

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



Obtención de generaciones avanzadas derivadas de *Solanum peruvianum* PI 126944 para el desarrollo de líneas de introgresión en el fondo genético del tomate cultivado

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNA: Elena Zafón Chuliá
TUTOR: Ana M^a Pérez de Castro
CO-TUTOR: M^a José Díez Niclós

Curso Académico: 2014-2015

VALENCIA, Julio de 2015

Título: Obtención de generaciones avanzadas derivadas de *Solanum peruvianum* PI 126944 para el desarrollo de líneas de introgresión en el fondo genético del tomate cultivado.

Resumen: En trabajos previos realizados en el Instituto Universitario para la Conservación y Mejora de la Agrobiodiversidad Valenciana (COMAV) se obtuvieron tres híbridos interespecíficos entre la entrada PI 126944 de *Solanum peruvianum* y el tomate cultivado. El objetivo de este trabajo ha sido la obtención de generaciones avanzadas de retrocruzamiento con el fin de desarrollar una población de líneas de introgresión. Se disponía de varias generaciones "F₄", "F₅" y "F₆", así como del primer y segundo retrocruce de alguna de estas generaciones. En concreto, los objetivos del trabajo han sido, por una parte, realizar el siguiente retrocruce hacia la especie cultivada mediante el rescate de las semillas inmaduras en distintas fechas después de la polinización, cultivándolas posteriormente *in vitro*. Por otra parte, se pretendía confirmar la presencia de fragmentos de la especie silvestre en algunas de estas plantas, empleando marcadores moleculares tipo CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*) polimórficos entre tomate y *S. peruvianum*. Se obtuvieron 587 frutos, a partir de cruces con 23 parentales (3 de la generación "F₄"-BC₁, 9 de la "F₅"-BC₁, 4 de la "F₅"-BC₂ y 7 de la "F₆"-BC₁). De esos frutos, 522 contenían semillas. El número total de semillas rescatadas fue de 5302, de las cuales aproximadamente la mitad se cultivaron cerradas, mientras que a la otra mitad se le practicó una incisión en la región de la chalaza, para favorecer el contacto con el medio. Se obtuvieron un total de 339 plantas, la mayor parte de las cuales procedían de semillas abiertas. A su vez, la mayoría de las plantas se desarrollaron por la vía de la germinación directa. Los mayores rendimientos (número de plantas obtenidas/fruto) se obtuvieron a partir de los frutos recolectados a los 25 ddp. En general, tal y como cabría esperar puesto que se trata de generaciones más avanzadas, los rendimientos de regeneración obtenidos en este trabajo superan los obtenidos en otros estudios. Los mayores rendimientos (26,87%) se obtuvieron a partir de los cruces con los parentales de la generación "F₅"-BC₂, es decir, las generaciones más avanzadas. Además, de los cruces con algunos de los parentales de esta generación se dejaron madurar frutos, habiéndose comprobado que fue posible obtener semillas maduras. Esto podría ser indicativo de que la incompatibilidad va siendo superada a medida que se realizan retrocruzamientos y que, para futuros ensayos, podría ya no ser necesaria la técnica de rescate de semillas inmaduras. La superación de las barreras postcigóticas resulta interesante para el grupo de investigación, ya que permitiría un avance más rápido en el proceso de construcción de la población de líneas de introgresión.

Se genotiparon algunas de las plantas obtenidas a partir de cruces con parentales de la generación "F₅"-BC₁. En todas las plantas analizadas se identificó el alelo de *S. peruvianum* para, al menos, uno de los marcadores utilizados. Por tanto, se ha confirmado que todos los descendientes genotipados procedían de cruce y no de autofecundación.

Palabras clave: tomate, *Solanum peruvianum*, cultivo *in vitro*, líneas de introgresión, CAPS

Title: Obtaining advanced generations derived from *Solanum peruvianum* PI 126944 to develop a set of introgression lines in the genetic background of cultivated tomato

Abstract: Three interspecific hybrids between *Solanum peruvianum* PI 126944 and cultivated tomato were obtained in previous works carried out in the "Instituto Universitario para la Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana" (COMAV). The objective of the work here presented was the obtaining of advanced backcross generations with the aim of constructing a set of introgression lines. Several "F₄", "F₅" and "F₆" generations, as well as their first and second backcross to tomato were available. Concretely, the objectives of the work were, on one hand, the obtaining of the following backcross to tomato, by immature seeds rescue at different dates after pollination (dap) and the subsequent *in vitro* cultivation. On the other hand, the intention was to confirm the presence of introgressions from the wild species in some of these plants, with CAPS markers (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*) polymorphic between tomato and *S. peruvianum*. The number of fruits obtained was 587, from crosses with 23 male parents (3 "F₄"-BC₁, 9 "F₅"-BC₁, 4 "F₅"-BC₂ and 7 "F₆"-BC₁). Fruits containing seeds were 522. A total of 5302 seeds were plated, approximately half of them closed and the other half after a small cut was made in the chalazal region, in order to promote contact with the culture medium. The number of plants regenerated was 339, most of them from opened seeds and directly germinated. The higher yields (plants/fruit) were obtained from fruits collected at 25 dap. As expected, given that generations were more advanced, yields obtained in this work were higher than those reported in other experiments. The highest yields (26.87%) came from crosses with male parents corresponding to the "F₅"-BC₂ generation, that is to say, the most advanced generations. Moreover, fruits from crosses with some of the parents of this generation were collected when ripened, and some mature seeds were obtained. This could indicate that incompatibility is being overcome with backcrosses and it could mean that cultivating immature seeds would not be necessary in future works. Overcoming post-zygotic barriers is important for the research group, given that it will accelerate the construction of the set of introgression lines.

Some of the plants obtained from crosses with male parents of the "F₅"-BC₁ generation were genotyped. The *S. peruvianum* allele was identified in all plants analyzed for, at least, one of the markers used. Thus, it has been confirmed that all plants analyzed came from a cross and not from selfing.

Key words: tomato, *Solanum peruvianum*, *in vitro* culture, introgression lines, CAPS

Autor: Alumna Dña. Elena Zafón Chuliá

Localidad y fecha: Valencia, Julio de 2015

Tutor académico: Dra. Dña. Ana M^a Pérez de Castro

Cotutor: Dra. Dña. M^a José Díez Niclós

Licencia Creative Commons “Reconocimiento no Comercial –Sin Obra Derivada”

Agradezco a mis dos tutoras, Ana y M^a José, así como a mis compañeras de laboratorio, su ayuda y su colaboración durante todos estos meses: sin ellas este trabajo no habría sido posible.

Índice

1. Introducción.....	1
1.1. La taxonomía del tomate y de las especies relacionadas	1
1.2. <i>Solanum peruvianum</i>	2
1.3. Naturaleza de las barreras de cruzabilidad entre <i>S. lycopersicum</i> y <i>S. peruvianum</i>	3
1.4. Barreras de cruzabilidad postcigóticas	3
1.4.1. Técnicas especiales para superar las barreras de cruzabilidad postcigóticas.....	4
1.5. Poblaciones de premejora	5
1.5.1. Líneas recombinantes consanguíneas	6
1.5.2. Retrocruces avanzados	6
1.5.3. Líneas de introgresión	6
1.5.4. Poblaciones de premejora desarrolladas con las diferentes especies silvestres relacionadas con el tomate.....	7
2. Objetivos.....	9
3. Materiales y métodos	10
3.1. Material vegetal	10
3.2. Métodos	12
3.2.1. Realización de los cruzamientos	12
3.2.2. Rescate de semillas inmaduras	12
3.2.3. Genotipado	13
3.2.3.1. Extracción DNA	13
3.2.3.2. Cuantificación de DNA	14
3.2.3.3. Marcadores CAPS.....	15
3.2.4. Análisis estadísticos	17
4. Resultados y discusión	18
4.1. Cuajado de los frutos	18
4.2. Respuesta obtenida del cultivo de semillas inmaduras.....	19
4.2.1. Cruces realizados con los parentales de la generación “F ₄ ”-BC ₁	22
4.2.2. Cruces realizados con los parentales de la generación “F ₅ ”-BC ₁	24
4.2.3. Cruces realizados con los parentales de la generación “F ₆ ”-BC ₁	26
4.2.4. Cruces realizados con los parentales de la generación “F ₅ ”-BC ₂	29
4.2.5. Comparación de los resultados obtenidos para las 4 generaciones de parentales masculinos.....	30

4.3. Desarrollo de las semillas en los frutos recolectados en la madurez provenientes de cruces realizados con parentales de la generación "F ₅ "-BC ₂	31
4.4. Genotipado	32
4.5. Discusión	33
5. Conclusiones	36
6. Bibliografía	37
7. Anexos	41

1. Introducción

1.1 La taxonomía del tomate y de las especies relacionadas

Desde que el tomate cultivado se introdujo en Europa en el siglo XVI, los botánicos reconocieron su relación cercana al género *Solanum*. Sin embargo, su denominación ha ido cambiando a lo largo de los años debido a las dudas acerca de su ubicación genérica. En 1700 se diferenció entre los géneros *Lycopersicon* y *Solanum*. Más tarde, en 1753, Linneo incluyó el género *Lycopersicon* dentro de *Solanum*, de modo que el tomate cultivado pasó a llamarse *Solanum lycopersicum*. En 1754, se encontraron polimorfismos en los caracteres de las anteras, por lo que Miller separó géneros y asignó el tomate cultivado al género *Lycopersicon* y a la especie *esculentum* (*L. esculentum*). A continuación, en 1979, fue Rick quien presentó una clasificación que relacionaba la especie cultivada con las especies silvestres conocidas sirviéndose del concepto biológico de especie: la capacidad reproductiva entre las especies silvestres y el tomate cultivado. De este modo, se identificaron nueve especies dentro del género *Lycopersicon*, que a su vez se dividía en *Esculentum* y *Peruvianum*. En el complejo *Peruvianum* se describieron aquellas especies que tenían dificultad de cruce con la especie cultivada, mientras que *Esculentum* presentaba especies principalmente autocompatibles y que cruzaban bien con el tomate cultivado. Por último, Child (1990), realizó un estudio basado en caracteres morfológicos que permitió incluir de nuevo el género *Lycopersicon* dentro de *Solanum*. Otros estudios lo reforzaron y en 2008, Peralta et al. propusieron una clasificación dividida en tres secciones: *Lycopersicon*, *Lycopersicoides* y *Juglandifolia*. Actualmente el tomate cultivado se conoce como *Solanum lycopersicum* L., dentro de la sección *Lycopersicon* (Peralta y Spooner, 2000).

El tomate y las 16 especies más relacionadas se incluyen dentro del género *Solanum*, tal y como se observa en la Tabla 1 (Peralta et al., 2008). Proviene de las altas altitudes de las costas occidentales de Sudamérica, principalmente Perú, Ecuador y Norte de Chile. La domesticación del tomate ha ido disminuyendo la variabilidad genética de la especie, lo cual hace de las especies silvestres, una fuente inmensa de recursos genéticos y con grandes expectativas para la mejora genética de este cultivo y en particular para el desarrollo de poblaciones de premejora. En cuanto al tomate cultivado, es capaz de cruzar con todas las especies de la sección *Lycopersicon*, aunque existen diferencias de cruzabilidad entre ellas: por ejemplo, con las especies *S. pennellii*, *S. pimpinellifolium*, *S. chmielewskii* y *S. neorickii*, el cruce resulta sencillo. En cambio, presenta importantes barreras de incompatibilidad con las especies que constituyen las secciones *Lycopersicoides* y *Juglandifolia*. Sin embargo, también hay casos dentro de la sección *Lycopersicon* que presentan dificultades cuando se quiere obtener el híbrido interespecífico, como sucede con *S. peruvianum*.

Tabla 1. Clasificación de las especies relacionadas con el tomate cultivado (Peralta et al., 2008)

Sección	Grupo	Especie
<i>Lycopersicon</i>	<i>Lycopersicon</i>	<i>S. cheesmaniae</i> (L. Riley) Fosberg <i>S. galapagense</i> S. Darwin & M.I. Peralta <i>S. lycopersicum</i> L. <i>S. pimpinellifolium</i> L.
	<i>Neolycopersicon</i>	<i>S. pennellii</i> Correll
	<i>Eryopersicon</i>	<i>S. chilense</i> (Dunal) Reich <i>S. corneliomuelleri</i> J.F. Macbr. <i>S. habrochaites</i> S. Knapp & D.M. Spooner <i>S. huaylasense</i> Peralta & S. Knapp <i>S. peruvianum</i> L.
	<i>Arcanum</i>	<i>S. arcanum</i> Peralta <i>S. chmielewskii</i> (C.M. Rick, keisicki, Fobes&M.Holle) D.M. Spooner, G.J Anderson & R.K. Jansen <i>S. neorickii</i> D.M. Spooner, G.J Anderson & R.K. Jansen
<i>Lycopersicoides</i>		<i>S. lycopersicoides</i> Dunal <i>S. sitiens</i> I.M. Johnst
<i>Juglandifolium</i>		<i>S. juglandifolium</i> Dunal <i>S. ochrantum</i> Dunal

En esta situación, se debe recurrir a distintas técnicas que permitan superar las barreras de cruzabilidad. El rescate de embriones inmaduros es una de las técnicas más empleadas para superar las barreras postcigóticas, las cuales también pueden persistir en las generaciones posteriores. En algunos casos más favorables, con algunas entradas, no es necesario realizar el rescate de embriones, no obstante, al ser una especie alejada del tomate cultivado, el número de semillas que se obtengan puede ser muy pequeño (Fulton et al., 1997a).

1.2 *Solanum peruvianum*

La especie *S. peruvianum* pertenece a la sección *Lycopersicon*, en concreto al grupo *Eriopersicon*. Morfológicamente, las plantas se caracterizan por ser pequeñas, con hojas y tallos pubescentes. Las flores están abiertas, con estambres curvados y son de color amarillo. Los frutos son verdes o blanquecinos y morados, redondos con un diámetro aproximado de 1-1,5 cm. Éstos contienen numerosas semillas de color marrón y de tamaño inferior al de la

especie cultivada. *S. peruvianum* se desarrolla frecuentemente en las formaciones de lomas, o bien, en desiertos costeros (Peralta et al., 2005). Crece a elevadas altitudes por los territorios de Sudamérica, sobre todo en Perú y en el Norte de Chile. Esta especie se caracteriza por su autoincompatibilidad estricta y por ser muy variable genéticamente. La especie anteriormente conocida como *Lycopersicon peruvianum* (L.) Miller, ha sido dividida en cuatro especies en la propuesta de Peralta et al. (2005): *S. corneliomuelleri* J.F. Macbr., *S. huaylasense* Peralta & S. Knapp y *S. arcanum* Peralta, además de *S. peruvianum*. La amplia base genética hace de ella un gran recurso en la mejora. Por ejemplo, es tolerante a estreses abióticos, como la sequía, y también posee genes de resistencia para determinados estreses bióticos, parte de los cuales ya han sido introgresados en variedades comerciales. Algunos de estos genes son: *Pyl*, que proporciona resistencia al hongo *Pyrenochaeta lycopersici* (Laterrot, 1978); los genes *Mi*, que confieren resistencia a nemátodos del género *Meloidogyne* (Gilbert, 1958); y los genes *Tm-2* (Laterrot y Pecaut, 1969) y *Tm-2²* (Hall, 1980) de resistencia al virus del mosaico del tomate (*Tomato mosaic virus*, ToMV).

En concreto, la entrada PI 126944, presenta especial interés ya que se ha descrito como resistente a distintos patógenos: al virus del bronceado del tomate (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) (Paterson et al., 1989); al virus del mosaico del tabaco (*Tobacco mosaic virus*, TMV) (Yamakawa y Nagata, 1975); al hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Rowe y Farley, 1981) y al virus del rizado amarillo del tomate (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV) (Picó et al., 1998; Pilowsky y Cohen, 2000). Hace algunos años, el grupo de trabajo obtuvo tres híbridos interespecíficos entre PI 126944 y el tomate cultivado (Picó et al., 2002), a partir de los cuales se desarrollaron nuevas generaciones, que se probaron por su resistencia a TYLCV y a TSWV. Los resultados mostraron que la resistencia se mantiene en algunos de los materiales derivados (Pérez de Castro et al., 2008; Julián et al., 2013). Dado el interés en mejora de las generaciones obtenidas, se inició a partir de ellas la construcción de una población de líneas de Introgresión (*Introgression lines*, ILs).

1.3 Naturaleza de las barreras de cruzabilidad entre *S. lycopersicum* y *S. peruvianum*

Existen barreras de cruzabilidad entre *S. peruvianum* y *S. lycopersicum* que dificultan la posibilidad de introgresar caracteres de interés en la especie cultivada. Así, es importante estudiar dichas barreras para poder diseñar técnicas que permitan superarlas. Estas barreras pueden actuar a dos niveles: precigótico o postcigótico. Entre *S. lycopersicum* y *S. peruvianum* las barreras existentes son de tipo postcigótico.

1.3.1 Barreras de cruzabilidad postcigóticas

En los cruzamientos entre *S. lycopersicum* y *S. peruvianum* existen varias barreras postcigóticas. Las barreras postcigóticas se dividen en aquellas que producen efectos sobre el embrión causando su muerte, o bien, aquellas relacionadas con la inviabilidad de los propios híbridos o su esterilidad. En el primer caso, la causa principal que provoca el aborto del embrión es la falta de nutrición del mismo. Este suceso ocurre cuando el tejido suspensor, que

transporta nutrientes y hormonas específicas al embrión desde el endospermo, no realiza adecuadamente su función. Otro factor que provoca una mala nutrición del embrión, es la degeneración temprana del endospermo. Según Barbano y Topoleski (1984) la completa degeneración ocurre 10 días después de la polinización (ddp), aunque estos tiempos varían dependiendo de la entrada utilizada. Tras la degeneración, a partir de 17 días, el embrión sigue desarrollándose anormalmente. A los 30-40 ddp se produce el aborto definitivo del embrión; no obstante, el fruto llega a desarrollarse dando lugar a semillas abortadas (Barbano y Topoleski, 1984).

En el segundo caso, tenemos las barreras postcigóticas relacionadas con la inviabilidad y esterilidad de los híbridos. Con el fin de entender dicho mecanismo, se han realizado varios estudios basados en la búsqueda de QTLs asociados a esterilidad a partir de colecciones de ILs. Por ejemplo, Eshed y Zamir (1995), en su estudio con ILs del cruce entre tomate cultivado y *S. pennellii*, detectaron 10 QTLs relacionados con la esterilidad del polen y 4 relacionados con fallos en la semilla híbrida procedente del cruce. En cualquier caso, no se ha encontrado ningún QTL que confiera esterilidad completa.

Por otro lado, estudios a nivel cromosómico, revelan que la causa podría estar relacionada con la reordenación cromosómica y la falta de homología entre genomas, lo cual afecta directamente a las especies silvestres (Bedinger et al., 2010).

1.3.2 Técnicas especiales para superar las barreras de cruzabilidad postcigóticas

Con el fin de superar las barreras postcigóticas se debe recurrir a la extracción de los embriones híbridos o semillas del fruto antes de su aborto y a su posterior cultivo en un medio artificial para su germinación. Así, podemos diferenciar varias técnicas de rescate como son: el cultivo de óvulos y ovarios, el cultivo de embriones y el cultivo de semillas inmaduras.

- Cultivo de óvulos y ovarios
Para aplicar esta técnica, se recolectan los ovarios entre 1-12 ddp, según la especie. Se extraen los óvulos y se colocan en el medio artificial favorable para su desarrollo. En casos de aborto extremadamente temprano, se cultivan directamente los ovarios, que se separan de la flor entre 12-15 ddp, en un medio artificial. Por último, los embriones se escinden cuando son visibles y se cultivan en el medio adecuado a sus necesidades de desarrollo (Chen Adachi et al., 1992).
- Cultivo de embriones
Esta técnica, una de las más empleadas actualmente, consiste en extraer los embriones de los óvulos y cultivarlos en un medio estéril que les permita desarrollarse y germinar. La dificultad de esta técnica reside en adaptar los requerimientos nutricionales al estado de desarrollo del embrión. El momento idóneo para rescatar los embriones procedentes del cruce *S. lycopersicum* x *S. peruvianum* es a los 25 ddp (Cap et al., 1991; Kharkongar et al., 2013).

El desarrollo del embrión puede llevarse a cabo en medios distintos, según el estado de desarrollo. En función de ello, se desarrollará directamente o seguirá la vía organogénica, pasando por la fase de callo. Por tanto, si está en fase temprana o globular, suplementaremos el medio con los nutrientes adecuados y el embrión seguirá la vía organogénica. En cambio, si está en una fase avanzada, en estado de corazón o torpedo, el medio estará libre de reguladores y el embrión se desarrollará directamente. En *Solanum*, Smith en 1944, fue el primero en obtener híbridos interespecíficos empleando esta técnica.

- Cultivo de semillas inmaduras

Esta técnica es una variante del cultivo de embriones, que se utiliza cuando las especies silvestres del cruce presentan fuertes barreras de cruzabilidad. En esta situación, es muy complicado el cultivo en el medio artificial y, por esta razón, se cultivan directamente las semillas inmaduras. Se traspasan los callos a un medio de regeneración de ápices y, luego, los brotes se transfieren a un medio de enraizamiento (Cap et al., 1991; Segeren et al., 1993; Pratta et al., 1999; Silva da Costa Ribeiro, 2001).

En 2002, Picó et al, lograron la obtención de varios híbridos interespecíficos entre *S. lycopersicum* y la entrada PI 126944 de *S. peruvianum*, aplicando esta técnica.

1.4 Poblaciones de premejora

La mejora tradicional basada en el aprovechamiento de especies silvestres, se ha realizado tradicionalmente mediante la obtención inicial del híbrido interespecífico y la realización posterior de retrocruces sucesivos hacia la especie cultivada hasta conseguir la introgresión del carácter deseado. Esta técnica es costosa y lenta. Con el fin de aprovechar más eficientemente el potencial genético de las especies silvestres, se han desarrollado las poblaciones de premejora.

Las poblaciones de premejora son conjuntos de líneas, cada una de las cuales contiene una fracción del genoma de la especie silvestre en el fondo genético de la especie cultivada. Su desarrollo también es costoso y largo, pero presenta una serie de ventajas que lo justifican: permite el aprovechamiento de genes menores gracias a la fragmentación del genoma; son poblaciones directamente aprovechables en mejora, al ser una gran proporción de su genotipo de la especie cultivada, y facilitan el cartografiado de genes o de regiones implicadas en caracteres cuantitativos (*Quantitative Trait Loci*, QTLs).

Existen diversos tipos de poblaciones de premejora, aunque todas están basadas en el mismo concepto. A continuación, se describen las poblaciones más estables y que más se utilizan en la práctica.

1.4.1 Líneas recombinantes consanguíneas

Las líneas recombinantes consanguíneas (*Recombinant Inbred Lines*, RILs) se obtienen a partir de un cruce inicial entre una variedad de la especie cultivada (parental recurrente) y una entrada de la especie silvestre (parental donante). A partir de la F1 se realizan autofecundaciones sucesivas hasta conseguir un conjunto de plantas homocigóticas, pero distintas debido a que contienen diferentes combinaciones alélicas. Se trata de un material estable, por lo que pueden llevarse a cabo ensayos en diferentes localidades y ambientes. Sin embargo, hay una elevada contribución del parental donante, lo cual dificulta la evaluación de algunos caracteres. En tomate, las RILs se han utilizado para mapear QTLs relacionados con el peso del fruto, sólidos solubles, tolerancia a estreses abióticos y otros caracteres de interés (Foolad, 2007).

1.4.2 Retrocruces avanzados

Las generaciones de retrocruces avanzados (*Advanced Backcross Populations*, AB) se inician con un cruce entre dos genotipos que suelen ser una especie silvestre y una especie cultivada. La progenie obtenida se va retrocruzando hacia el parental recurrente sucesivamente, con el objetivo de conseguir un conjunto de plantas que contengan el genoma completo del parental donante dividido en pequeños fragmentos sobre el fondo genético de la especie cultivada.

Las AB son más inestables que las RILs, ya que el grado de fijación es menor. No obstante, pueden añadirse varias generaciones de autofecundación, obteniéndose materiales de retrocruces avanzados con autofecundación (*Backcross Inbred Lines*, BILs) con una estabilidad similar a las RILs. En general, el uso combinado de AB y BILs puede llegar a resultar incluso más útil que las RILs, ya que hay menor proporción del genoma del parental donante. Este tipo de poblaciones se han utilizado en mejora de tomate para mapear QTLs relacionados con resistencia a hongos y virus, tolerancia a estreses abióticos, entre otros (Foolad, 2007).

1.4.3 Líneas de introgresión

En el proceso de obtención de las líneas de introgresión (*Introgression Lines*, ILs) se realizan más generaciones de retrocruce que en los procesos para AB y BILs, por lo que los fragmentos introgresados en las líneas finales son más pequeños (Figura 1). El resultado ideal que se espera conseguir es que cada línea contenga un único fragmento del genoma de la especie silvestre diferente al que poseen las demás líneas y que, en conjunto, todo el genoma esté representado. Para asegurar la máxima cobertura del genoma del parental donante y un

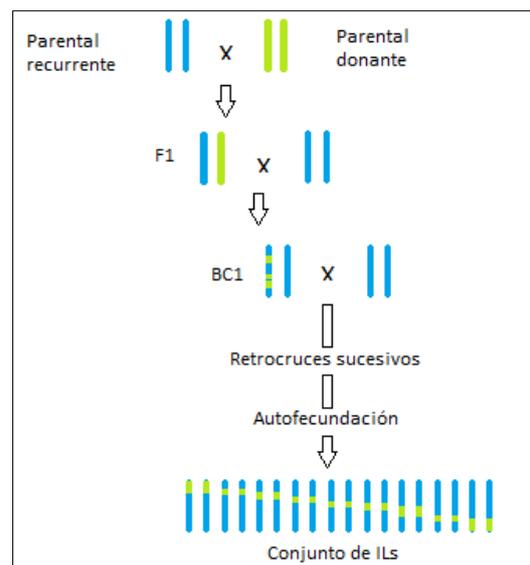


Figura 1. Esquema representativo del desarrollo de una población de ILs

elevado grado de homocigosis, se realiza una selección asistida por marcadores en todas las generaciones.

Las ILs son líneas casi isogénicas (*Near Isogenic Lines*, NILs) con respecto al parental recurrente, es decir, difieren del parental recurrente únicamente en una región muy pequeña del genoma. Además, son las poblaciones más eficientes para cartografiado y no hay interferencias entre genes y QTLs. Sin embargo, esto puede ser un inconveniente, ya que impide observar la interacción entre genes y QTLs. Con todo, el principal inconveniente de las ILs es el largo proceso de su obtención. Las colecciones de ILs en tomate se han utilizado para el mapeo de QTLs relacionados con caracteres como el rendimiento, la calidad del fruto o la resistencia a enfermedades (Foolad, 2007).

1.4.4 Poblaciones de premejora desarrolladas con las diferentes especies silvestres relacionadas con el tomate

A partir de los años 90 empezaron a desarrollarse distintas poblaciones de premejora con especies silvestres relacionadas con el tomate cultivado. Las especies más utilizadas fueron *S. pennellii*, *S. habrochaites* y *S. pimpinellifolium*, puesto que son cercanas al tomate y presentan buena cruzabilidad.

Por ejemplo, con la entrada LA716 *S. pennellii* se obtuvo una colección de 50 ILs, consiguiéndose la cobertura completa del genoma del parental donante (Eshed y Zamir, 1995). En 1995, se amplió la colección hasta 76 líneas, utilizando marcadores RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). A partir de esta población se mapearon 104 QTLs y, más tarde, se realizó una población de sub-ILs para mapeo más fino. Posteriormente, esta población ha sido reutilizada, obteniéndose hasta 500 sub-ILs y llegando a identificarse 2795 QTLs (Lippman et al., 2007). Dicha población ha permitido extraer conclusiones como la existencia de la segregación transgresiva, es decir, la aparición de fenotipos extremos que pueden suponer una mejora; además, ha aportado información sobre el carácter de la heterosis y se ha comprobado que la superdominancia está relacionada con caracteres reproductivos (Semel et al., 2006).

Respecto a la especie *S. pimpinellifolium*, a partir de la entrada LA1589 se desarrolló una población de 196 BILs (BC_2F_6) y fueron seleccionadas 100 líneas con el fin de representar el genoma completo de la especie silvestre. A continuación, se identificaron 71 QTLs de los cuales el 48% aportaba una mejora a la especie cultivada, como un color rojo del fruto más intenso (Doganlar et al., 2002). A partir de otra entrada de *S. pimpinellifolium*, LA2093, también se obtuvo una población de 170 RILs, que fue empleada para crear un mapa de ligamiento, del cual se dedujeron genes candidatos de respuesta a patógenos (Ashrafi et al., 2009). La última población de ILs a partir de *S. pimpinellifolium* ha sido desarrollada más recientemente (Barrantes et al., 2014) y se ha utilizado para cartografiar QTLs relacionados con caracteres agronómicos y de fruto.

En el caso de la entrada LA1777 de *S. habrochaites* se desarrollaron 200 líneas BC_3 y se identificaron 121 QTLs. Entre ellos, había 25 QTLs del alelo silvestre que presentaban una

mejora en la especie cultivada (Bernacchi et al., 1998). A partir de la población BC₃, se identificaron 99 ILS con las que se logró un 85% de cobertura del genoma de la especie silvestre. También se empleó la entrada LA407, de la misma especie, para desarrollar ILS. Basándose en estas líneas, la entrada LA407 se describió como parcialmente resistente a la bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Francis et al., 2001).

Por otro lado, a pesar de estar más alejada filogenéticamente del tomate cultivado y de tener muchas barreras de cruzabilidad, *S. lycopersicoides* también ha sido empleada para desarrollar poblaciones de premejora. Se pudo obtener una población de ILS, logrando un 96% de cobertura del genoma de la especie silvestre (Canady et al., 2005).

Con *S. peruvianum*, todavía no se ha desarrollado una población de ILS, pero sí otras poblaciones de premejora. En 1997, se obtuvo una generación BC₄ de 200 familias a partir de un cruce entre *S. lycopersicum* cv "E6203" y *S. peruvianum* LA1706 (Fulton et al., 1997a). Sin embargo, únicamente un 10% de las semillas del primer retrocruce fueron viables, dada la persistencia de las barreras de incompatibilidad. A partir de ellas se generaron 241 familias BC₃, se llevó a cabo a un genotipado con 177 marcadores RFLPs y se realizó un mapa de ligamiento en el cual se consiguió representar un 67% del genoma de la especie silvestre. A partir de las 220 familias de la BC₄, se identificaron 166 QTLs relacionados con 29 caracteres, como firmeza, peso o calidad del fruto. Además, para algunos caracteres, como el contenido en sólidos solubles, viscosidad o rendimiento, presentaron al menos un QTL en el que los alelos silvestres, aportaban una mejora agronómica a la especie cultivada. Una vez identificados los QTLs favorables, se realizó una comparación entre los resultados obtenidos con *S. peruvianum* y los obtenidos con *S. habrochaites* y *S. pimpinellifolium*. Se observó que había QTLs en común, aunque existían diferencias con respecto al alelo silvestre. Un ejemplo es el QTL responsable del color del fruto, en *S. peruvianum* y *S. habrochaites*, el alelo silvestre se relacionó con una disminución del color, mientras que en *S. pimpinellifolium* se asoció con un aumento en la intensidad del color rojo.

En conclusión, a pesar de la distancia filogenética existente entre los dos parentales, el porcentaje de recombinación fue mayor de lo esperado, lo cual indica que existe más similitud de la esperada entre cromosomas homólogos (Fulton et al., 1997a). No obstante, hasta la obtención de la población BC₄, *S. peruvianum* sólo se había utilizado para introgresar genes de resistencia a enfermedades (Fulton et al., 1997b).

2. OBJETIVOS

La mejora genética del tomate se fundamenta en gran medida en el aprovechamiento de las especies silvestres relacionadas, dada la estrecha base genética de este cultivo. *Solanum peruvianum* es una de las especies más alejadas filogenéticamente, pero de gran interés debido a que se han identificado en ella numerosos genes de resistencia a enfermedades y a estreses abióticos. Hace varios años, el grupo de investigación obtuvo varios híbridos interespecíficos entre la entrada PI 126944 y el tomate cultivado (Pico et al., 2002). El interés concreto de esta entrada radicaba en su resistencia frente a enfermedades virales. A partir de estos híbridos se desarrollaron varias generaciones de retrocruzamiento y autofecundación. Dada la existencia de estos materiales de mejora intermedios, se decidió construir una población de líneas de introgresión con el objeto de aprovechar el proceso de introducción de los genes de resistencia y poder cartografiarlos de manera precisa. En el momento de empezar este trabajo se disponía de varias generaciones “F₄”, “F₅” y “F₆”, así como del primer y segundo retrocruce hacia tomate cultivado de alguna de estas generaciones. A partir de este punto se inicia este trabajo cuyos objetivos concretos son:

- Obtener el siguiente retrocruce hacia la especie cultivada de varias de estas generaciones mediante el rescate de las semillas inmaduras en distintas fechas después de la polinización, cultivándolas posteriormente *in vitro*.
- Genotipado de las plantas obtenidas mediante marcadores moleculares tipo CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*) polimórficos entre tomate y *S. peruvianum*, con objeto de confirmar la presencia de fragmentos de la especie silvestre.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material vegetal

En trabajos anteriores del grupo, la línea NE-1 de *S. lycopersicum* se cruzó, como parental femenino, con la entrada PI 126944 de *S. peruvianum*. Se obtuvieron tres híbridos, F₁-B, F₁-E y F₁-A mediante rescate de embriones, siendo los tres autoincompatibles (Picó et al., 2002). Con el híbrido F₁-B se realizaron tres retrocruces sucesivos hacia la línea de tomate Fortuna C (FC), una variedad de tomate obsoleta conservada en el Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV). Dichos retrocruces (BC₁, BC₂ y BC₃) se obtuvieron gracias a la técnica de rescate de embriones, aunque en el tercer retrocruce (BC₃) hacia FC, se consiguió semilla viable sin utilizar esta técnica.

Por otro lado, debido a la incompatibilidad entre el tomate cultivado y *S. peruvianum*, el número de plantas obtenidas mediante retrocruzamiento fue reducido, de forma que no representaba por completo el genoma de la especie silvestre. Por esta razón, se realizaron cruces adicionales. Debido a la autoincompatibilidad que presentaban los híbridos interespecíficos, no podían autofecundarse, por lo que los cruces adicionales se realizaron entre ellos. Del cruce entre los híbridos F₁-B y F₁-E, se obtuvo una pseudo-F₂ ("F₂"), es decir, plantas que no procedían de autofecundación de plantas F₁, sino de un cruce entre dos de ellas. De este modo, se consiguió obtener progenie hasta la generación pseudo-F₆ ("F₆"), siendo aún persistente la autoincompatibilidad. A su vez, con las pseudo-F₂ y la pseudo-F₃ ("F₃") se realizaron diferentes retrocruces hacia FC, mediante la técnica de rescate de embriones, hasta obtener una "F₃"-BC₂ y una "F₂"-BC₁. Todos estos materiales han sido desarrollados en trabajos anteriores realizados en el COMAV (Picó et al., 2002; Pérez de Castro et al., 2008; Julián et al., 2013), (Figura 2).

A partir de algunos de estos materiales se planteó el presente Trabajo Fin de Grado. Como parental femenino se utilizó la variedad de tomate Fortuna C. Como parentales masculinos se utilizaron 23 plantas, pertenecientes a las generaciones "F₄"-BC₁ (3 plantas), "F₅"-BC₁ (9 plantas), "F₅"-BC₂ (4 plantas) y "F₆"-BC₁ (7 plantas) (Tabla 2).

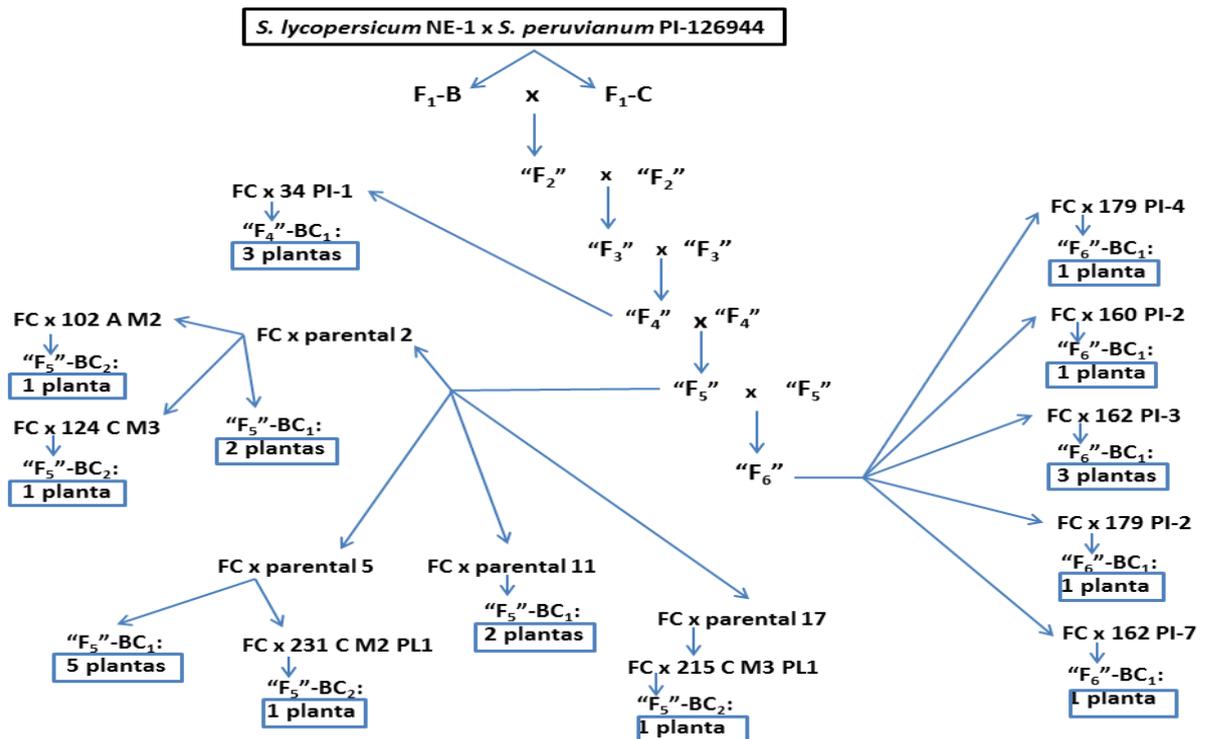


Figura 2. Genealogía del material vegetal incluido en este trabajo. Encuadrados en azul aparece el número de plantas de cada generación utilizadas en los cruces

Tabla 2. Genealogía de las plantas de las generaciones utilizadas en el presente trabajo. Sombreados en azul se destacan los códigos de las plantas empleadas como parentales masculinos

Generaciones								
"F4"	"F4"- BC1	"F5"	"F5"- BC1	"F5"-BC2	"F6"	"F6"- BC1		
34 PI-1		2	67 A M3		162 PI-7	IAA + 2IP FR 385		
			171 A M3					
			124 C M3	81 C1	160 PI-2	16 C M2		
			102 A M2	70 P1				
		5	285 M2 PL 1	292 M2 PL 1		162 PI-3		
				367 M2				13 A M3
				367.1 M3				13 A M3 callo 2
				378.1 M3				13 A M3 callo 3
		11	41 E M3	385.1 M2		179 PI-2	300 M2 PL1	
				231 C M2 PL1	13.2 C1			
		17		327 M2		179 PI-4	510 C1	
				272 M2				
				17	215 C M3 PL 1	12.2 P1		

3.2 Métodos

3.2.1 Realización de los cruzamientos

Los cruzamientos se realizaron en dos invernaderos pertenecientes al COMAV y situados en el campus de la Universitat Politècnica de València (UPV). Las características técnicas de ambos invernaderos fueron distintas. Aunque ambos disponían de sistema de calefacción, ésta no se puso en funcionamiento hasta el final del periodo en el que se realizaron las polinizaciones, que transcurrió desde finales de septiembre hasta principios de diciembre. Las operaciones básicas para la realización de hibridaciones artificiales en flores hermafroditas, como son las de tomate, son la emasculación de los estambres en estado inmaduro en el parental femenino y la polinización con polen del parental masculino.

La emasculación de las flores femeninas se realizó en estado inmaduro, cuando aún no estaban completamente abiertas y el color de los pétalos era verde amarillento. Con ayuda de unas pinzas se eliminaron los estambres, dejando únicamente los órganos femeninos de la flor, protegidos por los pétalos y los sépalos. Entre la emasculación y la polinización se dejó transcurrir un período de 24 horas con objeto de que se completara la madurez fisiológica del pistilo. Para llevar a cabo la polinización se cogió una flor completamente madura del parental masculino y, tras realizarle una incisión en el cono de anteras con ayuda de unas pinzas para facilitar la extracción del polen, se golpeó sobre una placa Petri, donde quedó depositado el polen. A continuación, se eliminaron los sépalos de las flores femeninas previamente emasculadas para facilitar la unión física del polen y el estigma. Al realizarse las polinizaciones en invernadero a prueba de insectos no fue necesario embolsar las flores tras el proceso. En caso de realizarse al aire libre sí hubiese sido necesario para evitar la llegada de polen no deseado, ya sea mediante insectos polinizadores o por el viento.

3.2.2 Rescate de semillas inmaduras

El rescate de las semillas inmaduras se llevó a cabo con frutos recogidos a los 25, 30 y 35 días después de la polinización (ddp). Para el cultivo de las semillas inmaduras, se utilizaron placas Petri con el medio 2 (Tabla 3), que fue el que mejor resultado dio en trabajos previos realizados por el grupo (Díez et al., 2014). El procedimiento para la apertura de los frutos fue el mismo en todos los casos. En primer lugar, se depositó el fruto en un recipiente que contenía una solución de etanol al 70%, durante 30 segundos, para desinfectar la parte exterior. Posteriormente, se abrió el fruto quitándole el pericarpio y se extrajeron las semillas, descartando aquellas con muy escaso desarrollo y con aspecto de no contener embrión. Las semillas así obtenidas se desinfectaron durante 14 minutos, en 200 mL de agua esterilizada con hipoclorito sódico (NaClO) al 0,1% y por último se enjuagaron con agua esterilizada (Pico et al., 2002). A continuación, se depositaron en placas Petri en el medio de cultivo descrito en la Tabla 2. A la mitad de las semillas se les practicó una incisión en la región de la chalaza, con ayuda de una aguja estéril, depositándolas posteriormente en el medio de cultivo de forma que la región de corte estuviera en contacto con el medio. La otra mitad se sembraron sin incisión alguna. Posteriormente se dejaron durante 7 días cubiertas con papel de aluminio para

simular las condiciones internas de oscuridad del fruto a una temperatura de 24-26 °C. Durante todo el proceso, el material se conservó en una cámara de cultivo con luz fluorescente durante 16h/día. La evaluación de la respuesta *in vitro*, se realizó mediante controles de las placas al mes de realizada la siembra de las semillas. Posteriormente, se realizaron nuevas revisiones, eliminando definitivamente las placas en las que no se observó ningún cambio.

Tabla 3. Componentes del medio de cultivo (Díez et al., 2014)

Componentes ¹	Concentración
Medio MS ² más vitaminas	4,414 (g/L)
Sacarosa	30 (g/L)
Zeatina	0,2 (mg/L)
Agar	7 (g/L)

¹pH= 5,7

²Murashige y Skoog (1962)

3.2.3 Genotipado

El genotipado del material vegetal se realizó con marcadores moleculares CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*), descritos previamente como polimórficos entre el tomate cultivado y la entrada PI 126944 (Julián et al., 2013). Se genotiparon aquellas plantas de las cuales fue posible obtener tejido. A continuación se describe el proceso que se siguió para realizar el genotipado.

3.2.3.1 Extracción DNA

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

- 1) Recoger aproximadamente 75 mg (tres folíolos pequeños) de material vegetal en un tubo Eppendorf de 1,5 ml.
- 2) Introducir los tubos con el material vegetal en nitrógeno líquido.
- 3) Triturar el material vegetal con ayuda de un mortero de plástico.
- 4) Añadir 500 µl de tampón de extracción CTAB (Anexo I). Mezclar el contenido del tubo por agitación e incubar a 65°C durante 30 minutos en baño o bloque térmico.
- 5) Añadir 450 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). A continuación, agitar la mezcla hasta obtener una emulsión verdosa.
- 6) Centrifugar durante 10 minutos a 15.700 xg.
- 7) Recuperar de la fase acuosa, que contiene el DNA, y transferir a un tubo nuevo (aproximadamente 400 µl).
- 8) Añadir de 1 volumen de isopropanol frío.
- 9) Mantener durante 5 minutos en hielo.

- 10) Centrifugar durante 10 minutos a 15.700 xg.
- 11) Eliminar el sobrenadante y añadir 100 µl de etanol al 70% para lavar el precipitado.
- 12) Centrifugar durante 5 minutos a 15.700 xg. Eliminar el etanol y dejar secar el precipitado durante 5 minutos.
- 13) Resuspender el precipitado en 50 µl de tampón TE (Anexo I) al que se ha añadido ARNasa y conservar a -20°C.

3.2.3.2 Cuantificación de DNA

Para comprobar la integridad del ADN y cuantificarlo, se separó el ADN extraído del material vegetal mediante electroforesis en gel de agarosa. La muestra que se cargó en un gel de agarosa al 1% en tampón TBE 1X (Anexo II), consistió en 1 µl de la extracción, 9 µl de agua y 2 µl 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 3). En el gel se cargó una mezcla de 0,5 µl de marcador, 9,5 µl de agua milliQ y 2 µl de tampón LB 6X.

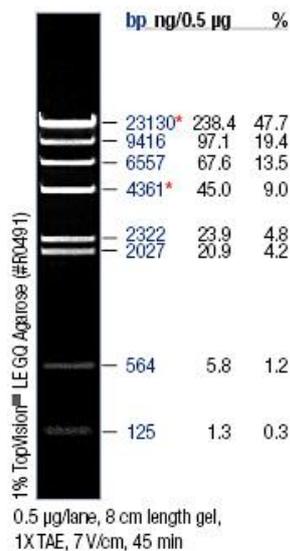


Figura 3. Marcador “Lambda DNA/HindIII” (Fermentas)

La tinción del gel se realizó en una solución de bromuro de etidio a una concentración de 0,5 µg/ml, durante 20 minutos.

3.2.3.3 Marcadores CAPS

Las secuencias polimórficas amplificadas y cortadas, o CAPS, son secuencias que se han amplificado mediante PCR y que se digieren mediante una enzima de restricción. La presencia o ausencia de sitios de restricción en el fragmento amplificado es lo que genera el polimorfismo.

El genotipado mediante CAPS se inició con una reacción de amplificación por PCR. A continuación el producto de PCR se digirió, cuando fue necesario, con la enzima de restricción que revelaba el polimorfismo. Finalmente, se separó el producto de la digestión mediante electroforesis en un gel de agarosa.

PCR

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

- 2,5 μ l de buffer 10X con una concentración de 15 mM de MgCl₂
- 1 μ l de MgCl₂ 25 mM
- 1 μ l de cebador directo a 10 μ M
- 1 μ l de cebador reverso a 10 μ M
- 1 μ l de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) a 10 mM
- 0,16 μ l de Taq polimerasa a una concentración de 5 unidades/ μ l
- 1 μ l de ADN molde a una concentración de entre 40 y 100 ng/ μ l

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

La PCR se llevó a cabo con una etapa inicial de desnaturalización, seguida por 35 ciclos de desnaturalización, hibridación y extensión, para finalizar con una extensión final (Tabla 4).

Tabla 4. Perfil térmico de la reacción de amplificación para los marcadores CAPS

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización inicial	94	5 min
Desnaturalización	94	30 s
Hibridación	55 ¹	1 min
Extensión	72	X ²
Extensión final	72	10 min

} 35 ciclos

¹La temperatura de hibridación varía en función del marcador aunque, en este caso, para todos los marcadores, la temperatura fue de 55°C.

²Según la longitud del fragmento a amplificar, cada 500 pb se adicionaron 30 segundos (Tabla 5).

La reacción de amplificación se realizó en un termociclador *Eppendorf Mastercycler*.

Tabla 5. Marcadores CAPS utilizados para el genotipado de las plantas elegidas para este trabajo

Marcador	Cromosoma	cM (Tomato-EXPEN2000)	Enzima de restricción	Temperatura de hibridación (°C)	Tiempo de extensión	Secuencia cebadores (5' → 3')
C2_At4g04955	2	63,5	<i>Hinfl</i>	55	30 s	TTGCTGTGGGGAACCAAGCAGATATAG
						TCCAGAGAGTCTTGATCCCATGTATGC
C2_At3g26900	2	142	<i>HaeIII</i>	55	1min	CCAAGGCATGACGTTAATTG
						TCTTTTCCATGTGTCAGTCAAC
C2_At3g46780	6	4	-	55	1 min 30 s	ATGGCTCCAACCTTACTTCAAATTC
						TCTGCATCTTGAAATGATGATGCAAC

ELECTROFORESIS

Para visualizar los productos de PCR se llevaron a cabo electroforesis utilizando geles de agarosa al 1% (peso/volumen) con tampón TBE 1X (Anexo II). Se añadieron 5 µl del producto de la PCR a una mezcla de 2 µl de tampón de carga LB 6X y 5 µl 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 (0,5µg/µl)” que permite determinar el tamaño de fragmentos de hasta 1.000 pb y “GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus (0,5µg/µl)”, que posibilita la determinación del tamaño de fragmentos de hasta 3.000 pb.

La tinción se llevó a cabo como se indica en el apartado 3.2.3.2.

DIGESTIÓN

Una vez confirmado que la amplificación se había producido correctamente, se procedió a la digestión enzimática para los marcadores para los que no se detectaba polimorfismo a nivel de la PCR.

La digestión del producto amplificado se llevó a cabo en un volumen total de 20 µl, conteniendo en cada caso:

- 2 µl de tampón 10X para la enzima
- 0,1 µl de la enzima correspondiente (Tabla 5) a una concentración de 10 unidades/µl
- 10 µl del producto de la PCR
- 7,9 µl de agua milliQ.

La digestión se realizó en un termociclador *Eppendorf Mastercycler* durante un mínimo de 3h, a la temperatura adecuada para cada enzima. La temperatura fue de 37°C para las enzimas empleadas en este trabajo.

El producto de cada digestión se visualizó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2% (peso/volumen) con tampón TBE 1X, según lo descrito anteriormente (apartado 3.2.3.3). A cada muestra se añadió 4 µl de tampón LB 6X y se cargó un volumen de 12 µl en cada pocillo.

La tinción se llevó a cabo como se indica en el apartado 3.2.3.2.

3.2.4 Análisis estadísticos

Se realizaron análisis de la varianza (ANOVA tipo III) para las variables número de semillas por fruto y número de plantas obtenidas por fruto. Las diferencias entre medias se estudiaron mediante el test de Duncan con un nivel de significación del 95%.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En primer lugar se presentarán los resultados relativos al cuajado de los frutos obtenido a partir de las polinizaciones realizadas. Posteriormente, se analizará la respuesta obtenida de las semillas sembradas *in vitro*. Por último, se expondrán los resultados del genotipado de aquellas plantas cuyo estado de desarrollo permitió obtener tejido para la extracción de DNA.

4.1 Cuajado de los frutos

El número de cruces realizados en el invernadero 1 fue de 1444, obteniéndose 463 frutos cuajados. En el invernadero 2 se realizaron 1429, llegando a cuajar 125 frutos. En conjunto, el porcentaje de cuajado obtenido en el invernadero 1 fue de 32,1 %, mientras que en el invernadero 2 fue del 9,35 % (Tabla 6). Como se ha comentado anteriormente, las características técnicas y condiciones ambientales de ambos invernaderos eran muy diferentes. En el invernadero 1, de más reciente construcción, la luminosidad era mucho mayor, lo cual incidió de manera positiva en el cuajado de los frutos. Adicionalmente, aunque ambos invernaderos disponen de calefacción, por restricciones económicas de la UPV, ésta se puso en funcionamiento a finales de noviembre, cuando las temperaturas ya no eran las óptimas para un correcto cuajado de los frutos. De nuevo, el invernadero 2 sufrió un retraso adicional en la puesta en marcha de la calefacción. Esto condicionó de forma importante el éxito de las polinizaciones, convirtiéndose, a nuestro juicio, en el principal factor determinante del bajo porcentaje de cuajado obtenido.

La participación de los distintos parentales masculinos en los cruzamientos estuvo en función de la floración de los mismos. Estas plantas pertenecen a las generaciones "F₄"-BC₁, "F₅"-BC₁, "F₅"-BC₂ y "F₆"-BC₁. Sus características morfológicas son diferentes, al igual que la floración. Esto impidió hacer un diseño equilibrado de cruzamientos, utilizando en cada fecha de polinización los parentales que en esos momentos estaban en floración. También se intentó utilizar el número máximo de parentales masculinos, ya que el fin del proyecto en el que se enmarca este TFG es la obtención de un conjunto de líneas de introgresión y es conveniente utilizar el máximo número de parentales masculinos para disminuir la probabilidad de perder fragmentos del parental donante.

Tabla 6. Cruces realizados y porcentajes de cuajado obtenidos con todos los parentales utilizados en el ensayo. El 1 y el 2 hacen referencia a la numeración de cada uno de los invernaderos utilizados

Generación	Parental masculino	Nº flores polinizadas		Nº frutos cuajados		% Cuajado	
		1	2	1	2	1	2
"F ₄ "-BC ₁	285 M2 PL1	120	-	54	-	45	-
	381 M3	90	-	52	-	57,78	-
	41 E M3	52	99	17	1	32,69	1,01
Total "F₄"-BC₁		262	99	123	1	46,94	1,01
"F ₅ "-BC ₁	171 A M3	28	90	2	9	7,14	10
	272 M2	132	32	56	0	42,42	0
	292 M2 PL1	86	263	43	58	50	22,05
	327 M2	96	136	39	4	40,63	2,94
	367 M2	86	94	31	12	36,05	12,77
	367.1 M3	39	167	7	3	17,95	1,8
	378.1 M3	22	30	9	3	40,91	10
	385.1 M2	46	-	20	-	43,48	-
67 A M3	101	225	14	3	13,86	1,33	
Total "F₅"-BC₁		636	1037	221	92	34,75	8,87
"F ₅ "-BC ₂	12.2 P1	46	-	23	-	50	-
	13.2 C1	19	-	3	-	15,79	-
	70 P1	106	-	13	-	12,26	-
	81 C1	16	-	4	-	25	-
Total "F₅"-BC₂		187	-	43	-	23	-
"F ₆ "-BC ₁	13 A M3	13	11	2	0	15,38	0
	13 A M3 callo 2	64	-	10	-	15,63	-
	13 A M3 callo 3	67	-	14	-	20,9	-
	16 C M2	10	-	0	-	0	-
	300 M2 PL1	17	168	2	30	11,76	17,86
	510 C1	126	-	37	-	29,37	-
	IAA+2IP FR 385	62	-	11	-	17,74	-
Total "F₆"-BC₁		359	179	76	30	21,17	16,76
TOTAL		1444	1315	463	123	32,1	9,35

Independientemente de todos los factores señalados, se observaron diferencias notables para los porcentajes de cuajado de los distintos parentales pertenecientes a cada una de las generaciones. Entre los factores que pueden estar contribuyendo a este resultado están las fechas concretas en las que se utilizó cada parental, ya que no todos florecieron a lo largo de todo el periodo en el que se realizaron las polinizaciones. Como ejemplo, del parental 367.1

M3 todos los cruces del invernadero 2 se realizaron en un momento en que la calefacción no estaba en funcionamiento, de forma que esto pudo condicionar el hecho de que el porcentaje de cuajado fuese muy bajo. Otro de los factores que pudo influir fue el número de flores polinizadas, que varió entre 225 en el caso del parental 67 A M3 y 10 para el parental 16C M2. Aunque un alto número de flores polinizadas no asegura un porcentaje elevado de cuajado (tal y como sucede en el caso de las 225 flores polinizadas con el parental 67 A M3), es cierto que un menor número de flores polinizadas sí limita la obtención de frutos cuajados.

4.2 Respuesta obtenida del cultivo de semillas inmaduras

Del total de 587 frutos cuajados, se obtuvo semilla en 522 de ellos. Se sembraron 5302 semillas, de las cuales 2633 se depositaron en el medio después de practicarles una incisión, mientras que 2686 se sembraron cerradas. De los 522 frutos obtenidos, 226 dieron lugar a una “respuesta inicial *in vitro*”, que incluye todos los tipos de desarrollo iniciales que más adelante se detallan. El número total de semillas que dieron respuesta fue de 551, 140 de las cuales se habían sembrado cerradas y 411 después de practicarles una incisión. Por lo tanto, el rendimiento global de respuestas iniciales *in vitro* fue de 10,4%. A partir de estas respuestas iniciales se consiguió regenerar un total de 339 plantas, que llamaremos “plantas obtenidas”, es decir, aquellas respuestas iniciales que continuaron su desarrollo hasta dar una planta. De este modo, el rendimiento de plantas obtenidas fue del 6,4%.

Se realizaron evaluaciones mensuales de las semillas inmaduras sembradas *in vitro* hasta pasados tres meses después del rescate de la semilla. En el transcurso de las primeras evaluaciones se constató la existencia de varios tipos de respuesta. Así, se observaron respuestas claras que consistieron en la germinación directa del embrión o la formación de callo con desarrollo posterior de ápices. Sin embargo, además de estos dos tipos de respuesta, se observaron también otros desarrollos menos claros de las semillas sembradas que consistieron en inicios de germinación o formación de callo, en ambos casos de desarrollo más lento, la aparición de brotes sin ápices o formación únicamente de raíces y desarrollos anómalos (Tabla 7). En un principio se consideraron como respuesta todos los tipos de desarrollo descritos. En las posteriores evaluaciones se observó que no todos ellos llegaban finalmente a desarrollar una planta. Por este motivo, se consideraron los dos tipos de respuesta anteriormente descritos: la “respuesta inicial *in vitro*” que incluye todos los tipos de desarrollo nombrados y el número de “plantas obtenidas”.

Tabla 7. Respuestas iniciales observadas y plantas regeneradas

Tipo de respuestas	Respuestas <i>in vitro</i>	Plantas regeneradas	Respuestas <i>in vitro</i> (%)	Plantas regeneradas (%)*
Germinación directa	330	240	60	73
Brote con ápice a partir de callo	71	53	13	79
Inicio de germinación	48	13	9	27
Inicio de callo	30	12	5	41
Desarrollo de raíz	12	2	2	17
Brotos sin ápices	36	11	7	31
Desarrollo anómalo	27	3	5	11

***Este dato hace referencia al porcentaje de plantas regeneradas obtenidas con respecto a cada tipo de respuesta inicial**

La respuesta mayoritaria observada *in vitro* fue la germinación directa, seguida del desarrollo de brotes con ápices a partir de callo. Alrededor de un 75 % de estas respuestas llegaron a desarrollar una planta completa. El resto de respuestas presentó porcentajes variables de éxito. Los peores resultados se dieron cuando se desarrollaba únicamente una raíz o el desarrollo era anómalo, sin estructuras definidas.

Aleatoriamente se visualizó el estado de desarrollo del embrión en algunas de las semillas a las que se les practicó una incisión. En la mayor parte de los casos, el embrión se encontraba en estado torpedo o cotiledón, es decir, estados avanzados de desarrollo. Los estados globular y corazón fueron observados en muy pocas ocasiones y siempre en frutos recolectados a los 25 ddp.

Como se ha indicado anteriormente, los frutos cuajados se recogieron en distintas fechas después de la polinización con objeto de determinar el momento en el que se obtuvieran los mejores resultados (Tabla 8).

Tabla 8. Respuesta obtenida en los cruces realizados con los parentales de las distintas generaciones en función de los días después de la polinización (ddp) a los que se recogieron los frutos

ddp	Generación	Nº frutos	Nº semillas	Respuestas <i>in vitro</i>	Plantas obtenidas	Plantas obtenidas/Nº frutos	Plantas obtenidas/Nº semillas
25	"F ₄ "-BC ₁	40	527	48	24	0,60	0,05
	"F ₅ "-BC ₁	127	1070	74	50	0,39	0,05
	"F ₅ "-BC ₂	12	169	93	57	4,75	0,34
	"F ₆ "-BC ₁	20	91	10	4	0,20	0,04
	TOTAL/MEDIA	199	1857	225	135	0,68	0,07
30	"F ₄ "-BC ₁	41	433	40	26	0,63	0,06
	"F ₅ "-BC ₁	92	819	77	54	0,59	0,07
	"F ₅ "-BC ₂	14	135	47	28	2,00	0,21
	"F ₆ "-BC ₁	23	263	10	3	0,13	0,01
	TOTAL/MEDIA	170	1650	174	111	0,65	0,07
35	"F ₄ "-BC ₁	43	451	31	17	0,40	0,04
	"F ₅ "-BC ₁	96	807	63	32	0,33	0,04
	"F ₅ "-BC ₂	13	150	42	36	2,77	0,24
	"F ₆ "-BC ₁	56	258	16	8	0,14	0,03
	TOTAL/MEDIA	208	1666	152	93	0,45	0,06

En general, la mejor respuesta se observó a los 25 ddp, momento en el que se obtuvo el mayor rendimiento, medido como la respuesta/nº frutos. Esta tendencia se mantuvo inalterable independientemente de la generación a la que perteneciera el parental masculino, con las excepciones de las generaciones F₄-BC₁ y F₅-BC₁ en las que el rendimiento a los 30 ddp, fue ligeramente superior que a los 25 ddp.

A continuación se analizan los resultados obtenidos en las diferentes generaciones.

4.2.1 Cruces realizados con los parentales de la generación "F₄"-BC₁

A partir de los cruces realizados con los tres parentales de la generación "F₄"-BC₁, se obtuvo un total de 124 frutos (Tabla 9). Se observaron diferencias significativas (P<0,05) en el número total de semillas por fruto entre los frutos descendientes de cada parental. Se observó una relación entre el tamaño de los frutos y el número de semillas que contenían. En general, los frutos del parental 41 E M3 fueron pequeños (entre 1'5 y 2'5cm de diámetro) o medianos (entre 2'5 y 4 cm de diámetro), mientras que los del parental 285 M2 PL1 fueron, sobre todo, medianos y grandes (>4cm de diámetro). La diferencia en el número de semillas podría deberse a la incompatibilidad de cada parental, lo cual habría provocado un mayor número de

semillas abortadas o semillas muy pequeñas y poco desarrolladas. Así, en el caso del parental 285 M2 PL1, se observaron en muchas ocasiones semillas con embriones en estado cotiledón. En cambio, para el 41 E M3, en ningún caso se visualizaron embriones en estado torpedo o cotiledón.

Para todos los parentales de esta generación, se observó una diferencia de respuesta entre las semillas abiertas y cerradas (Tabla 9). Es decir, la incisión sobre la región de la chalaza de las semillas, probablemente facilitó la salida del embrión, tal y como podría esperarse. Debido a ello, se consiguió regenerar más plantas procedentes de las semillas sembradas abiertas. El parental que dio un mayor rendimiento de respuestas iniciales fue el 285 M2 PL1, con un 17,94%, y un total de plantas regeneradas de 42 (Tabla 9).

Tabla 9. Respuesta obtenida de los cruces con parentales masculinos de la generación "F₄"-BC₁

Parental masculino		41 E M3	285 M2 PL1	381 M3	TOTAL	
Nº de frutos		17	57	50	124	
Nº de semillas A ¹		44	407	261	712	
Nº de semillas C ²		41	401	261	703	
Nº total de semillas		85	808	522	1415	
Nº semillas/Nº frutos		5,00	14,18	10,44	11,41	
Nº frutos que dieron respuesta		4	28	15	47	
Nº total R ³ o P ⁴		R	5	75	39	119
		P	5	42	20	67
Nº de R o P semillas A		R	4	73	33	110
		P	4	40	18	62
Nº de R o P semillas C		R	1	2	6	9
		P	1	2	2	5
RENDIMIENTOS (%)	Nº de R o P semillas A/Nº sem A	R	9,09	17,94	12,64	15,45
		P	9,09	9,83	6,90	8,71
	Nº de R o P semillas C/Nº sem C	R	2,44	0,50	2,30	1,28
		P	2,44	0,50	0,77	0,71
	Nº de R o P/Nº semillas	R	5,88	9,28	7,47	8,41
		P	5,88	5,20	3,83	4,73

¹ Abiertas, ² Cerradas; ³ Respuestas iniciales in vitro, ⁴ Plantas obtenidas

Como se ha descrito anteriormente, las plantas obtenidas se desarrollaron mayoritariamente a partir de germinación directa de la semilla, o bien, a partir de una fase previa de callo. Para esta generación, se obtuvieron 93 respuestas de germinación y 26 provenientes de callo (Tabla 10). Puede observarse que la respuesta mayoritaria en el caso de los tres parentales fue la germinación directa de las semillas. Esto podría deberse a la superación de la incompatibilidad, ya que en trabajos previos del grupo de investigación, donde se emplearon parentales de una generación anterior, la respuesta mayoritaria fue de callo (datos no publicados). También se observó que el hecho de practicar la incisión en la semilla antes de sembrarla mejora la eficiencia de la técnica (Tabla 10).

Tabla 10. Respuesta obtenida en los cruces con los parentales masculinos de la generación "F₄"-BC₁ según el tipo de desarrollo y la apertura o no de semilla antes de la siembra (A: semilla abierta, C: semilla cerrada)

Parental masculino	Siembra de la semilla abierta o cerrada	Nº Respuestas procedentes de germinación	Nº Respuestas procedentes de callo	Total
41 E M3	A	5	0	4
	C	1	0	1
	Total	5	0	5
285 M2 PL1	A	56	17	73
	C	2	0	2
	Total	58	17	75
381 M3	A	28	5	33
	C	2	4	6
	Total	30	9	39
Total "F ₄ "-BC ₁		93	26	119

En resumen, los mayores rendimientos para los cruces realizados con los parentales masculinos de la generación "F₄"-BC₁, se alcanzaron recolectando los frutos a los 25 o 30 ddp y practicando una incisión en las semillas antes de su siembra. La principal vía de respuesta fue la germinación directa del embrión.

4.2.2 Cruces realizados con los parentales de la generación "F₅"-BC₁

El número total de frutos obtenidos a partir de los cruces realizados con los 9 parentales de la generación "F₅"-BC₁ fue de 274. En este caso se obtuvieron frutos cuajados a partir de todos ellos. Se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) en el número total de semillas por fruto entre los frutos descendientes de algunos de los parentales. Concretamente, es destacable el bajo número de semillas por fruto encontrado en los cruces con el parental 67 A M3, que difirió significativamente del obtenido a partir de los parentales 367 M2, 378.1 M3 y el 385.1 M2 (Tabla 11). El bajo número de semillas por fruto obtenido en los cruces con el parental 67 A M3, podría deberse a la mayor incompatibilidad de ese parental por poseer mayor proporción de fondo genético del parental donante. De hecho, a pesar de haber realizado un gran número de polinizaciones con este parental se obtuvo poco éxito, tanto en el cuajado de los frutos como en el número de semillas por fruto. Por otro lado, en los parentales que dieron lugar a frutos con muchas semillas, éstas presentaron embriones en estados cotiledón y torpedo. Estos frutos fueron por lo general medianos y grandes para las tres fechas de recolección por igual, 25, 30 y 35 ddp.

Tabla 11. Respuesta obtenida de los cruces con parentales masculinos de la generación "F₅"-BC₁

Parental masculino		67 A M3	171 A M3	272 M2	292 M2 PL1	327 M2	367 M2	367.1 M3	378.1 M3	385.1 M2	TOTAL	
Nº de frutos		9	10	50	90	30	43	9	12	21	274	
Nº de semillas A ¹		24	39	250	425	124	257	38	74	111	1342	
Nº de semillas C ²		26	39	276	437	124	246	35	70	143	1396	
Nº total de semillas		50	78	526	862	248	503	73	144	254	2738	
Nº semillas/Nº frutos		5,56	7,80	10,52	9,58	8,27	11,70	8,11	12,00	12,10	9,99	
Nº frutos que dieron respuesta		1	4	18	33	8	14	2	5	12	97	
Nº total R ³ o P ⁴		R	1	6	39	79	13	36	5	8	27	214
		P	0	4	25	47	9	21	3	6	20	135
Nº de R o P semillas A		R	0	6	35	68	7	25	4	6	24	175
		P	0	4	23	41	7	18	2	5	18	118
Nº de R o P semillas C		R	1	0	4	11	6	11	1	2	3	39
		P	0	0	2	6	2	3	1	1	2	17
RENDIMIENTOS (%)	Nº de R o P semillas A/Nº sem A	R	0,00	15,38	14,00	16,00	5,65	9,73	10,53	8,11	21,62	13,04
		P	0,00	10,26	9,20	9,65	5,65	7,00	5,26	6,76	16,22	8,79
	Nº de R o P semillas C/Nº sem C	R	3,85	0,00	1,45	2,52	4,84	4,47	2,86	2,86	2,10	2,79
		P	0,00	0,00	0,72	1,37	1,61	1,22	2,86	1,43	1,40	1,22
	Nº de R o P/Nº semillas	R	2,00	7,69	7,41	9,16	5,24	7,16	6,85	5,56	10,63	7,82
		P	0,00	5,13	4,75	5,45	3,63	4,17	4,11	4,17	7,87	4,93

¹ Abiertas, ² Cerradas; ³ Respuestas iniciales *in vitro*, ⁴ Plantas obtenidas

Al igual que en los cruces realizados con los parentales de la generación "F₄"-BC₁, en este caso también se observó que la mayoría de respuestas iniciales y de plantas procedían de semilla abierta (Tabla 11).

El parental que dio un mayor rendimiento de respuestas iniciales y de plantas regeneradas fue el 385.1 M2, con un 10,63% y 7,87% respectivamente, llegándose a regenerar 20 plantas (Tabla 11). Con todo, los parentales que más plantas produjeron son el 292 M2 PL1, seguido de 272 M2. Los peores resultados se observaron en el parental 67 A M3, del que no se pudo obtener ninguna planta.

En cuanto al modo de desarrollo de las semillas sembradas, se siguió manteniendo la germinación directa del embrión como la vía mayoritaria de desarrollo (Tabla 12). En el caso de los parentales 367.1 M3 y el 67 A M3 En el parental 367.1 M3 la totalidad de sus respuestas procedieron de germinación, sin pasar por fase de callo.

Tabla 12. Respuesta obtenida en los cruces con los parentales masculinos de la generación "F₅"-BC₁ según el tipo de desarrollo y la apertura o no de semilla antes de la siembra (A: semilla abierta, C: semilla cerrada)

Parental masculino	Siembra de la semilla abierta o cerrada	Nº Respuestas procedentes de germinación	Nº Respuestas procedentes de callo	Total
67 A M3	A	1	0	1
	C	0	0	0
	Total	1	0	1
171 A M3	A	5	1	6
	C	0	0	0
	Total	5	1	6
272 M2	A	23	12	35
	C	4	0	4
	Total	27	12	39
292 M2 PL1	A	51	17	68
	C	8	3	11
	Total	59	20	79
327 M2	A	7	0	7
	C	4	2	6
	Total	11	2	13
367 M2	A	19	6	25
	C	6	5	11
	Total	25	11	36
367.1 M3	A	4	0	4
	C	1	0	1
	Total	5	0	5
378.1 M3	A	5	1	6
	C	1	1	2
	Total	6	2	8
385.1 M2	A	21	3	24
	C	3	0	3
	Total	24	3	27
Total "F₅-BC₁"		163	51	214

Por lo tanto, de nuevo, los mejores resultados de respuestas iniciales *in vitro* y de plantas regeneradas se obtuvieron recogiendo los frutos a los 30 ddp y sembrando las semillas abiertas, siendo la vía mayoritaria de desarrollo la germinación directa de la semilla. El parental que dio mayores rendimientos fue el 385.1 M2, mientras que los que más plantas produjeron fueron el 272 M2 y el 292 M2 PL1.

4.2.3 Cruces realizados con los parentales de la generación "F₆"-BC₁

Cinco de los seis parentales empleados para los cruzamientos hacia FC dieron un total de 92 frutos (Tabla 13). No hubo diferencias significativas ($P < 0,05$) en el número de semillas por fruto de los distintos parentales para esta generación. El tamaño de los frutos en esta generación, osciló entre pequeño y mediano. Además, no se observaron casi embriones en comparación con el resto de generaciones y los que pudieron observarse se encontraban en estados tempranos de desarrollo, como globular o corazón a los 25 y 30 ddp. Únicamente, el parental 510 C1, dio lugar a más semillas con embrión y en estados más avanzados, como el estado torpedo en frutos recolectados a los 25 ddp.

Por otro lado, en esta generación se observó una menor diferencia entre la respuesta de las semillas abiertas y cerradas (Tabla 13). Incluso hubo un parental, el 510 C1, que desarrolló más respuestas a partir de semilla cerrada que de semilla abierta. En cualquier caso, considerando el conjunto de parentales de esta generación, las semillas abiertas dieron lugar a un mayor número de respuestas iniciales *in vitro* y de plantas regeneradas, por lo que se sigue manteniendo la tendencia del resto de generaciones.

Tabla 13. Respuesta obtenida de los cruces con parentales masculinos de la generación "F₆"-BC₁

Parental masculino		13 A M3 callo 2	13 A M3 callo 3	300 M2 PL1	510 C1	IAA+2IP FR385	TOTAL	
Nº de frutos		8	8	25	31	12	92	
Nº de semillas A ¹		28	33	114	127	49	351	
Nº de semillas C ²		27	33	122	129	50	361	
Nº total de semillas		55	66	236	256	99	712	
Nº semillas/Nº frutos		6,88	8,25	9,44	8,26	8,25	7,74	
Nº frutos que dieron planta		0	1	1	3	7	12	
Nº total de R ³ o P ⁴		R	5	6	3	8	14	36
		P	0	1	1	4	9	15
Nº de R o P a partir de semillas A		R	5	5	3	3	11	27
		P	0	1	1	3	8	13
Nº de R o P a partir de semillas C		R	0	1	0	5	3	9
		P	0	0	0	1	1	2
RENDIMIENTOS (%)	Nº de R o P de sem A/Nº semillas A	R	17,86	15,15	2,63	2,36	22,45	7,69
		P	0	3,03	0,88	2,36	16,33	3,70
	Nº de R o P de sem C/Nº semillas C	R	0	3,03	0	3,88	6	2,49
		P	0	0	0	0,78	2	0,55
	Nº de R o P/Nº total semillas	R	9,09	9,09	1,27	3,13	14,14	5,06
		P	0	1,52	0,42	1,56	9,09	2,11

¹ Abiertas, ² Cerradas; ³ Respuestas iniciales *in vitro*, ⁴ Plantas obtenidas

Con respecto a los rendimientos, se observó valores más bajos, tanto en respuestas iniciales *in vitro* (5,06) como en plantas regeneradas (2,11) (Tabla 13). Estos rendimientos más bajos, podrían deberse a un mal funcionamiento de los cruzamientos en el invernadero, ya que, si nos fijamos en los porcentajes de cuajado del invernadero 1, que fue el invernadero con

condiciones más estables, son todos más bajos que los obtenidos con los parentales de las otras generaciones. Los frutos obtenidos podrán ser el resultado de polinizaciones deficientes, ya sea por la mala calidad o escasa cantidad del polen de estos parentales, lo que daría lugar a frutos con menor número de semillas, como en efecto sucede, y a una menor probabilidad de obtener repuesta. El parental que dio mejores resultados de respuesta y de regeneración de plantas fue el IAA+2IPFR385, con un rendimiento de respuestas iniciales de 14,14% y un 9,09% de rendimiento de regeneración con 9 plantas. También cabe destacar los rendimientos de respuesta inicial *in vitro* de los parentales 13 A M3 callo 2 y 13 A M3 callo 3, que fueron más elevados. Aunque para estos casos, el número total de semillas fue bajo.

En referencia al modo de desarrollo de las respuestas iniciales, se obtuvieron 27 respuestas de germinación y 9 provenientes de fase de callo (Tabla 14). De nuevo la respuesta mayoritaria fue a partir de germinación, con la única excepción del parental 13 A M3 callo 3, aunque debido a la baja respuesta de este genotipo, consideramos que no se pueden sacar conclusiones al respecto. En cualquier caso, también para esta generación la germinación directa fue la vía por la que se obtuvieron la mayor parte de las plantas.

Tabla 14. Respuesta obtenida en los cruces con los parentales masculinos de la generación "F₆"-BC₁ según el tipo de desarrollo y la apertura o no de semilla antes de la siembra (A: semilla abierta, C: semilla cerrada)

Parental Masculino	Siembra de la semilla abierta o cerrada	Nº Respuestas procedentes de germinación	Nº Respuestas procedentes de callo	Total
13 A M3 callo 2	A	3	2	5
	C	0	0	0
	Total	3	2	5
13 A M3 callo 3	A	2	3	5
	C	0	1	1
	Total	2	4	6
300 M2 PL1	A	1	2	3
	C	0	0	0
	Total	1	2	3
510 C1	A	3	1	4
	C	4	0	4
	Total	7	1	8
IAA+2IPFR385	A	11	0	11
	C	3	0	3
	Total	14	0	14
Total "F ₆ "-BC ₁		27	9	36

Por lo tanto, los mayores rendimientos para esta generación, se alcanzaron con el cultivo de semillas abiertas de frutos recogidos a los 25 ddp, a partir de germinación directa. El parental que dio mejores resultados fue el IAA+2IPFR385, lo que podría deberse a que, según se ha

comprobado en trabajos previos, este parental presenta una menor proporción del genoma de la especie silvestre que otros de la misma generación.

4.2.4 Cruces realizados con los parentales de la generación “F₅”-BC₂

En esta generación, los cruces realizados con los 4 parentales empleados dieron lugar a frutos. Estos cuatro parentales pertenecen a una generación más avanzada, puesto que provienen de un segundo retrocruce hacia la especie cultivada. A pesar de ello, el número de semillas por fruto no difirió mucho del obtenido con los parentales de la generación “F₄”-BC₁ (Tabla 15). Además, hay dos parentales que han dado lugar a frutos prácticamente vacíos, el 13.2 C1 y el 81 C1, con 1,5 y 5,33 semillas por fruto respectivamente. De estos parentales se hicieron muchas menos polinizaciones que con los otros dos de esta misma generación y en una única fecha (Tabla 6), por lo que consideramos que los resultados no pueden considerarse concluyentes.

Por otro lado, la tendencia observada en el resto de generaciones, acerca del mayor éxito de las semillas abiertas tanto en las repuestas iniciales como a nivel de plantas regeneradas, se mantuvo en todos los parentales de esta generación (Tabla 15). No obstante, la diferencia en la respuesta entre las semillas abiertas y cerradas, no fue tan grande como en el resto de generaciones.

Tabla 15. Respuesta obtenida de los cruces con parentales masculinos de la generación “F₅”-BC₂

Parental masculino		12.2 P1	13.2 C1	70 P1	81 C1	TOTAL	
Nº de frutos		23	2	11	3	40	
Nº de semillas A ¹		155	2	63	8	228	
Nº de semillas C ²		156	1	61	8	226	
Nº total de semillas		311	3	124	16	454	
Nº semillas/Nº frutos		13,52	1,50	11,27	5,33	11,35	
Nº fr que dieron planta		15	0	8	0	23	
Nº total de R ³ o P ⁴		R	120	0	62	0	182
		P	78	0	44	0	122
Nº de R o P a partir de sem A		R	63	0	36	0	99
		P	37	0	25	0	62
Nº de R o P a partir de sem C		R	57	0	26	0	83
		P	41	0	19	0	60
RENDIMIENTOS (%)	Nº de R o P de sem A/Nº sem A	R	40,65	0,00	57,14	0,00	43,42
		P	23,87	0,00	39,68	0,00	27,19
	Nº de R o P de sem C/Nº sem C	R	36,54	0,00	42,62	0,00	36,73
		P	26,28	0,00	31,15	0,00	26,55
	Nº de R o P/Nº total semillas	R	38,59	0,00	50,00	0,00	40,09
		P	25,08	0,00	35,48	0,00	26,87

¹ Abiertas, ² Cerradas; ³ Respuestas iniciales *in vitro*, ⁴ Plantas obtenidas

Con respecto al rendimiento en plantas y respuestas iniciales (Tabla 15), al tratarse de una generación más avanzada, hubo porcentajes más elevados, lo cual indica que las barreras de incompatibilidad van superándose con los retrocruzamientos. El rendimiento de regeneración de plantas para esta generación fue del 26,87%, mientras que el rendimiento de respuestas *in vitro* fue del 40,09%. Si comparamos los dos parentales de los que se obtuvo descendencia, el 70 P1 tuvo un rendimiento más elevado. En cuanto a la ausencia de respuesta a partir de los parentales 13.2 C1 y 81 C1, como se ha indicado anteriormente, podría estar relacionada con el bajo número de cruces que se realizaron con ellos, lo que se debió a la escasa floración de los mismos y probablemente a una mala calidad del polen que, en el caso de los pocos frutos cuajados, dio lugar a un escaso número de semillas.

Tabla 16. Respuesta obtenida en los cruces con los parentales masculinos de la generación “F₅”-BC₂ según el tipo de desarrollo y la apertura o no de semilla antes de la siembra (A: semilla abierta, C: semilla cerrada)

Parental masculino	Siembra de la semilla abierta o cerrada	Nº Respuestas procedentes de germinación	Nº Respuestas procedentes de callo	Total
12.2 P1	A	55	8	63
	C	53	4	57
	Total	108	12	120
70 P1	A	31	5	36
	C	26	0	26
	Total	57	5	62
	Total “F₅”-BC₂	165	17	182

El desarrollo de las semillas sembradas tuvo lugar en la mayoría de los casos mediante germinación directa del embrión, al igual que en el resto de generaciones (Tabla 16). La mayor diferencia entre respuesta de germinación y a partir de callo, se dio en el parental 12.2 P1.

En resumen, para esta generación, “F₅”-BC₂, se consiguió un mayor rendimiento en comparación con la respuesta obtenida con los parentales de generaciones anteriores. Las condiciones que dieron lugar a mejores resultados fueron el cultivo de semillas abiertas y la recolección de los frutos a los 25 dpp. La mayor parte de las plantas se desarrollaron mediante germinación directa del embrión.

4.2.5 Comparación de los resultados obtenidos para las 4 generaciones de parentales masculinos

Los resultados obtenidos en los cruces realizados con los parentales pertenecientes a las cuatro generaciones son comparables hasta cierto punto, ya que, como se ha indicado anteriormente, no se trata de un diseño equilibrado, sino que los cruces se hicieron dependiendo de la disponibilidad de polen en cada fecha de polinización y anteponiendo el

interés de utilizar el máximo número de parentales masculinos. Aclarado este punto, en general los resultados obtenidos en los cruces realizados a partir de los parentales masculinos pertenecientes a las cuatro generaciones distintas fueron bastante similares, con diferencias notables para algunos parámetros de la generación "F₅"-BC₂.

Respecto al número de días transcurridos desde la polinización a la recogida del fruto, a los 35 días se obtuvieron los peores resultados en cuanto a número de plantas/semillas para todos los parentales. En conjunto los 25 y 30 ddp fueron las mejores opciones, aunque si se analiza con más detalle cada generación, para la "F₄"-BC₁ y la "F₅"-BC₁ la mejor opción fue recolectar los frutos a los 30 ddp, mientras que para la "F₆"-BC₁ y la "F₅"-BC₂ fue mejor recogerlos a los 25 ddp. En todos los casos la apertura practicada en la cubierta de la semilla antes de la siembra facilitó la respuesta, obteniéndose una cantidad de plantas muy superior procedentes de semilla abierta. Por último, nuevamente en todos los casos, la vía mayoritaria de desarrollo de las plantas a partir de las semillas sembradas fue mediante germinación directa de los embriones, siendo mucho menos frecuente el paso por una fase de callo. Estos resultados permiten simplificar el protocolo para ensayos similares de cruzamientos con parentales derivados de *S. peruvianum*.

Otro comportamiento común a todas las generaciones fueron las diferencias notables entre los distintos parentales pertenecientes a cada generación. Aún eliminando los parentales que no dieron descendencia (por posible influencia de una menor representación en los cruzamientos u otros factores adversos), la diferencia más notable se obtuvo en la generación "F₆"-BC₁, con 1 planta obtenida a partir del parental 300 M2 PL1 y 9 del parental IAA+2IP FR385, lo que se correspondió con unos rendimientos (expresados en porcentaje y medidos como número de plantas/número de semillas) de 0,42 y 9,09 respectivamente. Estas diferencias fueron mucho menos acusadas en la generación "F₅"-BC₂, si eliminamos a los dos parentales que no dieron ningún descendiente. En este caso, el número de plantas osciló entre 44 y 78 y el rendimiento entre 25,08 y 35,48. Estos resultados ponen de relieve por un lado que el comportamiento depende en mucha mayor proporción de cada parental en particular que de la generación a la que pertenece.

4.3 Desarrollo de las semillas en los frutos recolectados en la madurez provenientes de cruces realizados con parentales de la generación "F₅"-BC₂

En el momento de abrir los primeros frutos provenientes de las polinizaciones efectuadas con los parentales de la generación "F₅"-BC₂ se observó la presencia de semillas con buen desarrollo, aparentemente normales, es decir similares a las semillas de esa misma edad en un fruto de tomate autofecundado. Con objeto de comprobar si estas semillas podrían germinar por si mismas si se dejaban madurar los frutos procedentes de las polinizaciones, se dejaron hasta la completa madurez un número de frutos procedentes de las polinizaciones realizadas con los parentales 12.2 P1, 81 C1 y 70 P1. Se abrieron los frutos y se anotó el número de semillas aparentemente maduras y el de semillas inmaduras que parecían no haber terminado su desarrollo. Para el parental 12.2 P1 se abrió un fruto, se encontraron 21 semillas maduras y 12 inmaduras. Para el parental 70 P1 se abrió otro fruto, donde se hallaron 38 semillas y todas

ellas parecían semillas maduras, ya que eran grandes y estaban bien desarrolladas. En uno de los frutos abiertos procedentes del parental 81 C1, se identificaron pocas semillas, 2 de ellas maduras y 7 inmaduras. Se abrió otro fruto descendiente de este mismo parental, cuyas semillas estaban todas abortadas. Estos resultados parecen corresponderse con la respuesta de plantas regeneradas a partir de estos parentales, ya que a partir de 81 C1 no llegó a obtenerse ninguna planta.

4.4 Genotipado

Como resultado de trabajos anteriores del grupo se dispone de un conjunto de 105 marcadores polimórficos entre el tomate cultivado y *S. peruvianum* (Julián et al, 2013). Las generaciones parentales utilizadas en este trabajo fueron genotipadas por el grupo de investigación en estudios previos (datos no publicados).

En el presente trabajo se han analizado las plantas que ha sido posible aclimatar y de las que se disponía de tejido. Se trata de 11 plantas, descendientes de dos parentales distintos de la generación F₅-BC₁. Para el genotipado preliminar realizado en este trabajo se seleccionaron tres marcadores, de tres cromosomas distintos, para los que las tres plantas parentales eran heterocigotas. El objetivo era confirmar que las 11 plantas descendientes procedían de cruce, además de determinar la presencia del fragmento de *S. peruvianum* para las regiones analizadas.

Para todos los parentales se identificaron descendientes portadores del alelo de *S. peruvianum* para cada uno de los tres fragmentos analizados (Tabla 9). Por el tipo de cruce del que proceden (retrocruce hacia la especie cultivada) las plantas portadoras del alelo de la especie silvestre eran heterocigotas.

Tabla 9. Genotipo para los tres marcadores utilizados de los descendientes analizados procedentes de dos de los parentales masculinos (T: homocigotos para el alelo de tomate, H: heterocigotos)

Parental	Planta	Marcador		
		C2_At4g04955	C2_At1g28530	C2_At3g46780
385.1 M2	771 A P1	T	H	T
	771 A P2	H	H	H
	774 A P1	T	H	T
	807 A P1	T	H	T
	812 A P1	H	T	H
	844 A P1	T	H	T
292 M2 PL1	759 A P1	H	H	H
	761 A P1	T	H	T
	802 A P1	T	T	T
	802 A P2	H	T	H
	805 A P1	T	H	T

Con la única excepción de la planta 802 A P1, en todas las plantas analizadas se identificó el alelo de *S. peruvianum* para al menos uno de los marcadores utilizados. Esto confirma que todos los frutos de los que se genotiparon descendientes procedían de cruce y no de autofecundación. Esto es cierto incluso para el fruto 802, ya que aunque la planta 802 A P1 resultó homocigota para el alelo de tomate para todos los marcadores analizados, la otra planta analizada de este mismo fruto presentaba el alelo de la especie silvestre para dos de los marcadores empleados.

En trabajos futuros, se analizarán todas las plantas obtenidas para todos los marcadores para los que cada uno de los parentales es heterocigoto. Una vez completado el genotipado, se programarán los cruces y, mediante la autofecundación de estas plantas, será posible obtener plantas homocigotas para cada uno de los fragmentos analizados.

4.5 Discusión

Los materiales empleados como parentales masculinos en este trabajo constituyen generaciones avanzadas derivadas del cruce inicial NE-1 x PI 126944, realizado por Picó et al. (2002). Estos autores emplearon, entre otras especies, distintas entradas de *S. peruvianum*. PI 126944 resultó ser la que más barreras de incompatibilidad presentó. De hecho, no se obtuvieron plantas regeneradas al realizar el cruce directo y el rescate de los embriones inmaduros. Tampoco fue posible obtener plantas empleando la técnica de mezcla de polen y el posterior rescate de los embriones. Para regenerar híbridos fue necesario realizar un tratamiento del pistilo, lo que permitió incrementar el número de embriones por fruto obtenidos a los 25 ddp. Estos embriones fueron cultivados en el interior de la semilla, con objeto de evitar la deshidratación y daños durante el manejo, si bien la semilla se cultivó tras realizar un corte en la región de la chalaza. El porcentaje de regeneración obtenido por Picó et al. (2002) en estas condiciones fue del 3%. En ensayos posteriores realizados por el grupo con condiciones similares (frutos recogidos a los 21 ddp y cultivo de semillas abiertas), en los que se trató de retrocruzar diferentes generaciones derivadas de estos cruces iniciales, solo fue posible obtener descendencia del cruce FC x "F₃", siendo el porcentaje de regeneración cercano al 10% (Julián et al., 2013). Las condiciones empleadas en los ensayos descritos serían comparables a las utilizadas en este ensayo para los frutos recogidos a los 25 ddp y cultivando la semilla abierta. En este trabajo, los rendimientos medios por generación en estas condiciones (frutos recogidos a las 25 ddp y semilla abierta) variaron entre 3,26 y 58,97, en función de la generación. Para todas las generaciones los rendimientos fueron superiores a los descritos en Picó et al. (2002), como resulta lógico al tratarse de generaciones más avanzadas en cuanto al número de retrocruces, en las que se espera que se vaya venciendo la incompatibilidad. De hecho, los rendimientos mayores en este ensayo se obtuvieron con los parentales de la generación "F₅"-BC₂ (26,87%), que constituyen las generaciones más avanzadas empleadas. Además, de cruces procedentes de tres de los parentales de esta misma generación, se dejaron madurar frutos de los que se sacaron las semillas. De los tres parentales se obtuvieron algunas semillas maduras, que parecían no haber abortado. Esto podría ser indicativo de que la incompatibilidad va siendo superada a medida que se realizan retrocruzamientos y que, para futuros ensayos, podría ya no ser necesaria la técnica de rescate

de semillas inmaduras. La superación de las barreras postcigóticas resulta interesante para el grupo de investigación, ya que permitiría un avance más rápido en el proceso de construcción de la población de líneas de introgresión.

En ensayos de cultivo de semillas inmaduras realizados por otros autores con objeto de obtener híbridos interespecíficos entre tomate y otras entradas distintas de *S. peruvianum*, los rendimientos fueron variables. Como ejemplo, en el ensayo realizado por Silva da Costa Ribeiro y de Britto Giordano (2001), en el que se rescataron y se cultivaron las semillas inmaduras de frutos recogidos a distintas fechas, el máximo rendimiento se obtuvo de frutos recolectados a los 38 ddp y fue de 9,4% de plantas regeneradas. En el trabajo realizado por Pratta et al. (1999), se llevaron a cabo cruces entre tomate y distintas especies silvestres relacionadas. El rendimiento fue variable, en función de la entrada; en el caso de las entradas de *S. peruvianum* el mayor rendimiento fue del 7,1%. En el ensayo de Imanishi et al. (1996) se cruzó una variedad de tomate cultivado con una entrada de *S. peruvianum*. En este trabajo, las semillas inmaduras que sembraron de cada fruto fueron seleccionadas según su apariencia, sembrándose aquellas que eran más grandes y parecían no haber abortado. El rendimiento que obtuvieron en su generación más avanzada (BC_1F_1) fue del 16,6%. En el ensayo de Segeren et al. (1993), a partir de un cruce inicial entre variedades cultivadas de tomate y entradas de *S. peruvianum*, obtuvieron un rendimiento de regeneración del 7,5%. En un ensayo similar, Cap et al. (1991) obtuvieron una sola planta, siendo el rendimiento de 0,31%. Otros autores han utilizado la técnica del rescate de embriones y su cultivo *in vitro* en lugar de cultivar directamente las semilla inmaduras. Utilizando esta metodología Thomas y Pratt (1981) obtuvieron un rendimiento de regeneración de plantas del 3%. Kharkongar et al. (2013) aportan datos sobre rendimiento de germinación de embriones, siendo este muy dependiente de los componentes del medio de cultivo. El rendimiento medio fue del 38,33%, oscilando desde el 10 al 80%. Estos autores no especifican el número de plantas que finalmente consiguen aclimatar. Chen y Adachi (1992) realizaron un estudio muy completo, probando como parentales femeninos diversos cultivares de tomate y como masculinos tres entradas de *S. peruvianum* y recolectando los frutos a distintos ddp. Todos los factores condicionaron el éxito en la respuesta de los embriones, oscilando el porcentaje de embriones que finalmente se desarrollaron entre un 3,2 y un 52,6%. Hay que señalar que se realizó una inspección previa del estado de desarrollo de los embriones en las semillas inmaduras y que sólo se rescataron los de las semillas inmaduras seleccionadas según su apariencia. Esto explicaría los altos valores de rendimiento obtenidos.

Por lo que respecta a las fechas de recolección de los frutos de cruces entre tomate y *S. peruvianum*, los resultados difieren en función del estudio. Como ejemplo, Silva da Costa Ribeiro y de Britto Giordano (2001) obtuvieron plantas regeneradas a partir de frutos recogidos entre 27 y 57 ddp, siendo los 38 ddp la fecha en que el rendimiento fue mayor. Pratta et al. (1999) lograron buenos resultados a partir de frutos colectados 30 ddp. Sin embargo, en otros ensayos como Picó et al. (2002), en fechas tan tempranas como 25 ddp ya se observó que la mayor parte de los embriones estaban abortados. La variabilidad de resultados obtenidos indica que son muchos los factores que intervienen en el proceso, siendo posiblemente el genotipo de los parentales uno de los más importantes. En cualquier caso, en

los ensayos citados los parentales masculinos pertenecían a la especie silvestre. En nuestro ensayo, los parentales empleados eran generaciones más avanzadas, teniendo como mínimo un retrocruce hacia la especie cultivada. Era de esperar que el aborto del embrión se produjese en fechas posteriores después de la polinización y por ese motivo se ensayaron distintas fechas de recogida de los frutos. Se ha comprobado, sin embargo, que los mayores rendimientos se obtuvieron con los frutos recogidos a los 25 ddp. Parece, por tanto, que el aborto del embrión en estas generaciones más avanzadas se sigue produciendo en fechas tempranas después de la polinización.

En cuanto a la vía de obtención de las plantas regeneradas, el desarrollo a partir de fase de callo es la vía mayoritaria en muchos de los ensayos (Cap et al., 1991; Segeren et al., 1993; Julián et al., 2013). En este sentido, la composición de los medios utilizados influye en el tipo de respuesta obtenida. En general, los medios empleados por otros autores incluían combinaciones de auxinas y citoquininas (Thomas y Pratt, 1981; Cap et al., 1991; Segeren et al., 1993; Julián et al., 2013), que favorecen la proliferación de callo. El medio empleado en este ensayo fue puesto a punto en un estudio previo realizado por el grupo en el que se ensayaron tres medios (Díez et al., 2014). Dos de los medios contenían combinaciones de citoquinina y auxina (1 mg/L de 6- bencilaminopurina y 2 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético o 0,5 g/L de zeatina y 0,2 g/L ácido indolacético, respectivamente) mientras que en el otro la zeatina (0,2 mg/L) era la única hormona empleada. Este último medio y el medio con zeatina e indolacético resultaron eficientes en la regeneración de ápices que dieron lugar a plantas. Se seleccionó el empleado en este ensayo por su menor complejidad y coste (Díez et al., 2014). El hecho de que en este ensayo la vía mayoritaria haya sido la germinación directa de la semilla puede deberse de nuevo a que se trate de generaciones más avanzadas. Apoya esta hipótesis el hecho de que el porcentaje de plantas obtenidas por germinación directa a partir de los cruces realizados con parentales de la generación "F₅"-BC₂ haya sido superior (90,66%) al obtenido para el resto de generaciones.

En la mayor parte de los ensayos, todas las semillas se cultivan bien cerradas (Thomas y Pratt, 1981; Segeren et al., 1993; Sacks et al., 1997) bien tras practicarles una incisión (Picó et al., 2002; Julián et al., 2013), pero no se comparan ambos métodos. Sin embargo, Pratta et al. (1999) cultivaron semillas abiertas y cerradas, habiendo obtenido plantas únicamente a partir de las semillas abiertas. Estos resultados coinciden con los obtenidos en este ensayo, en cuanto a que en nuestro caso se obtuvo un porcentaje muy superior de regeneración a partir de las semillas abiertas.

En general, tal y como cabría esperar puesto que se trata de generaciones más avanzadas, los rendimientos de regeneración obtenidos en este trabajo superan los obtenidos en otros estudios. El medio empleado proporcionó buenos resultados para favorecer la germinación directa de la semilla, frente a los utilizados en otros trabajos en los que la vía mayoritaria de regeneración pasa por fase de callo. Por otra parte, los 25 ddp parece ser una buena fecha de recolección de los frutos para evitar el temprano aborto del embrión. Además, la apertura de las semillas parece contribuir al mejor desarrollo del embrión, ya que facilita su contacto con el medio de cultivo, a la vez que proporciona protección.

5. Conclusiones

1. Se han regenerado un total de 339 plantas a partir de 522 frutos con semillas recolectados. El rendimiento ha sido superior al obtenido por otros autores en cruces entre tomate y distintas entradas de *Solanum peruvianum*. Dado que los parentales masculinos empleados en este trabajo pertenecían a generaciones más avanzadas, los mayores rendimientos pueden ser indicativos de que se va venciendo la incompatibilidad a medida que se realizan los retrocruzamientos. De hecho, los mayores rendimientos se han obtenido para los cruces con parentales masculinos de la generación "F₅"-BC₂, que constituye la generación más avanzada empleada. La superación de las barreras postcigóticas permitirá acelerar el proceso de obtención de las líneas de introgresión.
2. Los mayores rendimientos se han obtenido a partir de los frutos recolectados 25 días después de la polinización (ddp). Los rendimientos a partir de frutos recogidos a los 30 ddp fueron similares, pero para fechas posteriores el número de plantas regeneradas/fruto fue significativamente inferior. Parece, por tanto, que de forma similar a lo observado por otros autores, el aborto del embrión se produce en fechas tempranas después de la polinización incluso para estas generaciones más avanzadas.
3. El rendimiento obtenido a partir de las semillas abiertas ha sido muy superior al de las semillas cerradas. Esto indica que la práctica de la incisión en la región de la chalaza ha podido favorecer el contacto del embrión con el medio.
4. La mayoría de plantas se han desarrollado por la vía de germinación directa sin pasar por fase de callo. Esto puede deberse, de nuevo, al hecho de que se trate de generaciones más avanzadas en las que se va superando la incompatibilidad. De hecho, el porcentaje de plantas obtenidas por germinación directa a partir de los cruces realizados con parentales de la generación "F₅"-BC₂ fue superior al obtenido para el resto de generaciones. La germinación directa suele ser una respuesta más rápida que la regeneración por vía de callo, de forma que supondría una ventaja de cara al desarrollo de las generaciones siguientes.
4. En todas las plantas genotipadas se identificó el alelo de *S. peruvianum* para, al menos, uno de los marcadores utilizados. Por tanto, se ha confirmado que todos los frutos de los que se genotiparon descendientes procedían de cruce y no de autofecundación. Esto indica que la metodología empleada para los cruces es adecuada. En trabajos futuros se genotipará el resto de la descendencia obtenida en este ensayo.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Ashrafi H., Kinkade M. y 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: 935-956.
- Barbano P.P. y Topoleski L.D. 1984. Postfertilization hybrid seed failure in *Lycopersicon esculentum* x *Lycopersicon peruvianum* ovules. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 109: 95-100.
- Barrantes W., Fernández del Carmen A., López Casado G., González Sánchez M.A., Fernández Muñoz R., Granell A., Monforte A.J. 2014. Highly efficient genomics-assisted development of a library of introgression lines of *Solanum pimpinellifolium*. *Molecular Breeding* 34:1817–1831
- Bedinger P.A., Chetelat R.T., McClure B., Moyle L.C., Rose J. K.C., Stack S.M., Van der Knaap E., Baek Y.S., Lopez-Casado G., Covey P.A., Kumar A., Li W., Nunez R., Cruz-Garcia F. y Royer S. 2010. Interspecific reproductive barriers in the tomato clade: opportunities to decipher mechanisms of reproductive isolation. *Sexual Plant Reproduction* 24: 171-187.
- Bernacchi D., Beck-Bunn T., Eshed Y., Lopez J., Petiard V., Uhlig J., Zamir D. y Tanksley S. 1998. Advanced backcross QTL analysis in tomato. I. Identification of QTLs for trait of agronomic important from *Lycopersicon hirsutum*. *Theoretical and Applied Genetics* 97: 381-397.
- Canady M.A., Meglic V. y Chetelat R.T. 2005. A library of *Solanum lycopersicoides* introgression lines in cultivated tomato. *Genome* 48: 685-697.
- Cap G.B., Roberts P.A., Thomason I.J., y Murashige T. 1991. Embryo culture of *Lycopersicon esculentum* x *L. peruvianum* hybrid genotypes possessing heatstable resistance to *Meloidogyne incognita*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 116: 1082-1088.
- Chen L. y Adachi T. 1992. Embryo abortion and efficient rescue in interspecific hybrids, *Lycopersicon esculentum* and the “peruvianum-complex”. *Japanese Journal of Breeding* 42: 65-77.
- Child A. 1990. A synopsis of *Solanum* subgenus Potatoe (G. Don) (D'Arcy) (Tuberarium (Dun.))Bitter (s.l.). *Feddes Repertorium* 101: 209-235.
- Díez M.J, Gisbert C., Campos G. y Pérez-de-Castro A. 2014. Obtención de materiales derivados de *Solanum peruvianum* PI 126944 mediante el cultivo in vitro de semillas inmaduras. *Actas de Horticultura* 69: 157-158.
- Doganlar S., Frary A., Ku H.S. y Tanksley S.D. 2002. Mapping quantitative trait loci in inbred backcross lines of *Lycopersicon pimpinellifolium* (LA1589). *Genome* 45: 1189-1202.
- Doyle JJ, y Doyle JL. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.

Eshed Y. 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

Foolad M.R. 2007. Genome mapping and molecular breeding of tomato. *International Journal of Plant Genomics* 2007: 52 pp.

Francis D.M., Kabelka E., Bell J., Franchino B. y St. Clair D. 2001. Resistance to bacterial canker in tomato (*Lycopersicon hirsutum* LA407) and its progeny derived from crosses to *L. esculentum*. *Plant Disease* 85: 1171-1176.

Fulton T.M., Nelson J.C. y Tanksley S.D. 1997a. Introgression and DNA marker analysis of *Lycopersicon peruvianum*, a wild relative of the cultivated tomato, into *Lycopersicon esculentum*, followed through three successive backcross generations. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 895-902.

Fulton T.M., Beckbunn T., Emmatty D., Eshed Y., Lopez J., Petiard V., Uhlig J., Zamir D. y Tanksley S.D. 1997b. QTL analysis of an advanced backcross of *Lycopersicon peruvianum* to the cultivated tomato and comparisons with QTLs found in other wild species. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 881-894.

Gilbert J.C. 1958. Some linkage studies with the *Mi* gene for resistance to root-knot nematodes. *Report of the Tomato Genetics Cooperative* 8: 15-17.

Hall T.J. 1980. Resistance at the *Tm-2* locus in the tomato to *Tomato mosaic virus*. *Euphytica* 29: 189-197.

Imanishi S., Egashira H., Tanaka H., Harada S., Nishimura R., Takahashi S., Takashina T., Oumura S. 1996. Development of interspecific hybrids between *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum* var. *humifusum* and introgression of *L. peruvianum* invertase gene into *L. esculentum*. *Breeding Science* 46: 355-359

Julián O., Herráiz J., Corella S., diLolli I., Soler S., Díez M. J. y Pérez-deCastro A. 2013. Initial development of a set of introgression lines from *Solanum peruvianum* PI 126944 into tomato: exploitation of resistance to viruses. *Euphytica* 193: 183-196.

Kharkongar H.P., Khanna V.K., Tyagi W., Rai M. y Meetei N.T. 2013. Wide Hybridization and Embryo-Rescue for Crop Improvement in *Solanum*. *Agrotechnolgy* S11: 004. doi:10.4172/2168-9881. S11-004.

Laterrot H. 1978. Résistance aux maladies. B. *Pyrenochaeta lycopersici*. Rapport d'Activité INRA Station d'Ameloration des Plantes Maraicheres, 1977-1978: 102-103.

Laterrot H. y Pecaut. P. 1969. Gene *Trn-2*: new source. *Report of the Tomato Genetics Cooperative* 19: 13-14.

Lippman Z.B., Semel Y. y Zamir D. 2007. An integrated view of quantitative trait variation using tomato interspecific introgression lines. *Genetics & Development* 17: 545-552.

- Murashige T. y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Nuez F., Díez M.J., Prohens J., Blanca J.M., Sifres A., Picó B., Cordero L. y Zuriaga E. 2008. The study of molecular diversity in natural populations of wild and weedy tomatoes and its implications in tomato breeding. *Acta Horticulturae* 789: 249-256.
- Paterson R.G., Scott S.G. y Gergerich R.C. 1989. Resistance in two *Lycopersicon* species to an Arkansas isolate of tomato spotted wilt virus. *Euphytica* 43: 173-178.
- Peralta I.E. y Spooner D.M. 2000. Classification of wild tomatoes: a review. *Kurtziana* 28: 45-54.
- Peralta I.E., Knapp S., Spooner D.M. 2005. New Species of Wild Tomatoes (*Solanum* Section *Lycopersicon*: *Solanaceae*) from Northern Peru. *Systematic Botany* 30: 424-434.
- Peralta I.E., Spooner D.M. y 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.
- Pérez de Castro A., Herráiz J., Díez M.J., Soler S. y Nuez F. 2008. Breeding program for the introgression of resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* and *Tomato spotted wilt virus* derived from *Solanum peruvianum* PI126944 in tomato. XVI EUCARPIA Meeting Working Group Tomato, 12-15 de Mayo, Wageningen (Holanda). P1-03: 51
- Picó B., Díez M.J. y Nuez F. 1998. Evaluation of whitefly-mediated inoculation techniques to screen *Lycopersicon esculentum* and wild relatives for resistance to *Tomato yellow leaf curl virus*. *Euphytica* 101: 259-271.
- Picó B., Herráiz J., Ruíz J.J. y Nuez F. 2002. Widening the genetic basis of virus resistance in tomato. *Scientia Horticulturae* 94: 73-89.
- Pilowsky M. y Cohen S. 2000. Screening additional wild tomatoes for resistance to the whitefly-borne *Tomato yellow leaf curl virus*. *Acta Physiologia Plantarum* 22: 351-353.
- Pratta G., Zorzoli R. y Picardi L.A. 1999. Obtención y micropropagación de híbridos intra e interespecíficos de tomate (género *Lycopersicon*). *Biotechnología Aplicada* 16: 242-245.
- Rick C.M. 1979. Biosynthetic studies in *Lycopersicon* and closely related species of *Solanum*. En Hawkes J.G., Lester R.N. y Skelding A.D. (Ed.) *The biology and taxonomy of the solanaceae*. Academic Press, New York-London: 667-668.
- Rowe R.C. y Farley J.D. 1981. Strategies for controlling *Fusarium* crown and root rot in greenhouse tomatoes. *Plant Disease* 65: 107-112.
- Sacks E.J., Gerhardt L.M., Graham E.B., Jacobs J., Thorrup T.A. y Clair D.A. 1997. Variation among genotypes of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) for crossability to *L. peruvianum* (L.) Mill. *Annals of Botany* 80: 469-477.

Segeren M.I., Sondahl M.R., Siqueira W.J., Medina Silho H.P., Nagai H. y Lourenção A.L. 1993. Tomato Breeding: 1. Embryo rescue of interspecific hybrids between *Lycopersicon esculentum*, MILL. and *L. peruvianum* (L.) MILL. Revista Brasileira de Genética 16: 367-380.

Semel Y., Nissenbaum J., Menda N., Zinder M., Krieger U., Issman N., Pleban T., Lippman Z., Gur A. y Zamir D. 2006. Overdominant quantitative trait loci for yield and fitness in tomato. Proceedings of the National Academy of Science USA 103: 12981-12986.

Silva da Costa Ribeiro C. y Britto Giordano L. 2001. Método de obtenção de híbridos interespecíficos entre *Lycopersicon esculentum* e *L. peruvianum*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília. 36: 793-799.

Smith P.G. 1944. Embryo culture of a tomato species hybrid. Proceedings of the American Society for Horticultural Science 44: 413-416.

Yamakawa K. y Nagata N. 1975. Three tomato lines obtained by use of chronic gamma radiation with combined resistance to TMV and *Fusarium* race J-3. Technical News, Institute of Radiation Breeding 16: 2pp.

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)

- 0,9 M Tris
- 0,9 M 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