



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL

# **Manejo de una colección preliminar de líneas de introgresión de *Solanum peruvianum* en el fondo genético del tomate cultivado**

---

Trabajo fin de grado en Biotecnología

**Autor:** Antonio Calabuig Serna

**Tutora:** Ana M<sup>a</sup> Pérez de Castro

**Cotutora:** M<sup>a</sup> José Teresa de Jesús Díez Niclós

***Curso académico 2015-2016***

València, Julio de 2016

Licencia Creative Commons "Reconocimiento No Comercial-Sin Obra Derivada"

**Título:** Manejo de una colección preliminar de líneas de introgresión de *Solanum peruvianum* en el fondo genético del tomate cultivado.

**Resumen:** La entrada PI 126944 de *Solanum peruvianum* resulta de interés por presentar resistencia distintas plagas y enfermedades. En el “Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana” (COMAV) se dispone de generaciones avanzadas desarrolladas a partir de un cruce inicial entre la entrada PI 126944 y el tomate cultivado. En concreto, los materiales más avanzados constituyen el tercer retrocruce hacia tomate de generaciones pseudo-F<sub>5</sub> desarrolladas a partir del cruce interespecífico inicial. Por otra parte, se han identificado marcadores moleculares polimórficos tipo CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequences*), microsatélites (*Simple Sequence Repeat, SSR*) y SCARs (*Sequence Characterized Amplified Regions*) entre los parentales de estas generaciones. El objetivo de este trabajo es el avance en el desarrollo de la colección de líneas de introgresión (*introgression lines, ILs*) de *S. peruvianum* PI 126944 en el fondo genético del tomate cultivado. Para ello, por una parte, se pretendía obtener semilla de autofecundación de los materiales disponibles. Además, se avanzaría en el genotipado de las generaciones disponibles hasta el momento. El trabajo se realizó empleando un conjunto de plantas de generaciones avanzadas derivadas de PI 126944. Se fenotiparon por caracteres reproductivos un total de 263 genotipos. Los mayores porcentajes de genotipos con presencia de flores normales, frutos cuajados y producción de semilla viable se observaron en la generación pseudo-F<sub>5</sub>-BC<sub>3</sub>, confirmando que a medida que se recupera fondo genético del parental cultivado disminuye la severidad de las barreras de incompatibilidad entre ambas especies. En el genotipado de los parentales de las generaciones más avanzadas (“F<sub>4</sub>”-BC<sub>2</sub>, “F<sub>5</sub>”-BC<sub>2</sub>, “F<sub>5</sub>”-BC<sub>3</sub> y “F<sub>6</sub>”-BC<sub>2</sub>) para las que se obtuvo semilla de autofecundación se observó el alelo de *S. peruvianum* en al menos uno de los parentales genotipados a excepción de algunas regiones del cromosoma 8 y la totalidad del 10, por lo que gran parte del genoma de la especie silvestre parece estar representada. Los descendientes del parental 12.2 P1 forman parte de la generación más avanzada que se dispone. Los 63 descendientes de dicho parental se genotiparon con los 14 marcadores moleculares que resultaron heterocigotos para el parental 12.2 P1. Se observó una distorsión de la segregación a favor del alelo de tomate en dos de ellos, localizados en los cromosomas 3 y 6 respectivamente. Las regiones de los cromosomas 8 y 9 analizadas resultaron homocigotas para el alelo de tomate. Por último, fueron identificados marcadores SNPs entre los parentales de la población y uno de los híbridos que permitirán el diseño de una plataforma de secuenciación masiva que acelere el avance en el desarrollo de la colección de ILs.

**Palabras clave:** tomate, *Solanum peruvianum*, líneas de introgresión, CAPS, SNPs

**Títol:** Maneig d'un conjunt preliminar de línies d'introgressió de *Solanum peruvianum* en el fons genètic de la tomaca cultivada.

**Resum:** L'entrada PI 126944 de *Solanum peruvianum* resulta d'interés per presentar diverses resistències a plagues i malalties. A l' "Institut de Conservació i Millora de l'Agrodiversitat Valenciana" es disposa de generacions avançades desenvolupades a partir d'un encreuament inicial entre l'entrada PI 126944 i la tomaca cultivada. Concretament, els materials més avançats constitueixen el tercer retroencreuament cap a la tomaca de generacions pseudo-F<sub>5</sub> desenvolupades a partir de l'encreuament interespecífic inicial. D'altra banda, s'han identificat marcadors moleculars polimòrfics CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequences*), microsatèlites (*Simple Sequence Repeat, SSR*) y SCARs (*Sequence Characterized Amplified Regions*) entre els parentals d'estes generacions. L'objectiu d'este treball és l'avanç en el desenvolupament de la col·lecció de línies d'introgressió (*introgression lines, ILs*) de *S. Peruvianum* PI 126944 en el fons genètic de la tomaca cultivada. A tal efecte, d'una banda es pretenia obtenir llavor d'autofecundació dels materials disponibles. D'altra banda, s'avançaria en el genotipat de les generacions disponibles fins al moment. El treball es va realitzar usant un conjunt de plantes de generacions avançades derivades de PI 126944. Es van fenotipar en base a caràcters reproductius un total de 263 genotips. Els majors percentatges de genotips amb flors normals, fruits quallats i producció de llavor viable es van observar en la generació pseudo-F<sub>5</sub>-BC<sub>3</sub>, confirmant que a mesura que es recupera el fons genètic del parental cultivat disminueix la severitat de les barreres d'incompatibilitat entre ambdues espècies. En el genotipat dels parentals de les generacions més avançades ("F<sub>4</sub>"-BC<sub>2</sub>, "F<sub>5</sub>"-BC<sub>2</sub>, "F<sub>5</sub>"-BC<sub>3</sub> y "F<sub>6</sub>"-BC<sub>2</sub>) per a les quals es va obtenir llavor d'autofecundació es va observar l'al·lel de *S. peruvianum* en almenys un dels parentals genotipats a excepció d'algunes regions del cromosoma 8 i la totalitat del 10, per la qual cosa gran part del genoma de l'espècie silvestre sembla estar representada. Els descendents del parental 12.2 P1 formen part de la generació més avançada disponible. Els 63 descendents es van genotipar mitjançant 14 marcadors moleculars que van resultar heterozigots per al parental 12.2 P1. Es va observar una distorsió de la segregació a favor de l'al·lel de tomaca en dos d'ells, localitzats als cromosomes 3 y 6 respectivament. Les regions dels cromosomes 8 i 9 analitzades van resultar homozigotes per a l'al·lel de tomaca. Per últim, van ser identificats marcadors SNPs entre els parentals de la població i un dels híbrids que permetran el disseny d'una plataforma de seqüenciació massiva que accelere l'avanç en el desenvolupament de la col·lecció d'ILs.

**Paraules clau:** tomaca, *Solanum peruvianum*, línies d'introgressió, CAPS, SNPs

**Title:** Management of a preliminary set of introgression lines of *Solanum peruvianum* in the genetic background of cultivated tomato.

**Abstract:** The interest of accession *S. peruvianum* PI 126944 lies on its resistance to different pests and diseases. Advanced generations derived from an initial cross between PI 126944 and cultivated tomato are available at the “Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana” (COMAV). Concretely, the most advanced plant materials correspond to the third backcross to tomato of pseudo-F<sub>5</sub> generations derived from the initial interspecific cross. On the other hand, CAPS (cleaved amplified polymorphic sequences), SSR (simple sequence repeat) and SCARs (sequence characterized amplified regions) markers polymorphic between the parents of these generations have been identified. The objective of this work is the advance in the development of the set of introgression lines (ILs) of *S. peruvianum* PI 126944 in the tomato genetic background. For this purpose, seeds from self-pollination of the available materials were obtained. Furthermore, the genotyping of the available generations was carried out. The work was performed by using a set of plants from the most advanced generations derived from PI 126944. 263 genotypes were phenotyped according to reproductive characters. The highest percentages of genotypes exhibiting normal flowers, set fruits and viable seeds were observed in pseudo-F<sub>5</sub>-BC<sub>3</sub> generation, confirming the idea that the more proportion of tomato genetic background is acquired the less severity of incompatibility barriers between both species is shown. The parentals of the most advanced generations (“F<sub>4</sub>”-BC<sub>2</sub>, “F<sub>5</sub>”-BC<sub>2</sub>, “F<sub>5</sub>”-BC<sub>3</sub> y “F<sub>6</sub>”-BC<sub>2</sub>) which produced viable seed were genotyped and the *S. peruvianum* allele was observed at least in one parental, with the exception of some regions of chromosome 8 and the entire chromosome 10. Consequently, the major part of the wild species genome seems to be represented. The descendants of parental 12.2 P1 belong to the most advanced generation available. 63 descendants were genotyped with the 14 molecular markers that turned out to be heterozygous for the 12.2 P1 parental. A segregation distortion towards tomato allele was observed in two of them, localized in chromosomes 3 and 6 respectively. Analyzed regions of chromosomes 8 and 9 were homozygous for tomato allele. Finally, SNPs markers were identified between the population parentals and one of the hybrids, which will allow the design of a massive sequencing platform to accelerate the development of the ILs set.

**Key words:** tomato, *Solanum peruvianum*, introgression lines, CAPS, SNPs

**Autor:** Antonio Calabuig Serna

**Tutora académica:** Dra. Dña. Ana M<sup>a</sup> Pérez de Castro

**Cotutora:** Dra. Dña. M<sup>a</sup> José Díez Niclós

**Localidad y fecha:** València, Julio 2016

**Lugar de realización:** Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad  
Valenciana (COMAV)

**Tipo de licencia de autorización de acceso y difusión del TFG:** Licencia Creative Commons  
“Reconocimiento No Comercial-Sin obra derivada”

Gràcies a Ana i M<sup>a</sup> José per haver-me donat l'oportunitat de conèixer la millora genètica vegetal de més a prop, una ciència que cada dia m'agrada més, i gràcies per tota la seua ajuda i paciència en este treball. Gràcies també a Gabi i en especial a Patri, per haver sigut una mentora i companya de laboratori immillorable. Per últim, gràcies a totes les persones que contribueixen a millorar la qualitat de l'educació pública, gràcies a la qual sóc qui sóc.

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. TAXONOMÍA DEL TOMATE Y DE LAS ESPECIES SILVESTRES RELACIONADAS	1
1.2. RELACIONES DE CRUZABILIDAD ENTRE EL TOMATE Y LAS ESPECIES RELACIONADAS	2
1.3. <i>SOLANUM PERUVIANUM</i>	3
1.4. POBLACIONES DE PREMEJORA	4
1.4.1. Líneas recombinantes consanguíneas	5
1.4.2. Retrocruces avanzados con autofecundación	5
1.4.3. Líneas de introgresión	6
1.4.4. Poblaciones de premejora desarrolladas con las especies silvestres relacionadas con el tomate	7
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>10</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>11</b>
3.1. MATERIAL VEGETAL	11
3.2. MÉTODOS	12
3.2.1. Fenotipado por caracteres reproductivos	12
3.2.1.1. Aclimatación de las plantas mantenidas <i>in vitro</i>	12
3.2.1.2. Caracterización de las plantas aclimatadas	12
3.2.2. Genotipado mediante marcadores moleculares	13
3.2.2.1. Extracción de DNA	13
3.2.2.2. Cuantificación del DNA	14
3.2.2.3. Marcadores moleculares	15
3.2.3. Genotipado por secuenciación	19
3.2.3.1. Extracción del DNA	19
3.2.3.2. Cuantificación del DNA	19
3.2.3.3. Genotipado	19
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>20</b>
4.1. FENOTIPADO POR CARACTERES REPRODUCTIVOS	20
4.2. GENOTIPADO	23

<b>ÍNDICE DE CONTENIDOS</b>	<b>Página</b>
4.2.1. Genotipado de los parentales de las generaciones más avanzadas	23
4.2.2. Genotipado de los descendientes "F <sub>5</sub> "-BC <sub>3</sub>	26
4.3. GENOTIPADO POR SECUENCIACIÓN	29
5. CONCLUSIONES	31
6. BIBLIOGRAFÍA	32
7. ANEXOS	36

## ÍNDICE DE TABLAS

Página

<b>Tabla 1.</b> Clasificación de las especies silvestres relacionadas con el tomate (Peralta <i>et al.</i> 2008).	2
<b>Tabla 2.</b> Componentes de la PCR para marcadores utilizados.	15
<b>Tabla 3.</b> Perfil térmico de la reacción de amplificación para los marcadores CAPS.	16
<b>Tabla 4.</b> Marcadores utilizados en el genotipado de las plantas seleccionadas en este trabajo. Sombreados se indican los marcadores utilizados en el genotipado de las plantas de la generación F <sub>5</sub> -BC <sub>3</sub> .	17 y 18
<b>Tabla 5.</b> Reactivos de la digestión enzimática para marcadores CAPS.	19
<b>Tabla 6.</b> Características reproductivas de las plantas evaluadas de las generaciones más avanzadas disponibles.	20

## ÍNDICE DE FIGURAS

Página

<b>Figura 1.</b> Esquema representativo del desarrollo de una población de ILs.	6
<b>Figura 2.</b> Híbrido interespecífico F1-E. Fenotipo característico, con entrenudos cortos y hojas pequeñas.	13
<b>Figura 3.</b> Marcador “Lambda DNA/HindIII” (Fermentas).	14
<b>Figura 4.</b> Flores con desarrollo normal en descendientes de 179 PI 4 (A). Flores con desarrollo anormal en descendientes de 124 C M3 (B y C).	21
<b>Figura 5.</b> Frutos de los descendientes del parental 12.2 P1.	22
<b>Figura 6.</b> Frutos de los descendientes del parental 70 P1.	23
<b>Figura 7.</b> Representación gráfica del contenido del genoma de los parentales de las plantas con semilla de autofecundación. En blanco representadas las regiones homocigotas para tomate, en gris las heterocigotas y en negro las homocigotas para <i>S. peruvianum</i> . El símbolo “-” indica ausencia de dato.	24
<b>Figura 8.</b> Representación gráfica del contenido del genoma de los descendientes del parental 12.2 P1. En blanco representadas las regiones homocigotas para tomate y en gris las heterocigotas. El símbolo ‘-’ indica ausencia de dato.	28

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS Y SUBÍNDICES

BCRILs: *Backcross recombinant inbred lines*

BC<sub>y</sub>: retrocruce número “y”

CAPS: *Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*

COMAV: Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana.

FC: Fortuna C

“F<sub>x</sub>”: generación pseudo-F<sub>x</sub>

ILs: *Introgression Lines*

NIL: *Near Isogenic Line*

QTLs: *Quantitative Trait Loci*

RFLPs: *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RILs: *Recombinant inbred lines*

SCARs: *Sequence Characterized Amplified Regions*

SSR: *Simple Sequence Repeat*

## 1. Introducción

### 1.1. Taxonomía del tomate y de las especies silvestres relacionadas

A lo largo de la historia el tomate cultivado ha sido clasificado en diferentes grupos taxonómicos atendiendo a diversos criterios. Desde la introducción del tomate en Europa en el siglo XVI se consideró su inclusión taxonómica en el género *Solanum*; no obstante, en 1694 Tournefort separó esta especie en un género distinto llamado *Lycopersicon* basándose en una clasificación morfológica de los frutos. Posteriormente, en 1753 Lineo incluyó de nuevo el tomate en el género *Solanum* como también lo hizo Jussieu en 1789. Sin embargo, en 1754 Miller recuperó la clasificación iniciada por Tournefort a finales del siglo XVII y describió el tomate cultivado como la especie *Lycopersicon esculentum* M., de nuevo perteneciente a un género diferenciado de las especies del género *Solanum*. Esta separación taxonómica basada en el polimorfismo de las anteras fue mantenida por la mayoría de autores hasta más allá de la segunda mitad del siglo XX. En 1979 Rick propuso una clasificación basada en el estudio de relaciones de cruzabilidad y describió dos grupos taxonómicos: en el complejo *esculentum* agrupó la mayoría de especies auto-compatibles que eran capaces de cruzar con el tomate cultivado mientras que en el complejo *peruvianum* incluyó las especies auto-incompatibles entre las cuales se encontraban *Lycopersicon peruvianum* y *L. chilense*. De este modo, los diferentes criterios de clasificación basados en caracteres morfológicos y cruzabilidad entre especies dieron lugar a agrupaciones taxonómicas en especies, subespecies y variedades. En 1990 Child incluyó de nuevo el tomate dentro del género *Solanum* y lo distribuyó en tres series diferentes: *Lycopersicum*, *Ericopersicon* y *Neolycopersicon* (Peralta y Spooner, 2000).

En 2008 Peralta *et al.* estudiaron las relaciones taxonómicas entre el tomate cultivado y otras especies silvestres relacionadas, describiendo un total de 17 especies agrupadas en 3 secciones: *Lycopersicon*, *Lycopersicoides* y *Juglandifolia*. El tomate fue ubicado en la sección *Lycopersicon*, en concreto en el grupo *Lycopersicon*, uno de los cuatro (*Lycopersicon*, *Neolycopersicon*, *Eriopersicon* y *Arcanum*) en los que dicha sección se divide (**Tabla 1**).

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

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

A pesar de que la denominación del tomate cultivado ha ido cambiando a lo largo de la historia debido a la controversia generada por su ubicación taxonómica, el nombre específico más aceptado actualmente es *Solanum lycopersicum* L.

### 1.2. Relaciones de cruzabilidad entre el tomate y las especies relacionadas

El tomate cultivado no presenta incompatibilidad total en los cruces interespecíficos de la sección *Lycopersicon* aunque sí que existen diferencias en la cruzabilidad entre las diferentes especies. En el caso de *S. pennellii*, *S. pimpinellifolium*, *S. chmielewskii* y *S. neorickii* los cruces resultan sencillos, no obstante la obtención del híbrido con otras especies, como es el caso de *S. peruvianum* presenta mayor dificultad (Peralta *et al.*, 2008). *S. peruvianum* es una especie autoincompatible y presenta importantes barreras de cruzabilidad cuando es usado como parental femenino en hibridaciones sexuales con *S. lycopersicum*, ya que se produce el aborto temprano del embrión. Estas barreras de tipo postcigótico pueden deberse a fallos en el aporte de nutrientes al embrión por parte del tejido suspensor o bien por la degeneración temprana del endospermo (Barbano y Topoleski, 1984).

Además de constituir un paso limitante en la obtención del híbrido interespecífico, las barreras de cruzabilidad pueden llegar a arrastrarse en las siguientes generaciones, por ello es necesario el uso de técnicas que permitan sortear dichas barreras (Hogenboom, 1972). En el

caso concreto de la obtención de híbridos F1 a partir de *S. lycopersicum* y *S. peruvianum* el rescate de embriones o de semillas inmaduras son técnicas adecuadas para superar las barreras de tipo postcigótico (Fulton *et al.*, 1997a).

### **1.3. *Solanum peruvianum***

*S. peruvianum* pertenece a la sección *Lycopersicon*. Fenotípicamente las plantas son pequeñas y poseen hojas y tallos pubescentes, las flores abiertas contienen estambres curvados y amarillos. Los frutos son redondos, poseen un diámetro entre 1 y 1,5 cm y son de color verde o blanquecino y morado. Las semillas son de color marrón y de tamaño inferior al de las del tomate cultivado (Peralta *et al.*, 2005). Es la especie silvestre relacionada con el tomate más extendida en Sudamérica, en concreto se desarrolla en la región comprendida entre Perú y Chile. Es capaz de crecer en un amplio rango de altitudes y se puede encontrar tanto en zonas áridas cercanas al Pacífico como en localizaciones cercanas a los andes, a 3000 m sobre el nivel del mar. Además, es una de las especies de la sección *Lycopersicon* más polimórficas y recientemente fue dividida en cuatro especies diferentes: *S. peruvianum* L. s.str., *S. corneliomulleri* J. F. Macbr., *S. arcanum* Peralta y *S. huaylasense* Peralta (Rick, 1963; Peralta *et al.*, 2005).

Respecto a la variabilidad genética, *S. peruvianum* es un reservorio inmenso de recursos genéticos susceptibles de ser usados en la mejora genética del tomate cultivado. El hecho de que sea una especie capaz de crecer a altitudes muy diversas constituye un punto de partida interesante para la búsqueda de genes relacionados con la adaptación a estreses abióticos. Por otro lado, ya han sido introgresados mediante cruces interespecíficos genes de resistencia al virus del mosaico del tomate (*Tomato mosaic virus*, ToMV) y de resistencia a nematodos, sugiriendo el interés de esta especie como fuente de resistencia a estreses bióticos (Rossi *et al.*, 1998; Foolad, 2007). Algunos ejemplos concretos de estos genes y QTLs ya descritos en *S. peruvianum* son: los genes *Tm-1*, *Tm-2* (Laterrot y Pecaut, 1969), y *Tm-2*<sup>2</sup> de resistencia al ToMV (Hall, 1980), el gen *Frl* de resistencia al hongo *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* (Vakalounakis *et al.*, 1997), genes *Mi* de resistencia los nematodos del género *Meloidogine* (Gilbert, 1958) o algunos QTLs de resistencia a la bacteria *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* (Van Heusden *et al.*, 1999).

Una de las entradas de *S. peruvianum* más interesantes es la PI 126944 ya que presenta resistencia a diversos patógenos entre los cuales se encuentran el virus del rizado amarillo del tomate (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV) (Picó *et al.*, 1998; Pilowsky y Cohen, 2000), el virus del bronceado del tomate (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) (Paterson *et al.*, 1989), el

virus del mosaico del tabaco (*Tobacco mosaic virus*, TMV) (Yamakawa y Nagata, 1975), el virus del rizado de la hoja del tomate (*Tomato leaf curl virus*, ToLCV) (Muniyappa *et al.*, 1991) y el hongo *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicislycopersici* (Rowe y Farley, 1981). Picó *et al.*, 2002 obtuvieron tres híbridos interespecíficos a partir de dicha entrada de *S. peruvianum* y el tomate cultivado. Las generaciones posteriores obtenidas a partir de estos híbridos fueron ensayadas para comprobar su resistencia frente al TSWV y al TYLCV y se concluyó que algunos de los materiales derivados mantenían las resistencias a dichos virus (Pérez de Castro *et al.*, 2008; Julián *et al.*, 2013). Debido al interés de estas nuevas generaciones en la mejora del tomate cultivado, se pretende desarrollar un conjunto de líneas de introgresión que contengan el genoma de la entrada PI 126944 en el fondo genético de *S. lycopersicum*.

#### **1.4. Poblaciones de premejora**

El tomate cultivado presenta en comparación con sus especies silvestres relacionadas un fondo genético bastante pobre. La principal causa de esta pérdida de biodiversidad genética se debe al proceso de domesticación, ya que en sus inicios se basó en la selección de los fenotipos más adecuados entre el germoplasma de tomate disponible. El hecho de seleccionar entre un número reducido de plantas y la naturaleza autógena del tomate cultivado provocaron una disminución de la variación genética asociada a la deriva genética. En las últimas décadas, el estudio de la variación genética de las especies silvestres relacionadas con el tomate ha sido fundamental para el aprovechamiento de dicha biodiversidad en la mejora de nuevos cultivares en general y en el desarrollo de poblaciones de premejora en particular (Bai y Lindhout, 2007).

La obtención de híbridos constituye el primer paso en el aprovechamiento de la variabilidad genética de las especies silvestres relacionadas con el tomate. La introgresión de nuevos genes de interés se ha conseguido tradicionalmente mediante retrocruzamientos subsiguientes del híbrido con la especie cultivada. Es decir, una vez se ha obtenido el híbrido interespecífico a partir del cruzamiento del parental donante (especie silvestre relacionada de interés) con el parental recurrente (entrada de tomate cultivado), se cruza dicho híbrido con el parental recurrente. Dado que de esta forma la introgresión es costosa y lenta, la tendencia actual es aprovechar el proceso para desarrollar poblaciones de premejora. Las poblaciones de premejora son conjuntos de líneas que poseen cada una de ellas uno o varios fragmentos cromosómicos de la especie silvestre en el fondo genético de la especie cultivada (Zamir, 2001).

A pesar de que la obtención de poblaciones de las mismas es también un proceso largo y dificultoso, estas presentan algunas ventajas: es posible incorporarlas directamente a programas de mejora debido a que poseen una gran proporción de genoma del parental cultivado y permiten destapar variabilidad oculta del parental silvestre mediante la identificación y el mapeo de QTLs (*Quantitative Trait Loci*) o genes menores interesantes desde el punto de vista agronómico. Actualmente existen diferentes tipos de poblaciones de premejora, cada una de ellas desarrolladas mediante un diseño de cruzamientos concreto.

#### 1.4.1. Líneas recombinantes consanguíneas

Las líneas recombinantes consanguíneas (*Recombinant inbred lines*, RILs) son un conjunto de líneas homocigotas obtenidas a partir de autofecundaciones del híbrido interespecífico inicial. Este tipo de poblaciones de premejora comportan una serie de ventajas para el mapeo de QTLs y genes menores, ya que cada una de las líneas obtenidas finalmente posee una combinación alélica distinta a las demás y es genéticamente estable por ser homocigota. Esta característica en concreto reduce el efecto del ambiente sobre la varianza fenotípica y permite el análisis de caracteres cuantitativos (Paran *et al.*, 1995). Además, el número de individuos necesarios para detectar ligamiento entre un marcador y un QTL es menor en el caso de las RILs si lo comparamos con el de otras poblaciones como las  $F_2$ , por lo que el mapeo de QTLs resulta más eficiente si se usan este tipo de poblaciones de premejora (Simpson, 1989). Por otro lado, las RILs poseen algunos inconvenientes, en algunos casos aparecen barreras de cruzabilidad en las primeras generaciones  $F_1$  que dificultan las autofecundaciones iniciales siguientes. Este fenómeno podría deberse a la presencia de una alta proporción de genoma de la especie silvestre en la línea obtenida (Paran *et al.*, 1995).

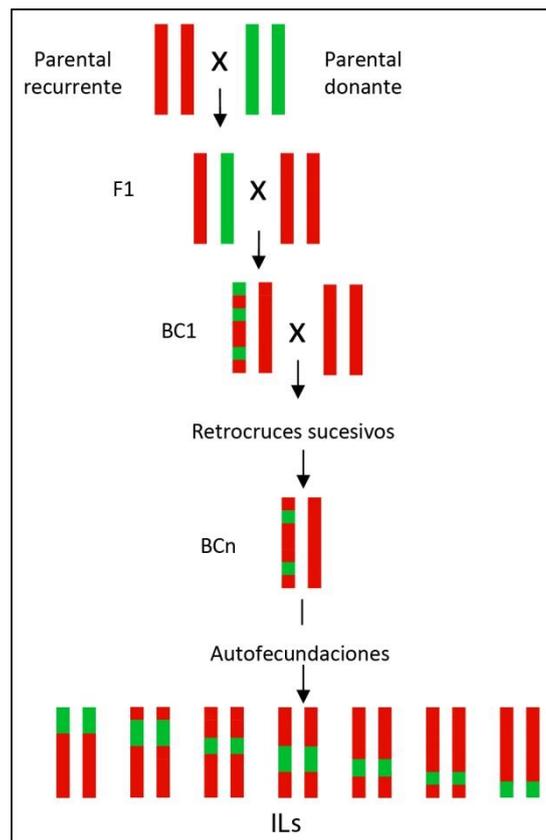
#### 1.4.2. Retrocruces avanzados con autofecundación

Como ya se ha apuntado, a pesar de la utilidad de las líneas recombinantes consanguíneas (RILs) en el mapeo de QTLs en ocasiones no es posible obtener este tipo de poblaciones de premejora debido a la esterilidad de los individuos  $F_1$ . En estos casos es posible obtener otro tipo de población de premejora a partir del híbrido interespecífico mediante retrocruzamientos con el parental recurrente y autofecundaciones sucesivas; se trata de los retrocruces avanzados con autofecundación (*Backcross recombinant inbred lines*, BCRIILs). Este proceso permite por una parte conseguir en pocas generaciones el genoma del parental silvestre dividido en fragmentos cromosómicos introgresados en el fondo genético de la especie cultivada. Por otro lado, las autofecundaciones incrementan el nivel de homocigosis, de este modo se obtiene un conjunto de líneas genéticamente más estables respecto a otras generaciones los retrocruces o las  $F_2/F_3$ . Por último, los fragmentos cromosómicos del parental

silvestre en el fondo genético del parental cultivado son más pequeños por lo que la detección y el mapeado de QTLs resulta más eficiente (Ramsay *et al.*, 1996; Monforte y Tanksley, 2000).

#### 1.4.3. Líneas de introgresión

El objetivo ideal del desarrollo de un conjunto de líneas de introgresión (*Introgression lines*, ILs) es conseguir una población cuyas líneas posean un único fragmento cromosómico del parental silvestre en homocigosis, es decir, que cada individuo contenga introgresado en el fondo genético del parental cultivado un fragmento concreto del genoma del parental donante y distinto al que han introgresado los demás. Esto se consigue mediante retrocruces sucesivos más avanzados que en el caso de las RILs y que en el de los retrocruces avanzados con autofecundación. Finalmente, la autofecundación permite fijar el fragmento introgresado en homocigosis (Zamir, 2001) (**Figura 1**). Cada una de las ILs así obtenidas constituye una línea casi isogénica (*Near isogenic line*, NIL) con respecto al parental recurrente. El largo proceso de obtención de estas poblaciones de premejora constituye su principal inconveniente.



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

Respecto a las ventajas, las ILs permiten detectar QTLs de forma muy eficiente, ya que las diferencias observadas entre el parental recurrente y cada línea casi isogénica deben ser consecuencia del fragmento de genoma del parental silvestre introgresado. Además, esta

diseción del genoma del parental silvestre en el fondo genético del cultivado permite evitar interacciones entre QTLs distintos y, a su vez, estudiar dichas interacciones mediante cruzamientos entre las distintas ILs (Lippman *et al.*, 2007).

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

Uno de los objetivos principales en la mejora del tomate es el aprovechamiento eficaz de la variabilidad genética de las especies silvestres relacionadas con el tomate, es decir, la búsqueda de nuevos genes que aporten características agronómicas de interés al tomate cultivado. En este sentido, las poblaciones de premejora desarrolladas a partir de entradas silvestres de *S. pennellii*, *S. pimpinellifolium* y *S. habrochaites* entre otras han constituido una herramienta de gran interés para el mapeo de genes y QTLs (Foolad, 2007; Passam *et al.*, 2007).

Eshed y Zamir (1995) desarrollaron un conjunto de 50 ILs a partir de la entrada de *S. pennellii* LA 716 que cubrían el 100% del genoma de la especie silvestre. Esta población de líneas de introgresión ha sido usada para mapear QTLs relacionados con diversas características como el peso del fruto (Alpert y Tanksley, 1996), el color y la formación de  $\beta$ -carotenos (Ronen *et al.*, 2000) o el descubrimiento de la relación entre el grado de ejerción del estigma y el grado de autopolinización (Chen y Tanksley, 2004). Posteriormente se han desarrollado diferentes poblaciones de sub-ILs con la finalidad de lograr un mapeo más fino de los QTLs, estas han permitido identificar hasta 2795 QTLs distintos. Además, han facilitado el estudio de ciertos caracteres que se expresan en la descendencia pese a no estar presentes en los parentales, debido a interacciones entre los alelos de la especie silvestre y la cultivada (Tanksley, 1993; Lippman *et al.*, 2007). Con estas poblaciones también se han llevado a cabo estudios sobre la heterosis y la relación de la presencia de loci superdominantes en las líneas y su capacidad reproductiva (Semel *et al.*, 2006).

En el caso de *S. pimpinellifolium* se ha desarrollado una población de 196 líneas provenientes de retrocruces avanzados con autofecundación de las cuales 100 son suficientes para representar por completo el genoma de la especie silvestre. Mediante esta nueva población ha sido posible mapear 71 nuevos QTLs, 34 de ellos relacionados con la presencia de algún alelo silvestre que afecta a características agronómicas de interés como el rendimiento o la forma del fruto (Doganlar *et al.*, 2002). Además, con la finalidad de facilitar el mapeo de otras secuencias relacionadas con caracteres interesantes en la mejora se ha desarrollado una población de RILs que ha permitido estudiar resistencias a estreses bióticos y abióticos y

contenido en licopeno de los frutos (Ashrafi *et al.*, 2009). Más recientemente se ha obtenido otra población de ILs a partir de una entrada diferente de *S. pimpinellifolium* que ha permitido la detección de otros QTLs relacionados con otros caracteres (Barrantes *et al.*, 2014).

Respecto a *S. habrochaites*, se obtuvo una población BC<sub>3</sub> de más de 200 líneas que sirvió para detectar 121 QTLs relacionados con caracteres de relevancia agronómica. Además, se observó que en 25 de estos QTLs la presencia del alelo silvestre determinaba fenotipos favorables pese a no estar este carácter presente en la entrada del parental donante original (Bernacchi *et al.*, 1998). También se han desarrollado poblaciones de retrocruces avanzados con autofecundación resistentes a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* a partir de la entrada resistente LA407 de *S. habrochaites*. En este caso se han llegado a detectar líneas que mantienen dicha resistencia y además poseen más del 87% del fondo genético del tomate cultivado, lo que las convierte en candidatas para su uso directo en programas de mejora (Francis *et al.*, 2001).

A pesar de las barreras de cruzabilidad que presentan otras especies silvestres más alejadas filogenéticamente con el tomate cultivado se han desarrollado a partir de las mismas otras poblaciones de premejora. A partir de la entrada LA2951 de *S. lycopersicoides* se obtuvo un conjunto de 56 líneas de introgresión en el fondo genético de *S. lycopersicum*. Más tarde se desarrolló un subconjunto de 34 líneas con el objetivo de conseguir mayor resolución en el mapeo de loci de interés (Canady *et al.*, 2005).

En el caso concreto de *S. peruvianum* se han desarrollado poblaciones BC<sub>3</sub> y BC<sub>4</sub> a partir de la entrada silvestre LA1706, aunque debido a las barreras de incompatibilidad existentes las semillas obtenidas fueron escasas. No obstante, a pesar de la distancia genética entre ambos parentales, el valor de recombinación que se obtuvo (muy próximo al valor esperado) sugirió un alto nivel de homología entre ambos genomas (Fulton *et al.*, 1997a; Fulton *et al.*, 1997b).

Las 241 líneas de la generación BC<sub>3</sub> fueron analizadas mediante 177 marcadores moleculares del tipo RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) y otros basados en amplificación por PCR. A partir del genotipado de la población obtenida se consiguió un mapa de ligamiento que cubría el 67% del genoma del parental silvestre. Parte de la fracción del genoma no representado correspondía a regiones relacionadas con esterilidad. La falta de representación de otras regiones se asoció con el limitado tamaño de la generación BC<sub>1</sub> (Fulton *et al.*, 1997a). Las 220 familias de la generación BC<sub>4</sub> fueron analizadas para la detección de QTLs relacionados con 35 caracteres agronómicos de interés, finalmente se identificaron 166 QTLs ligados a 29 de estos caracteres. Para algunos de los caracteres cuantitativos estudiados como el contenido en

sólidos solubles, el peso del fruto o el rendimiento, al menos uno de los QTLs detectados presentó mejoras desde el punto de vista agronómico si el alelo silvestre estaba presente. Por tanto, la generación BC<sub>4</sub> constituye un recurso importante para la mejora del tomate cultivado, ya que hasta su obtención únicamente se habían introgresado en *S. lycopersicum* procedentes de *S. peruvianum* genes de resistencia. Además, el estudio reafirmó la idea de que los alelos silvestres en el fondo genético del tomate pueden contribuir a un carácter favorable pese a no ser este fenotípicamente detectable en el parental donante (Fulton *et al.*, 1997b).

## 2. Objetivos

La entrada PI 126944 de *Solanum peruvianum* resulta de interés por presentar resistencia a distintas plagas y enfermedades. En el “Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana” (COMAV) se dispone de generaciones avanzadas desarrolladas a partir de un cruce inicial entre la entrada PI 126944 y el tomate cultivado. En concreto, los materiales más avanzados constituyen generaciones de segundo o tercer retrocruce hacia tomate de distintas generaciones “F<sub>4</sub>”, “F<sub>5</sub>” y “F<sub>6</sub>”. Por otra parte, se han identificado marcadores moleculares polimórficos de tipo CAPS (*Cleaved Amplified Polimorphic Sequence*), microsatélites (*Simple Sequence Repeat, SSR*) y SCARs (*Sequence Characterized Amplified Regions*) entre los parentales de estas generaciones. Dada la dificultad encontrada en la introgresión de fragmentos de PI 126944 en tomate, resulta de interés aprovechar las generaciones disponibles para el desarrollo de una colección de líneas de introgresión (*Introgression Lines, ILs*) que representen todo el genoma de esta entrada en el fondo genético de la especie cultivada.

En este contexto, el objetivo del trabajo es el avance en el desarrollo de la colección de ILs de *S. peruvianum* PI 126944 en el fondo genético del tomate cultivado. Los objetivos concretos de este trabajo final de grado son:

- Caracterización fenotípica por características reproductivas de los materiales más avanzados aclimatados y cultivados en invernadero.
- Obtención de semilla de autofecundación de los materiales fértiles y autocompatibles.
- Confirmación de la presencia de fragmentos de la especie silvestre en los materiales mediante el genotipado con marcadores moleculares de tipo CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*), microsatélites (*Simple Sequence Repeat, SSR*) y SCARs (*Sequence Characterized Amplified Regions*) polimórficos entre tomate y *S. peruvianum*.
- Identificación mediante genotipado por secuenciación (*Genotyping by Sequencing, GBS*) de marcadores SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) entre los parentales de la colección.

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1. Material vegetal

En trabajos anteriores del grupo se desarrollaron tres híbridos a partir del cruzamiento entre la línea NE-1 de *S. lycopersicum* y la entrada de *S. peruvianum* PI 126944. Dichos híbridos, F<sub>1</sub>-B, F<sub>1</sub>-E y F<sub>1</sub>-A, fueron obtenidos a partir del cultivo de semillas inmaduras y resultaron ser autoincompatibles (Picó *et al.*, 2002). Posteriormente, se obtuvieron nuevas generaciones mediante tres retrocruces sucesivos hacia la línea Fortuna C (FC) de *S. lycopersicum*. En los retrocruces BC<sub>1</sub> y BC<sub>2</sub> fue necesario el rescate de embriones para obtener la progenie mientras que en el tercer retrocruce BC<sub>3</sub> se consiguió semilla viable sin recurrir a esta técnica.

El número de plantas obtenidas a partir de cada retrocruce fue bastante reducido por lo que la probabilidad de obtener el genoma de *S. peruvianum* totalmente representado en los materiales obtenidos era baja, por ello se llevaron a cabo cruzamientos adicionales. Puesto que los híbridos F<sub>1</sub>-B, F<sub>1</sub>-E y F<sub>1</sub>-A eran autoincompatibles no fue posible obtener la generación F<sub>2</sub> de dichos individuos mediante autofecundación. En su lugar, se cruzaron los híbridos F<sub>1</sub>-B y F<sub>1</sub>-E para desarrollar una pseudo-F<sub>2</sub> ("F<sub>2</sub>"), es decir, una generación F<sub>2</sub> que no procede de la autofecundación de los individuos F<sub>1</sub> si no del cruce entre individuos diferentes de la F<sub>1</sub>. Puesto que las generaciones obtenidas seguían mostrando autoincompatibilidad se siguió este mismo esquema de cruzamientos hasta obtener la generación pseudo-F<sub>6</sub> ("F<sub>6</sub>"). Además, mediante la técnica de rescate de embriones se consiguieron desarrollar generaciones "F<sub>3</sub>"-BC<sub>2</sub> y "F<sub>2</sub>"-BC<sub>1</sub> retrocruzando pseudo-F<sub>3</sub> y pseudo-F<sub>2</sub> hacia FC (Picó *et al.*, 2002; Pérez de Castro *et al.*, 2008; Julián *et al.*, 2013). Posteriormente, mediante la técnica de cultivo de semillas inmaduras, el grupo ha obtenido las generaciones "F<sub>4</sub>"-BC<sub>1</sub>, "F<sub>5</sub>"-BC<sub>1</sub>, "F<sub>5</sub>"-BC<sub>2</sub> y "F<sub>6</sub>"-BC<sub>1</sub>, así como el siguiente retrocruce de todas ellas hacia tomate cultivado.

Un conjunto de plantas pertenecientes a las generaciones más avanzadas han sido las empleadas en el presente trabajo. En concreto, los materiales utilizados se describen a continuación.

En primer lugar, del conjunto de plantas de las generaciones más avanzadas, fue posible aclimatar en invernadero un total de 291 plantas, habiéndose podido fenotipar por caracteres reproductivos 263 de ellas (Tabla 6).

En cuanto a las plantas seleccionadas para su genotipado mediante marcadores moleculares, se trata, en primer lugar, de 21 de los parentales empleados para la obtención de las generaciones más avanzadas. En concreto se seleccionaron aquellos parentales de los que derivaban materiales a partir de los cuales se obtuvieron descendientes que dieron lugar a

frutos con semillas viables (**apartado 4.2.1.**). Además, se genotiparon los descendientes obtenidos a partir del cruce del tomate cultivado (FC) como parental femenino con el parental masculino 12.2 P1, perteneciente a la generación "F<sub>5</sub>"-BC<sub>2</sub>.

Por último, para el genotipado por secuenciación se utilizaron seis muestras: dos de PI 126944, dos de FC, una de NE-1 y una del híbrido F<sub>1</sub>-A. Excepto para el caso del híbrido, las muestras procedían de una mezcla de extracción de DNA de cinco plantas de cada uno de los genotipos correspondientes.

## **3.2. Métodos**

### **3.2.1. Fenotipado por caracteres reproductivos**

#### *3.2.1.1. Aclimatación de las plantas mantenidas in vitro*

Las plantas disponibles procedentes del rescate de semillas inmaduras de ensayos anteriores (**apartado 3.1**) se mantuvieron en cultivo *in vitro* en botes conteniendo medio base 4,414 g/L de sales de Murashige y Skoog (MS) + Vitaminas Gamborg B5; 20 g/L de sacarosa; 0,8% de agar y el pH ajustado a 5,7. Las plantas se subcultivaron a medio fresco a medida que se desarrollaban. En el momento en el que se disponía de cuatro copias de una planta, se seleccionó una de las mismas para ser aclimatada y transferida a invernadero. Para ello, se extrajo la planta, limpiando la raíz con objeto de eliminar los restos de medio de cultivo, para a continuación transferirla a maceta pequeña (7x7x8 cm) con sustrato. Las plantas se mantuvieron durante una semana cubiertas con un vaso de plástico en cámara de cultivo con condiciones de luz y temperatura controlada (24-26°C con luz fluorescente, 50 μmol fotones/m<sup>2</sup>s, durante 16 h al día). Trascurrido este tiempo, las plantas fueron transferidas a maceta de 20 L en invernadero, con condiciones de luz y temperatura controladas.

#### *3.2.1.2. Caracterización de las plantas aclimatadas*

Una vez las plantas aclimatadas comenzaron a desarrollarse en el invernadero, se llevó a cabo la caracterización de las mismas por caracteres reproductivos. Se realizaron controles semanales anotando de cada planta: la presencia de flores normales, la presencia de flores anormales (pequeñas, con inflorescencias abortadas, con escaso desarrollo de las anteras) y el cuajado de frutos. Algunas de las plantas presentaron un fenotipo característico, consistente en entrenudos cortos y hojas muy pequeñas, lo que daba a la planta un aspecto achaparrado. Este fenotipo es el que presentó el híbrido interespecífico F<sub>1</sub>-E, uno de los que derivan los materiales empleados en este trabajo (**Figura 2**).



**Figura 2.** Híbrido interespecífico F1-E. Fenotipo característico, con entrenudos cortos y hojas pequeñas.

En aquellos casos en los que se obtuvieron frutos cuajados, se recolectaron de las plantas y se extrajeron las semillas de aquellos que contenían semillas viables.

### 3.2.2. Genotipado mediante marcadores moleculares

El genotipado de las plantas se llevó a cabo mediante tres tipos de marcadores moleculares: CAPS (*Cleaved Amplified Polimorphic Sequence*), microsatélites (*Simple Sequence Repeat*, SSR) y SCARs (*Sequence Characterized Amplified Regions*). El polimorfismo en estos marcadores para las entradas FC de *S. lycopersicum* y PI 126944 de *S. peruvianum* fue comprobado anteriormente (Julián *et al.*, 2013). A continuación se describe el proceso seguido para el genotipado de las plantas.

#### 3.2.2.1. Extracción de DNA

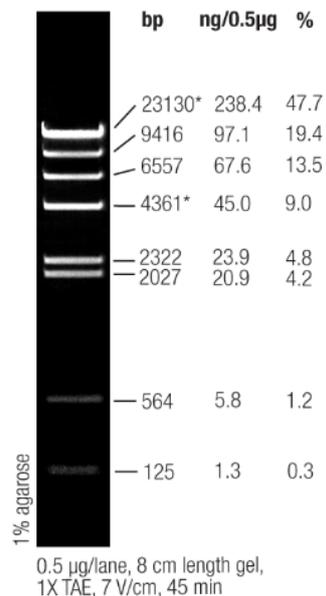
El DNA se extrajo a partir de hojas jóvenes siguiendo el protocolo de Doyle y Doyle (1990) con algunas modificaciones:

- 1- Recoger 75 mg de material vegetal en un microtubo de 1.5 ml.
- 2- Introducir los tubos en nitrógeno líquido.
- 3- Triturar el material vegetal con un mortero de plástico.
- 4- Añadir 500 µl de tampón de extracción CTAB (**Anexo I**). Mezclar el contenido del tubo mediante agitación.
- 5- Incubar el tubo a 65°C durante 30 minutos.
- 6- Añadir 450 µl de cloroformo-isoamílico (24:1). Agitar la mezcla hasta obtener una emulsión verdosa.

- 7- Centrifugar durante 10 minutos a 15.700 xg.
- 8- Recuperar la fase acuosa conteniendo el DNA (400 µl aproximadamente) y transferir a un tubo nuevo.
- 9- Añadir un volumen de isopropanol frío.
- 10- Mantener 5 minutos en hielo.
- 11- Centrifugar 10 minutos a 15.700 xg.
- 12- Eliminar el sobrenadante y añadir 100 µl de etanol al 70% para lavar el precipitado.
- 13- Centrifugar durante 5 minutos a 15.700 xg. Eliminar el etanol y dejar secar el precipitado 5 minutos.
- 14- Resuspender el precipitado en 50 µl de tampón TE (**Anexo I**) al que se ha añadido RNasa y conservar a -20° C.

### 3.2.2.2. Cuantificación del DNA

Con la finalidad de comprobar la integridad del DNA se cuantificaron las muestras extraídas mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón TBE (**Anexo II**). Para ello se cargó 1 µl de extracción en 9 µl de agua y 2 µl de tampón LB 6X (**Anexo II**). El voltaje aplicado para la separación fue de 143 V en cubeta de electroforesis TBE 1X. La cuantificación del DNA se llevó a cabo usando el marcador “Lambda DNA/HindIII” (**Figura 3**).



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

La disolución cargada en el gel estaba compuesta por 0,5 µl de marcador, 9,5 µl de agua milliQ y 2 µl de tampón LB 6X. El gel se tiñó durante 20 minutos en una disolución de bromuro de etidio a una concentración de 0,5 µg/ml.

### 3.2.2.3. Marcadores moleculares

Para el genotipado de las plantas se utilizaron tres tipos de marcadores moleculares. Los marcadores CAPS o secuencias polimórficas amplificadas y cortadas se basan en el uso de enzimas de restricción para la digestión de una secuencia concreta previamente amplificada mediante PCR. El polimorfismo en dicha secuencia es generado en el caso de que esté presente o no el sitio de restricción para la enzima utilizada. Por otro lado, los marcadores SCARs son regiones amplificadas de una secuencia caracterizada mediante cebadores específicos. El polimorfismo se basa en las diferencias de longitud de las secuencias amplificadas. Por último, los marcadores SSR son secuencias cortas de nucleótidos (entre 2 y 6 pb) que se repiten en tándem. El polimorfismo no se genera debido al tamaño de dicha secuencia si no al distinto número de repeticiones de la misma.

Por tanto, el genotipado constó de una reacción de amplificación por PCR y en el caso de los CAPS, de la posterior digestión del producto de PCR con la enzima de restricción que revelaba el polimorfismo. Finalmente se separó el producto de la PCR o de la digestión (según el caso) mediante electroforesis en gel de agarosa.

### PCR

La reacción de PCR para los marcadores se llevó a cabo en un volumen total de 25 µl (**Tabla 2**).

**Tabla 2.** Componentes de la PCR para marcadores utilizados.

Reactivo	Concentraciones del stock	Volumen (µl)	Concentración final
Agua Milli-Q	-	17,34	-
Tampón	10X	2,5	1X
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1	1 mM
Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs)	10 mM	1	0,4 mM
Cebador directo	10 µM	1	0,4 mM
Cebador reverso	10 µM	1	0,4 mM
Taq polimerasa	5 U/µl	0,16	0,8 U/25 µl
DNA molde	40-100 ng/µl	1	40-100 ng/25 µl

El inicio de la reacción constó de una primera etapa de desnaturalización, seguida de 35 ciclos de desnaturalización, hibridación y extensión. La reacción se completó con una extensión final (**Tabla 3**).

**Tabla 3.** 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	X <sup>1</sup>	1 min
Extensión	72	Y <sup>2</sup>
Extensión final	72	10 min

} x 35

<sup>1</sup>La temperatura de hibridación varía en función del marcador.

<sup>2</sup>El tiempo de extensión varía según la longitud del fragmento a amplificar, a razón de 30 segundos por cada 500 pb.

La reacción de amplificación se realizó en un termociclador *Eppendorf Mastercycler*. Los marcadores seleccionados para el genotipado de las plantas (**Tabla 4**) fueron aquellos para los que el parental 12.2 P1 resultó heterocigoto para los alelos de tomate y *S. peruvianum*.

### ELECTROFORESIS

La visualización de los productos de PCR fue llevada a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% (peso/volumen) con tampón TBE 1X (**Anexo II**). La mezcla de carga estaba formada por 5 µl del producto de la PCR, 2 µl de tampón de carga LB 6X y 5 µl de agua MilliQ. La separación se llevó a cabo aplicando un voltaje de 143 V en una cubeta de electroforesis con tampón TBE 1X.

El tamaño de los fragmentos fue comprobado mediante el marcador “GeneRuler 100 bp DNA ladder (0,5 µg/µl)” de la casa comercial Fermentas, que permite determinar el tamaño de fragmentos de hasta 1.000 pb. La tinción de los geles se llevó a cabo en una solución de bromuro de etidio a una concentración de 0,5 µg/ml durante 20 minutos.

**Tabla 4.** Marcadores utilizados en el genotipado de las plantas seleccionadas en este trabajo.

Sombreados se indican los marcadores utilizados en el genotipado de las plantas de la generación F<sub>5</sub>-BC<sub>3</sub>. (Continuación en página siguiente).

Marcador	Tipo de marcador	Cromosoma	cM (Tomato-EXPEN2000)	Enzima de restricción	Temperatura de hibridación (°C)	Tiempo de extensión	Secuencia cebadores (5' - 3')
SSR92	SSR	1	0	-	50	1 min	AAGAAAGAGGATCGATCGAAGA TCATGACCACGACTACATGTTTC
SSR1/18,5	SSR	1	18,5	-	55	1 min	AAAAAGTGGGGAAGGAGCCTA ACCTCAACGGGAAAGTACCA
SSR75	SSR	1	53,5	-	55	1 min	CCATCTATTATCTCTCCAACAC GGTCCCAACTCGGTACACAC
TG460	CAPS	1	70	Mbol	57	1 min	GAAGAAAGGGAAACAAGGAAAG TGTTCTGCTTGACTAGAAGTATGG
SSR222	SSR	1	97,5	-	55	1 min	TCTCATCTGGTCTGCTGTT TTCTTGGAGGCCAGAAAC
SSR156	SSR	1	146	-	50	1 min	CACGCCTATGCACCTTTCTT CTTCAAGGCTAAACCTCCGA
CT190	SCAR	1	163,5	-	58	30 s	TTCAACAACAGGACTCAATACA TAAGAAAGGCAAGATTTGGC
TG608	CAPS	2	0	Msel	53	1 min	GAAAGCTTCTTAAGCAGGTTGTG TCATTAGTGTAGGCAAGTGAAG
SSR356	SSR	2	44	-	55	1 min	ACCATCGAGGCTGCATAAAG AACCATCCAATGCTCAATC
C2_At4g04955	CAPS	2	63,5	Hinfl	55	2 min	TTGCTGTGGGGAACCAAGCAGATATAG TCCACAGAGCTTGTATCCCATGTATGC
TAHINA-2-139,5b	SSR	2	139,5	-	50	1 min	ATGTGCACACACCGTGAACC ATGCAATTGCCATTGACCTA
C2_At3g26900	CAPS	2	142	HaeIII	55	2 min	CCAAAGGATGACGTTAATTGG TCTTTTTCCATGTGCAGTCAAC
SSR3/0	SSR	3	0	-	55	30 s	GGAAGTCGAGAGGTTGGTGAAG CCACTTTCCAGCCACATTG
C2_At1g28530	CAPS	3	21	Dral	55	1 min	ATTATGAAGATGTCTATACACTTCCCTAC AGGATTTGCTTTTGAACATAGAAATGCTT
SSR111	SSR	3	75	-	55	1 min	TTCTCCCTTCCATCAGTTCT TTTGTCTATACTGCTGACA
C2_At5g62390	CAPS	3	75,6	EcoRV	55	90 s	TGCTACTAAGTGTGATGCCATTGAG TTGGGGTGCATAACATCAAGC
C2_At5g08050	SCAR	3	104	-	55	1 min	TGCGATTTCAAGTTTCTCTGCTTC TCCCCTACTGGAATACAGTTGTTG
SSR601	SSR	3	162	-	55	1 min	TCTGCATCTGGTGAAGCAAG CTGGATTGCTGGTTGATTT
SSR310	SSR	4	8	-	55	1 min	GCGATGAGGATGACATTGAG TTTACAGGCTGTCGTTCTT
SSR43	SSR	4	14	-	50	1 min	CTCCAAATTGGGCAATAACA TTAGGAAGTTGCATTAGGCCA
C2_At3g17040	SCAR	4	22	-	55	1 min	TGGGTTGATGAGTGGAAAG AGTAGAGGTTACGAAATTCCTCTGC
SSR306	SSR	4	48	-	55	1 min	ACATGAGCCCAATGAACCTC AACATTCGCGACGTACATA
CT188	SCAR	4	88,4	-	55	1 min	ATCCTCTCTGCCCCACACA GTTGCTTTTGTCCATCTCTAG
SSR146	SSR	4	103	-	50	1 min	TATGGCCATGGTGAACC CGAACGCCACCACTATACCT
SSR293	SSR	4	109	-	50	1 min	GCAAAGAGCTCGATCTCAA TTCAAGTTACTGGCTTCGCT
SSR188	SSR	4	135,5	-	50	1 min	TGCAGTGAGTCTCGATTTGC GGTCTATTGCAGATAGGGC
SSR5/0	SSR	5	0	-	53	1 min	CAACATTTGCTGTTTTGTAATG GCGATGAGATCGACTCAAAA
SSR325	SSR	5	18,5	-	50	1 min	CCATTGACAGCCATTATCC TGATGTGAAGAGTTGATGAGG
SSR115	SSR	5	35	-	50	1 min	CACCTTTATTAGATCTCTCT ATTGAGGATGCAACAGCC
SSR5/44	SSR	5	44	-	55	1 min	TGATGCCTACAGGCACAAG TGCAATAATGAGAATATGTTGGATG
SSR162	SSR	5	119	-	50	1 min	GCTCTTACAAGTGAACCTTCTC CAACAGCCAGGAACAAGGAT
C2-9	SCAR	6	4	-	55	2 min	ATGGCTCCAACCTTACTTCAAATTC TCTGCATCTGAAATGATGCAAC
SSR48	SSR	6	6	-	50	1 min	ATCTCTGGCTCTCTGTTT GTCCATGGCCACATGAATACG
SSR128	SSR	6	35	-	50	1 min	GGTCCAGTTCAATCAACCGA TGAAAGTCTCTCATGGTTG
C2_At1g21640	CAPS	6	37	Afal	53	30 s	AGAAAAGTCATCCATGGAAACAACAC TGGCCACAATGACCACTCACCTTG
TAHINA-6-69	SSR	6	69	-	55	1 min	CTGCAATGAAGGTTCTCC AGGATTGGACAGTGTTTCA
SSR350	SSR	6	101	-	55	1 min	GGAATAACCTCTAACTGCGGG CGATGCCCTCATTGGACTT
SSR241	SSR	7	0	-	55	1 min	TCAACAGCATAAGTGGAGGAGG TCCTCGTAATTGATCCACC
SSR286	SSR	7	0	-	48	1 min	AGCTATGGAATTTACAGGACCA ATTCAGGTAGCATGGAACGC

**Tabla 4.** Continuación.

Marcador	Tipo de marcador	Cromosoma	cM (Tomato-EXPEN2000)	Enzima de restricción	Temperatura de hibridación (°C)	Tiempo de extensión	Secuencia cebadores (5' - 3')
SSR304	SSR	7	30,5	-	52	1 min	TCCTCCGGTTGTTACTCCAC TTAGCACTTCACCGATTCC
C2_At1g02180	CAPS	7	73	AluI	55	90 s	TTTCTCATCTCAGCTTCTGCTGTA AGATACCACTCATCAGCAGGATT
CD40	CAPS	8	9	MbolI	55	1 min	TCAAAAGGACAAACAACCAATAAGC GATGAGGCTGCGGAGTATTTCG
SSR15	SSR	8	22,7	-	55	1 min	CACTTGCCATCTCTAGCCC ATGGATGCCCAAATTGAAGA
SSR8/30	SSR	8	30	-	55	1 min	TTGAATTCGCCAACTCTATG AAATTTCTCACTATTITGTTAGTGAC
SSR63	SSR	8	53	-	55	1 min	CCACAAACAATTCCATCTCA GCTCCGCCATCTGATACG
TG510	CAPS	8	57	HpaII	55	2 min	GCATTTATTATTCAGGCACAAAG TGTGTCTAATGTTCTTTCTCCAC
TAHINA-8-71b	SSR	8	71	-	53	1 min	TCCAGGATAGACCTTGAGGAAC TCCACCAGCTTTGGATCTG
SSRB105694	SSR	8	87	-	53	1 min	AAAGCCAAAGTGGGAAGAACTCAAGG CTCGTAAAACGTTTCATCAATCTCGC
TG254	CAPS	9	4	MbolI		1 min	GACTCGGGGCAATTATCTG AAACGAGCACTGCATTCTG
TG18	CAPS	9	14	MbolI	55	30 s	AAGGGTTGTTGATTCGGTCA GCACCAAGTTTCCATCTGT
SSR73	SSR	9	32	-	45	1min	TGGGAAGATCTGATGATGG TTCCCTTCTCTGGACTCA
C2_At1g07310	CAPS	9	74,5	HaeIII	55	2 min	AGAAAACTACGATCTCGAAATCACC AAACTGCCATAGTAGATTGCGG
TAHINA-9-90	SSR	9	90	-	55	1 min	CTAGATAGGGCCCAAGGGTA TCAAGGCGAAATCAAGATCA
SSR599	SSR	9	103	-	55	1 min	GGATTTCTCATGGGAATCAATC TCCCTGATCTTGATGATGTTG
TG230	CAPS	10	0	AfaI	50	90 s	TTGCAGAAAGCAACCTTGAC TACTTCTCCCCATTCATGC
TG303	CAPS	10	11	HpaII	57	1 min	TCTGGACAACATTTCTCATATTC TCTTTGTGCTTTTCTCTATTTTC
SSR248	SSR	10	35	-	55	1 min	GCATTCGCTGATGCTCTGTT GGGAGCTTCATCATAGTAACG
C2At3g08760	CAPS	10	39	AluI	55	2 min	TCTCCAGAACGTTGTGTGCAAGG TCTCATGTAGAAATGTAAAGCTTGG
SSR80	SSR	11	20	-	50	1 min	GGCAATGCAAGGATTGG AGGGTCATGTTCTTGATTGCA
C2_At5g16630	CAPS	11	31,2	TaqI	55	1 min	TAAATGCAATCACTGATGGAGAGCA TGCCAATACTGCATCCCAACAAT
SSR76	SSR	11	37,5	-	50	1 min	ACGGGTCGCTTTTGAACAA CCACCGGATCTCTTCGTA
SSR46	SSR	11	40	-	50	1 min	CCGAGGGGAATCTTGAATAC GCACCATCTCTGTGCTCT
C2_At2g28490	CAPS	11	98	TaqI	55	1 min	ACGGGATTTCTCCATTGAAACTCTG ATTGAATCTGCCCAACAAGACTG
TAHINA-12-39	SSR	12	39	-	52	30 s	ATTGCCACGTGGATTGACTC TGCAAGCTGTTCTTTTCAGAC
tg394	CAPS	12	48	FokI	56	30 s	AGCCTCATGAGACTACAA TACAGCACAAATCTTACC
CT99	SCAR	12	53,5	-	50	1 min	GTCCCGTGACATACTTACTG AGATTTCTGTTGGAGGTGAGT
ct239	CAPS	12	68	HinfI	56	2 min	TGGAACGGAGTCAAAACAGAGA GAATGCCATCAGGAAAGGTAAT
SSR345	SCAR	12	72,5	-	60	2 min	AAGCCAAGCTCGAACCTGTA ATCCATGCTGCTCTTCT
C2_At4g31150	CAPS	12	96,5	EcoRV	55	30 s	TACTGAAGATGACTTCAAATGGAGATT TCATTTTATCCAAAAGTTCCAGAA
SSR12/97c	SCAR	12	97	-	53	2 min	TTGCTTCACTTGTGCGAATC TCTGTGAGTCCCAAAAAG
C2_At5g21170	CAPS	12	120	EcoRI	55	2 min	TCTTCATCGGGTATATATCATTCAA ACTGCCACTGGCTCTTTCAAATC

## DIGESTIÓN

Una vez confirmado que la amplificación se había producido de forma correcta, se analizaron los marcadores para los que el polimorfismo era detectable a nivel de PCR. Para el revelado de los demás se requirió digestión enzimática. La digestión se llevó a cabo en un volumen total de 20 µl, conteniendo los volúmenes de cada reactivo según se indican en la **tabla 5**.

**Tabla 5.** Reactivos de la digestión enzimática para marcadores CAPS.

Reactivo	Concentraciones del stock	Volumen ( $\mu$ l)	Concentración final
Agua Milli-Q	-	7,8	-
Tampón	10X	2	1X
Enzima ( <b>Tabla 4</b> )	10 U/ $\mu$ l	0,2	0,2 U/25 $\mu$ l
Producto de PCR	-	10	-

Las muestras se digirieron en un termociclador *Eppendorf Mastercycler* durante un mínimo de 3h a 37°C para todas las enzimas excepto para TaqI y MseI, cuya temperatura de digestión es de 65°C. El producto de las digestiones se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (peso/volumen) con tampón TBE 1X. A cada muestra se añadieron 7  $\mu$ l de tampón LB 6X y se cargó un volumen de 12  $\mu$ l en cada pocillo. La separación por electroforesis y la tinción de los geles se llevó a cabo según se ha explicado previamente en el subapartado anterior.

### 3.2.3. Genotipado por secuenciación

Con objeto de poder incrementar la densidad de marcadores por cromosoma se realizó un genotipado por secuenciación (*Genotyping by Sequencing*, GBS) de los parentales de la población y de uno de los híbridos entre ellos. El objetivo fue identificar marcadores de tipo SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) que permitiesen posteriormente emplear sistemas de genotipado masivo para el análisis de las descendencias disponibles.

#### 3.2.3.1. Extracción de DNA

La extracción del DNA se llevó a cabo empleando el kit comercial “DNeasy Plant Mini Kit” (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante. El proceso se basaba en el empleo de membranas de sílice unida a varios pasos de centrifugación.

#### 3.2.3.2. Cuantificación del DNA

La cuantificación del DNA se llevó a cabo por espectrofotometría (Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer v.3.5). Tras la cuantificación de las muestras se prepararon diluciones de las mismas a una concentración entre 50 y 200 ng/ $\mu$ L para su utilización en el GBS.

#### 3.2.3.3. Genotipado

Las muestras se genotiparon en el *Genomic Diversity Facility*, en *Cornell University* (Ithaca, Nueva York, USA). La estrategia empleada fue la descrita por [Elshire et al. \(2011\)](#). La secuenciación se llevó a cabo empleando la plataforma Illumina HiSeq 2000 (Illumina Inc, San Diego, CA, USA). El procesado inicial de las secuencias fue realizado por el servicio de “Bioinformática y Genómica del COMAV”.

## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Fenotipado por caracteres reproductivos

Para llevar a cabo el fenotipado por caracteres reproductivos fue posible aclimatar un total de 291 genotipos pertenecientes a las generaciones más avanzadas de retrocruces. De estos, 263 fueron evaluados. Las 28 plantas restantes se eliminaron debido a que resultaron infectadas por el virus del mosaico del tomate (*Tomato mosaic virus*, ToMV) o por el virus del rizado amarillo del tomate (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV) una vez llevadas al invernadero. Para cada genotipo se anotó la presencia de flores normales, flores anormales, frutos y semillas, además de la manifestación del fenotipo de tipo E (Tabla 6).

**Tabla 6.** Características reproductivas de las plantas evaluadas de las generaciones más avanzadas disponibles.

Generación	Parental	Nº de genotipos	Flores normales (% de genotipos)	Flores anormales (% de genotipos)	Frutos (% de genotipos)	Semillas (% de genotipos)	Fenotipo E (% de genotipos)
pseudo-F4-BC2	163 C M2	2	50,0	50,0	50,0	0,0	50,0
	285 M2 PL1	5	20,0	0,0	20,0	0,0	80,0
	304 M2 pl.1	4	25,0	50,0	25,0	25,0	75,0
	304.1 M2	6	33,3	50,0	16,7	0,0	16,7
	381 M3	7	42,9	0,0	42,9	28,6	14,3
	Evaluados	24	33,3	25,0	29,2	12,5	41,7
pseudo-F5-BC2	102 A M2	10	60,0	20,0	60,0	30,0	40,0
	124 C M3	11	54,5	45,5	9,1	9,1	72,7
	124 CM2	2	100,0	50,0	50,0	50,0	50,0
	171 A M3	3	66,7	33,3	66,7	0,0	33,3
	215 C M3 pl.1	2	100,0	50,0	100,0	50,0	50,0
	230 C M2	14	57,1	35,7	28,6	7,1	35,7
	231 C M2 pl.1	3	66,7	100,0	66,7	66,7	33,3
	240 M3 pl.1	4	50,0	50,0	25,0	25,0	25,0
	265 M2	6	33,3	33,3	16,7	0,0	66,7
	272 M2	10	70,0	50,0	60,0	20,0	40,0
	292 M2 pl.1	10	30,0	30,0	40,0	30,0	60,0
	327 M2	3	66,7	33,3	66,7	0,0	33,3
	367 M2	3	0,0	33,3	0,0	0,0	100,0
	367.1 M3	1	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0
	369 M2	15	53,3	33,3	46,7	13,3	33,3
	378.1 M3	2	0,0	50,0	0,0	0,0	100,0
	385 M3	6	66,7	33,3	66,7	50,0	16,7
	385.1 M2	6	33,3	16,7	33,3	0,0	66,7
	97 M2	4	25,0	25,0	25,0	25,0	50,0
	Evaluados	115	51,3	36,5	40,0	18,3	47,8
pseudo-F5-BC3	12.2 P1	42	59,5	28,6	59,5	16,7	35,7
	70 P1	32	90,6	9,4	71,9	40,6	6,3
	Evaluados	74	73,0	20,3	64,9	27,0	23,0
pseudo-F6-BC2	179PI4	5	100,0	60,0	60,0	20,0	40,0
	265 M2	25	36,0	56,0	20,0	8,0	68,0
	300 M2 pl.1	1	0,0	100,0	100,0	0,0	100,0
	45 A M2	12	33,3	16,7	33,3	25,0	50,0
	46 A	1	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	510 C1	3	66,7	0,0	66,7	0,0	33,3
	IAA+2IPFR385	3	66,7	33,3	33,3	0,0	66,7
	Evaluados	50	46,0	44,0	34,0	14,0	60,0

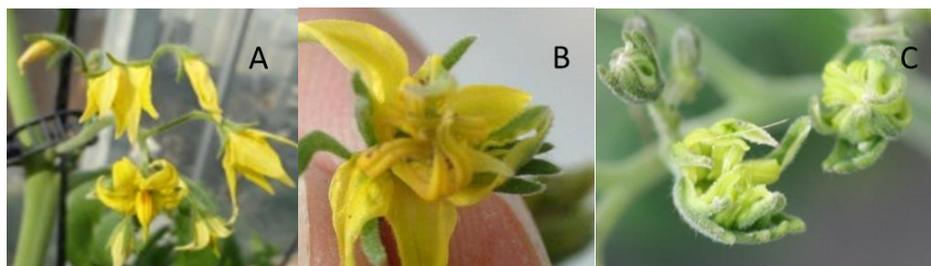
Para aproximadamente la mitad de los genotipos evaluados se probó más de una planta, en el caso de que en la primera planta aclimatada no se hubiesen obtenido semillas. En estos casos, se consideró suficiente con que una de las plantas evaluadas mostrase el fenotipo

correspondiente, es decir, que si de un genotipo se evaluaron dos plantas y una de ellas mostraba flores normales y la otra no, se anotó la presencia de flores normales. En cualquier caso, salvo algunas excepciones, el fenotipo de las réplicas clonales de cada uno de los genotipos coincidió. Las diferencias fenotípicas entre plantas del mismo genotipo dependieron en parte de la época de cultivo en la que se trasladaron a invernadero.

La caracterización fenotípica permitió conocer las características reproductivas de las plantas. Ciento veintinueve de ellas resultaron estériles. De las plantas que resultaron fértiles, 23 plantas no dieron lugar a ningún fruto y en 87 plantas se observó cuajado de frutos. De las 87 plantas que cuajaron frutos, 50 plantas dieron frutos con semillas y 37 plantas presentaban frutos sin semillas.

Los resultados obtenidos para cada una de las características evaluadas resultaron variables entre los genotipos de una misma generación. Esta variabilidad se debió en parte a las diferencias en el número de plantas evaluadas para cada genotipo.

Respecto a la presencia de flores normales, el mayor porcentaje (73%) se observó en la generación pseudo-F<sub>5</sub>-BC<sub>3</sub> (**Tabla 6**). Resulta lógico el hecho de que en la generación más avanzada de retrocruces hacia FC el porcentaje de plantas mostrando flores normales aumente, ya que las plantas de esta generación son las que muestran una mayor proporción de fondo genético del parental cultivado, en este caso la variedad de tomate FC. Del mismo modo, el porcentaje de plantas con flores anormales fue aproximadamente del 20% en el caso de la generación pseudo-F<sub>5</sub>-BC<sub>3</sub> mientras que en las generaciones pseudo-F<sub>4</sub>-BC<sub>2</sub>, pseudo-F<sub>5</sub>-BC<sub>2</sub> y pseudo-F<sub>6</sub>-BC<sub>2</sub> los valores fueron superiores. La anomalía de las flores consistió por lo general en un desarrollo anormal, un tamaño muy reducido de las mismas, el escaso desarrollo de las anteras y la presencia de anteras no fusionadas (**Figura 4**). En ningún caso hubo producción de polen fértil. Fue frecuente el caso de plantas con ambos tipos de flores: en el conjunto de los materiales evaluados, aproximadamente en el 25% de los genotipos en los que se observaron flores normales aparecían también flores anormales.



**Figura 4.** Flores con desarrollo normal en descendientes de 179 PI 4 (A). Flores con desarrollo anormal en descendientes de 124 C M3 (B y C).

Tanto en el caso del porcentaje de plantas con frutos cuajados como en el de plantas con semilla viable los valores más elevados se obtuvieron en la generación pseudo-F<sub>5</sub>-BC<sub>3</sub>. Aproximadamente un 65% de la plantas de esta generación mostró frutos cuajados y el 27% desarrolló semillas, lo que supone que alrededor del 40% de los genotipos de esta generación en los que se obtuvieron frutos produjeron semillas. Los valores inferiores en cuanto a cuajado y producción de semillas que se obtuvieron en las generaciones menos avanzadas confirma el hecho de que la severidad de las barreras de incompatibilidad entre ambas especies disminuye a medida que se recupera el fondo genético del parental cultivado.

El menor porcentaje de plantas con el fenotipo E obtenido fue del 23% en la generación pseudo-F<sub>5</sub>-BC<sub>3</sub>, seguida de la generación pseudo-F<sub>4</sub>-BC<sub>2</sub> con aproximadamente un 42%. Resulta también lógico que la reducción en el porcentaje del genoma de *S. peruvianum* reduzca la probabilidad de que se presenten las características asociadas a este fenotipo.

Como ya se ha comentado, existe gran variabilidad entre los diferentes genotipos de una misma generación debido en parte a las diferencias entre el número de plantas evaluadas, no obstante cabe destacar las diferencias existentes entre los porcentajes obtenidos en los dos genotipos que conforman la generación pseudo-F<sub>5</sub>-BC<sub>3</sub> (**Tabla 6**). Como ejemplo, en el caso de las plantas obtenidas a partir del parental 70 P1 alrededor de un 91% desarrollaron flores normales mientras que de las obtenidas a partir del parental 12.2 P1 lo hicieron aproximadamente un 60%. Esta tendencia de mayor similitud con el parental cultivado de las plantas procedentes del parental 70 P1 se mantuvo para todas las características evaluadas (**Figuras 5 y 6**). Estas diferencias entre las descendencias de ambos parentales podrían deberse al hecho de que el parental 70 P1 procediera de una autofecundación accidental de FC y no de un retrocruce tal y como era esperable. Sin embargo, la presencia de un porcentaje de plantas con flores anormales o con fenotipo E parece sugerir que en estos materiales existe genoma de *S. peruvianum*. En este sentido sería necesario el análisis con una elevada densidad de marcadores a nivel de genotipo del parental 70 P1 para determinar si ha existido un posible error experimental y esta planta procede de autofecundación.



**Figura 5.** Frutos de los descendientes del parental 12.2 P1.



**Figura 6.** Frutos de los descendientes del parental 70 P1.

La presencia de determinados fragmentos del genoma del parental de *S. peruvianum* debe estar condicionando la esterilidad a distintos niveles en algunos de los genotipos evaluados. De hecho, las primeras poblaciones desarrolladas a partir de *S. peruvianum*, cubrían únicamente el 67% del genoma de esta especie, debido en parte a que las regiones asociadas a autoincompatibilidad, crecimiento determinado y esterilidad del híbrido no pudieron estar representadas (Fulton *et al.*, 1997a). En trabajos anteriores desarrollados por el grupo se ha confirmado que en las generaciones de las que derivan los materiales aquí empleados está prácticamente representada la totalidad del genoma de la especie silvestre (Julián *et al.*, 2013). El genotipado de los parentales de los que derivan las plantas de las que se ha obtenido descendencia por autofecundación ha permitido determinar si alguna de las regiones no se encuentra representada en los materiales más avanzados (ver apartado 4.2).

## **4.2. Genotipado**

### **4.2.1. Genotipado de los parentales de las generaciones más avanzadas**

En los trabajos anteriores llevados a cabo por el grupo de investigación se identificó un conjunto de 105 marcadores polimórficos entre tomate y PI 126944 (Julián *et al.*, 2013). De estos marcadores, 15 eran CAPS o SCARs, mientras que los 90 restantes eran SSRs. Algunos de los SSRs tenían tamaños de los alelos en ambos parentales que permitían su discriminación en agarosa. Por simplicidad en su detección, estos SSRs, además de los CAPS y SCARs, son los que se emplean de forma rutinaria en el laboratorio para el genotipado de las generaciones más avanzadas. Por otra parte, aprovechando que se disponía de marcadores CAPS y SCARs polimórficos entre tomate y *S. lycopersicoides*, y que muchos de estos marcadores habían sido descritos como polimórficos entre tomate y varias especies de Solanáceas (Peiró *et al.*, 2015), se comprobó que un porcentaje elevado de los mismos eran también polimórficos entre tomate y *S. peruvianum* (datos no publicados). Todos estos marcadores son los que se han empleado en el genotipado de las generaciones más avanzadas. En concreto, se decidió

genotipar los parentales de las generaciones “F<sub>4</sub>”-BC<sub>2</sub>, “F<sub>5</sub>”-BC<sub>2</sub>, “F<sub>5</sub>”-BC<sub>3</sub> y “F<sub>6</sub>”-BC<sub>2</sub> a partir de cuyos hijos se había obtenido semilla de autofecundación (Tabla 6, Figura 7).

Marcador	304 M2 PLANTA 1	381 M3	102 A M2	124 C M3	124 C M2	215 C M3P L1	230 C M2	231 C M2 PLANTA 1	240 M3	265 M2	272 M2	292 C M2 PLANTA 1	369 M2	385 M3	97 M2	12.2 P1	70 P1	179 PI-4	265 M2	45A M2	46 A	
SSR92																						
SSR1/18,5																						
SSR75																						
TG460																						
SSR222																						
SSR156																						
CT190																						
TG608																						
SSR356																						
C2_At4g04955																						
TAHINA-2-139,5b																						
C2_At3g26900																						
SSR3/0																						
C2_At1g28530																						
SSR111																						
C2_At5g62390																						
C2_At5g08050																						
SSR601																						
SSR310																						
SSR43																						
C2_At3g17040																						
SSR306																						
CT188																						
SSR146																						
SSR293																						
SSR188																						
SSR5/0																						
SSR325																						
SSR115																						
SSR5/44																						
SSR162																						
C2-9																						
SSR48																						
SSR128																						
C2_At1g21640																						
TAHINA-6-69																						
SSR350																						
SSR241																						
SSR286																						
SSR304																						
C2_At1g02180																						
CD40																						
SSR15																						
SSR8/30																						
SSR63																						
TG510																						
TAHINA-8-71b																						
SSRB105694																						
TG254																						
TG18																						
SSR73																						
C2_At1g07310																						
TAHINA-9-90																						
SSR599																						
TG230																						
TG303																						
SSR248																						
C2At3g08760																						
SSR80																						
C2_At5g16630																						
SSR76																						
SSR46																						
C2_At2g28490																						
TAHINA-12-39																						
tg394																						
CT99																						
ct239																						
SSR345																						
SSR12/97c																						
C2_At5g21170																						

**Figura 7.** Representación gráfica del contenido del genoma de los parentales de las plantas con semilla de autofecundación. En blanco representadas las regiones homocigotas para tomate, en gris las heterocigotas y en negro las homocigotas para *S. peruvianum*. El símbolo “-” indica ausencia de dato.

Todas las plantas analizadas excepto la 179 PI-4 correspondían a un retrocruce hacia tomate, de forma que para todas las regiones analizadas el genotipo podría ser bien homocigoto para el alelo de tomate bien heterocigoto. En el caso del genotipo 179 PI-4 también se detectaron regiones homocigotas para el alelo de *S. peruvianum*. Para todos los marcadores analizados al menos una de las plantas presentó el alelo de *S. peruvianum*, excepto para la región final del cromosoma 8 y la totalidad del cromosoma 10. En cualquier caso, por la cobertura del genoma que proporciona el conjunto de marcadores empleado, hay ciertas regiones para las que no se dispone de información (**Figura 7**). En los trabajos anteriores del grupo de investigación se habían genotipado distintas plantas de las generaciones “F<sub>4</sub>” y “F<sub>5</sub>” de las que derivan los materiales empleados en este trabajo (Julián *et al.*, 2013). En el conjunto de las plantas “F<sub>4</sub>” analizadas estuvo representada la práctica totalidad del genoma de *S. peruvianum*, con la excepción de la región distal del cromosoma 8. En cuanto a las plantas “F<sub>5</sub>”, contenían en conjunto todo el genoma de la especie silvestre, con la excepción de un fragmento del cromosoma 8 y otro del cromosoma 9. Era por tanto de esperar que en el conjunto de plantas de las generaciones “F<sub>4</sub>”-BC<sub>1</sub>, “F<sub>5</sub>”-BC<sub>1</sub> apareciese prácticamente representado el genoma de *S. peruvianum*.

En trabajos anteriores realizados por el grupo se genotiparon las generaciones previas a las empleadas en este trabajo (“F<sub>4</sub>”, “F<sub>5</sub>” y “F<sub>6</sub>”) utilizando alrededor de 64 marcadores (datos no mostrados). En estas generaciones, se comprobó que se producía tanto una disminución de la fracción del genoma introgresada como una reducción en el tamaño de los fragmentos de *S. peruvianum* introgresados a medida que se llevaban a cabo generaciones de retrocruzamiento (Julián *et al.* 2013). Esta reducción se confirmó también en las nuevas generaciones obtenidas en este trabajo. Como ejemplo, el parental 12.2 P1 deriva de la planta 215 C M3 pl. 1, y para parte de los cromosomas se observó que los fragmentos introgresados en 12.2 P1 se habían reducido como consecuencia de la recombinación (**Figura 7**). Otros autores han obtenido resultados similares tras generaciones de retrocruzamiento o autofecundación en poblaciones derivadas de distintas especies silvestres relacionadas con el tomate (Eshed *et al.*, 1992; Tanksley *et al.*, 1996; Fulton *et al.*, 1997a). Esta reducción en el tamaño de los fragmentos indica que es posible introgresar de forma eficiente el genoma de *S. peruvianum* en el fondo genético de *S. lycopersicum* para la construcción de la población de ILs, a pesar de la distancia genética entre ambas especies.

Se dispone de información acerca del genotipo del parental 70 P1 para 42 marcadores. Hasta el momento no se ha identificado el alelo de *S. peruvianum* para ninguno de ellos. Esta planta es un descendiente del retrocruce hacia tomate de la planta 102 A M2, también genotipada en

este trabajo (**Figura 7**). Considerando la proporción del genoma de *S. peruvianum* que conserva la planta 102 A M2, resulta muy poco probable que un descendiente suyo por retrocruzamiento haya perdido todos los fragmentos de la especie silvestre. Por tanto, es posible que 70 P1 proceda en realidad de una autofecundación accidental de FC y no de un retrocruce. Sin embargo, tal y como se ha comentado previamente (**apartado 4.1.**) algunos de los descendientes procedentes de 70 P1 presentan características propias de *S. peruvianum*. Además, por el procedimiento empleado para realizar las polinizaciones, no resulta fácil que se produzcan autofecundaciones accidentales. Dado que 70 P1 no ha sido todavía genotipada con todos los marcadores disponibles, podría encontrarse alguna región de *S. peruvianum* representada que confirmase que se trata de un retrocruce.

#### 4.2.2. Genotipado de los descendientes “F<sub>5</sub>”-BC<sub>3</sub>

Las generaciones más avanzadas de las que se dispone hasta el momento son las plantas “F<sub>5</sub>”-BC<sub>3</sub>, es decir, los descendientes de los parentales 12.2 P1 y 70 P1. Dado que se ha comprobado que la incompatibilidad se va reduciendo a medida que se incrementa el número de retrocruces, sería de interés poder avanzar en el desarrollo de las líneas de introgresión con estos materiales más avanzados. Esto permitiría evitar la necesidad de recurrir al rescate de embriones o el cultivo de semillas inmaduras para obtener los sucesivos retrocruces. Con objeto de determinar la fracción del genoma de *S. peruvianum* representada en estos materiales más avanzados, se decidió genotipar los descendientes del parental 12.2 P1.

Como se ha comentado previamente (**apartado 4.2.1., Figura 7**), en el caso del parental 70 P1 no se han identificado introgresiones de la especie silvestre, de forma que por el momento no se han genotipado sus descendientes. Por lo tanto, se han genotipado los 63 descendientes disponibles del parental 12.2 P1. El parental 12.2 P1 había sido genotipado con 39 marcadores, si bien estos no se encontraban igualmente distribuidos a lo largo de los 12 cromosomas (**Figura 7**). Como ejemplo, no se disponía de información para ningún marcador del cromosoma 7, mientras que en el cromosoma 12 se habían utilizado 6 marcadores. Para 25 de los marcadores, 12.2 P1 resultó homocigoto para el alelo de tomate, de forma que para obtener representación del genoma de la especie silvestre para las regiones correspondientes a estos marcadores será necesario recurrir a otras generaciones menos avanzadas (**Figura 8**).

Los 14 marcadores restantes, aquellos para los que el parental 12.2 P1 resultó heterocigoto, fueron los que se emplearon para el genotipado de los 63 descendientes (**Figura 8**). Se analizó la segregación obtenida para los 14 marcadores, comprobándose que para 12 de ellos se ajustaba a una segregación mendeliana. Sin embargo, para dos de estos marcadores se

observó una distorsión de la segregación a favor del alelo de tomate. Se trata de los marcadores C2\_At5g62390 ( $\chi^2=4,58 > \chi^2_{1gl. p=0,05}=3,84$ ) y C2-9 ( $\chi^2=5,73 > \chi^2_{1gl. p=0,05}=3,84$ ), localizados en los cromosomas 3 y 6, respectivamente. [Fulton et al. \(1997a\)](#) obtuvieron distorsión de la segregación hacia los alelos de *S. peruvianum* para una región del cromosoma 9, próxima a un locus *gamete promoter* cuyo alelo de la especie silvestre se hereda preferencialmente sobre el alelo de tomate ([Pelham, 1968](#)). En el parental 12.2 P1 los marcadores estudiados del cromosoma 9 estaban fijados para los alelos de tomate, de forma que no se ha podido estudiar la distorsión de la segregación para esta región.

Se dispone de información del fenotipado para caracteres reproductivos de 39 de los descendientes de 12.2 P1 genotipados. Se trató de relacionar la presencia de alguna región de *S. peruvianum* con la esterilidad o con la presencia de incompatibilidad en las plantas de las que no se obtuvo semilla, o bien la ausencia de regiones de la especie silvestre en las plantas de las que no se obtuvo semilla. No se identificó ninguna asociación entre el genotipo y alguna de estas características. Otros autores han identificado regiones asociadas con esterilidad en poblaciones derivadas de *S. peruvianum*. Como ejemplo, [Fulton et al. \(1997a\)](#) al analizar plantas de la generación BC<sub>1</sub> obtenida a partir de la entrada LA1708 de *S. peruvianum* localizaron una región asociada a esterilidad en el cromosoma 1, próxima al gen *S* de autoincompatibilidad. En cualquier caso, las generaciones estudiadas en este trabajo son generaciones avanzadas, de forma que es probable que determinadas regiones asociadas a esterilidad ya no estén presentes y estén fijadas para los alelos de tomate.



### 4.3. Genotipado por secuenciación

Hasta el momento, durante el proceso de desarrollo de la colección de ILs derivadas de PI 126944, el factor limitante para el avance ha sido la obtención de plantas por retrocruzamiento a partir de las generaciones disponibles. En este sentido, el genotipado de los materiales que se obtenían era abordable mediante marcadores tipo CAPS, SSRs o SCARs, tal y como se venía haciendo en el laboratorio. Actualmente, el grupo se encuentra en disposición de obtener gran cantidad de materiales. Por una parte, se ha optimizado el protocolo para la obtención de plantas mediante cultivo de semillas inmaduras (Campos *et al.*, 2016), de manera que en caso de necesitar recurrir al retrocruce de plantas de las generaciones anteriores, la eficiencia del proceso permitiría generar muchos descendientes. Por otra parte, tal y como se ha comentado en los apartados anteriores, en las generaciones más avanzadas disponibles se ha vencido en parte la incompatibilidad, de manera que ha sido posible obtener descendencia por autofecundación de parte de los materiales. En este sentido, resulta necesario disponer de un sistema de genotipado a gran escala que permita genotipar gran cantidad de materiales en poco tiempo. Además, será posible de esta forma incrementar la densidad de marcadores por cromosoma. En este contexto se decidió abordar la identificación de marcadores SNP polimórficos entre los parentales de la población de ILs: FC y NE-1 como parentales de tomate y PI 126944 como parental de *S. peruvianum* (se incluyó además el híbrido F<sub>1</sub>-A, **apartado 3.1.**). El sistema empleado fue el genotipado por secuenciación o GBS. Una vez seleccionados los SNPs, el sistema que se empleará para el genotipado masivo de los materiales obtenidos será la plataforma Sequenom.

Se obtuvieron lecturas en al menos uno de los genotipos incluidos en el análisis para una media de 105.872 secuencias por cromosoma. Para la selección de los posibles SNPs se eligieron aquellas secuencias en las que se disponía de información suficiente para identificar el polimorfismo, es decir, información al menos de un parental de tomate y de PI 126944, o bien de un parental de al menos alguna de las especies y del híbrido F<sub>1</sub>-A. Por una parte, los parentales debían ser homocigotos para el SNP. Por otra parte, el genotipo de FC y NE-1 debía diferir del genotipo de PI 126944. Por último, en el caso de disponer información para el híbrido F<sub>1</sub>-A, este debía ser heterocigoto y sus alelos coincidir con el de los parentales de cada especie, respectivamente.

Tal y como se ha comentado, el sistema de genotipado masivo que se va a emplear será la plataforma Sequenom. El genotipado por Sequenom se basa en la realización de una PCR multiplex, seguida de una reacción de extensión que utiliza como cebador un único oligo que permite detectar el SNP. Los productos así obtenidos se analizan mediante espectrometría de

masas (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry*, MALDI-TOF MS). Este sistema permite distinguir los genotipos en función de las masas moleculares de los productos de extensión (Ragoussis, 2009). En concreto, se llevará a cabo en el servicio “Laboratorio de Epigenética y Genotipado (Plataforma Sequenom)” de la Unidad Central de Investigación de Medicina de la Universitat de València. Para aprovechar la capacidad de una placa de Sequenom se decidió en un primer ensayo incluir para su validación SNPs de los cromosomas 1 y 2 (alrededor de unos 30 para cada cromosoma), lo que permitirá el genotipado con estos marcadores de 192 plantas. Se presentan a continuación los resultados del GBS para los cromosomas 1 y 2 y se describen los criterios empleados para la selección de los SNPs.

En el cromosoma 1 se han identificado 6.833 SNPs polimórficos entre los parentales, siendo 4.725 de ellos SNPs simples. Estos corresponde a una densidad media de 1 SNP simple cada 20.855 pb. En el caso del cromosoma 2, se han identificado 5.217 SNPs polimórficos, 3.648 de ellos simples. La densidad en este caso es de 1 SNP simple cada 12.168 pb.

Del conjunto de SNPs obtenidos se seleccionarán, tal y como se ha comentado previamente, alrededor de 30 por cromosoma. Para la elección se priorizará que se trate de un SNP verdadero y no un indel (inserción/delección). Se evitarán también los SNPs de posiciones hipervariables, con más de 4 variantes en 100 pb, además de los SNPs que se encuentren a menos de 60 bases de otro SNP (Blanca *et al.*, 2011).

## 5. Conclusiones

1. Se han fenotipado por caracteres reproductivos un total de 263 genotipos descendientes de las generaciones "F<sub>4</sub>"-BC<sub>1</sub>, "F<sub>5</sub>"-BC<sub>1</sub>, "F<sub>5</sub>"-BC<sub>2</sub> y "F<sub>6</sub>"-BC<sub>1</sub> derivadas del cruce entre tomate y *S. peruvianum* PI 126944. De ellos, 134 han resultado fértiles y a partir de 50 de los mismos ha sido posible obtener semilla viable de autofecundación. Los mayores porcentajes de genotipos con presencia de flores normales, frutos cuajados y producción de semilla viable se observaron en la generación pseudo-F<sub>5</sub>-BC<sub>3</sub>. Estos resultados confirman que a medida que se recupera fondo genético del parental cultivado disminuye la severidad de las barreras de incompatibilidad entre ambas especies. Esto facilitará en gran medida el avance en la construcción de la población de líneas de introgresión (ILs).
2. Se han genotipado los parentales de las generaciones más avanzadas ("F<sub>4</sub>"-BC<sub>2</sub>, "F<sub>5</sub>"-BC<sub>2</sub>, "F<sub>5</sub>"-BC<sub>3</sub> y "F<sub>6</sub>"-BC<sub>2</sub>) a partir de los cuales se han obtenido semillas de autofecundación. Para la mayoría de marcadores se observó el alelo de *S. peruvianum* en al menos uno de los parentales genotipados a excepción de algunas regiones del cromosoma 8 y la totalidad del 10. Por tanto, la mayor parte del genoma de la especie silvestre parece estar representada en los materiales más avanzados de los que se dispone. Únicamente será necesario recurrir a generaciones anteriores para las regiones que no están cubiertas en estos materiales.
3. Los descendientes del parental 12.2 P1 forman parte de la generación más avanzada de la que se dispone. Un total de 63 de los descendientes obtenidos a partir de 12.2 P1 se genotiparon con los 14 marcadores moleculares que resultaron heterocigotos para este parental. Se observó una distorsión de la segregación a favor del alelo de tomate en dos de ellos localizados en los cromosomas 3 y 6 respectivamente. Las regiones de los cromosomas 8 y 9 analizadas resultaron homocigotas para el alelo de tomate. A partir de 7 de estas plantas ha sido posible obtener semilla de autofecundación. Estos descendientes resultan de interés para el avance en el desarrollo de la colección de ILs.
4. Se ha realizado un genotipado por secuenciación de los parentales de la población y de uno de los híbridos interespecíficos entre ellos. Los SNPs identificados permitirán el diseño de una plataforma de secuenciación masiva que acelere el avance en el desarrollo de la colección de ILs y que incremente la densidad de marcadores disponibles para el genotipado.

## 6. Bibliografía

- ALPERT, K. B. Y TANKSLEY, S. D. (1996). High-resolution mapping and isolation of a yeast artificial chromosome contig containing fw2. 2: a major fruit weight quantitative trait locus in tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*, 15503-15507.
- ASHRAFI, H.; KINKADE, M. Y FOOLAD, M. R. (2009). A new genetic linkage map of tomato based on a *Solanum lycopersicum* × *S. pimpinellifolium* RIL population displaying locations of candidate pathogen response genes. *Genome*, *52*, 935-956.
- BAI, Y. Y LINDHOUT, P. (2007). Domestication and breeding of tomatoes: what have we gained and what can we gain in the future?. *Annals of Botany*, *100*, 1085-1094.
- 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. Á.; FERNÁNDEZ-MUÑOZ, R.; GRANELL, A. Y MONFORTE, A. J. (2014). Highly efficient genomics-assisted development of a library of introgression lines of *Solanum pimpinellifolium*. *Molecular Breeding*, *34*, 1817-1831.
- 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 traits of agronomic importance from *Lycopersicon hirsutum*. *Theoretical and Applied Genetics*, *97*, 381-397.
- BLANCA, J. M.; CAÑIZARES, J.; ZIARSOLO, P.; ESTERAS, C.; MIR, G.; NUEZ, F.; GARCÍA-MAS, J. Y PICÓ, M. B. (2011). Melon transcriptome characterization: Simple sequence repeats and single nucleotide polymorphisms discovery for high throughput genotyping across the species. *The Plant Genome*, *4*, 118-131.
- CAMPOS, G.; GISBERT, C.; PÉREZ-DE-CASTRO, A. Y DÍEZ, M.J. (2016). Obtaining advanced generations from *Solanum peruvianum* PI 126944 in the genetic background of *S. lycopersicum* by immature seed culture: facing incompatibility (enviado).
- CANADY, M. A.; MEGLIC, V. Y CHETELAT, R. T. (2005). A library of *Solanum lycopersicoides* introgression lines in cultivated tomato. *Genome*, *48*, 685-697.
- CHEN, K. Y. Y TANKSLEY, S. D. (2004). High-Resolution Mapping and Functional Analysis of se2. 1 A Major Stigma Exsertion Quantitative Trait Locus Associated With the Evolution From Allogamy to Autogamy in the Genus *Lycopersicon*. *Genetics*, *168*, 1563-1573.
- DOGANLAR, S.; FRARY, A.; KU, H. M. Y TANKSLEY, S. D. (2002). Mapping quantitative trait loci in inbred backcross lines of *Lycopersicon pimpinellifolium* (LA1589). *Genome*, *45*, 1189-1202.
- DOYLE, J. J. Y DOYLE J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, *12*, 13-15.
- ELSHIRE, R. J.; GLAUBITZ, J. C.; SUN, Q.; POLAND, J. A.; KAWAMOTO, K.; BUCKLER, E. S. Y MITCHELL, S. E. (2011). A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS one*, *6*, e19379.
- 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.

- ESHED, Y.; ABU-ABIED, M.; SARANGA, Y. Y ZAMIR, D. (1992). *Lycopersicon esculentum* lines containing small overlapping introgressions from *L. pennellii*. *Theoretical and Applied Genetics*, *83*, 1027-1034.
- FOOLAD, M. R. (2007). Genome mapping and molecular breeding of tomato. *International Journal of Plant Genomics*, 2007.
- 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.; BECK-BUNN, 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. *Tomato Genet. Coop. Rep*, *8*, 15-17.
- HALL, T. J. (1980). Resistance at the *Tm-2* locus in the tomato to tomato mosaic virus. *Euphytica*, *29*, 189-197.
- HOGENBOOM, N. G. (1972). Breaking breeding barriers in *Lycopersicon*. 1. The genus *Lycopersicon*, its breeding barriers and the importance of breaking these barriers. *Euphytica*, *21*, 221-227.
- JULIÁN, O.; HERRÁIZ, J.; CORELLA, S.; DI-LOLLI, I.; SOLER, S.; DÍEZ, M. J. Y PÉREZ-DE-CASTRO, 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.
- LATERROT, H. Y PECAUT, P. (1969). Gene *Tm-2*: new source. *Tomato Genet Coop Rep*, *19*, 13-14.
- LIPPMAN, Z. B.; SEMEL, Y. Y ZAMIR, D. (2007). An integrated view of quantitative trait variation using tomato interspecific introgression lines. *Current opinion in genetics & development*, *17*, 545-552.
- MONFORTE, A. J. Y TANKSLEY, S. D. (2000). Development of a set of near isogenic and backcross recombinant inbred lines containing most of the *Lycopersicon hirsutum* genome in a *L. esculentum* genetic background: a tool for gene mapping and gene discovery. *Genome*, *43*, 803-813.
- MUNIYAPPA, V.; JALIKOP, S. H.; SAIKIA, A. K.; SHIVASHANKAR, G.; BHAT, A. I. Y RAMAPPA, H. K. (1991). Reaction of *Lycopersicon* cultivars and wild accessions to tomato leaf curl virus. *Euphytica*, *56*, 37-41.
- PARAN, I.; GOLDMAN, I.; TANKSLEY, S. D. Y ZAMIR, D. (1995). Recombinant inbred lines for genetic mapping in tomato. *Theoretical and applied genetics*, *90*, 542-548.

- PASSAM, H. C.; KARAPANOS, I. C.; BEBELI, P. J. Y SAVVAS, D. (2007). A review of recent research on tomato nutrition, breeding and post-harvest technology with reference to fruit quality. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology*, 1, 1-21.
- PATERSON, R. G.; SCOTT, S. J. Y GERGERICH, R. C. (1989). Resistance in two *Lycopersicon* species to an Arkansas isolate of tomato spotted wilt virus. *Euphytica*, 43, 173-178.
- PEIRÓ, R.; DÍEZ, M. J. Y PÉREZ DE CASTRO, A. (2015). A set of PCR-based markers for management of a library of *Solanum lycopersicoides* introgression lines. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 90, 279-284.
- PELHAM, J. (1968). Disturbed segregation of genes on chromosome 9: gamete promoter, Gp, a new gene. *Tomato Genet Coop*, 18, 27-29.
- PERALTA, I. E. Y SPOONER, D. M. (2000). Classification of wild tomatoes: a review. *Kurtziana* 28: 45-54.
- PERALTA, I. E.; KNAPP, S. Y 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*. *Syst Bot Monogr*, 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.; HERRAIZ, J.; RUIZ, 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 Physiologiae Plantarum*, 22, 351-353.
- RAGOUSSIS, J. (2009). Genotyping technologies for genetic research. *Annual review of genomics and human genetics*, 10, 117-133.
- RAMSAY, L.; JENNINGS, D.; KEARSEY, M. J.; MARSHALL, D. F.; BOHUON, E. J. R.; ARTHUR, A. E. Y LYDIATE, D. J. (1996). The construction of a substitution library of recombinant backcross lines in *Brassica oleracea* for the precision mapping of quantitative trait loci. *Genome*, 39, 558-567.
- RICK, C. M. (1963). Barriers to interbreeding in *Lycopersicon peruvianum*. *Evolution*, 216-232.
- RONEN, G.; CARMEL-GOREN, L.; ZAMIR, D. Y HIRSCHBERG, J. (2000). An alternative pathway to  $\beta$ -carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of Beta and old-gold color mutations in tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 11102-11107.

- ROSSI, M.; GOGGIN, F. L.; MILLIGAN, S. B.; KALOSHIAN, I.; ULLMAN, D. E. Y WILLIAMSON, V. M. (1998). The nematode resistance gene *Mi* of tomato confers resistance against the potato aphid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 9750-9754.
- ROWE, R. C. Y FARLEY, J. D. (1981). Strategies for controlling *Fusarium* crown and root rot in greenhouse tomatoes. *Plant Dis*, 65, 107-112.
- 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 Sciences*, 103, 12981-12986.
- SIMPSON, S. P. (1989). Detection of linkage between quantitative trait loci and restriction fragment length polymorphisms using inbred lines. *Theoretical and applied genetics*, 77, 815-819.
- TANKSLEY, S. D. (1993). QTL analysis of transgressive segregation in an interspecific tomato cross. *Genetics*, 134, 585-596.
- TANKSLEY, S. D.; GRANDILLO, S.; FULTON, T. M.; ZAMIR, D.; ESHED, Y.; PETIARD, V.; LOPEZ, J. Y BECK-BUNN, T. (1996). Advanced backcross QTL analysis in a cross between an elite processing line of tomato and its wild relative *L. pimpinellifolium*. *Theoretical and applied genetics*, 92(2), 213-224.
- VAKALOUNAKIS, D. J.; LATERROT, H.; MORETTI, A.; LIGOXIGAKIS, E. K. Y SMARDAS, K. (1997). Linkage between *Frl* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* resistance) and *Tm-2* (tobacco mosaic virus resistance-2) loci in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Annals of applied biology*, 130, 319-323.
- VAN HEUSDEN, A. W.; KOORNNEEF, M.; VOORRIPS, R. E.; BRÜGGEMANN, W.; PET, G.; VRIELINK-VAN GINKEL, R.; CHEN, X. Y LINDHOUT, P. (1999). Three QTLs from *Lycopersicon peruvianum* confer a high level of resistance to *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. *Theoretical and Applied Genetics*, 99, 1068-1074.
- YAMAKAWA, K. Y NAGATA, N. (1975). Three tomato lines obtained by the use of chronic gamma radiation with combined resistance to TMV and *Fusarium* race J-3. *Technical News, Inst. Rad. Breed*, 16, 2.
- ZAMIR, D. (2001). Improving plant breeding with exotic genetic libraries. *Nature reviews genetics*, 2, 983-989.

## 7. Anexos

### **ANEXO I:** Tampones para la extracción de DNA

#### 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