desarrollados, la presencia del triplete AGG estuviese relacionada con una mayor tasa de fallo.

**Tabla 13: Número y porcentaje de éxito obtenido en la amplificación en función de la presencia del triplete AGG en uno o ambos cebadores.**

	Amplifican	No amplifican	Total
Con AGG	15 (57,7%)	10 (42,3%)	25 (54,3%)
Sin AGG	15 (75%)	4 (25%)	19 (45,7%)

#### 4.1.3 Tamaño del producto de PCR

En este trabajo se obtuvo producto de PCR en 25 marcadores. Previo al desarrollo de marcadores polimórficos se disponía de información, aportada por SGN, para 14 de estos marcadores. Se conocía el tamaño de PCR esperado para distintas entradas relacionadas con tomate y la especie cultivada: *S. lycopersicum* TA209 y LA925, *S. pennellii* TA56 y LA716 y *S. pimpinellifolium* LA1589 (Tabla 14).

Tabla 14: Tamaño del producto de PCR para distintas entradas proporcionado por SGN (2012) y tamaño del producto de PCR obtenido en este ensayo. Los resultados para los que no coincide el resultado obtenido con el esperado se muestran sombreados en gris. Los marcadores con tamaños obtenidos y esperados similares, para los que la diferencia puede deberse a discrepancias en el método de determinación del tamaño, se muestran sombreados en verde.

		Información previa de SGN (2012)		
Cromosoma	Marcador	Especie	Tamaño(pb)	Tamaño obtenido (pb)
3	TG-244	<i>S.lycopersicum</i> LA925	450	300
		<i>S.pennellii</i> LA716	450	
4	C2-4	<i>S.lycopersicum</i> TA209	1550	500
		<i>S.pennellii</i> TA56	1450	
		<i>S.pennellii</i> LA716	450	
		<i>S.pimpinellifolium</i> LA1589	450	
6	C2-11	<i>S.lycopersicum</i> TA209	450	450
		<i>S.pennellii</i> TA56	450	
6	C2-13	<i>S.lycopersicum</i> TA209	650	450
		<i>S.pennellii</i> TA56	650	
7	C2-16	<i>S. lycopersicum</i> TA209	275	1500
		<i>S.pennellii</i> TA56	275	
7	CT-114	<i>S.lycopersicum</i> LA925	1125	1031
		<i>S.pennellii</i> LA716	1125	
8	C2-18	<i>S.lycopersicum</i> TA209	1200	450
		<i>S.pennellii</i> TA56	1200	
9	C2-23	<i>S.lycopersicum</i> TA209	1150	1200
		<i>S.pennellii</i> LA716	1150	
		<i>S.pimpinellifolium</i> LA1589	1150	
9	TG-254	<i>S.lycopersicum</i> LA925	1700	1200-500/2000-1200
		<i>S.pennellii</i> LA716	1700	
11	C2-29	<i>S.lycopersicum</i> TA209	350	1200
		<i>S.lycopersicum</i> LA925	1300	
		<i>S.pennellii</i> TA56	350	
		<i>S.pennellii</i> LA716	1200	
		<i>S.pimpinellifolium</i> LA1589	1300	
11	TG-393	<i>S.lycopersicum</i> LA925	750	700
		<i>S.pennellii</i> LA716	750	
11	C2-34	<i>S. lycopersicum</i> TA209	1200	1200
		<i>S. pennellii</i> TA56	1100	

Tabla 14 (continuación).

Información previa de SGN (2012)				
Cromosoma	Marcador	Especie	Tamaño(pb)	Tamaño obtenido (pb)
11	C2-30	<i>Solanum lycopersicum</i> TA209	850	500/900
		<i>Solanum pennellii</i> TA56	850	
12	C2-31	<i>S.lycopersicum</i> TA209	1000	350
		<i>S.pennellii</i> TA56	1000	

\*El guión separa el tamaño de fragmentos obtenidos en una misma especie, mientras que la barra separa el tamaño de los alelos obtenidos para las dos especies (se exponen en el orden *S. lycopersicum* y *S. lycopersicoides*).

Un total de 7 marcadores, de los 14 disponibles con información previa, concuerdan en el tamaño de PCR esperado para *S. lycopersicum* con al menos uno de los ensayos previos descritos. Para 5 de estos 7 marcadores (sombreados en verde en la tabla 14) se consideró que el resultado obtenido coincidía con el esperado debido a que la diferencia en tamaño fue muy pequeña, no superando en algunos casos los 50 pb (Tabla 14). Esta desigualdad pudo deberse a discrepancias por el método escogido para el análisis de los fragmentos. En este trabajo se empleo electroforesis en gel de agarosa en todos los casos, determinando el tamaño del fragmento por comparación con un marcador de tamaños conocidos. Es posible que la información proporcionada por el SGN fuese generada empleando otras técnicas tales como secuenciación o electroforesis capilar. En cualquier caso, también el método de electroforesis en gel de agarosa puede proporcionar resultados ligeramente diferentes debido a la interpretación del investigador.

Para 7 de los 14 marcadores (sombreados en gris en la Tabla 14) no se observó concordancia entre los resultados esperados y obtenidos. La diferencia mínima encontrada entre los tamaños de los fragmentos de *S. lycopersicum* fue de 150 pb. De hecho, incluso en la información previa disponible había resultados de tamaños distintos para la misma especie (Tabla 14). Como ejemplo, para el marcador C2-29 donde el tamaño en *S. lycopersicum* es de 350 pb para la entrada TA209 y de 1300 pb para LA925. Así mismo, no pudo encontrarse una tendencia común, en cuanto a si el tamaño era mayor o menor de lo esperado, en las discrepancias obtenidas en el tamaño de los fragmentos.

El porcentaje de coincidencias entre los resultados obtenidos y los esperados es del 50%. En el estudio de Bai y col. (2004) únicamente en el 21,5% de los marcadores para los que

se obtuvo amplificación no coincidían los tamaños de PCR obtenidos con los previamente descritos. En su ensayo se obtuvo amplificación correcta en 28 marcadores para las especies estudiadas: *S. lycopersicum* cv. Moneymaker, *S. neorickii* G1.1601, *S. cheesmaniae* G1. 1615, *S. habrochaites* LA1777, *S. pennellii* LA716., *S. peruvianum* LA2172 y *S. chilense* G1. 1556. En el trabajo de Bai todas las discrepancias que se observaron (un total de 6) entre el tamaño esperado por el SGN y el obtenido tras la amplificación de PCR pertenecen a marcadores de tipo CT. Bai y col. atribuyeron las diferencias obtenidas a la posible presencia de intrones en el ADN genómico. Un 32% de las parejas de cebadores con fallo amplificaron fragmentos de ADN con una longitud de hasta 1500 pb mayor a la predicha.

#### 4.1.4 Búsqueda de polimorfismo

##### 4.1.4.1 Polimorfismo en PCR

De los 25 marcadores que amplificaron correctamente, 3 de ellos presentaron polimorfismo en PCR (Tabla 15), lo que supone el 12 % de los marcadores con producto de PCR.

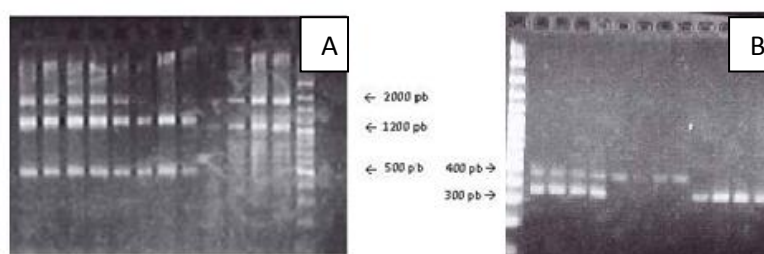
**Tabla 15: Marcadores con polimorfismo en PCR. Se expone el tamaño (pb) de los fragmentos resultantes de la amplificación en *S. lycopersicum* y *S. lycopersicoides*.**

Cromosoma	Marcador	<i>S. lycopersicum</i>	<i>S. lycopersicoides</i>
8	TG176	350	450
9	TG254	1200-500	2000-1200
11	C2-30	1031	500

El porcentaje de polimorfismo en PCR fue mayor al que obtuvieron Bai y col. (2004). El ensayo llevado a cabo por estos autores tenía como finalidad desarrollar marcadores tipo CAPS entre tomate y 6 especies silvestres relacionadas (*S. neorickii*, *S. cheesmaniae*, *S. habrochaites*, *S. pennellii*, *S. peruvianum* y *S. chilense*). Sólo 1 de 29 marcadores empleados (3,45%) presentó polimorfismo en el tamaño del fragmento amplificado. En el presente trabajo el porcentaje que se obtuvo fue mayor, posiblemente porque *S. lycopersicoides* es una especie genéticamente alejada del tomate cultivado, mientras que las 6 especies silvestres empleadas en el estudio de Bai y col. (2004) pertenecen a la sección *Lycopersicon*.

Otro estudio similar, fue el de Konieczky y Ausubel (1993); el objetivo de este ensayo era convertir 18 marcadores RFLPs, de la especie *Arabidopsis thaliana*, en CAPS. Estos autores obtuvieron polimorfismo en PCR en el 5,5% de los marcadores probados, similar al 3,45% descrito por Bai y col. (2004).

En general, se espera que los fragmentos que contienen intrones se conserven menos entre especies distintas. Esto puede facilitar la detección de polimorfismo y por tanto, su uso puede ser recomendable (Konieczky y Ausubel 1993). Sin embargo, la presencia de estas regiones que no se expresan incrementa el tamaño del fragmento y puede dificultar la amplificación (Bai y col., 2004). Los marcadores de tipo TG se diseñaron a partir de ADN genómico y no tienen por qué corresponder a secuencias que se expresan. En este trabajo el 66,3% de las PCR con polimorfismo corresponden a este tipo de marcadores (Figura 19).



**Figura 19: Visualización en gel de agarosa del producto de PCR para los marcadores TG254 (A) y TG176 (B). En ambas imágenes las primeras 4 muestras del gel corresponden al híbrido interespecífico, las siguientes 4 a LA2951 y las últimas 4 a VF36. El marcador empleado en ambas imágenes es "GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus"**

#### 4.1.4.2 Polimorfismo por enzima de restricción

Para los 22 marcadores restantes no se observó polimorfismo en PCR, por lo que se procedió a la búsqueda de polimorfismo mediante el empleo de enzimas de restricción.

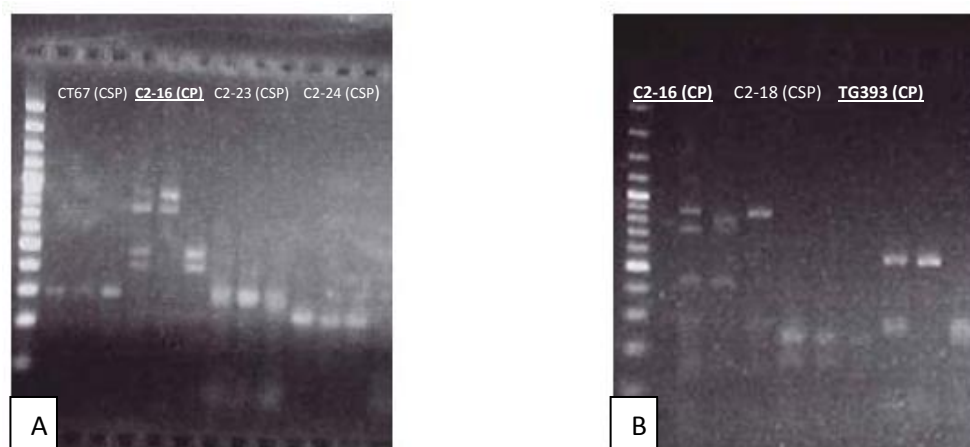
En los marcadores C2-13, C2-24, CT114 y CT67 se utilizaron todas las enzimas de la colección y ninguna generó polimorfismo (Tabla 16). El siguiente paso fue secuenciar los fragmentos amplificados en ambas especies, con objeto de identificar una endonucleasa que proporcione polimorfismo (apartado 4.1.4.3). Para 11 de los marcadores (CT137, TG18, C2-4, C2-11, C2-16, C2-18, C2-23, C2-29, TG393, C2-24 y C2-31) se obtuvo polimorfismo entre ambas especies con al menos una de las enzimas ensayadas (Tabla 16).

**Tabla 16: Enzimas que cortan proporcionando polimorfismo entre VF36 y LA2951, que cortan sin generar polimorfismo y que no producen corte para cada uno de los marcadores. Porcentaje de corte polimórfico por marcador. Los marcadores para los que se han probado todas las enzimas de la batería y no se ha hallado polimorfismo están sombreados en gris.**

Marcador	No cortan	Cortan		% de polimorfismo
		Con polimorfismo	Sin Polimorfismo	
CT67	<i>HapII, Ddel, HhaI, DpnI, HaeIII</i>		<i>HinfI, AfaI, AluI, MboI, MseI</i>	0
CT137	<i>HapII, DpnI</i>	<i>HaeIII, MboI</i>	<i>HinfI, AluI</i>	33,3
TG18	<i>HapII, HaeIII, HinfI, AfaI, DpnI</i>	<i>MboI</i>	<i>Ddel, MseI</i>	12,5
CT115	<i>HaeIII, Ddel, AfaI, HhaI, DpnI</i>		<i>MboI, HapII</i>	0
TG244	<i>HapII, HaeIII, Ddel, HinfI, AfaI, DpnI, MboI</i>			0
C2-4	<i>HaeIII, Ddel, HinfI, AfaI, HhaI, DpnI, MseI, MboI</i>	<i>AluI</i>	<i>HapII</i>	10
C2-11	<i>HapII, HaeIII, Ddel, HinfI, HhaI, AluI, DpnI, MboI</i>	<i>AfaI</i>	<i>MseI</i>	10
C2-13	<i>AfaI, Ddel, DpnI</i>		<i>HapII, HaeIII, HinfI, HhaI, AluI, MseI, MboI</i>	0
C2-16	<i>HapII, HhaI, DpnI</i>	<i>AfaI, MboI, MseI</i>	<i>AluI, HinfI, Ddel</i>	33,3
CT114	<i>HhaI, HapII, DpnI, HaeIII</i>		<i>Ddel, AfaI, AluI, MseI, MboI, HinfI</i>	0
C2-18	<i>HapII, HaeIII, HhaI, Ddel</i>	<i>AluI</i>	<i>AfaI</i>	16,7
C2-23	<i>HapII, HaeIII, HinfI, HhaI, AluI, DpnI</i>	<i>MboI</i>	<i>Ddel, AfaI, MseI</i>	10,0
C2-24	<i>HapII, HaeIII, HinfI, AfaI, HhaI, AluI, DpnI</i>	<i>NlaIII</i>	<i>Ddel, MboI, MseI</i>	10
C2-22	<i>HhaI</i>		<i>AluI, MseI</i>	0
CT238	<i>HapII, HinfI, AfaI, HhaI, MseI</i>		<i>HaeIII, AluI, DpnI, MboI</i>	0
C2-29	<i>HaeIII, Ddel, HinfI, AfaI, MboI</i>	<i>AluI, MseI</i>	<i>HapII, HhaI, DpnI</i>	20
CT138	<i>AluI, HhaI</i>		<i>AfaI, MboI</i>	0
TG393	<i>Ddel, HhaI, DpnI</i>	<i>MboI, AfaI</i>	<i>HapII, HaeIII, HinfI, AluI</i>	22,2
C2-31	<i>HapII, Ddel, HhaI, DpnI</i>	<i>AfaI</i>		20

Para cuatro de los marcadores (CT137, C2-29, TG393 y C2-16) se halló polimorfismo con más de una enzima (Figura 20). El porcentaje de polimorfismo obtenido osciló entre el 10 y 33,3%. Este resultado es comparable con el estudio de Canady y col. (2005), siendo lo más frecuente que sean entre una y tres las enzimas que otorgan polimorfismo.





**Figura 20:** Visualización en gel de agarosa al 2% de varios productos de digestión obtenidos para distintos marcadores con las enzimas *MseI* (A) y *AfaI* (B). Para cada marcador se muestra el resultado de tres muestras del híbrido interespecífico, tres de LA2951 y tres de VF36, en este orden. Se utilizó en ambos casos el marcador “GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus” (extremo izquierdo).CP: corte polimórfico; CSP: corte sin polimorfismo.

La batería enzimática que se empleó en este trabajo para la búsqueda de polimorfismo consiste en 10 enzimas de restricción y es la misma que utilizaron Canady y col. (2005). Se probaron todas las enzimas en prácticamente la totalidad de marcadores objeto de estudio; a excepción de 6 de ellos, donde aún deben de ensayarse algunas endonucleasas de la colección.

Las endonucleasas que proporcionaron corte con polimorfismo en los marcadores ensayados fueron *Mbol*, *AfaI*, *AluI*, *MseI* y *HaeIII* (Tabla 17). *Mbol* es la que presentó mayor porcentaje de éxito (33,3%). Todas las enzimas de la colección han proporcionado corte en algún marcador, aunque en la mayor parte de los casos sin revelar polimorfismo entre VF36 y LA2951.

**Tabla 17:** Enzimas de la colección de Canady y col. (2005) en orden según el porcentaje de corte polimórfico.

Enzima	<i>Mbol</i>	<i>AfaI</i>	<i>AluI</i>	<i>MseI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>DdeI</i>	<i>HinfI</i>	<i>HapII</i>	<i>HhaI</i>	<i>DpnI</i>
No corta	3	8	4	2	10	10	8	11	12	12
Corta con polimorfismo	5	4	3	2	1	0	0	0	0	0
Corta sin polimorfismo	7	6	8	6	3	5	6	4	1	2
Total	15	18	15	10	14	15	14	15	13	14
% de corte	33,3	22,2	20,0	20,0	7,1	0	0	0	0	0

El Kit-CAPS desarrollado por Bai y col. (2004) para tomate y 6 especies silvestres relacionadas está conformado por 23 endonucleasas. Con anterioridad a este estudio, Brugmans y col. (2003) emplearon estas enzimas para transformar marcadores AFLPs en CAPS. En el presente ensayo coinciden 6 de estas enzimas de restricción (*Hinfl*, *Ddel*, *DpnI*, *HaeIII*, *HhaI* y *AluI*), utilizadas en la búsqueda de marcadores polimórficos entre tomate y *S. lycopersicoides*.

Se ha descrito que las enzimas con una secuencia de corte de 4 ó 5 nucleótidos generan polimorfismo de forma más efectiva que las enzimas de restricción con un mayor número de nucleótidos selectivos (Bai y col., 2004). Estos resultados coinciden con los resultados de este trabajo, donde las enzimas seleccionadas para el desarrollo de marcadores polimórficos se definen, todas ellas, por 4 nucleótidos selectivos de corte (Tabla 18).

**Tabla 18: Lista de enzimas de restricción que se emplean en los protocolos CAPS desarrollados en este trabajo.**

Enzima	Secuencia de corte
<i>Mbol</i>	GATC
<i>HaeIII</i>	GG / CC
<i>AfaI</i>	GT / AC
<i>AluI</i>	AG / CT
<i>MseI</i>	T/TA A

En trabajos futuros deben ensayarse las enzimas que quedan por probar en algunos marcadores y secuenciar los fragmentos de la amplificación de los marcadores para los que no se identifique ninguna enzima de la colección que genere polimorfismo.

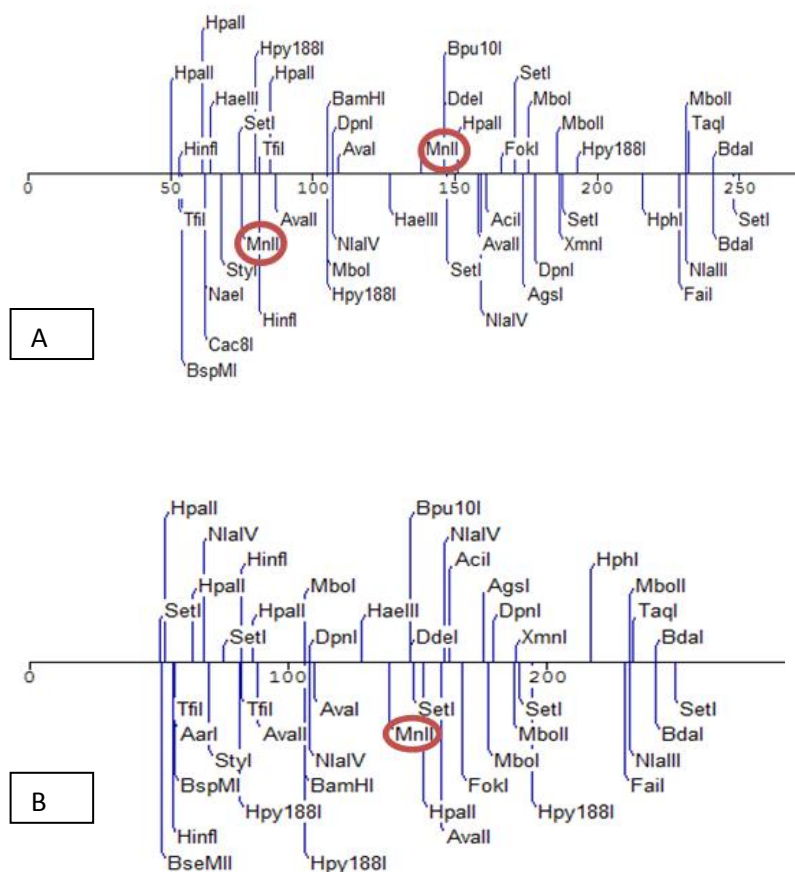
#### 4.1.4.3 Secuenciación del producto de PCR

Para los marcadores C2-13, C2-24, CT67 y CT114 se probaron las 10 enzimas de la batería empleadas en este trabajo y no se halló corte polimórfico con ninguna de ellas. Las PCR de los marcadores C2-13, C2-24 y CT67 correspondientes a LA2951 y VF36 se enviaron a secuenciar con la finalidad identificar posibles endonucleasas que proporcionen polimorfismo. Para el marcador CT114 no se disponía de suficiente producto de PCR por lo que no fue posible mandarlo a secuenciar.

Para el marcador CT67, se envió a secuenciar el producto amplificado, pero la secuencia obtenida no tuvo suficiente calidad como para poder obtener conclusiones a partir de ella. Sería necesario volver a realizar la PCR con este marcador para ambas especies y ajustar bien la cantidad de producto de PCR que se lleva a secuenciar.

Las secuencias obtenidas del producto de PCR de C2-13 y C2-24 tuvieron buena claridad en una región de al menos 250 pb tanto para VF36 como para LA2951. Se analizaron los mapas de restricción para las dos especies para ambos marcadores.

En el caso de C2-13, entre las posibles endonucleasas generadoras de polimorfismo, se optó por *MnII*, con dos puntos de corte en *S. lycopersicoides* (Figura 21A) y sólo uno para *S. lycopersicum* (Figura 21B). Tras la digestión con *MnII* no pudo comprobarse el polimorfismo esperado; obteniéndose fragmentos de 200 y 110 pb para ambas especies. Estos resultados pueden explicarse, en primer lugar, por el hecho de que la secuencia no presentó buena calidad en los primeros 88 nucleótidos en la especie *S. lycopersicoides* y 91 nucleótidos para el caso de tomate, donde se sitúa el punto de corte que debía generar polimorfismo. Por otra parte, lo mismo sucedió en la región final de la secuencia, por lo que es posible que en esta zona exista otro punto de corte que explique estos resultados.



**Figura 21: Mapa de restricción de la secuencia obtenida para el marcador C2-13 en la especie *S. lycopersicoides* LA2951 (A) y *S. lycopersicum* VF36 (B).**

En lo referente a C2-24 se observó que la enzima *NlaIII* proporcionaba fragmentos de diferente tamaño en las dos especies. *S. lycopersicoides* presentaba un solo punto de corte para este enzima, mientras que para VF36 se identificaron dos puntos de corte en la región para la que se obtuvo buena calidad de secuencia. Los tamaños esperados (teniendo en cuenta que el tamaño total del producto de amplificación fue de 450 pb) eran aproximadamente de 300 y 150 pb para *S. lycopersicoides* (Figura 22A) y 175, 125 y 150 pb en el caso de tomate (Figura 22B).

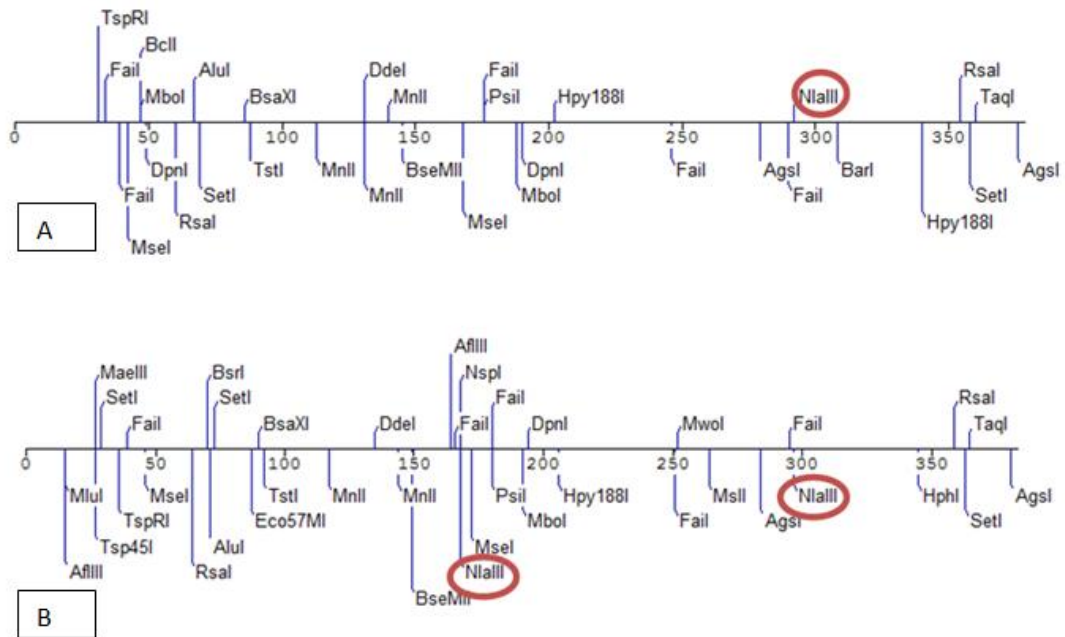


Figura 22: Mapa de restricción de la secuencia obtenida para el marcador C2-24 en la especie *S. lycopersicoides* LA2951 (A) y *S. lycopersicum* VF36 (B).

Se procedió a comprobar estos resultados para el marcador C2-24 con la digestión enzimática. La digestión reveló corte polimórfico entre VF36 y LA2951 y los fragmentos generados corresponden a 200 y 120 pb para tomate y 350 pb y 100 pb en el caso de *S. lycopersicoides* (Figura 23).

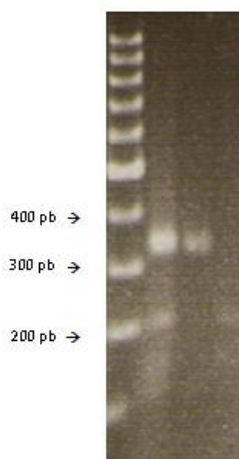


Figura 23: Digestión con la enzima *NlaIII* del producto de PCR amplificado para el marcador C2-24. El carril de la izquierda corresponde al marcador "GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus". La primera muestra corresponde al híbrido interespecífico, la segunda a *S. lycopersicoides* y la última a tomate.

Las diferencias observadas entre los tamaños predichos a partir de los resultados de la secuenciación pueden deberse a que parte de la región inicial del fragmento no haya sido secuenciada. De esta forma, el punto de corte situado en *S. lycopersicoides* alrededor de nucleótido 300 del producto secuenciado, debe corresponder al fragmento de 350 pb, siendo por tanto el fragmento restante menor al tamaño de 150 pb predicho. De forma similar, en el producto de tomate, el fragmento de un tamaño algo superior a 200 pb debe corresponder al predicho de 175 pb; el otro fragmento que se observa podría incluir las otras dos bandas predichas, que no se distinguen en tamaño.

#### 4.1.5 Puesta a punto de protocolos CAPS

En este trabajo se ha puesto a punto un protocolo para los siguientes marcadores: CT137, C2-4, C2-11, C2-16, C2-18, TG176, C2-23, C2-24, TG18, TG254, C2-29, C2-30, TG393 y C2-31 (Tabla 19). Se obtuvo, por tanto, protocolos CAPS para 14 marcadores de un total de 25 con producto de PCR (56%). En trabajos futuros deben probarse nuevas enzimas de restricción en los marcadores para los que no se halló polimorfismo.

**Tabla 19: Protocolos CAPS puestos a punto en este trabajo**

Cromosoma	Marcador	Temperatura de hibridación (°C)	Enzima	Tamaño del fragmento obtenido	
				VF36	LA2951
1	CT137	53	<i>HaeIII</i>	850	1031
			<i>Mbol</i>	1031-400	900
4	C2-4	53	<i>AluI</i>	350-175	300
6	C2-11	55	<i>AfaI</i>	300	400
7	C2-16	55	<i>AfaI</i>	300-900	500-700-750
			<i>Mbol</i>	1031	500-450
			<i>MseI</i>	400-500	1031-900
8	C2-18	55	<i>AluI</i>	400	350
8	TG176	58	NN <sup>2</sup>	450	350
9	C2-23	53	<i>Mbol</i>	1200	1031

Tabla 19 (continuación)

Cromosoma	Marcador	Temperatura de hibridación (°C)	Enzima	Tamaño del fragmento obtenido	
				VF36	LA2951
9	TG18	55	<i>Mbol</i>	200	500
9	TG254	50	NN <sup>2</sup>	2000-1200	1200-500
11	C2-29	53	<i>AluI</i>	450-500	1031
			<i>MseI</i>	220-275	300-210
11	C2-30	TD <sup>1</sup> 53/43	NN <sup>2</sup>	1031	500
11	TG393	55	<i>AfaI</i>	300	600
			<i>Mbol</i>	450-300	500-250
12	C2-31	55	<i>AfaI</i>	300	250

<sup>1</sup>TD PCR *touchdown*. <sup>2</sup>NN: No necesario el uso de enzimas de restricción, por polimorfismo en PCR.

En muchos ocasiones se halló más de una enzima que otorgó corte polimórfico. En estos casos debe escogerse la enzima más económica o la que proporciona un polimorfismo más sencillo de interpretar.

#### 4.2 Genotipado de líneas de la colección ILS

La colección de líneas de introgresión realizada por Canady y col., (2005) fue construida empleando como marcadores una combinación de RFLPs, isoenzimas y marcadores morfológicos. Parte de las líneas de la colección se mantienen en forma de heterocigotos, debido a problemas de esterilidad de los homocigotos. Para el manejo de estas generaciones segregantes y con objeto de facilitar la identificación de los fragmentos introgresados, esos mismos investigadores convirtieron 16 RFLPs en marcadores CAPS.

En el marco de este trabajo y de trabajos anteriores desarrollados por el grupo (Palomino, 2011) se han identificado un conjunto de marcadores basados en la PCR, polimórficos entre tomate y *S. lycopersicoides*, que permitirán un manejo más eficiente de la colección de ILs. En este sentido, el objetivo era incrementar la densidad de marcadores disponibles, con objeto de, en primer lugar, disponer de un mayor número de marcadores por introgresión para poder identificar la presencia de recombinación en los fragmentos grandes

mantenidos en heterocigosis. Por otro lado, esta mayor densidad permitirá aumentar la definición en la determinación del tamaño de las introgresiones.

En este sentido, se han utilizado marcadores desarrollados en estos trabajos con dos objetivos: en primer lugar, se ha determinado la longitud de las introgresiones presentes en algunas líneas homocigotas y, en segundo lugar, se han genotipado líneas segregantes con objeto de reproducirlas.

#### 4.2.1 Longitud de la introgresión

Se seleccionaron un conjunto de líneas con el objetivo inicial de determinar la longitud del fragmento introgresado utilizando los marcadores desarrollados previamente (Tabla 20).

**Tabla 20: Genotipo obtenido en las líneas cuyo objeto de estudio fue la longitud del fragmento introgresado.**

Línea	Marcador	Cromosoma	Introgresión	Genotipo
LA3345	TG18	9	Heterocigota	S
LA3892	TG393	11	Homocigota	L
LA4233	CT137	1	Homocigota	T
LA4245	C2-4	4	Homocigota	T
LA4246	C2-5	4	Homocigota	T
LA4266	C2-16	7	Heterocigota	T

\* T: homocigoto para tomate, L: homocigoto para *S. lycopersicoides*; S: segregación.

La línea LA3345 es proporcionada por el TGRC como homocigota para una introgresión en el cromosoma 9, en la región de los marcadores TG18 y CT143 (Figura 25); es portadora del gen *Dia-3* y no se conoce la longitud de la introgresión. Se analizaron 9 plantas de esta línea con el marcador TG18, con objeto de determinar si la introgresión cubre este marcador. Se comprobó segregación en la línea, observándose plantas heterocigotas y homocigotas para ambos alelos de la entrada LA2951 (Figura 24). Se concluyó por una parte, que la introgresión cubre la región correspondiente al marcador TG18, y por otra parte que esta línea no es proporcionada en homocigosis por el TGRC.



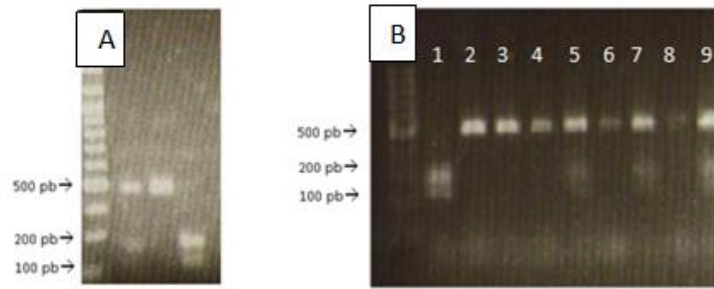


Figura 24: Visualización en gel de agarosa el 2% de los resultados para el marcador TG18. En ambas imágenes se incluye el marcador “GeneRuler 100 bp DNA ladder” en el carril izquierdo. (A) Alelos del marcador para el híbrido interespecífico, LA2951 y VF36, en este orden. (B) Resultados obtenidos en las 9 muestras analizadas. Se distinguen homocigotos para el alelo de VF36 (1), homocigotos para el alelo de LA2951 (2, 3, 4, 6, 8) y heterocigotos (5, 7 y 9).

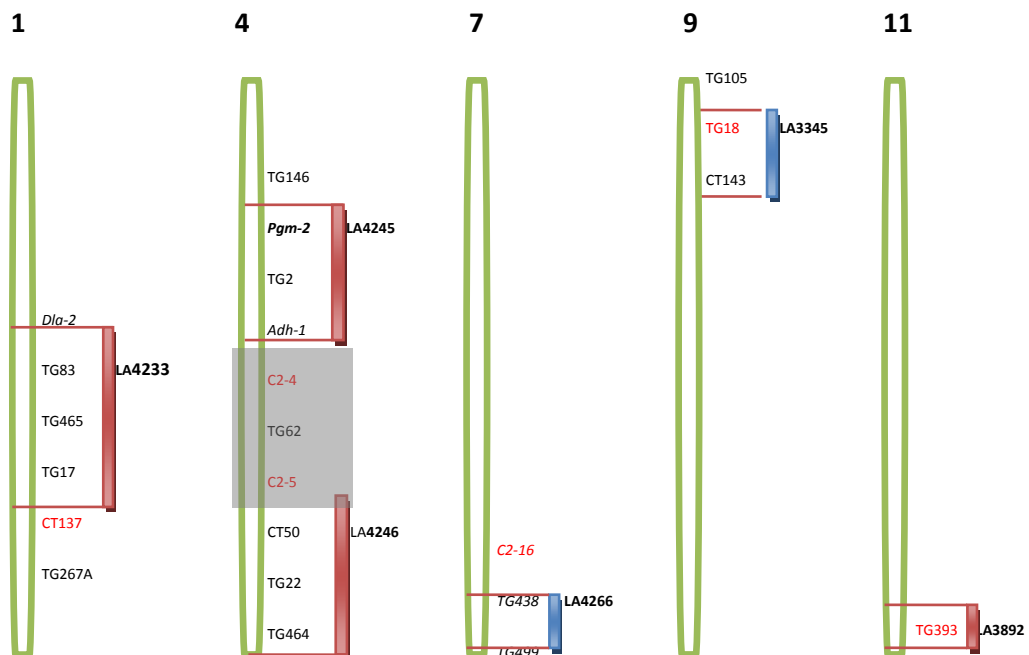


Figura 25: Mapa genético de los segmentos del cromosoma de *S. lycopersicoides* introgresados en *S. lycopersicum*. Con la línea vertical se indica la línea de introgresión. Las bandas rojas representan una introgresión en homocigosis y las bandas azules una introgresión en heterocigosis. La zona sombreada de gris es un fragmento no representado en la colección de ILS. (Canady y col., 2005). Se representan en rojo los marcadores utilizados en este trabajo.

El marcador RFLP TG393 (cromosoma 11) fue el marcador utilizado por Canady y col. (2005) para detectar la introgresión en homocigosis de la línea LA3892 (Figura 25). Cinco plantas de esta línea analizadas en este trabajo fueron homocigotas para el alelo de *S. lycopersicoides*. En este caso los resultados obtenidos confirman los datos proporcionados por Canady y col. (2005).

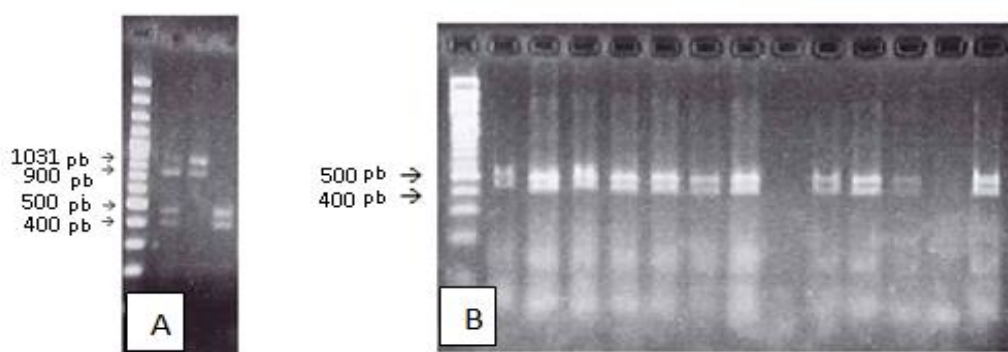
La introgresión de la línea LA4233, en el cromosoma 1, se extiende entre los marcadores TG83 y TG17. El final de la introgresión por el extremo distal se encuentra delimitada entre los marcadores TG17 y TG267A (Figura 25) (Canady y col., 2005). El marcador CT137 está localizado entre estos dos marcadores, de forma que se utilizó para determinar si la introgresión lo incluía. El 100% de las plantas genotipadas fueron homocigotas para el alelo de tomate, lo que significa que la introgresión finaliza en un punto anterior a la ubicación de este marcador.

Con la misma finalidad se escogió el marcador C2-4 para genotipar la línea LA4245. El último marcador determinado dentro de la introgresión es *Adh-1* (Figura 25) y se sabe que TG62 no forma parte de esta línea; sin embargo, no se conoce la longitud exacta de la introgresión (Canady y col., 2005). El marcador C2-4 se encuentra entre *Adh-1* y TG62. Todas las plantas analizadas son homocigotas para el alelo de tomate lo que significa que la introgresión no alcanza la ubicación de este marcador.

De forma similar, el único marcador conocido en el inicio de la introgresión perteneciente a la línea LA4246 es CT50 (Figura 25) (Canady y col., 2005). En este trabajo se utilizó el marcador C2-5 para estudiar la zona flanqueante al comienzo de la introgresión. C2-5 está localizado entre los marcadores TG62, que se sabe que no forma parte de la introgresión, y CT50 (Figura 25). Las plantas estudiadas presentan el genotipo de tomate con lo que se concluye que este marcador se ubica fuera del fragmento introgresado.

Es importante estudiar la longitud de la introgresión en las líneas LA4245 y LA4246 porque el fragmento delimitado por ambas líneas (zona sombreada en gris, Figura 25) es la región más grande sin representación de *S. lycopersicoides* en la colección de ILS. Por lo tanto, resulta de interés conocer el tamaño exacto de esta región.

En lo referente a la línea LA4266, cabe mencionar que contiene dos introgresiones que se encuentran en los cromosomas 7 y 8; la primera corresponde a un fragmento en homocigosis y la última a una introgresión en heterocigosis. Con objeto de determinar la longitud de la secuencia introgresada ubicada en el cromosoma 7, se empleó el marcador C2-16, localizado al comienzo de la introgresión (Figura 25). Todas las plantas resultaron ser homocigotas para el alelo de tomate (Figura 26), lo que permitió comprobar que la introgresión no llega hasta este fragmento.



**Figura 26: Visualización en gel de agarosa al 2% del marcador C2-16 “GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus” (extremo izquierdo). (A) Alelos del marcador para el híbrido interespecífico, LA2951 y VF36, en este orden (B) Digestión con la enzima *MseI* en la línea LA4266**

#### 4.2.3 Líneas segregantes

Las líneas LA4266, LA4270, LA4279 y LA4282 son proporcionadas por el TGRC como segregantes para la introgresión de *S. lycopersicoides*, ya que forman parte de las líneas que por problemas de esterilidad de los homocigotos se mantienen en forma de heterocigotos. Además, según se ha comentado previamente, la línea LA3345 que el TGRC proporciona como homocigota, resultó ser segregante. Para todas estas líneas se analizaron un conjunto de plantas con objeto de identificar plantas portadoras del fragmento de la especie silvestre para poder reproducir la semilla disponible.

La línea LA3345, comentada anteriormente, produjo entre su descendencia un 33,3% de heterocigotos, 55,5% de homocigotos para la introgresión y un 11,2% de homocigotos para el alelo de *S. lycopersicum*. El porcentaje de plantas con el alelo de la especie silvestre fijado es mucho mayor al que obtuvo Canady y col. (2005) en su estudio (Tabla 21).

**Tabla 21: Segregación observada en este ensayo (obtenida) y segregación obtenida por Canady y col. (2005) (esperada) a partir de plantas heterocigotas para el fragmento de *Solanum lycopersicoides* para los distintos marcadores analizados en este ensayo.**

Línea	Marcador	Segregación obtenida (%)*			Segregación esperada (%)*		
		T	H	L	T	H	L
LA3345	TG18	11,2	33,3	55,5	25	60	15
LA4266	TG510		91,7	8,3	30	60	10
LA4270	TG18	80		20	25	60	15
	C2-23	80	20		25	60	15
LA4282	TG68	100			40	60	
	TG180	100			40	60	
	CT99	100			40	60	

\*T: homocigoto para tomate; L: homocigoto para *S. lycopersicoides*; H: heterocigoto.

Respecto a la línea LA4266, además del fragmento en homocigosis comentado previamente en el cromosoma 7, contiene una introgresión en heterocigosis ubicada en el cromosoma 8 (Figura 14, 3.2.1). Dicha introgresión se analizó en este trabajo con el marcador TG510. Los resultados muestran una segregación del 91,7% de heterocigotos y un 8,3% de homocigotos para el alelo de *S. lycopersicoides*. La segregación obtenida en esta línea es similar a los datos expuestos por Canady y col. (2005), con la excepción de que en este trabajo no se obtuvieron plantas homocigotas para los alelos de *S. lycopersicum*, mientras que en la descendencia de Canady y col. (2005) este genotipo representó el 30%.

Para el genotipado de la línea LA4270 se emplearon dos marcadores, localizados ambos en el brazo corto del cromosoma 9 (Figura 14, 3.2.1). De las cinco plantas analizadas, cuatro resultaron ser homocigotas para el alelo de tomate. La planta restante fue homocigota para el alelo de *S. lycopersicoides* para TG18 y heterocigota para el marcador C2-23 (Tabla 22). Estos resultados indican que se ha producido recombinación, fijándose en esta planta la región correspondiente al marcador TG18 y produciéndose segregación en el caso de C2-23.

**Tabla 22: Genotipo de cada planta analizada en la línea LA4270 para los marcadores TG18 y C2-23.**

Línea	Marcador	Genotipo por planta*				
LA4270	TG18	T	T	L	T	T
	C2-23	T	T	H	T	T

\*T: homocigoto para tomate; L: homocigoto para *S. lycopersicoides*; H: heterocigoto.

Esta línea presenta una introgresión de gran tamaño, correspondiente al cromosoma 9 casi en su totalidad (Figura 14, 3.2.1). Canady y col. (2005) afirman que es suficiente con utilizar un marcador por línea para la comprobación de la segregación, ya que han comprobado que la recombinación es poco frecuente en las líneas. Sin embargo, en el caso de introgresiones grandes sí es posible que se produzca recombinación, tal y como ha sucedido en este trabajo para LA4270. Esto implica la necesidad de disponer de una densidad mayor de marcadores polimórficos entre tomate y *S. lycopersicoides*.

El porcentaje de homocigotos para el alelo de tomate obtenido en este ensayo entre los descendientes de esta línea (80%) fue muy superior al obtenido (25%) en el ensayo de Canady y col. (2005) (Tabla 21). En este caso es importante tener en cuenta que para el análisis de esta línea Canady y col. (2005) emplearon 175 plantas y en el presente trabajo se genotiparon únicamente 5 descendientes. Cabe mencionar que en la línea LA3345 anteriormente comentada y cuya introgresión se localiza en el mismo cromosoma, se obtuvo un 33,3% de heterocigotos en la descendencia frente al 60% obtenido en el ensayo de Canady y col. (2005).

Respecto a la línea LA4279, se define como heterocigota para la introgresión (Figura 14, 3.2.1) (Canady y col., 2005). En este trabajo se empleó el marcador C2-29, ya que se conoce su ubicación dentro del fragmento introgresado. En el genotipado se obtuvieron únicamente plantas homocigotas para tomate lo que indica que en estas plantas se ha perdido la introgresión. Este fragmento es de gran tamaño y debería por lo tanto analizarse la descendencia con un marcador ubicado en el otro extremo de la introgresión para comprobar si se conserva parte del fragmento. Por otra parte, Canady y col. (2005) observaron en algunas líneas de la colección una distorsión en la segregación a favor de tomate, conduciendo a una frecuencia reducida de los alelos de *S. lycopersicoides*. Este hecho podría justificar los resultados obtenidos, sin embargo aún no se conoce si existe distorsión en la segregación en esta línea.

En lo referente a la línea LA4282, posee una introgresión que abarca casi la totalidad del cromosoma 12, la mayor parte en heterocigosis, si bien la parte final de la introgresión es homocigota para *S. lycopersicoides* (Figura 14, 3.2.1). Para el estudio se utilizaron los marcadores TG68, TG180 y CT99, localizados en la región para la que la introgresión esta mantenida en heterocigosis. En todas las plantas analizadas se obtuvo homocigosis para el alelo de tomate. La distorsión en la segregación observada en otras líneas podría explicar la

ausencia de heterocigotos. Canady y col. (2005) no obtuvieron homocigotos para *S. lycopersicoides* en la descendencia, lo que justificaron, en algunos casos, de esta forma. Por otra parte, también podría haber ocurrido una fijación a favor de los alelos de tomate y una pérdida del fragmento introgresado.

## 5. CONCLUSIONES

- En 25 de los 44 marcadores probados en este ensayo se obtuvo producto de PCR, tanto para *Solanum lycopersicum* como para *Solanum lycopersicoides*. Este resultado confirma que marcadores diseñados para otras especies silvestres relacionadas con el tomate resultan también útiles para una especie más alejada como es *S. lycopersicoides*.
- En un 50% de los marcadores con información previa y correcta amplificación se observó coincidencia para el tamaño de PCR obteniendo con el previamente descrito para otras especies del género *Solanum*. Este hecho indica el alto grado de conservación entre las especies silvestres relacionadas con el tomate.
- Un 12% de los marcadores para los que se obtuvo producto de PCR generaron polimorfismo en la amplificación. Este resultado es mayor al obtenido en estudios realizados con otras especies emparentadas con *S. lycopersicum*; esto puede deberse a que *S. lycopersicoides* es una de las especies más alejadas entre las especies relacionadas con tomate. La identificación de polimorfismo en PCR posibilita un análisis menos costoso en tiempo y dinero.
- Se identificaron 11 marcadores polimórficos mediante digestión enzimática entre *S. lycopersicoides* y la especie cultivada. En trabajos futuros se continuará la búsqueda de polimorfismo para los marcadores restantes, recurriendo a la secuenciación de los fragmentos amplificados cuando se identifique una enzima que genere polimorfismo.
- El empleo de parte de los marcadores desarrollados en este trabajo, además de otros desarrollados previamente por el grupo, para definir la longitud de las introgresiones presentes en algunas de las líneas proporcionadas como homocigotas por el “Tomato Genetics Resource Center” y para genotipar líneas segregantes con objeto de identificar plantas portadoras del fragmento de *S. lycopersicoides*, ha confirmado la utilidad de los mismos en el manejo de la colección de líneas de introgresión.
- El genotipado de líneas segregantes para la introgresión de *S. lycopersicoides* ha permitido detectar recombinación. Este hecho justifica la necesidad de incrementar la

densidad de marcadores basados en la PCR polimórficos entre tomate y *S. lycopersicoides*, con objeto de disponer de varios marcadores por introgresión para el análisis de las líneas segregantes.

- Ha sido posible identificar plantas portadoras del alelo de *S. lycopersicoides* en 3 de las 4 líneas mantenidas como heterocigotas analizadas. La introgresión se halló en homocigosis y en heterocigosis en las descendencias de las líneas LA3345 y LA4266. La presencia de plantas heterocigotas para la introgresión permitirá con una probabilidad elevada obtener descendencia por autofecundación de las mismas. La descendencia de línea LA4270 presentó la introgresión únicamente en homocigosis. La presencia de un factor de esterilidad asociado a la introgresión en esta línea puede impedir la obtención de descendencia por autofecundación; para el mantenimiento de la línea será, por tanto, necesario cruzar las plantas homocigotas identificadas con VF36.



## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Aldana J., Cure J.R, Almanza M.T, Vecil D., Rodríguez D. 2007. Efecto de *Bombus atratus* (Hymenóptera: Apidae) sobre la productividad de tomate *S. lycopersicum* bajo invernadero en la sabana de Bogotá, Colombia. *Agronomía Colombiana*, 25:62-72.
- Ashrafi H., Kinkade M., Foolad M.R. 2009. A new genetic linkage map of tomato based on a *Solanum lycopersicum* x *S. pimpinellifolium* RIL population displaying locations of candidate pathogen response genes. *Genome*, 52: 935-56.
- Bai Y., Lindhout P. 2007. Domestication and Breeding of Tomatoes: What have We Gained and What Can We Gain in the Future. *Annals of Botany*, 100: 1085–1094.
- Bai Y., Feng X., Van der Hulst R., Lindhout P. 2004. A set of simple PCR markers converted from sequence specific RFLP markers on tomato chromosomes 9 to 12. *Molecular Breeding*, 13: 281-287.
- Bailey D.W. 1971. Recombinant inbred strains. *Transplantation*, 11: 325-327.
- Bernacchi D., Beck-Bunn T., Emmatty D., Eshed S., Inai J., Lopez V., Petiard H., Sayama J., Uhlig J., Zamir D. 1998. Backcross QTL analysis of tomato. II. Evaluation of near-isogenic lines carrying single-donor introgressions for desirable wild QTL-alleles derived from *Lycopersicon hirsutum* and *L. pimpinellifolium*. *Theoretical and Applied Genetics*, 97: 170-180.
- Bedinger P.A., Covey P., Welch L., Frank E., Chalivendra S., Kumar A., Katsuhiko. K., Van Der Knaap E. 2009. Incongruencia Unilateral en el Clado de Tomate. Simposio de reproducción de las solanáceas. Lima, Perú.
- Brouwer D.J., St. Clair D.A., 2004. Fine mapping of three quantitative trait loci for late blight resistance in tomato using near isogenic lines (NILs) and subNILs. *Theoretical and Applied Genetics*, 108: 628–638.
- Brugmans B., Van Der Hulst G.M., Visser G.F., Lindhout P., Van Eck H.A. 2003. new and versatile method for the successful conversion of AFLP

- markers into simple single locus markers. *Nucleic Acids Research*, 31: 10.
- Canady M.A., Meglic V., Chetelat R.T. 2005. A library of *Solanum lycopersicoides* introgression lines in cultivated tomato. *Genome*, 48: 685–697
  - Chen L.Z., Adachi T. 1996. Efficient hybridization between *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum* via embryo rescue and in vitro propagation. *Plant Breed*, 115: 251-256.
  - Chetelat R.T., Meglic V. 2000. Molecular mapping of chromosome segments introgressed from *Solanum lycopersicoides* into cultivated tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Theoretical and Applied Genetics*, 100: 232–241.
  - Chetelat R.T., Wentao L. 2009. En busca del Tomate Silvestre: Historia del Banco de Germoplasma y Estudios de la Biología de la Reproducción. C. M. Rick Tomato Genetics Resource Center. Simposio de reproducción de las solanáceas. Lima, Perú.
  - Chetelat R.T., Rick C.M., DeVerna J.W. 1989. Isozyme analysis, chromosome pairing, and fertility of *Lycopersicon esculentum* (*Solanum lycopersicoides*) diploid backcross hybrids. *Genome*, 32: 783–790
  - Chetelat R.T., DeVerna J.W., Bennett A.B. 1995. Introgression into tomato (*Lycopersicon esculentum*) of the *L. chmielewskii* sucrose accumulator gene (*sucr*) controlling fruit sugar composition. *Theoretical and Applied Genetics*, 91: 327-333.
  - Chetelat R.T., Cisneros P., Stamova L., Rick C.M. 1997. A male-fertile *Lycopersicon esculentum* (*Solanum lycopersicoides*) hybrid enables direct backcrossing to tomato at the diploid level. *Euphytica*, 95: 99–108.
  - Chetelat R.T., Pertuzé R.A., Faundez L., Graham E.B., C.M. Jones. 2009. Distribution, ecology and reproductive biology of wild tomatoes and related nightshades from the Atacama Desert region of northern Chile. *Euphytica*, 167: 77-93.

- Child A. 1990. A synopsis of *Solanum* subgenus Potatoe (G. Don) (D'Arcy) (Tuberarium (Dun.) Bitter (s.l.). Feddes Repertorium, 101: 209-235.
- COMAV (Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana). <http://www.comav.upv.es>. (Verificado 15 de julio de 2012).
- Cooper H.F., Spillane C., Hodgkin T. 2001. Broadening the genetic base of crops: an overview. En: H. D. Cooper, T. Hodgkin, C. Spillane (Eds.). Broadening the genetic base of crops production. IPGRI y FAO, 1-23.
- Davis J., Yu D., Evans W., Gokirmak T., Chetelat R.T., Stotz H.U. 2009. Mapping of loci from *Solanum lycopersicoides* conferring resistance or susceptibility to *Botrytis cinerea* in tomato. Theoretical and Applied Genetics, 119: 305-314.
- Díez M.J., Nuez F., 2008. Tomato. En: Prohens J, Nuez F. Handbook of Plant Breeding, 2: 249-323.
- Doyle J.J., Doyle J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12: 13-15.
- Eshed Y., Zamir D. 1994a. Introgressions from *Lycopersicon pennellii* can improve the soluble-solids yield of tomato hybrids. Theoretical and Applied Genetics, 88: 891-897.
- Eshed Y., Zamir D. 1994b. A genomic library of *Lycopersicon pennellii* in *L. esculentum*: A tool for fine mapping of genes. Euphytica, 79:175–179.
- Eshed Y., Zamir D. 1995. An introgression line population of *Lycopersicon pennellii* in the cultivated tomato enables the identification and fine mapping of yield-associated QTL. Genetics, 141: 1147-1162.
- Eshed Y., Abu-Abied M., Saranga Y., Zamir D. 1992. *Lycopersicon esculentum* lines containing small overlapping introgressions from *L. pennellii*. Theoretical and Applied Genetics, 79: 175–179.
- Esquinas-Alcázar J., Nuez F. 1995. Situación taxonómica, domesticación y difusión. En: Fernando Nuez (Eds.). El cultivo del tomate. Ediciones Mundi Prensa, 14-42.

- FAOSTAT 2012. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://faostat.fao.org>. (Verificado 15 de Julio de 2012).
- Frary A., Doganlar S. 2003. Comparative genetics of crop plant domestication and evolution. *Turkish Journal of Agricultural Forestry*, 27: 59–69.
- Fulton T. M, Grandillo S., Beck-Bunn T., Fridman E., Frampton A., Lopez J., Petiard V., Uhlig J., Zamir D., Tanksley S. D. 2000. Advanced backcross QTL analysis of a *Lycopersicon esculentum* × *Lycopersicon parviflorum* cross. *Theoretical and Applied Genetics*, 100: 121-150.
- Gavrilenko T.A., Barbakar N.I., Pavlov A.V. 1992. Somatic hybridization between *Lycopersicon* and non-tuberous *Solanum* species of the *Etuberosa* series. *Plant Science*, 86: 203–214.
- Gradziel T.M., Robinson R.W. 1989. *Solanum lycopersicoides* gene introgression to tomato, *Lycopersicon esculentum*, through the systematic avoidance and suppression of breeding barriers. *Sexual Plant Reproduction*, 2: 43–52.
- Handley L.W., Nickels R.L, Cameron M.W., Moore P.P., Sink K.C. 1986. Somatic hybrid plants between *Lycopersicon esculentum* and *Solanum lycopersicoides*. *Theoretical and Applied Genetics*, 71: 691–697.
- Heywood, V.H. 1993. Flowering plants of the world. Oxford University Press, 336 pp.
- Hossain M., Imanishi S. y Matsumoto A. 1994. Production of somatic hybrids between tomato (*Lycopersicon esculentum*) and nightshade (*Solanum lycopersicoides*) by electrofusion. *Breeding Science*, 44: 405–412.
- Hoyt E., 1992. Conservando los parientes silvestres de las plantas cultivadas. *ADdelson–Wesley Iberoamericana*, 52 pp.
- Jenkins J.A. 1948. The origin of the cultivated tomato. *Economic Botany*, 2: 379-392.
- Jeuken M.J.W., Lindhout P. 2004. The development of lettuce backcross inbred lines (BILs) for exploitation of the *Lactuca saligna* (wild lettuce) germplasm. *Theoretical and Applied Genetics*, 109: 394-401.

- Jones J. B. 1999. Tomato plant culture. Ed. CRC Press, 1990 pp.
- Kobayashi R.S., J.R. Stommel, y S. L. Sinden. 1996. Somatic hybridization between *Solanum ochranthum* and *Lycopersicon esculentum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 45: 73–78.
- Konieczny A., Asubel F.M. 1993. A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *The Plant Journal*, 4: 403-410.
- Larry R., Joanne L. 2007. Genetic resources of tomato. En: M K Razdan; A. K. Mattoo (Eds.). *Genetic improvement of solanaceous crops Vol. 2*. Science Publishers.
- Levi A., Ridley B.L., Sink K.C. 1988. Biased organelle transmission in somatic hybrids of *Lycopersicon esculentum* and *Solanum lycopersicoides*. *Current Genetics*, 14: 177–182.
- Long M., De Souza S.J, Rosenberg C., Gilbert W. 1998. Relationship between “proto-splice sites” and intron phases: Evidence from dicodon analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95: 219-223.
- Luckwill L.C. 1943. The genus *Lycopersicon*: an historical, biological, and taxonomical survey of the wild and cultivated tomatoes. *Aberdeen University Studies*, 120: 1-44. *Univ. Aberdeen Studies* 120: 36.
- Monforte A.J., Tanksley S.D. 2000. Development of a set of near isogenic and backcross recombinant inbred lines containing most of the *Lycopersicon hirsutum* genome in a *L. esculentum* genetic background: a tool for gene mapping and gene discovery. *Genome*, 43: 803–813.
- Moore P.P., Sink K.C. 1988. Characterization of a *Lycopersicon esculentum* (*Solanum lycopersicoides*) somatic hybrid lacking a glutamate oxaloacetate transaminase isozyme. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 13: 39–47.
- Müller C.H. 1940. A revision of the genus *Lycopersicon*. U.S.D.A. *Miscellaneous Publications*, 382: 128.
- Nuez F. 2000. Introducción al análisis del ligamiento y cartografía de marcadores simples. En: F. Nuez y J.M. Carrillo. *Los marcadores*

- genéticos en la mejora vegetal. Universidad Politécnica de Valencia, 153-294.
- Nuez F. 2001. El cultivo de jitomate. Mundi-prensa. 793 pp.
  - Oleszek W., Shannon S., Robinson R.W. 1986. Steroidal alkaloids of *Solanum lycopersicoides*. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 55: 653–657.
  - Palomino M. 2011. Desarrollo de marcadores moleculares para el manejo de un conjunto de líneas de introgresión de *Solanum lycopersicoides* en el fondo genético del tomate cultivado. Trabajo Final de Carrera, ETSIAMN. Universidad Politécnica de Valencia.
  - Paterson A.H., DeVerna J.W., Lanini B., Tanksley S.D. 1990. Fine Mapping of quantitative trait loci using selected overlapping recombinant chromosomes, in an interspecies cross of tomato. *Genetics*, 124: 735-742.
  - 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. The taxonomy of tomatoes: a revision of wild tomatoes (*Solanum* section *Lycopersicon*) and their outgroup relatives in sections *Juglandifolium* and *Lycopersicoides*. *Systematic Botany Monographs*, 84: 1-186.
  - Pertuzé R.A., Ji Y., Chetelat R.T. 2002. Comparative linkage map of the *Solanum lycopersicoides* and *S. sitiens* genomes and their differentiation from tomato. *Genome*, 45: 1003–1012.
  - Pertuzé R.A., Ji Y., Chetelat R.T. 2003. Transmission and recombination of homeologous *Solanum sitiens* chromosomes in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 107: 1391–1401.
  - Phillips B.R., Provvidenti R., Robinson R.W. 1977a. Reaction of *Solanum lycopersicoides* to viral diseases of the tomato. *Report of the Tomato Genetics Cooperative*, 27: 18.
  - Phillips B.R., Robinson R.W., Shail J.W. 1977b. Evaluation of *Solanum lycopersicoides* for resistance to fungal disease and nematodes. *Report of the Tomato Genetics Cooperative*, 27: 18–19.

- Plenck J.J. Plantas medicinales (lino). Icones Plantarum Medicinalium, Viena, 1788-1803.
- Rao R., Hodgkin T. 2002. Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 68: 1–19.
- Rick C.M., 1951. Hybrids between *Lycopersicon esculentum* Mill. and *Solanum lycopersicoides* Dun. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 37: 741-744.
- Rick C.M., 1976. Natural variability in wild species of *Lycopersicon* and its bearing on tomato breeding. *Genética Agraria* 30:249-259
- Rick C.M. 1978. The Tomato. *Scientific American*, 239: 76-87.
- Rick C.M. 1986. Reproductive isolation in the *Lycopersicon peruvianum* complex. In *Solanaceae, biology and systematics*, ed. W. G. D’Arcy, 477–495.
- Rick CM. 1988. Tomato-like nightshades: affinities, autecology, and breeders opportunities. *Economic Botany*, 42: 145–154
- Rick C.M. 1995. Tomato. *Lycopersicum esculentum* (Solanaceae). *Evolution of crop plants*, 2nd ed, 452-457.
- Rick C.M., Fobes J. F. 1975. Allozyme variation in the cultivated tomato and closely related species. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 102: 376-386.
- Rick C.M, Hawkes J.G., Lester R.N., Skelding A.D. 1979. Biosystematic studies in *Lycopersicon* and closely related species of *Solanum*. *The Biology and Taxonomy of Solanaceae*, 667–677.
- Rodríguez G.R., Herrera Y.C., Sánchez H. L. 2008. Efectos de heterosis para el contenido de sólidos solubles y el tamaño del fruto en el tomate (*Solanum lycopersicum*, L.) y su adaptación para los sistemas de cultivo protegido. *Agrotecnia de Cuba*, 34: 66-77.
- Rousseaux M.C., Jones C.M., Adams D., Chetelat R.T., Bennet A., Powell, A., 2005. QTL analysis of fruit antioxidants in tomato using *Lycopersicon pennellii* introgression lines. *Theoretical and Applied Genetics*, 111: 1396–1408.

- Smith S.D., Peralta I.E. 2002. Ecogeographic surveys as tools for analyzing potential reproductive isolating mechanisms: an example using *Solanum juglandifolium* Dunal, *S. ochranthum* Dunal, *S. lycopersicoides* Dunal, and *S. sitiens* I.M. Johnston. *Plant Taxonomy*, 51: 341–349.
- SGN. 2012. Solanaceae Genomics Network. <http://solgenomics.net> (Verificado 31 de julio de 2012.)
- Soler S., Nuez F. 2004. Genes de Resistencia en cultivos hortícolas. Resistencia genética a patógenos vegetales. Editorial de la UPV: 393-463.
- Tanksley S.D., Nelson J.C. 1996. Advanced backcross QTL analysis: a method for the simultaneous discovery and transfer of valuable QTLs from unadapted germplasm into elite breeding lines. *Theoretical and Applied Genetics*, 92: 191-203.
- Tanksley S.D., Ganai 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: 1141–1160.
- TGRC, 2012. Tomato Genetics Resource Center. <http://tgrc.ucdavis.edu> (Verificado 31 julio 2012).
- Tournefort, J. P. 1694. *Elemens de Botanique*. Paris: l’Imprimerie royale.
- USDA, 2012. United States Department of Agriculture. <http://www.ars-grin.gov/npgs/searchgrin.html>. (Verificado 15 de julio de 2012).
- Warnock S.J. 1991. Natural Habitats of *Lycopersicon* Species *Campbell*. *Hortscience*, 26: 466-471.
- Zamir D. 2001. Improving plant breeding with exotic genetic libraries. *Nature Reviews Genetics*, 2: 983–989.
- Zegarra Z.R. 2005. Biodiversity and taxonomy of southern Peru desertic flora: family Solanaceae. *Idesia (Chile)*, 23: 63-75
- Zhang Y., Stommel J. R. 2000. RAPD and AFLP tagging and mapping of *Beta* (*B*) and *Beta* modifier (*MoB*), two genes which influence  $\beta$ -



carotene accumulation in fruit of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Theoretical Applied Genetics, 100: 368-375.

## 7. ANEXOS

### ANEXO I: Tampones para la extracción de ADN

#### 1. Tampón de extracción

- 2% (peso/volumen) CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio)
- 20 mM EDTA (ácido etilen diaminotetraacético)
- 100 mM Tris (tris (hidroximetil) aminometano)
- 1,42 M NaCl

Ajustar el pH a 8

#### 2. Tampón TE

- 10 mM Tris
- 1 mM EDTA

Ajustar el pH a 8

### ANEXO II: Tampones para la electroforesis y para el gel.

#### 1. Tampón de electroforesis (TBE 10X)

- 0,9M Tris
- 0,9M Ácido bórico
- 20 mM EDTA.

Ajustar el pH a 8

#### 2. Tampón de carga (LB 6X)

- 40% (peso/volumen) de sacarosa
- 0,25% azul de bromofenol
- 0,1 M EDTA