



**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**  
**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO**

**EFFECTO DE REGIONES CROMOSÓMICAS DE *Solanum*  
*pimpinellifolium* SOBRE CARACTERES QUE AFECTAN LA  
CALIDAD DE FRUTO EN EL CONTEXTO GENÉTICO DEL  
TOMATE CULTIVADO**

**Lic. en Biotecnología MARIANELA D. LUCIANI**

**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS AGRARIAS**

**Director: DRA. ROXANA ZORZOLI**

**Co-Director: DR. GUSTAVO R. RODRÍGUEZ**

**2017**

**EFFECTO DE REGIONES CROMOSÓMICAS DE *Solanum pimpinellifolium* SOBRE  
CARACTERES QUE AFECTAN LA CALIDAD DE FRUTO EN EL CONTEXTO  
GENÉTICO DEL TOMATE CULTIVADO**

Marianela D. Luciani

Licenciada en Biotecnología - Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR.

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Agrarias, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido previamente presentada para la obtención de otro título en ésta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario, durante el período comprendido entre Abril del 2012 y Noviembre del 2016, bajo la dirección de la Ing. Agr. (Dra.) Roxana Zorzoli.

Lic. en Biotec. Marianela D. Luciani  
Nombre y firma del Doctorando

Ing. Agr. (Dra.) Roxana Zorzoli  
Nombre y firma del Director

Ing. Agr. (Dr.) Gustavo R. Rodríguez  
Nombre y firma del Co-Director

Defendida: 11 de Diciembre de 2017.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer en primer lugar a mis directores, la Dra. Roxana Zorzoli y el Dr. Gustavo Rodríguez, por haberme dado la posibilidad de realizar esta tesis doctoral, pero sobre todo por su dedicación permanente, su constante y paciente seguimiento y sus invaluable enseñanzas. Gracias por su guía, ayuda y contención en cada paso y etapa de la tesis y de mi formación. Gracias por su acompañamiento y comprensión en todo momento, apoyándome siempre y en cuestiones que trascienden los límites académicos. También, y de manera muy especial, quiero agradecer al Dr. Javier Pereira da Costa, a quien no solo debo mucho de este trabajo sino una gran contribución en todas las tareas y una gran parte de la formación recibida. Gracias por la colaboración permanente, la buena predisposición y generosidad para compartir experiencias y conocimientos y el incansable sentido del humor alegrando cada momento.

A los integrantes de la Cátedra de Genética de la Facultad de Ciencias Agrarias (UNR) por tantas enseñanzas del mundo de la agronomía y más allá de este, por todas sus contribuciones y, más aun, por haberme recibido con tanta amabilidad y afecto. Gracias a la Dra. Liliana Picardi, al Dr. Guillermo Pratta y a los Ing. Agr. (MSc) Graciela Nestares y Fernando López Anido. Ha sido un privilegio formar parte de la cátedra.

A mis todos compañeros. En especial a Vladimir, por su compañerismo, su ayuda en cada ensayo, su inagotable paciencia y, sin dejar de mencionar, sus incontables lecciones acerca del campo. A Gise, Viki, Jose y Paolo, por su gran generosidad y colaboración permanente. Gracias por tantas horas y labores compartidas. A Mechi, Tati, Gaby, Anita, Mica, Lou, Flor, Fer, Pau, Euge, Caro y todos los chicos que pasaron por la Sala de Becarios. A todos ellos muchas gracias por los buenos momentos compartidos, porque han hecho de mi paso por la facultad más que agradable.

A los ayudantes de la Cátedra de Genética. Gracias a Dana, Daniela, Manuel, Marcela, Agustín y a todos los chicos que colaboraron con diferentes tareas y con este trabajo de tesis contagiando sus ganas de aprender y su renovadora energía.

Al personal no docente de la Facultad, y en particular, de la Sección Horticultura del Campo Experimental, Florida, Ramón, Toni y Hernán. Gracias por su asistencia y cooperación en las diferentes tareas y en los ensayos llevados a campo.

A mis familiares y amigos por acompañarme a lo largo de estos años, y muy en especial a mis padres y hermanas que son mi sostén en la vida y a Martín que día a día comparte conmigo y me apoya en todo. Sin ellos no lo habría logrado. Inmensamente gracias.

Al CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas) por haber financiado mi carrera de posgrado, y a la Fundación Josefina Prats por la contribución económica otorgada durante la realización de este trabajo de tesis doctoral.

## **PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS**

- “VARIACIÓN INTER E INTRA FAMILIAR PARA CALIDAD DE FRUTO EN RETROCRUZAS TEMPRANAS DE TOMATE” Luciani MD, Pereira da Costa JH, Rodríguez GR, Picardi LA, Zorzoli R. SOCIEDAD ARGENTINA DE GENETICA (SAG 2013) - XLII Congreso Argentino de Genética - III Reunión Regional SAG-NOA. Salta, 20 al 23 de Octubre de 2013. Publicado en Actas del Congreso en *Journal of Basic & Applied Genetics*. Suppl. Vol. XXIV(1) - pág. 180.
- “ANÁLISIS MOLECULAR DE UNA RETROCRUZA INTERESPECÍFICA EN TOMATE PARA LA OBTENCIÓN DE LÍNEAS CASI ISOGÉNICAS” Luciani, Marianela D.; Pereira da Costa, Javier H.; Vazquez, Dana V.; Rodríguez, Gustavo R.; Picardi, Liliana A.; Zorzoli, Roxana. XV Congreso y XXXIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Zavalla, 28-29 de noviembre de 2013. Publicado en Actas del Congreso en *Resúmenes del XV Congreso y XXXIII Reunión Anual ISSN 2314-1484* - pág. 32.
- “REGIONES GENÓMICAS ASOCIADAS A CARACTERES DE CALIDAD DE FRUTOS EN UNA RETROCRUZA DE TOMATE” Luciani, Marianela D.; Pereira da Costa, Javier H.; Rodríguez, Gustavo R.; Picardi, Liliana A.; Zorzoli, Roxana. XLIII Congreso Argentino de Genética y IV Reunión Regional SAG La Pampa-Patagonia. San Carlos de Bariloche, 19 al 22 de octubre de 2014. Publicado en Actas del Congreso en *Journal of Basic & Applied Genetics*. Suppl. Vol. XXV(1) - pág. 221.
- “RELACIÓN DEL COLOR Y LA DUREZA CON LA VIDA EN ESTANTERÍA DE LOS FRUTOS EN TOMATE” Luciani, Marianela D.; Cambiaso, Vladimir; Pereira da Costa, Javier H.; Piola, Ezequiel; Rodríguez, Gustavo R.; Picardi, Liliana A.; Zorzoli, Roxana. XVI Congreso y XXXIV Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario, 4-5 de diciembre de 2014. Publicado en Actas del Congreso en *Resúmenes del XVI Congreso y XXXIV Reunión Anual ISSN 2314-1484* - pág. 79.
- “DETECCIÓN DE *QTLs* PARA CARACTERES DE CALIDAD DE FRUTO EN FAMILIAS BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> DERIVADAS DE UN CRUZAMIENTO INTERESPECÍFICO DE TOMATE” Luciani, Marianela D.; Pereira da Costa, Javier H.; Rodríguez, Gustavo R.; Picardi, Liliana A.; Zorzoli, Roxana. XLIV Congreso Argentino de Genética. Mar del Plata, Provincia de Buenos Aires, del 13 al 16 de septiembre de 2015. Publicado en Actas del Congreso en *Journal of Basic & Applied Genetics*. Suppl. Vol. XXVI(1) 2015 - pág. 183.
- “VARIANCIAS GENÉTICAS PARA CARACTERES DE CALIDAD DE FRUTO EN RETROCRUZAS AVANZADAS DE TOMATE” Nuñez, Marcela S.; Wagner, Agustín; Luciani, Marianela D.; Zorzoli, Roxana; Rodríguez, Gustavo R.; Pereira da Costa, Javier H. XVIII Congreso y XXXVI Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario, 5-6 de diciembre de 2016. Publicado en Actas del Congreso en *Resúmenes del XVIII Congreso y XXXVI Reunión Anual ISSN 2314-1484* - pág. 24.

# ÍNDICE

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

## RESUMEN

## ABSTRACT

## INTRODUCCIÓN GENERAL..... 1

## OBJETIVOS GENERALES..... 13

## **CAPÍTULO I** - *CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE FAMILIAS BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> ORIGINADAS DE UN CRUZAMIENTO INTERESPECÍFICO DE TOMATE*..... 14

### Introducción..... 15

### Objetivos específicos..... 20

### Materiales y Métodos..... 21

### Resultados..... 32

#### -Evaluación por caracteres de calidad de fruto de familias BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub>..... 32

#### -Caracterización por marcadores moleculares de familias BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub>..... 36

#### -Detección de *QTLs* en las familias BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub>..... 38

#### -Validación de *QTLs* asociados a caracteres de calidad de fruto..... 40

### Discusión..... 43

### Conclusiones parciales..... 49

## **CAPÍTULO II** - *DESARROLLO DE NILs: OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE GENERACIONES BC<sub>3</sub> Y BC<sub>4</sub>*..... 50

### Introducción..... 51

### Objetivos específicos..... 55

### Materiales y Métodos..... 56

### Resultados..... 65

#### -Parte I: Análisis de la generación BC<sub>3</sub>..... 65

#### -Evaluación de caracteres fenotípicos en la generación BC<sub>3</sub>..... 65

#### -Caracterización por marcadores moleculares de ADN de la generación BC<sub>3</sub>..... 69

#### -Detección de *QTLs* en la generación BC<sub>3</sub>..... 72

#### -Validación de *QTLs* asociados a caracteres de calidad de fruto..... 74

#### -Parte II: Obtención de líneas casi isogénicas..... 77

#### -Caracterización molecular complementaria de las NILs..... 79

### Discusión..... 83

#### -(I) Detección de *QTLs* en generaciones de retrocruzas avanzadas..... 83

#### -(II) Desarrollo y obtención de NILs..... 94

### Conclusiones parciales..... 100

<b><u>CAPÍTULO III - EVALUACIÓN Y VALORACIÓN DE pre-NILs</u></b> .....	<b>101</b>
Introducción .....	<b>102</b>
Objetivos específicos .....	<b>106</b>
Materiales y Métodos .....	<b>107</b>
Resultados .....	<b>112</b>
- <u>Parte I: Evaluación de familias pre-NILs</u> .....	112
-Evaluación por caracteres fenotípicos de las familias pre-NILs .....	112
-Characterización por marcadores <i>SSR</i> de las familias pre-NILs .....	117
-Detección de <i>QTLs</i> en las familias pre-NILs .....	118
-Validación de <i>QTLs</i> asociados a caracteres de calidad de fruto .....	120
- <u>Parte II: Evaluación de pre-NILs-PP</u> .....	122
Discusión .....	<b>130</b>
Conclusiones parciales .....	<b>144</b>
<b>CONCLUSIONES FINALES</b> .....	<b>145</b>
<b>CONSIDERACIONES FINALES</b> .....	<b>146</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>149</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>171</b>

## **ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS**

**a/b:** relación entre la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm (a) y de 675 nm (b).

**ADN:** ácido desoxirribonucleico.

**ANOVA:** análisis de la variancia.

**BC<sub>x</sub>:** *backcross generation x* o retrocruza x.

**BC<sub>x</sub>S<sub>x</sub>:** *selfing x of the backcross x* o x autofecundación de la x retrocruza.

**CC:** genotipo homocigota para los alelos aportados por Caimanta.

**CP:** genotipo heterocigota para alelos aportados por Caimanta y LA722.

**Cr:** cromosoma.

**% GR:** porcentaje del genoma del padre recurrente recuperado.

**INDEL:** inserción/delección.

**L:** porcentaje de reflectancia.

**NIL:** *near isogenic line* o línea casi isogénica.

**pb:** pares de bases.

**PCR:** *Polymerase Chain Reaction* o reacción en cadena de la polimerasa.

**PP:** genotipo homocigota para los alelos aportados por LA722.

**QTL:** *Quantitative Trait Locus* o locus de carácter cuantitativo.

**SSR:** *Simple Sequence Repeat* o repetición de secuencia simple.

**VG/VF:** variación fenotípica atribuible a variación genética.

**Vp:** vida poscosecha.

## RESUMEN

---

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una de las hortalizas que más se consume en Argentina, constituyendo una fuente esencial de nutrientes para la dieta humana. El principal destino de la producción en nuestro país es el consumo en fresco, donde la calidad de los frutos juega un rol trascendental. Además, un carácter de fundamental importancia para la comercialización del fruto fresco es la prolongación de la vida poscosecha. En nuestro país, el desarrollo de nuevas variedades de tomate ha estado relegado y los materiales comercializados provienen de semillas importadas desarrolladas para otros ambientes y condiciones de cultivo, que además, carecen de la calidad requerida por los consumidores. Frente a la reducida variabilidad genética en el germoplasma cultivado, las especies de tomate silvestres se vuelven importantes recursos para enriquecer las bases del cultivo con alternativas génicas que mejoren la calidad, la adaptación y la productividad. En este trabajo se recurrió a la especie silvestre *S. pimpinellifolium* como fuente de variabilidad y de genes para la mejora de la calidad del fruto. Los objetivos fueron demostrar el efecto fenotípico sobre caracteres de calidad de fruto de regiones cromosómicas introgresadas desde *S. pimpinellifolium* en el contexto genético del cultivar Caimanta, y obtener un nuevo acervo genético mejorado basado en Caimanta que resulte adaptado a las condiciones de cultivo locales. A través de un esquema de mejoramiento basado en retrocruzas se buscó la obtención de nuevas líneas similares al cultivar (*NILs*) con aportes de la especie silvestre para mejorarlo. Se partió del cruzamiento inicial entre el cultivar argentino tipo platense denominado Caimanta y la accesión LA722 de *S. pimpinellifolium*, y en cada ciclo de retrocruza hacia el padre cultivado se realizaron análisis fenotípicos y moleculares para la selección de plantas de interés. En un principio, se estudiaron generaciones avanzadas del cruzamiento (familias BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> y generación BC<sub>3</sub>) para explorar el germoplasma silvestre. En las familias BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> se hallaron 20 *QTLs* ( $p \leq 0,01$ ) asociados al diámetro, altura, forma, peso, número de lóculos, parámetro de color a/b, firmeza y acidez titulable del fruto. En la BC<sub>3</sub>, se encontraron diez *QTLs* ( $p \leq 0,01$ ) asociados al diámetro, forma, peso, vida poscosecha y firmeza. El menor número de asociaciones en la BC<sub>3</sub> se relaciona, al menos en parte, con la mayor recuperación del genoma recurrente. Además, la comparación a través de las generaciones permitió la validación de 38 asociaciones a diferentes caracteres de calidad. Mediante estos análisis de *QTLs*, se detectaron diversas regiones genómicas relacionadas a la calidad del fruto en *S. pimpinellifolium*, resultando una valiosa herramienta para identificar *loci* con efectos deseados para el mejoramiento. Siguiendo una metodología que articuló los estudios de *QTLs* con el desarrollo

de nuevas variedades dentro de un mismo proceso, se obtuvieron 22 nuevas líneas de tomate, cada una llevando aportes del genoma silvestre en el fondo genético cultivado. Se emplearon análisis fenotípicos y moleculares (marcadores *SSR*) para asistir la introgresión de regiones genómicas asociadas a caracteres de calidad del fruto y la recuperación del genoma de Caimanta, avanzando en los estudios genéticos simultáneamente al desarrollo de nuevos materiales. Esta estrategia permitió optimizar la selección de plantas con características idóneas en cada retrocruza, lográndose una mejora significativa de la eficiencia en cuanto a tiempos y cantidad de materiales requeridos y alcanzándose las primeras *NILs* en generaciones tempranas (*BC*<sub>3</sub> y *BC*<sub>4</sub>). Una caracterización molecular complementaria reveló que las introgresiones silvestres en las líneas obtenidas no eran únicas, reclasificándolas como *pre-NILs* y señalando la importancia de incorporar más marcadores en los estudios para el adecuado control de la recuperación del genoma recurrente y de la calidad de las líneas. Se detectaron introgresiones silvestres adicionales en las 22 líneas, con un total de 120 en todo el conjunto y un promedio de 5,5 por línea. Aun así, estas *pre-NILs* representan importantes recursos que acercan la variabilidad silvestre, haciéndola disponible a fitomejoradores y genetistas. En este trabajo, notables diferencias fueron halladas entre las generaciones, algunos *QTLs* se fueron perdiendo y otros nuevos fueron emergiendo al avanzar en las retrocruzas. El efecto final de la introgresión silvestre en la *pre-NIL* resultó bastante menor que lo previsto por los análisis de *QTLs* en las generaciones tempranas, indicando que estos análisis fueron bajos predictores del comportamiento final en la *pre-NIL*. Estas observaciones muestran una baja conservación y una fuerte dependencia del *background* genético en los estudios de *QTLs*. En general, las *pre-NILs* obtenidas exhibieron buenos atributos de calidad, e incluso varias superaron al progenitor cultivado para diversos rasgos. Estas líneas presentaron valores discrepantes para caracteres como el tamaño, la forma, la vida poscosecha, el color, la firmeza, los sólidos solubles y la acidez de los frutos, representando materiales de alto valor agronómico y siendo algunas muy promisorias para constituir nuevos cultivares con beneficios en la calidad. Además, estas *pre-NILs* posibilitaron conocer algunas de las regiones genómicas que controlan rasgos relacionados a la calidad del fruto, adentrándonos en las bases genéticas de estos caracteres. En conclusión, los resultados mostraron que la introgresión de regiones genómicas de *S. pimpinellifolium* en el genoma cultivado permitió mejorar diferentes características de calidad de los frutos y obtener nuevos recursos vegetales con alto potencial para programas de mejoramiento y estudios genéticos en tomate.

## ABSTRACT

---

### **EFFECT OF INTROGRESSED GENOMICS REGIONS FROM *Solanum pimpinellifolium* IN THE CULTIVATED TOMATO GENETIC BACKGROUND ON FRUIT QUALITY TRAITS**

The quality of tomato fruits (*Solanum lycopersicum* L.) plays a transcendental role, both in producers and consumers choice. In view of the reduced genetic variability in cultivated germplasm, wild tomato species become important resources for improving quality. The objectives of this work were to demonstrate the phenotypic effect on fruit quality traits of introgressed chromosomal regions from *S. pimpinellifolium* in the cultivar Caimanta genetic background, and to obtain a new improved genetic stock based on Caimanta and adapted to the local growing conditions. Through an improvement scheme based on backcrosses, we aim to reach new lines similar to the cultivar (NILs) with contributions of the wild species. Beginning from the initial cross between the Argentinean cultivar Caimanta and the accession LA722 of *S. pimpinellifolium*, different cycles of backcrossing towards the cultivated parent were done, where phenotypic and molecular analyzes assisted for plant selection. This strategy allowed an optimized selection, obtaining a significant improvement of the efficiency and reaching the first NILs in early generations (BC<sub>3</sub> and BC<sub>4</sub>). Initially, advanced generations (BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> families and BC<sub>3</sub>) were explored, detecting several *S. pimpinellifolium* regions associated with fruit quality traits (such as diameter, height, shape, weight, shelf life, color, firmness, soluble solids, among others). However, significant differences in QTL studies were found between generations. The wild introgression effect on the final line was significantly lower than predicted by QTLs analyzes in early generations, indicating that these analyzes were low predictors of its final behavior and showing a strong background dependence in QTL studies. Following an approach that connected QTL surveys with new varieties development, 22 new tomato lines were obtained. Afterwards, a complementary molecular characterization revealed that the wild introgressions in the lines achieved were not unique, reclassifying them as pre-NILs. In general, the pre-NILs showed good quality features, and even several exceeded the cultivated parent for diverse traits, becoming very promising materials. These results indicated that introgression of *S. pimpinellifolium* regions in the cultivated genome allowed to improve fruit quality properties and to obtain new vegetal resources with high potential for breeding programs and genetic studies in tomato.

## **INTRODUCCIÓN GENERAL**

---

El tomate es una de las hortalizas más consumidas en el mundo, representa una valiosa fuente de nutrientes para la dieta humana y es un producto de gran importancia agrícola. Desde el punto de vista botánico, el tomate es en realidad una fruta, sin embargo comúnmente es tratado como una hortaliza debido a su forma de consumo. Además del uso directamente del fruto en fresco, ya sea de manera cruda o cocida, se desarrollan una gran variedad de productos procesados a partir del mismo, como pastas, tomates enlatados enteros, tomates enlatados en cubitos, jugos, salsas y sopas. El fruto de tomate no posee un valor nutricional muy elevado, por ejemplo un tomate medio de aproximadamente 135 gramos aporta cerca de 25 calorías. De hecho, es un alimento poco energético, ya que alrededor del 95 % de su peso es agua y cerca de un 4 % son hidratos de carbono. No obstante, debido al alto nivel de consumo, los tomates aportan importantes nutrientes a la alimentación humana. Contribuyen significativamente con las vitaminas A y C, con minerales esenciales (como el potasio y magnesio) y constituyen la principal fuente de licopeno en la dieta humana. Este pigmento, que da el color rojo característico al tomate, tiene propiedades antioxidantes y se considera que cumple funciones protectoras contra el cáncer y enfermedades cardiovasculares (Foolad, 2007).

El tomate se encuentra ampliamente distribuido en el mundo, y si bien es una planta tropical, se cultiva en casi todos los rincones yendo desde regiones tropicales hasta zonas frías. Esta extensa distribución ha sido posible en gran medida gracias al uso de invernaderos, que permitió su producción en lugares donde el cultivo a campo estaba restringido debido a las bajas temperaturas. Durante los últimos 20 años, la producción de tomate y el área dedicada a su cultivo se han duplicado. En la actualidad, el tomate representa el séptimo cultivo más importante a nivel mundial después del maíz, arroz, trigo, papa, soja y yuca. Su producción mundial alcanzó cerca de 170 millones de toneladas en el 2014 (FAOSTAT, 2014). Hace 20 años atrás, Europa y América eran los productores más importantes, sin embargo hoy en día Asia domina el mercado del tomate, siendo China el principal productor seguido por Estados Unidos, India, Turquía, Egipto, Italia, Irán, España, Brasil y México. Curiosamente, los países en los que se observan los mayores rendimientos corresponden al norte de Europa, donde las condiciones climáticas no son favorables al cultivo de tomate y el área dedicada a esta actividad es muy pequeña. En estos países la mayor parte de la producción se realiza en condiciones controladas bajo invernadero (Bergougnoux, 2014).

Debido a su gran aceptación como alimento y versatilidad en la elaboración de comidas, el tomate es una de las hortalizas que más se consume en Argentina, con un promedio de 16,0 kg/habitante/año, siendo este valor superior al consumo promedio mundial estimado en 5,6 kg/habitante/año (FAOSTAT, 2013). En Argentina, la superficie destinada a explotaciones agropecuarias representa cerca de 160 millones de hectáreas (ha), de las cuales aproximadamente 142 mil se destinan a la producción de hortalizas. De esta superficie, Santa Fe ocupa el séptimo lugar con 6.110 ha, representando un 4,3 % del total (INDEC, Censo Nacional Agropecuario 2008). Dentro de la provincia santafesina, el área del Cinturón Hortícola de Rosario, que comprende los departamentos de Rosario, Constitución, San Lorenzo y San Jerónimo, es una zona muy importante, no solo productivamente sino en cuanto a la comercialización, ya que abastece a más de 2 millones de habitantes. Los ingresos brutos de los productos hortícolas para la región son superiores a los 138 millones de pesos, encontrándose el tomate cultivado bajo invernadero séptimo en importancia (Tabla 1) (Censo del Cinturón Hortícola de Rosario, 2012).

**Tabla 1-** Ordenamiento de los cultivos en función a los Ingresos Brutos dentro del Cinturón Hortícola de Rosario. Fuente: Censo 2012 del Cinturón Hortícola de Rosario.

	Cultivo	Superficie (ha)	Rendimiento (tn/ha)	Precio de venta (\$/kg)	Ingresos Brutos (\$)
1	Papa	678	15	1,79	18.147.321
2	Acelga	322	20	2,08	13.404.167
3	Lechuga	382	8	4,38	13.382.250
4	Espinaca	325	8	4,17	10.840.333
5	Repollo	89	25	4,00	8.850.000
6	Buero	55	12	12,00	7.908.480
7	Tomate invernadero	16	120	3,89	7.583.333
8	Choclo	230	12	2,50	6.903.000
9	Perejil	216	10	3,00	6.486.900
10	Cebolla verdeo	54	10	12,00	6.440.400
11	Brócoli	151	8	5,00	6.046.800
12	Chaucha	70	10	7,00	4.893.000
13	Rúcula	99	6	6,94	4.125.000
14	Remolacha	104	10	3,33	3.468.333
15	Radicheta	78	10	4,17	3.268.750
16	Alcaucil	36	8	9,20	2.623.840
17	Coliflor	42	12	5,00	2.514.000
18	Zapallito	118	12	1,76	2.494.588
19	Melón	26	15	4,86	1.903.125
20	Batata	34	20	2,25	1.507.500
21	Tomate campo	9	40	2,78	977.778
22	Berenjena	14	20	3,33	963.333
23	Zanahoria	12	20	4,00	960.000
24	Arveja	198	4	1,00	793.600
25	Apio	7	25	3,00	488.250
26	Espárrago	14	5	6,00	420.000
27	Calabaza	10	20	1,94	396.667
28	Varios	7	15	3,00	319.950
29	Escarola	2	10	3,00	73.500
30	Pimiento	6	2	4,17	49.583
31	Haba	1	4	8,00	40.000
32	Pepino	2	3	3,33	19.000
	<b>TOTAL</b>	<b>3.407</b>			<b>138.292.782</b>

El censo realizado en el año 2012 destinado a relevar la población de productores y variables de producción en el área del Cinturón Hortícola de Rosario mostró que en la actualidad existe un 36 % menos de productores que hace 18 años atrás, un 17 % menos que hace 11 años y un 4 % menos que en el censo 2008. Además, se observa una caída del 18,8 % de la superficie de tierras destinadas a la horticultura comparado con el censo 2008. En el total, diversas especies no presentaron diferencias importantes en la superficie cultivada con respecto al 2008 (acelga, alcaucil, batata, remolacha, radicheta, brócoli, repollo, perejil y espinaca), algunas aumentaron su cultivo (rúcula y berro), mientras que otras, entre las cuales se halla el tomate, disminuyeron significativamente: papa (50 %), tomate de campo (66 %), espárrago (67 %) y lechuga (18 %) (Censo del Cinturón Hortícola de Rosario, 2012). Los datos de este último censo reflejan una evidente disminución de la producción hortícola en la región. Esto podría deberse, entre diversas cuestiones, a problemáticas relacionadas con la baja disponibilidad y calificación de la mano de obra, escaso asesoramiento técnico, altos costos de los cultivos, falta de planificación y escaso control administrativo. Además, en el caso de las frutas y hortalizas los daños poscosecha pueden llegar a ser elevados, ocasionando importantes pérdidas que afectan su producción. Trabajos realizados encontraron valores de pérdidas poscosecha cercanos al 20 % para el tomate (Ferratto *et al.*, 2008). Sumado a esto, y en relación a la producción de tomate nacional, es importante destacar que Argentina posee un perfil netamente importador de semillas. El desarrollo de nuevos materiales de tomate en nuestro país ha quedado relegado, tal es así que en los últimos 10 años no se han registrado ante el INASE (Instituto Nacional de Semillas) híbridos nacionales (de un total de 298) y se han inscripto solo 14 cultivares argentinos (de un total de 63). Las semillas importadas, aunque satisfacen medianamente el rendimiento buscado por los productores locales, carecen de la calidad requerida por los consumidores y son materiales que fueron obtenidos para otros ambientes y condiciones de cultivo. En este contexto, resulta necesario fortalecer las capacidades locales y el desarrollo de nuevos recursos, con el propósito de renovar la producción, apuntando a mejorar la calidad de vida de la comunidad y favorecer el crecimiento regional.

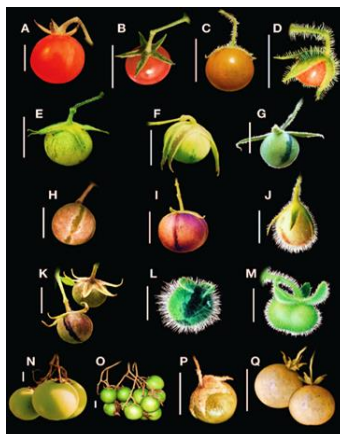
El tomate cultivado (*Solanum lycopersicum* L.) pertenece a la familia de las Solanáceas, formada por más de 3.000 especies que incluyen muchas plantas de importancia económica como la papa, berenjena, petunia, tabaco, pimiento, entre otras. Desde su introducción en Europa en el siglo XVI, se asumió que el tomate estaba estrechamente relacionado con el género

*Solanum*. En 1753, Linneo lo clasificó por primera vez bajo el nombre específico de *Solanum lycopersicum*. Sin embargo, su clasificación y designación han sido tema de debate durante mucho tiempo (Foolad, 2007; Peralta y Spooner, 2007). Miller, un contemporáneo de Linneo, lo ubicó dentro del género *Lycopersicon* (el cual consideraba como un género diferente a *Solanum*) y muchos botánicos y genetistas siguieron esta clasificación. Con el advenimiento de la era molecular fue posible la revisión de la clasificación filogenética de las solanáceas y *Lycopersicon* fue reintroducido en el género *Solanum* dentro de la sección *Lycopersicon*. Es interesante observar que 200 años de debate fueron necesarios para confirmar la descripción inicial de Linneo. La organización de los grupos dentro del tomate también ha sufrido transformaciones a lo largo de la historia. En 1940, Müller identificó seis especies de tomate separadas en dos secciones: el subgénero *eulycopersicon*, incluyendo a *Lycopersicon esculentum* y *L. pimpinellifolium*; y el subgénero *eriopersicon*, que reagrupa a *L. peruvianum*, *L. cheesmaniae*, *L. hirsutum* y *L. glandulosum*. Algunos años más tarde, Rick (1960; 1979) propuso una clasificación del tomate basándose en la capacidad de las especies silvestres para hibridarse con el tomate cultivado. Reconoció nueve especies divididas en dos grupos principales. Todas las especies del complejo *esculentum* (*L. esculentum*, *L. pimpinellifolium*, *L. cheesmaniae*, *L. pennellii*, *L. hirsutum*, *L. chmielewskii* y *L. parviflorum*) pueden hibridarse con el tomate cultivado, tienen flores amarillas y el color del fruto varía desde rojo a naranja, amarillo o verde. Las especies del complejo *peruvianum* (*L. chilense* y *L. peruvianum*) presentan una baja capacidad de hibridación con el tomate cultivado y son extremadamente diversas. En la actualidad, se sabe que la descripción real del tomate es bastante más compleja de lo que se pensó inicialmente. La última clasificación reconoce al tomate cultivado (*Solanum lycopersicum* L., ex *L. esculentum*) y 12 parientes silvestres relacionados (Peralta *et al.*, 2005; 2008):

- 1- *S. pimpinellifolium* L. (ex *L. pimpinellifolium*),
- 2- *S. pennellii* Correll (ex *L. pennellii*),
- 3- *S. chilense* (Dunal) Reiche (ex *L. chilense*),
- 4- *S. corneliomuelleri* J.F. Macbr (ex *L. peruvianum* var. *glandulosum*),
- 5- *S. habrochaites* S. Knapp & D.M. Spooner (ex *L. hirsutum*),
- 6- *S. huaylasense* Peralta & S. Knapp (ex *L. peruvianum*),
- 7- *S. peruvianum* L. (ex *L. peruvianum*),
- 8- *S. arcanum* Peralta (ex *L. peruvianum* var. *hirsutum*),

- 9- *S. chmielewskii* (C.M. Rick, Kesicki, Forbes & M. Holle) D.M. Spooner, G.J. Anderson, R.K. Jansen (ex *L. chmielewskii*),
- 10- *S. neorickii* (D.M. Spooner, G.J. Anderson & R.K. Jansen) (ex *L. parviflorum*),
- 11- *S. cheesmaniae* (L. Riley) Fosberg (ex *L. cheesmaniae*),
- 12- *S. galapagense* S.C. Darwin & Peralta (ex *L. cheesmaniae* var. *minor*).

Las especies silvestres de tomate son nativas de América del Sur, distribuidas desde el centro de Ecuador, pasando por Perú hasta el norte de Chile y también en las Islas Galápagos (Spooner *et al.*, 2005). Estas especies crecen en una gran variedad de hábitats, desde el nivel del mar a lo largo de la costa del Pacífico a más de 3.300 metros en los valles del lado occidental de los Andes, desde climas áridos a climas lluviosos. A menudo, se hallan en valles estrechos y aislados, adaptadas a microclimas particulares y diversos tipos de suelos. Es probable que la geografía andina, los diversos hábitats ecológicos y los diferentes climas contribuyeran, en conjunto, a la gran diversidad encontrada en las especies silvestres (Figura 1). Esta diversidad se expresa tanto en características morfológicas, como fisiológicas y sexuales, y las convierte en recursos genéticos muy valiosos (Peralta y Spooner, 2005). Las especies silvestres de tomate presentan flores que suelen ser amarillas y sus frutos son carnosos, variables en tamaño, forma, color y pubescencia. La gran mayoría posee frutos de color verde, con excepción de las dos especies de las Islas Galápagos (con frutos de color amarillo y naranja) y *S. pimpinellifolium*, que es la única especie silvestre con frutos rojos. El sistema de apareamiento también ha desempeñado un papel clave en la evolución y diversificación de las especies. En el tomate, la autoincompatibilidad es gametofítica y varía desde alógamas auto-incompatibles, a alógamas facultativas, a autógamas auto-compatibles. Rick (1982) llegó a la conclusión de que este sistema evolucionó a partir de la auto-incompatibilidad como la condición ancestral a la auto-compatibilidad. Dentro de las diferentes especies de tomate se encuentra una gama completa de estos sistemas, que van desde autógamas como *S. cheesmaniae* y *S. neorickii* hasta algunos biotipos auto-incompatibles de fecundación cruzada obligatoria en *S. chilense*, *S. habrochaites*, *S. peruvianum* y *S. pennellii*. Una auto-compatibilidad con varios grados de fecundación cruzada facultativa se encuentra en *S. chmielewskii*, *S. lycopersicum*, *S. pimpinellifolium*, y en algunos biotipos auto-compatibles de *S. habrochaites* y *S. pennellii* (Bedinger *et al.*, 2011).



**Figura 1-** Diversidad mostrada por las especies silvestres de tomate. Fuente: Peralta *et al.* (2008).

En el tomate cultivado, la historia de su domesticación y evolución ha moldeado fuertemente su condición actual. La domesticación es un tipo especial de diversificación de las especies distinta de la divergencia mediante la selección natural en un medio natural. Curiosamente, muchos rasgos seleccionados por la domesticación, de manera más o menos intencional por la acción del hombre, son perjudiciales en la naturaleza. En el tomate, los frutos comestibles, el color rojo atractivo y el aumento del tamaño han caracterizado este proceso. No obstante, cómo ha ocurrido la domesticación del tomate no resulta claro aún. A través de los años, se han planteado dos hipótesis principales, una que apoya a Perú y otra a México como los posibles sitios de domesticación. La hipótesis que señala a Perú (De Candolle, 1886) hace hincapié en evidencias botánicas, complementadas por aspectos lingüísticos, históricos y estudios moleculares más recientes (Nesbitt y Tanksley, 2002). Sin embargo, no hay suficiente evidencia arqueológica que afirme claramente esta teoría. La segunda hipótesis que postula a México (Jenkins, 1948) se apoya en que sí hay buena evidencia del cultivo de tomate en México y de su uso en la alimentación azteca ya por el siglo XVI. Además, Jenkins sostiene que el nombre tomate, muy probablemente, deriva de la palabra mexicana "*Tomatl*", utilizada por los indígenas aztecas y que los colonizadores castellanos tradujeron por tomate. Un estudio reciente (Blanca *et al.*, 2015) destinado a delinear mejor la historia de su domesticación, utilizó la variación genómica y la estructura de la diversidad genética analizando más de 7.000 *SNPs* (*Single Nucleotide Polymorphism* o polimorfismo de nucleótido simple) y 1.008 accesiones de *Solanum lycopersicum* var. *lycopersicum*, *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (Dunal) D.M. Spooner, G.J. Anderson & R.K. Jansen y *S. pimpinellifolium* para comparar y contrastar la diversidad molecular de estas poblaciones de tomate. Los resultados de este trabajo señalaron

a *S. pimpinellifolium* como el antecesor silvestre más cercano del tomate cultivado y a *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* como un intermediario evolutivo entre *S. pimpinellifolium* y el cultivado (Blanca *et al.*, 2015). Este estudio avaló la teoría de una domesticación en dos pasos: una primera etapa en el Sur de América y un segundo paso en Mesoamérica. La primera fase de domesticación habría ocurrido en manos de los primeros agricultores en Ecuador o el norte de Perú y luego una selección adicional habría tenido lugar en México a partir de materiales pre-domesticados. Desde allí, el tomate fue llevado a Europa por los españoles y luego se extendió por todo el mundo (Blanca *et al.*, 2012). En Europa, inicialmente, el tomate fue usado solo con fines ornamentales, posiblemente debido a su parecido con ciertos *Solanum* tóxicos, como la mandrágora y la belladona. Desde España, el tomate llegaría a Italia a través de Nápoles, que era propiedad española en ese momento, difundiéndose luego hacia el norte. En Inglaterra, el consumo de tomate era común por la segunda mitad del siglo XVIII y, acompañando la colonización Inglesa, los tomates se exportaron a Medio Oriente/Asia y luego a América del Norte. Así, en el siglo XIX el establecimiento de rutas comerciales y diversas colonias contribuyeron a difundir la especie. El uso del tomate como un vegetal comestible fue ganando importancia y expandiéndose por el mundo (Bergougnoux, 2014).

En una perspectiva evolutiva, la domesticación y la selección artificial a manos del hombre indujeron importantes cambios fisiológicos y han reducido notablemente la diversidad genética del cultivo de tomate. Las consecuencias más importantes de este proceso han sido la modificación del sistema reproductivo, el incremento del tamaño del fruto y la reducción de la base genética (Warnock, 1988). Posteriormente, el mejoramiento intensivo de variedades por la ciencia moderna continuaría moldeando la base genómica del cultivo y, en parte, aumentado la erosión genética que comenzó con la domesticación. Sin embargo, algunos estudios apoyan la idea de que el mejoramiento moderno ha realizado grandes avances introduciendo nueva diversidad. Las crecientes preocupaciones sobre la vulnerabilidad genética han motivado a los mejoradores a buscar en los parientes silvestres nuevas fuentes de variación para ampliar la diversidad del germoplasma cultivado. Estimaciones y análisis de la diversidad genética han indicado que la domesticación y las prácticas tempranas han llevado a progresivos cuellos de botella genéticos, mientras que algunas prácticas del mejoramiento moderno reintrodujeron algo de variación genética en el cultivo a partir de especies silvestres (Sim *et al.*, 2009). Blanca *et al.* (2015) mostró que *S. lycopersicum* var. *lycopersicum* contemporáneo presentó un aumento moderado en la diversidad en comparación con los grupos tradicionales, aunque esta

sigue siendo baja en comparación con los subgrupos más ancestrales. Apoyando estas observaciones de la mezcla de genes de las especies silvestres con el germoplasma cultivado, debido al mejoramiento moderno, la reciente secuenciación del genoma ha mostrado que el cultivar Heinz 1706 lleva en sí introgresiones de *S. pimpinellifolium*, cuyos trazos son detectables en los cromosomas 4, 9, 11 y 12 (The Tomato Genome Consortium, 2012). Finalmente, lo que resulta claro es que agricultores y mejoradores han dado forma a la diversidad actual a lo largo de los años en un proceso que resulta difícil de rastrear y dilucidar.

El mejoramiento moderno de tomate ha buscado producir y distribuir nuevas variedades con mejores caracteres agronómicos, dependiendo del método de cultivo (a campo o en invernadero) y del destino de la producción (consumo en fresco o procesamiento). Una consecuencia notable de los programas modernos fue la selección de rasgos específicos para tomates destinados al consumo en fresco y para los destinados al procesamiento, promoviendo una gran diversificación y diferenciación genética entre estas dos clases (Lin *et al.*, 2014). En los cultivares destinados al procesamiento se buscó principalmente un hábito de crecimiento determinado y compacto, la concentración de la floración y fructificación y una fácil separación del fruto para la cosecha mecánica, junto a algunas características específicas del fruto como el color, pH, acidez, sólido solubles, sólidos totales y viscosidad. En los cultivares destinados al mercado en fresco se valoró especialmente la apariencia del fruto, buscando una forma y color uniformes, ausencia de manchas o anomalías externas, tamaños grandes y redondos, buena firmeza y vida poscosecha, sumados a algunos aspectos relacionados al sabor (Foolad, 2007). No obstante, más allá de estas diferencias, el objetivo general del mejoramiento moderno en el tomate cultivado ha sido el incremento de la producción con frutos altamente adaptados a la cadena comercial (Simmonds, 1990). En un segundo lugar, se han considerado características como la resistencia a enfermedades, amplia adaptabilidad, precocidad en la maduración o tolerancia a estreses abióticos, postergándose aspectos importantes que le dan calidad al fruto. De hecho, en las últimas décadas se ha podido observar una innegable pérdida de calidad en el tomate a causa de la propia naturaleza de los nuevos genotipos obtenidos. El deterioro en el sabor de los cultivares modernos de tomate en relación a las variedades tradicionales ha sido una de las principales quejas de los consumidores (Tieman *et al.*, 2017).

La calidad de los frutos juega un rol muy importante tanto en la elección de los cultivares por parte de los productores como en la demanda del producto obtenido por parte de los consumidores. Los atributos externos del tomate que pueden ser percibidos por la vista y el

tacto determinan la elección inicial por parte del consumidor. Sin embargo, esto no es una garantía de la calidad sensorial interna caracterizada por el sabor, el aroma y la consistencia de la pulpa. Por lo tanto, aunque la decisión inicial de compra se realiza en base al aspecto y caracteres como el color y la firmeza, las adquisiciones posteriores dependen fundamentalmente de la evaluación que el consumidor establece en el momento del consumo relacionada con el equilibrio entre azúcares y ácidos y con el contenido de aromas volátiles (Kader *et al.*, 1978; Jones y Scott, 1983; Wolters y Gembert, 1990). En un estudio reciente Tieman *et al.* (2017), combinando paneles de degustación con análisis químicos y genómicos de casi 400 variedades de tomate, identificaron diversos compuestos volátiles, azúcares y ácidos que contribuyen significativamente al sabor buscado por los consumidores. Algunos de estos parecerían haberse perdido con el tiempo, llevando al deterioro en el sabor de las variedades modernas, y volviéndose importantes *loci* candidatos para la mejora en la calidad del tomate. Hoy en día, y principalmente en el mercado del tomate fresco, los consumidores solicitan nuevos tomates, con mejores caracteres de calidad y sabores más diversos.

Junto a las propiedades que confieren calidad al fruto, un atributo de fundamental importancia y altamente apreciado en el mercado del tomate fresco es la vida poscosecha. Cualquier intento de prolongar la vida poscosecha de los frutos favorece su comercialización y disminuye las pérdidas. En los países en desarrollo, las pérdidas poscosecha de frutas y hortalizas representan casi el 50 % de lo producido (Meli *et al.*, 2010). Para el tomate se ha demostrado que los métodos empleados después de la cosecha pueden afectar la calidad de los frutos e incluso disminuir las pérdidas poscosecha (Raffo *et al.*, 2012). Sin embargo, estos métodos son laboriosos y los frutos tratados químicamente no son bien aceptados en el mercado. Por otro lado, una forma de controlar el proceso de madurez puede ser a través de la incorporación de genes “*larga vida*” a cultivares comerciales. Dentro del acervo genético de la especie se han identificado algunos mutantes espontáneos que alteran el proceso de madurez y pueden prolongar la vida poscosecha del fruto de tomate. Estudios fisiológicos y genéticos han caracterizado varios mutantes de la maduración como el *never ripe (Nr)*, *non ripening (nor)* y *ripening inhibitor (rin)* (Giovannoni, 2004). Estos genes, localizados en los cromosomas 9, 10 y 5 respectivamente, bloquean o alargan el proceso de madurez. Su uso en condiciones homocigóticas no es válido ya que el fruto no madura, sin embargo en condiciones heterocigóticas han tenido éxito en proporcionar una maduración tardía. Los métodos de mejoramiento tradicionales utilizaron estos genes para el desarrollo de líneas y cultivares con

maduración tardía (Giovannoni, 2007), y de hecho, podemos encontrarlos en los tomates “*larga vida*” comúnmente comercializados en nuestro país. No obstante, aun en condición heterocigota, estos genes producen acciones negativas sobre la calidad debido a los efectos pleiotrópicos que tienen sobre otras vías metabólicas involucradas en brindar al fruto un adecuado sabor, aroma y/o textura. Como alternativa, otra forma de generar diversidad genética dentro del germoplasma cultivado es el empleo de técnicas de ingeniería genética, que permiten silenciar o promover la expresión de genes de manera dirigida. En la actualidad, las preocupaciones de los consumidores sobre los OGM (Organismos Genéticamente Modificados) así como los altos costos de la ingeniería, aplacaron estos desarrollos comerciales. El tomate de maduración tardía, denominado tomate Flavr-savr®, con una expresión reducida de una proteína de la pared celular (una poligalacturonasa) obtenido por una construcción antisentido, fue una de las primeras plantas transgénicas liberadas en el mercado (Sanders y Hiatt, 2005). Esta transformación mejoró significativamente la vida poscosecha de los frutos y la calidad del almacenamiento. Sin embargo, fue un fracaso comercial debido a la resistencia por parte de los consumidores frente a los materiales transgénicos (Bauchet y Causse, 2012). Hoy en día, diversos intentos de prolongar la vida poscosecha mediante técnicas de ingeniería genética se siguen realizando (Meli *et al.*, 2010; Uluisik *et al.*, 2016), no obstante, difícilmente logren algún éxito comercial frente al gran rechazo hacia el consumo de alimentos transgénicos en la percepción pública.

En todo programa de mejoramiento la diversidad genética es esencial y nuevas estrategias capaces de aumentar la base genética para la calidad y vida poscosecha del tomate cultivado deben ser desarrolladas. Debido a los diversos cuellos de botella y a la selección natural y artificial que ha sufrido el cultivo durante su domesticación y mejoramiento, la variabilidad existente en el tomate cultivado es muy reducida. Se estima que solo el 5 % de la variación genética total del género se encuentra en la forma cultivada y, por consiguiente, las poblaciones de mejoramiento tradicionales presentan un *plateau* fisiológico tanto para incrementar el rendimiento como diversos rasgos de calidad (Grandillo *et al.*, 1999a; Stevens, 1976). Esto ha dirigido la atención hacia *pools* génicos más distantes. En este contexto, el germoplasma exótico constituye una importante fuente de variabilidad y un recurso genético de gran valor para el desarrollo de nuevas variedades (Tanksley y Nelson, 1996). Gur y Zamir (2004) sostienen que la biodiversidad presente en el tomate silvestre representa una fuente

subexplotada que puede enriquecer las bases genéticas del cultivo con alternativas génicas que mejoren la productividad y la calidad. El trabajo del Dr. Charles Rick (1915-2002) representa un hito trascendental en el uso de la diversidad genética del tomate silvestre. Rick propuso que los cruzamientos entre especies silvestres y cultivadas generaban nueva diversidad fenotípica y demostró que variación transgresiva positiva podía encontrarse dentro de las progenies interespecíficas. A pesar de mostrar un fenotipo agronómicamente inferior, el germoplasma exótico contiene segmentos genómicos que pueden mejorar numerosos caracteres (Rick, 1986). En los últimos años, se ha fomentado el uso de especies silvestres como fuente de polimorfismos y nuevos genes. Algunos ejemplos del mejoramiento del tomate cultivado a partir de introgresiones silvestres son: el uso de *S. habrochaites* para mejorar la tolerancia al frío y el contenido en carotenos, de *S. chilense* para la tolerancia a sequía, de *S. cheesmanii* para la tolerancia a salinidad, de *S. pennellii* para el contenido en azúcares y el rendimiento, y de *S. pimpinellifolium*, *S. cheesmanii* y *S. chmielewskii* para aumentar los sólidos solubles, entre otros (Hobson y Grierson, 1993; Ikeda *et al.*, 2013; Semel *et al.*, 2006; Stevens, 1986). No obstante, las especies silvestres de tomate no han sido suficientemente estudiadas en su aporte para mejorar características de la calidad del fruto. Por ejemplo, dentro del germoplasma silvestre cabe esperar valores de interés fitotécnico para la vida poscosecha, ya que en condiciones naturales el mantenimiento de las propiedades organolépticas del fruto durante largo tiempo puede ser una estrategia adaptativa para atraer a los predadores y asegurar la dispersión de las semillas. La especie silvestre *S. pimpinellifolium* es una especie autógena y puede cruzarse con el tomate cultivado en ambos sentidos dando lugar a híbridos fértiles. Esta especie se caracteriza por presentar frutos pequeños, pero de alta calidad nutritiva con una mayor concentración de vitamina C, azúcares solubles y un elevado contenido en materia seca total (Stevens y Rick, 1986). Pratta *et al.* (1996) y Zorzoli *et al.* (1998, 2000) encontraron que genotipos de *S. pimpinellifolium* y sus híbridos con el tomate cultivado presentaban una mayor vida poscosecha que los cultivares comerciales y al mismo tiempo una mejor calidad del fruto (en cuanto a color, textura y sabor). De este modo, el uso de cruzamientos interespecíficos en tomate presenta un gran potencial para el desarrollo de nuevos materiales y también para explorar las bases genéticas de caracteres relacionados a la calidad del fruto.

En base a lo expuesto anteriormente, la hipótesis que guía el presente trabajo es:

*La introgresión de segmentos cromosómicos de la especie de tomate silvestre *Solanum pimpinellifolium* por retrocruzas mejora los caracteres de calidad de fruto en el genotipo cultivado.*

## OBJETIVOS GENERALES

---

- Demostrar el efecto fenotípico sobre caracteres de calidad de fruto en tomate de regiones cromosómicas introgresadas desde la accesión LA722 de *S. pimpinellifolium* en el contexto genético del cultivar argentino Caimanta.
- Obtener un acervo genético mejorado basado en el cultivar Caimanta que resulte adaptado a las condiciones de cultivo locales.

La redacción de este trabajo de tesis se estructuró en tres capítulos:

- Primer capítulo: “CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE FAMILIAS BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> ORIGINADAS DE UN CRUZAMIENTO INTERESPECÍFICO DE TOMATE”, se describen familias derivadas de la autofecundación de la segunda retrocruza (BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub>) del cruzamiento entre un cultivar de *S. lycopersicum* y *S. pimpinellifolium*, explorándose el aporte de la especie silvestre al germoplasma cultivado.

- Segundo capítulo: “DESARROLLO DE NILs: OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE GENERACIONES BC<sub>3</sub> Y BC<sub>4</sub>”, se desarrolla la metodología y procedimientos empleados en la obtención de nuevas líneas de tomate a partir de este cruzamiento interespecífico. Se muestra la manera en que se fue avanzando en las retrocruzas hacia el cultivar, hasta conseguir líneas casi isogénicas (NILs), y los análisis realizados en el proceso.

- Tercer capítulo: “EVALUACIÓN Y VALORACIÓN DE pre-NILs”, se presenta la caracterización fenotípica mediante caracteres de calidad del fruto, el análisis de los diferentes segmentos introgresados y el estudio del comportamiento integral de las nuevas líneas (pre-NILs) derivadas fruto de estas investigaciones.

En cada uno de los capítulos, se introduce el tema a abordar, se detallan los materiales y métodos empleados y los resultados obtenidos, y se ofrece una discusión y reflexión acerca de los mismos. Por último, a modo de cierre, se brindan las conclusiones generales del trabajo y algunas consideraciones finales.

## **CAPÍTULO I**

# **CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE FAMILIAS BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> ORIGINADAS DE UN CRUZAMIENTO INTERESPECÍFICO DE TOMATE**

## INTRODUCCIÓN

---

Las especies silvestres de tomate constituyen una fuente valiosa de genes y la introgresión de este germoplasma exótico en materiales elite se convierte en una estrategia muy promisoría para el desarrollo de nuevas variedades (Tanksley y Nelson, 1996; Bauchet y Causse, 2012). Sin embargo, existen diversas barreras relacionadas con el uso de las especies silvestres que dificultan este proceso, y más aún cuando se trata de caracteres de herencia compleja. Entre estas, podemos mencionar cuestiones como la segregación distorsionada, la supresión de la recombinación y el arrastre por ligamiento de caracteres desfavorables (Wang y Chee, 2010). En los programas de mejoramiento tradicional las especies silvestres fueron exclusivamente utilizadas para incorporar genes mayores, principalmente de resistencia a factores bióticos o abióticos, debido especialmente a la dificultad que tenían los mejoradores para distinguir genes favorables de los desfavorables en el germoplasma silvestre (Sim *et al.*, 2009). El advenimiento de los marcadores moleculares ha permitido superar en gran medida estas limitaciones, creando nuevas oportunidades para explotar el germoplasma exótico y abriendo una nueva era en la agronomía denominada “mejoramiento molecular” (Grandillo *et al.*, 1999a). Los *marcadores genéticos* representan diferencias genéticas entre especies o entre organismos individuales. En particular, los marcadores moleculares de ADN permiten revelar diferencias en el ADN que serán visualizadas por alguna técnica molecular específica. Estos marcadores suelen ser selectivamente neutros porque muchas veces se hallan localizados en regiones no codificantes. Además, a diferencia de los morfológicos y bioquímicos, los marcadores de ADN son prácticamente ilimitados en número y no se ven afectados por factores ambientales y/o la etapa del desarrollo de la planta. Cuando un marcador genético se encuentra muy próximo a un gen particular (es decir, estrechamente ligado), este puede actuar como una "etiqueta" del gen. Los marcadores, generalmente, no constituyen los genes objetivos en sí, pero operan como "signos" de ellos (Collard *et al.*, 2005). El mejoramiento molecular y los marcadores han posibilitado un uso más sistemático y eficaz del germoplasma silvestre, proporcionando nuevos recursos y contribuyendo a aumentar la diversidad genética disponible (Grandillo *et al.*, 1999a).

En la naturaleza, y para la gran mayoría de los caracteres de importancia agronómica, la variación fenotípica observada raramente se debe al efecto de un único gen, por el contrario, esta variación es continua y condicionada por varios (y algunas veces muchos) *loci* genéticos.

Para estos caracteres, conocidos como caracteres cuantitativos, la variación genética resulta difícil de diseccionar debido a los numerosos genes que interactúan junto con una importante influencia ambiental. Los marcadores moleculares han hecho posible estimar con suficiente precisión el número, tipo y magnitud de los efectos génicos involucrados en la determinación de un carácter cuantitativo. Frecuentemente, no es posible establecer si el efecto detectado con un *locus* marcador se debe a uno o más genes ligados que afectan el carácter. Por esta razón, el término *locus de carácter cuantitativo* (*QTL*, de sus siglas en inglés *Quantitative Trait Locus*) fue acuñado para describir una región del cromosoma que tiene un efecto significativo sobre un carácter cuantitativo. Los marcadores moleculares posibilitan la localización de genes o *QTLs* de interés en el genoma vegetal, aumentando la eficiencia de los métodos de selección y acortando los tiempos y el espacio necesario para la selección de individuos superiores (Tanksley, 1993). Al mismo tiempo, ayudan a disminuir el arrastre por ligamiento de características no deseables, contrarrestando posibles efectos negativos del germoplasma exótico. Además, permiten detectar alelos valiosos en las especies silvestres, incluso cuando estén ocultos en fenotipos desfavorables. El fenotipo de una planta no siempre es un buen predictor de su potencial genético y la mera caracterización fenotípica resulta insuficiente. A pesar de presentar un fenotipo inferior al genotipo elite, las especies silvestres pueden poseer alelos que aporten a mejorar características hortícolas y los métodos basados en marcadores ayudan a aprovechar estos recursos exóticos (Bernacchi *et al.*, 1998a; Grandillo y Tanksley, 1996a).

Dentro de un programa de mejoramiento, el análisis de *QTLs* en cruzamientos interespecíficos resulta muy útil para adentrarse en el germoplasma silvestre y estudiar sus aportes. En el transcurso de los últimos 25 años se han publicado numerosas investigaciones de *QTLs* en diversas especies hortícolas. En tomate, se han analizado *QTLs* relacionados con caracteres de importancia agronómica, como el rendimiento, la resistencia a enfermedades e insectos, la tolerancia a estreses abióticos, y también otros vinculados a la calidad de los frutos (Foolad, 2007; Grandillo *et al.*, 2011; 2013). Para llevar a cabo estas investigaciones, las primeras poblaciones recombinantes que se utilizaron fueron poblaciones segregantes tempranas tipo F<sub>2</sub> (segunda generación filial) o BC<sub>1</sub> (primera retrocruza o *backcross* 1). Estas son fáciles de desarrollar y presentan alto desequilibrio de ligamiento, sin embargo poseen varias desventajas. Entre ellas podemos mencionar limitaciones en las evaluaciones, ya que se trabaja sobre plantas individuales las cuales no pueden ser replicadas; presencia de excesiva

variación genética que puede afectar negativamente la precisión en la detección de *QTLs*; inestabilidad en los efectos de los *QTLs* debido a cambios en la constitución genética de generación en generación; y además, no son poblaciones de aplicación inmediata en el mejoramiento (Foolad, 2007). Para intentar superar algunos de estos problemas se han desarrollado poblaciones recombinantes más estables como las líneas endocriadas recombinantes (*RILs*), las líneas de retrocruzas endocriadas (*BILs*) y las líneas de introgresión (*NILs*). Estas presentan diversos beneficios para el mapeo genético, no obstante tienen la desventaja que requieren mucho tiempo para su obtención. Entre estos dos extremos, las poblaciones de *retrocruzas avanzadas* se vuelven un valioso recurso para la identificación y caracterización de *QTLs* debido a su alto nivel de homocigosis y uniformidad del fondo genético. Con una menor variación genética y una reducida proporción del genoma donante, en comparación a las primeras poblaciones segregantes, las retrocruzas avanzadas permiten mayor precisión en la estimación y localización de *QTLs*. Según Tanksley y Nelson (1996) el *análisis de QTLs en retrocruzas avanzadas* constituye una estrategia favorable respecto a los métodos tradicionales. Dentro de esta estrategia, la autofecundación de retrocruzas generando familias  $BC_2S_1$  o  $BC_2S_2$  (primera o segunda autofecundación de la segunda retrocruza) se convierte en un modo de estudiar *QTLs* recesivos provenientes del padre donante involucrados en la expresión del carácter de interés en estas poblaciones (Tanksley y Nelson, 1996). Asimismo, la detección de *QTLs* en familias derivadas por autofecundación es una alternativa para validar asociaciones encontradas, ya que una retrocruza sigue siendo una generación segregante que impide el ensayo replicado en diferentes ambientes.

Diversos estudios en tomate han aplicado el *análisis de QTLs en retrocruzas avanzadas*, mostrando valiosos resultados de esta metodología (Wang y Chee, 2010). Entre algunos que podemos citar, Tanksley *et al.* (1996) estudiaron familias  $BC_2S_1$  y  $BC_3$  derivadas del cruzamiento entre una línea elite y *S. pimpinellifolium* accesión LA1589 encontrando diversos *QTLs* asociados a rasgos importantes para tomates destinados al procesamiento. Fulton *et al.* (1997) evaluaron *QTLs* para caracteres hortícolas en familias  $BC_3$  y  $BC_4$  del cruzamiento entre *S. peruvianum* accesión LA1706 y el cultivar E6203. Bernacchi *et al.* (1998a) detectaron *QTLs* relacionados a caracteres agronómicos en una generación  $BC_3$  obtenida a partir de la especie *S. habrochaites* accesión LA1777 como padre donante. Además, utilizando esta estrategia lograron desarrollar *NILs* con introgresiones silvestres provenientes de dos especies donantes diferentes (*S. habrochaites* LA1777 y *S. pimpinellifolium* LA1589) (Bernacchi *et al.*, 1998b).

Fulton *et al.* (2000) identificaron *QTLs* para atributos hortícolas, examinando plantas BC<sub>2</sub> y familias BC<sub>3</sub>, generadas empleando a *S. neorickii* como donante. En otro estudio, Fulton *et al.* (2002) analizaron *QTLs* relacionados a propiedades bioquímicas que pueden contribuir al sabor del tomate como los azúcares y ácidos orgánicos. Chaïb *et al.* (2006) trabajaron con diversas generaciones procedentes de una línea de tomate tipo *cherry* (BC<sub>3</sub>S<sub>1</sub>, BC<sub>3</sub>S<sub>3</sub>, *RILs* y *NILs*), investigando *QTLs* para seis caracteres de calidad, su efecto individual y su estabilidad en los años, generaciones y contextos genéticos. Stevens *et al.* (2007) mapearon *QTLs* para el contenido de ácido ascórbico en poblaciones derivadas de cruzamientos entre variedades cultivadas y tres especies relacionadas (*S. pennellii*, *S. habrochaites* y una línea tipo *cherry*). Estos trabajos, junto a muchos otros, permitieron descubrir numerosos *QTLs* de interés y revelaron que, en gran medida, las especies silvestres son importantes fuentes de alelos con efectos agronómicamente favorables a pesar del fenotipo global inferior que puedan presentar.

Buscando estudiar el germoplasma silvestre y sus aportes a la mejora del tomate cultivado, la Cátedra de Genética de la Facultad de Ciencias Agrarias comenzó a trabajar con la especie silvestre *S. pimpinellifolium*. Los primeros análisis revelaron que genotipos de *S. pimpinellifolium* y sus híbridos con el tomate cultivado presentaban una mejor calidad del fruto y una mayor vida poscosecha que cultivares comerciales (Pratta *et al.*, 1996; Zorzoli *et al.*, 1998; 2000). Investigaciones posteriores utilizando diferentes genotipos señalaron que un cultivar argentino de tipo platense, denominado Caimanta, y la accesión LA722 de *S. pimpinellifolium* manifestaban la mayor divergencia genética y que el híbrido entre ellos resultaba el más promisorio (Pratta *et al.*, 2003). Pereira da Costa *et al.* (2009) mostraron además que en la generación F<sub>2</sub> del cruzamiento entre Caimanta y LA722 se amplió considerablemente el rango de variación para la vida poscosecha de los frutos y que la recombinación de genes de ambos progenitores tuvo efectos positivos generándose nueva variabilidad. Con base en estos primeros resultados, se constituyó un programa de mejoramiento, a partir del cultivar Caimanta de *S. lycopersicum* y la entrada LA722 de *S. pimpinellifolium*, destinado a estudiar estos materiales y las contribuciones de la especie silvestre, y utilizarlos para mejorar al genotipo cultivado. Como parte de este proyecto, inicialmente se realizó el cruzamiento entre Caimanta y LA722, obteniéndose la primera generación filial F<sub>1</sub>. Luego, el híbrido F<sub>1</sub> fue retrocruzado hacia el cultivar Caimanta (parental recurrente), generándose la primera retrocruza (BC<sub>1</sub>, *backcross* 1) entre Caimanta y LA722. A

partir de diversas plantas BC<sub>1</sub> seleccionadas en base a marcadores moleculares y caracteres fenotípicos se obtuvo la segunda retrocruza (BC<sub>2</sub>, *backcross* 2) hacia Caimanta (Pereira da Costa, 2012). En los primeros trabajos con estas retrocruzas se hallaron diversas regiones genómicas asociadas a caracteres de calidad y a la vida poscosecha de los frutos, señalando la existencia de variabilidad genética en estos materiales para ser aprovechada (Pereira da Costa *et al.*, 2013). Estos análisis mostraron que la introgresión de regiones genómicas de *S. pimpinellifolium* puede mejorar a la especie cultivada, y que aún no han sido suficientemente exploradas.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

---

- Evaluar caracteres de calidad de fruto y marcadores moleculares en familias originadas a partir de la autofecundación de plantas de la segunda retrocruza (BC<sub>2</sub>) del cruzamiento entre Caimanta y LA722 de *S. pimpinellifolium*.
  
- Detectar *QTLs* asociados a caracteres de calidad de fruto en las familias BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> del cruzamiento entre el cultivar Caimanta y LA722 de *S. pimpinellifolium*.
  
- Validar *QTLs* detectados en las familias BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> a través de la comparación con generaciones precedentes del cruzamiento entre Caimanta y LA722.



una vida poscosecha promedio de  $9,7 \pm 0,9$  días (Figura I.2). El cultivar Caimanta presenta una buena sanidad general, siendo resistente al virus del mosaico del tabaco (gen Tm-2), a la raza 1 (gen I) de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) y al tizón temprano del tomate causado por *Alternaria solani* (Ell. and Mart.). La línea LA722 de *S. pimpinellifolium* tiene un hábito de crecimiento indeterminado y un gran número de flores por inflorescencia, con frutos esféricos y de tamaño pequeño, con  $0,9 \pm 0,1$  g de peso y  $18,7 \pm 0,4$  días de vida poscosecha (Rodríguez *et al.*, 2006) (Figura I.2). El cultivar Caimanta fue provisto por la EEA de INTA Cerrillos (Salta, Argentina) y la línea LA722 por el *Tomato Genetic Resources Center, Department of Vegetable Crops, University of California* (Davis, USA).

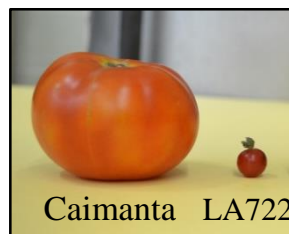
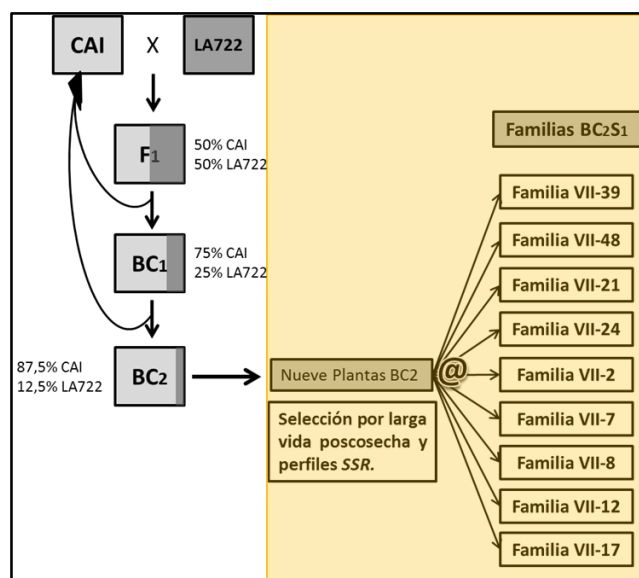


Figura I.2- Frutos representativos de Caimanta y LA722.

Previo a este trabajo de tesis, se realizó el cruzamiento inicial entre Caimanta y LA722 para obtener la primera generación filial ( $F_1$ ). La  $F_1$  se retrocruzó hacia Caimanta (padre recurrente) generándose la primera retrocruza o *Backcross* 1 ( $BC_1$ ). Luego, en la campaña siguiente, a partir de la retrocruza de la  $BC_1$  hacia Caimanta se consiguió la segunda retrocruza o *Backcross* 2 ( $BC_2$ ). Para su caracterización, ambas generaciones  $BC_1$  y  $BC_2$  fueron evaluadas fenotípica y molecularmente (Pereira da Costa *et al.*, 2013). A continuación, como trabajo de esta tesis se seleccionaron nueve plantas de la generación  $BC_2$  siguiendo dos criterios. El primer criterio fue elegir aquellas plantas  $BC_2$  que mostraran los mayores valores medios para el carácter vida poscosecha, manteniendo orígenes diversos, en relación a que no provinieran todas de la misma  $BC_1$ , sino que diferentes plantas  $BC_1$  retrocruzadas estuvieran representadas en los parentales de las  $BC_2$  seleccionadas. El segundo criterio de selección fue que las plantas elegidas segregaran en conjunto para 28 marcadores *SSR* (*Simple Sequence Repeat* o microsatélites) distribuidos en el genoma de tomate y que habían sido previamente utilizados en las generaciones  $BC_1$  y  $BC_1S_1$  para detectar *QTLs* asociados a caracteres de calidad de fruto (Pereira da Costa *et al.*, 2013). Con el fin de evaluar todos los segmentos *SSR* de interés, se buscó que estos se hallaran en condición heterocigota en al menos una de las plantas

seleccionadas, lo cual llevó a la elección de plantas con valores bajos de vida poscosecha (como el caso de la BC<sub>2</sub> VII-8 y la BC<sub>2</sub> VII-17). La autofecundación de las nueve plantas escogidas dio origen a las *nueve familias BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub>* que se evaluaron en la *campaña 2012/2013* (Figura I.3).



**Figura I.3-** Diagrama de cruza para la obtención de las familias BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> a partir del cultivar Caimanta de *S. lycopersicum* (CAI) y la especie silvestre *S. pimpinellifolium* (LA722). Distintos tonos de gris indican el porcentaje teórico del genoma de cada progenitor en cada generación. En amarillo se marca el material vegetal evaluado en este trabajo. El material precedente fue obtenido por Pereira da Costa (2012).

Las plantas BC<sub>2</sub> a partir de las cuales se derivaron las familias BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> exhibieron diversas características en cuanto a la calidad del fruto. En la Tabla I.1 se muestran los valores medios y el error estándar para los caracteres fenotípicos en cada una de las plantas BC<sub>2</sub> que dio origen a una familia BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> (resultados obtenidos por Pereira da Costa, 2012).

**Tabla I.1-** Valores medios y errores estándar de cada carácter fenotípico para cada planta BC<sub>2</sub> que generó una familia BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> (resultados Pereira da Costa, 2012).

	Planta BC <sub>2</sub>				
	VII-39	VII-48	VII-21	VII-24	VII-2
Diámetro (cm)	3,70 ± 0,07	4,51 ± 0,17	5,49 ± 0,14	4,34 ± 0,21	4,16 ± 0,24
Altura (cm)	3,37 ± 0,04	3,97 ± 0,15	4,53 ± 0,06	3,47 ± 0,12	3,40 ± 0,19
Forma	0,91 ± 0,01	0,88 ± 0,02	0,83 ± 0,02	0,80 ± 0,02	0,82 ± 0,02
Peso (g)	24,88 ± 2,25	46,53 ± 4,56	79,40 ± 4,10	38,89 ± 4,23	35,50 ± 5,99
Vida poscosecha (días)	16,08 ± 1,30	13,78 ± 0,98	9,50 ± 0,73	9,00 ± 0,69	10,00 ± 1,64
L	36,18 ± 0,17	39,34 ± 0,31	38,41 ± 0,46	38,12 ± 0,27	38,87 ± 0,76
a/b	1,28 ± 0,02	1,19 ± 0,02	1,10 ± 0,02	1,20 ± 0,03	1,23 ± 0,01
Firmeza	42,38 ± 0,81	55,25 ± 0,78	48,35 ± 1,65	sd	45,00 ± 1,27
Sólidos Solubles (°Brix)	5,83 ± 0,08	4,10 ± 0,05	6,15 ± 0,15	5,75 ± 0,07	7,83 ± 0,11
pH	4,57 ± 0,00	4,60 ± 0,01	4,48 ± 0,05	4,35 ± 0,12	4,29 ± 0,02
Acidez Titulable	0,32 ± 0,00	0,24 ± 0,00	0,27 ± 0,01	0,42 ± 0,02	0,53 ± 0,02

L: porcentaje de reflectancia. a/b: índice de color. sd: sin dato.

Tabla I.1- (continuación)

	Planta BC <sub>2</sub>			
	VII-7	VII-8	VII-12	VII-17
Diámetro (cm)	3,58 ± 0,17	5,30 ± 0,35	4,93 ± 0,20	5,47 ± 0,12
Altura (cm)	3,13 ± 0,13	3,80 ± 0,19	3,96 ± 0,16	4,23 ± 0,19
Forma	0,88 ± 0,01	0,73 ± 0,03	0,81 ± 0,01	0,77 ± 0,02
Peso (g)	24,34 ± 3,35	61,91 ± 10,97	52,06 ± 8,40	71,53 ± 7,49
Vida poscosecha (días)	16,50 ± 1,61	5,75 ± 0,62	9,25 ± 0,62	7,57 ± 0,37
L	38,26 ± 0,31	40,40 ± 1,08	38,38 ± 0,18	37,67 ± 0,60
a/b	0,96 ± 0,01	1,04 ± 0,05	1,16 ± 0,05	1,21 ± 0,03
Firmeza	38,67 ± 1,11	48,58 ± 3,85	45,56 ± 0,76	68,75 ± 1,09
Sólidos Solubles (°Brix)	7,88 ± 0,16	7,95 ± 0,12	6,40 ± 0,09	5,92 ± 0,05
pH	4,87 ± 0,05	4,34 ± 0,03	4,40 ± 0,06	4,48 ± 0,05
Acidez Titulable	0,20 ± 0,01	0,48 ± 0,03	0,34 ± 0,04	0,33 ± 0,02

L: porcentaje de reflectancia. a/b: índice de color. sd: sin dato.

Además, según la información brindada por Pereira da Costa (2012), las nueve plantas BC<sub>2</sub> que generaron las familias BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> variaron en cuanto al porcentaje del genoma del padre recurrente (Caimanta) recuperado, encontrándose valores entre un 74 % y 93 %. En la Tabla I.2 se presenta el porcentaje del genoma de Caimanta recuperado en cada planta BC<sub>2</sub> seleccionada y también los perfiles de SSR para dichas plantas, resaltándose en gris aquellos SSR que fueron heterocigotas en la planta BC<sub>2</sub> y por lo tanto mostrarán segregación en la familia BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> derivada por autofecundación (datos proporcionados por Pereira da Costa, 2012).

Tabla I.2- Perfil de SSR (Simple Sequence Repeat) y porcentaje del genoma de Caimanta recuperado para cada una de las plantas BC<sub>2</sub> que dio origen a una familia BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> (Fuente: Pereira da Costa, 2012).

SSR	Cr	Planta BC <sub>2</sub>									
		VII-39	VII-48	VII-21	VII-24	VII-2	VII-7	VII-8	VII-12	VII-17	
095	1	CP	CP	CC	CP	CC	CC	CC	CC	CC	CC
220060	1	CP	CP	CC	CP	CC	CC	CC	CC	CC	CC
009	1	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
288	1	CP	CP	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	sd
295	2	CP	CP	CP	CP	CC	CC	CC	CC	CC	CC
598	2	CC	CC	CP	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CP
320	3	CP	CP	CP	CP	CC	CC	CP	CC	CC	CC
014	3	CC	CP	CP	CP	CC	CC	CP	CC	CC	CC
115	5	CC	CP	CP	CP	CC	CC	CC	CC	CC	CP
162	5	CC	CP	CP	CP	CP	CC	CC	CP	CP	CC
211044	6	CC	CC	CC	CP	CC	CC	CC	CC	CC	CC
128	6	CC	CC	CC	CP	CC	CC	CC	CC	CC	CC
286	7	CC	CC	CC	CC	CP	CP	CP	CC	CC	CC
276	7	CC	CC	CC	CC	CP	CP	CP	CP	CC	CC
045	7	CP	CC	sd	sd	CC	CP	CP	CC	CC	CC
344	8	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
327	8	CC	CC	CP	CP	CC	CC	CC	CC	CC	CC
063	8	CP	CP	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
038	8	CP	CC	CC	CC	sd	sd	sd	sd	sd	CC
069	9	CC	CC	sd	sd	CC	CC	CC	CC	CC	sd
070	9	CC	CC	CC	CC	CP	CC	CC	CC	CC	CP
034	10	CC	CC	sd	sd	CC	CC	CC	CC	CC	sd
596	10	CP	CP	CC	CC	CC	CP	CC	CC	CC	CC
318	10	CP	CP	CC	CC	CC	CP	CC	CC	CC	CP
080	11	CP	CP	CC	CP	CP	CP	CC	CP	CC	CP
G036	11	CC	CC	CC	CP	CP	CP	CC	CP	CC	CC
1061	11	CC	CC	CC	CP	CC	CC	CC	CC	CC	CC
H301	12	CP	CP	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CP
% CAI recuperado		78,6 %	76,8 %	86,0 %	74,0 %	88,9 %	87,0 %	88,9 %	92,6 %	88,0 %	

Cr: cromosoma. C: alelo del cultivar Caimanta. P: alelo de LA722 de *S. pimpinellifolium*. sd: sin dato. En gris se destacan aquellos marcadores SSR que resultaron heterocigotas en cada planta BC<sub>2</sub>.

Las semillas obtenidas a partir de la autofecundación de cada una de las nueve plantas BC<sub>2</sub> se sembraron en *speedlings* para su germinación en los meses de Julio/Agosto. Los plantines fueron trasplantados en invernadero, en un diseño completamente aleatorizado, cuando presentaron cuatro hojas verdaderas totalmente desplegadas. La distancia entre plantas fue de 35 cm y la distancia entre surcos de 1 m (Figura I.4). Previo al trasplante se realizó una fertilización orgánica del suelo. Las plantas fueron regadas tres veces por semana, lo suficiente para evitar el estrés durante el período de crecimiento.



**Figura I.4-** Distribución de plantas en el Invernadero.

En la *campaña 2012/2013* se llevó a cabo la evaluación fenotípica para caracteres de calidad de fruto de las familias BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> y se recolectó tejido de hoja de cada una de las plantas para la caracterización por marcadores moleculares de ADN. Se evaluaron entre 18 y 30 plantas por familia BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> y 5 plantas de cada progenitor del cruzamiento original como testigos, analizando un total de 3.226 frutos (Tabla I.3).

**Tabla I.3-** Número total de plantas y de frutos evaluados en *S. lycopersicum* (Caimanta), LA722 de *S. pimpinellifolium* y en las familias BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub>.

Genotipo	n° Plantas	n° frutos evaluados
Caimanta	5	49
LA722	5	91
Familia BC <sub>2</sub> S <sub>1</sub> VII-39	30	517
Familia BC <sub>2</sub> S <sub>1</sub> VII-48	20	331
Familia BC <sub>2</sub> S <sub>1</sub> VII-21	19	300
Familia BC <sub>2</sub> S <sub>1</sub> VII-24	30	479
Familia BC <sub>2</sub> S <sub>1</sub> VII-2	20	302
Familia BC <sub>2</sub> S <sub>1</sub> VII-7	20	282
Familia BC <sub>2</sub> S <sub>1</sub> VII-8	18	193
Familia BC <sub>2</sub> S <sub>1</sub> VII-12	19	299
Familia BC <sub>2</sub> S <sub>1</sub> VII-17	30	383
Total	216	3.226

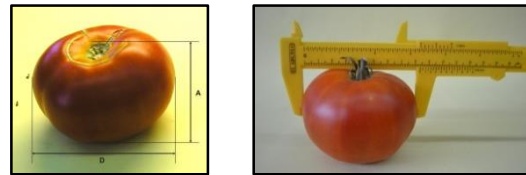
## **CARACTERES FENOTÍPICOS**

En cada planta se cosecharon 10 frutos al estado *pintón*, estado en el cual se detectan visualmente los primeros síntomas de acumulación de carotenoides, definido por presentar un 10 % de la superficie del fruto con el color de madurez (Giovannoni, 2004), y se evaluaron los caracteres:

- Peso (P, en g).

- Diámetro (D, en cm).

- Altura (A, en cm).



**Figura I.5-** Esquema de caracteres relacionados al tamaño del fruto y calibre empleado para su medición.

- Forma (Fo, cociente altura sobre diámetro).

- Espesor del pericarpio (EE, en cm).

- Número de lóculos (nLo).

- Vida poscosecha (Vp): días transcurridos desde la cosecha hasta el inicio del ablandamiento del fruto. Para evaluar este carácter, los frutos cosechados fueron almacenados a  $25 \pm 3^\circ\text{C}$  en una estantería (Figura I.6). Siguiendo la metodología propuesta por Buescher *et al.* (1976) y Schuelter *et al.* (2002), los frutos fueron examinados tres veces por semana y fueron descartados aquellos comercialmente inacceptables por mostrar arrugamiento o excesivo ablandamiento.



**Figura I.6-** Frutos almacenados para la evaluación de la Vp.

En frutos cosechados al estado rojo maduro, definido cuando el 100 % de la superficie del fruto tiene el color de madurez (Giovannoni, 2004), se evaluaron los siguientes caracteres:

- Firmeza (F): medida sobre el plano ecuatorial, en dos áreas opuestas del fruto con un durómetro tipo Shore A (Durofel DFT100) con puntera de  $0,10 \text{ cm}^2$ .



**Figura I.7-** Durómetro.

- Color: a través del porcentaje de reflectancia (L) y el cociente a/b. Los parámetros **L**, **a** (absorbencias a longitudes de onda de 540 nm) y **b** (absorbencias a longitudes de onda de 675 nm) fueron determinados con un cromámetro CR 400 (Figura I.8). El rango de variación de estos parámetros es para **a** desde +60 para tonos rojos a -60 para tonos verdes, para **b** desde +60 para amarillos a -60 para azules y para **L**



Figura I.8- Cromámetro.

desde +100 para blancos a 0 para negros. El valor de los parámetros de color de las muestras se obtuvo promediando las medidas obtenidas de tres lecturas en la zona ecuatorial de cada fruto.

La firmeza y el color del fruto fueron determinados en al menos cinco frutos por planta.

- Contenido en sólidos solubles (SS, en °Brix): porcentaje de glucosa más fructosa del jugo homogeneizado, medido con un refractómetro manual.



Figura I.9- Refractómetro.

- Acidez (Ac): medida a través del pH del jugo homogeneizado y de la acidez titulable (Ac. titulable, en gramos de ácido cítrico/100 gramos de jugo homogeneizado) calculada a partir del volumen de NaOH 0,1 N necesario para llevar a 8,1 el pH de 10 g de jugo disueltos en 100 ml de agua destilada.



Figura I.10- Equipo de titulación.

Para el contenido en sólidos solubles, pH y acidez la unidad experimental fue la muestra de jugo obtenida de 3 a 8 frutos por planta dependiendo del tamaño del fruto, mientras que para los demás caracteres la unidad experimental fue el fruto.

### MARCADORES MOLECULARES

Se emplearon marcadores de ADN tipo *SSR* (*Simple Sequence Repeat* o microsatélites).

Los *SSR* son repeticiones en tándem de unidades formadas por mono-, di-, tri-, tetra- o penta-nucleótidos que cubren todo el genoma. El polimorfismo, originado por variaciones en el número de repeticiones, es revelado por amplificación mediante *PCR* (*Polymerase Chain Reaction*) usando cebadores que flanquean el *locus* microsatélite. En el trabajo previo analizando la primera retrocruza ( $BC_1$ ) se emplearon diversos tipos de marcadores, entre los cuales los *SSR* resultaron los más eficientes en la detección de *QTLs* asociados a caracteres de

calidad de fruto (Pereira da Costa, 2012), motivo por el cual se siguió trabajando solo con este tipo de marcador en las generaciones siguientes. Las ventajas de los *SSR* radican en su naturaleza multialélica, comportamiento codominante, relativa abundancia, amplio polimorfismo y extensa cobertura del genoma, sumados a la facilidad de amplificación por *PCR* y la exigencia de poca cantidad de ADN de partida (Powell *et al.*, 1996).

Para el desarrollo de los *SSR* (Pereira da Costa, 2012), se utilizaron aquellos disponibles en la página web de la red genómica de Solanáceas (<http://www.solgenomics.net>), de donde se puede obtener la secuencia de *primers*, el tamaño de los alelos del genotipo cultivado y silvestre y su localización cromosómica. Se eligieron marcadores polimórficos distribuidos equitativamente en el genoma de tomate, seleccionándose al menos dos *SSR* por cromosoma y ubicados preferentemente en brazos distintos. Todos los cromosomas contuvieron al menos dos *SSR* polimórficos, con excepción del cromosoma 12 con un único *SSR* y el cromosoma 4 para el cual no hubo *SSR* polimórfico. En definitiva, 28 *SSR* mostraron polimorfismo entre Caimanta y LA722 y fueron utilizados para las evaluaciones moleculares y para asistir en las retrocruzas (Tabla I.4).

**Tabla I.4-** *SSR* (Simple Sequence Repeat) utilizados en las generaciones BC<sub>1</sub>-BC<sub>2</sub> y empleados en este trabajo, su ubicación cromosómica, el rango de tamaño entre alelos silvestres y cultivados y la secuencias de los *primers forward* y *reverse*.

<i>SSR</i>	Cr	Tamaño	Secuencia <i>Primer Forward</i> (5'-3')	Secuencia <i>Primer Reverse</i> (5'-3')
<i>SSR095</i>	1	229-242	CAATCCAACAAGCAATCCCT	CCACATAACTAAGCCCACAACCT
<i>SSR220060</i>	1	135-142	CCAGTTGCCTTCCAGATGT	CCTTCTGACAGAGATTGCGT
<i>SSR009</i>	1	168	CCCTTTGCAAGTTCTTCTTCA	TTCATGAGCCAACATAGGAGG
<i>SSR288</i>	1	260-275	TCGTGGGAATTTGTTAACCC	TCTTCATCGTCTCTCTCTG
<i>SSR295</i>	2	204-224	CTCCAGAAGGAACTCGATGC	CAATTCCTTTACCTGCCAC
<i>SSR598</i>	2	186-194	TGGAAAGAAGCAGTAGCATTG	CAACGAACATCCTCCGTCT
<i>SSR320</i>	3	165-171	ATGAGGCAATCTTACCTGG	TTCAGCTGATAGTTCTTGCG
<i>SSR014</i>	3	166-174	TCTGCATCTGGTGAAGCAAG	CTGGATTGCCTGGTTGATT
<i>SSR115</i>	5	211-231	CACCCTTTATTCAGATTCCTCT	ATTGAGGGTATGCAACAGCC
<i>SSR162</i>	5	260-264	GCTCTCTACAAGTGGAACTTCTC	CAACAGCCAGGAACAAGGAT
<i>SSR211044</i>	6	209-218	AGCAGGGTAAGTCTCCAGCA	CAAGACCATTGGTGTCTGTG
<i>SSR128</i>	6	139-147	GGTCCAGTTCAATCAACCGA	TGAAGTCGTCTCATGGTTCG
<i>SSR286</i>	7	120-130	AGCTATGGAGTTTCAGGACCA	ATTCAGGTAGCATGGAACGC
<i>SSR276</i>	7	160-194	CTCCGGCAAGAGTGAACATT	CGACGGAGTACTTCGCATT
<i>SSR045</i>	7	158-167	TGTATCCTGGTGGACCAATG	TCCAAGTATCAGGCACACCA
<i>SSR344</i>	8	185-217	TGTTGCTCGAACTCTCCAAA	CATAGGAGAGGTAACCCGCA
<i>SSR327</i>	8	180-186	TCAGGATCAGGAGCAGGAGT	TGGACTTGTTCATGAACCC
<i>SSR063</i>	8	200-211	CCACAAACAATTCATCTCA	GCTCCGCCATACTGATACG
<i>SSR038</i>	8	215-223	GTTTCTATAGCTGAACTCAACCTG	GGGTTCATCAAATCTACCATCA
<i>SSR069</i>	9	146-164	TTGGCTGGATTATTCCTGTTG	GCATTTGATAGAAGGCCAGC
<i>SSR070</i>	9	138-244	TTTAGGGTGTCTGTGGGTCC	GGAGTGCAGAGGATAGAG
<i>SSR034</i>	10	200-208	TGTAACGTCAAATTCAGGTG	CTCCGCAATGTGTTGTATGG
<i>SSR596</i>	10	184-191	TTCGGATAAAGCAATCCACC	TCGATTGTGTACCAACGTCC
<i>SSR318</i>	10	276-290	GCAGAGGATATTGCATTCGC	CAAACCGAATCATCAAGGG
<i>SSR080</i>	11	167-170	GGCAAATGTCAAAGATTGG	AGGGTCATGTTCTTGATTGCA
<i>SSRG036</i>	11	175-187	TGTTTTAAACTGAAGATGTGTTAAATG	TGAATGAGCAAGTTAAACAGTAAGG
<i>SSR1061</i>	11	231-240	TCAGGTTAGTGTTCATGCAG	GTTCTACGTAAGATTCATG
<i>SSRH301</i>	12	164-185	TGCTGTTTTGTTGGCTCAC	TGTTTCATATCTTTGATGGCATGT

Cr: cromosoma. El tamaño de los alelos es indicado en pares de bases.

Para los procedimientos moleculares se utilizaron protocolos estándares y puestos a punto en el laboratorio.

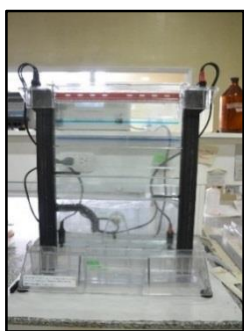
La extracción de ADN genómico se realizó a partir de hojas jóvenes siguiendo el protocolo para extracción de ADN (Microprep) descrito por Fulton *et al.* (1995). De cada planta a analizar se recolectaron hojas jóvenes y se mantuvieron en *freezer* a  $-80^{\circ}$  hasta el momento de procesar la muestra. El ADN fue extraído a partir de 40 mg de hoja en un tubo de 1,5 ml. El tejido fue disgregado utilizando un taladro mecánico y en presencia de 200  $\mu$ l de una solución de lisis. Esta solución se prepara a partir de bisulfito de sodio, un buffer de extracción (0,35 M Sorbitol, 0,1 M Tris, 5 mM EDTA, pH 8,25), un buffer de lisis nuclear (0,2 M Tris, 0,05 M EDTA, 2 M NaCl, 2 % CTAB, pH 7,5/8) y Sarkosyl 5 %. Luego de la ruptura del tejido, se adicionan 450  $\mu$ l más de la solución de lisis y se incuba la muestra en un baño termostatzado a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 30-60 minutos. Para separar el ADN de las proteínas y otros componentes celulares, se añaden 600  $\mu$ l de una mezcla cloroformo:isoamyl alcohol (24:1) y se centrifuga a 10.000 rpm por 5 min. A continuación, se transfiere el sobrenadante o fase acuosa (fase donde se encuentra el ADN) a otro tubo de 1,5 ml que contenga 600  $\mu$ l de isopropanol a temperatura ambiente. Las muestras se agitan suavemente y se centrifugan a 12.000 rpm durante 5 min (paso que precipitará el ADN). El sobrenadante es descartado y el precipitado se lava con una solución 70 % v/v de etanol. El pellet obtenido luego de una nueva centrifugación a 12.000 rpm durante 1 min se deja secar a temperatura ambiente durante toda la noche. Al día siguiente, el ADN precipitado es resuspendido en 200  $\mu$ l de buffer TE (10 mM Tris-Cl pH 8, 1 mM EDTA).

La cantidad y calidad de ADN extraído se evaluó en geles de agarosa al 1 % teñidos con *SYBR Safe* por comparación con un estándar de ADN del fago lambda. Una vez conocida su concentración se realizaron las diluciones correspondientes de manera de obtener soluciones de trabajo de 40  $\eta$ g/ $\mu$ l de ADN.

Para la reacción de PCR, cada muestra (20  $\mu$ l de volumen final) se compuso de 40  $\eta$ g de ADN genómico, 2,5 mM de dNTPs, 40 mM de cloruro de magnesio ( $\text{MgCl}_2$ ), 10  $\mu$ M de cada *primer*, 2  $\mu$ l de Taq buffer 10X y 1,5 unidades de Taq polimerasa. Se utilizó un protocolo de amplificación de tipo “*touchdown*” que consistió en las siguientes etapas: una desnaturalización inicial de 5 min a  $94^{\circ}\text{C}$  y luego un ciclo de 30 s a  $94^{\circ}\text{C}$ , 30 s a  $58^{\circ}\text{C}$  y 1 min a  $72^{\circ}\text{C}$ . Durante

los diez ciclos siguientes se repiten estos tres pasos pero la temperatura de *annealing* se reduce 0,5 °C por ciclo, hasta llegar a 53 °C. A continuación, durante 24 ciclos se repiten los siguientes tres pasos de 30 s a 94 °C, 30 s a 54 °C y 1 min a 72 °C. Finalmente, se realiza un paso de elongación de 5 min a 72 °C.

La amplificación de las muestras fue probada en geles de agarosa al 1 %, sembrando 2 µl del amplificado junto con 1 µl del *loading* buffer 5X. Los geles fueron teñidos con *SYBR Safe* y la electroforesis se realizó a 60 V constante durante 20 minutos.



**Figura I.11-** Cuba de electroforesis vertical.

La separación de los fragmentos de amplificación se realizó en geles de poliacrilamida (6 % p/v) a temperatura ambiente (Figura I.11). Dos *SSR* fueron corridos por gel de poliacrilamida. Los *SSR* corridos en un mismo gel fueron seleccionados en base a su tamaño, buscando tamaños diferentes y sembrando primero el de menor tamaño para evitar la superposición con el siguiente *SSR*. Además, el momento del sembrado en el gel del segundo *SSR* estuvo desfasado 1 hora del primero.

La corrida electroforética se llevó a cabo a 50 W constante durante 3 horas. La visualización se realizó mediante tinción con nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) que consiste en los siguientes pasos: -fijación (30 min en agitación en 1,5 litros de una solución de ácido acético al 10 % v/v), -lavado (dos lavados con agua destilada de 5 min cada uno), -tinción (30 min en agitación en 2 litros de una solución de  $\text{AgNO}_3$  0,1 % p/v y formaldehído 0,07 % v/v) y finalmente, -revelado (agitación hasta aparición de las bandas en 2 litros de una solución de carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) 3 % p/v, formaldehído 0,07 % v/v y tiosulfato de sodio 0,4 % p/v).

### **ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

Para el estudio de los caracteres fenotípicos se siguieron las metodologías clásicas de la genética cuantitativa (Kearsey y Pooni, 1996). La distribución normal de los caracteres cuantitativos se verificó a través de la prueba de Shapiro-Wilk (1965). Los progenitores originales del cruzamineto (Caimanta y LA722 de *S. pimpinellifolium*) fueron evaluados como testigos y la comparación entre sus medias se realizó mediante una prueba *t Student* (t). En cada familia  $\text{BC}_2\text{S}_1$  se analizaron los patrones de distribución de frecuencias de las distintas variables. La variación de los caracteres entre y dentro de familias se examinó utilizando un

análisis de la variancia (ANOVA) anidado y las medias entre familias se compararon mediante el Test de Duncan. Para estimar la variancia genética y calcular los porcentajes de variancia fenotípica atribuible a variancia genética (% VG/VF) en las distintas familias se empleó un ANOVA (adaptado de Mariotti y Collavino, 2014).

Para los análisis moleculares, y dada la naturaleza codominante de los microsatélites, se probó la segregación mendeliana esperada para una generación BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> (1:2:1, homocigotas CC: heterocigotas CP: homocigotas PP, donde C representa el alelo de Caimanta y P el alelo de LA722 para un *locus* microsatélite dado) a través de una prueba de  $\chi^2$  (Snedecor, 1964).

La asociación entre los marcadores moleculares *SSR* y los caracteres de interés agronómico se determinó a través del método de un solo punto (*single point analysis*, Tanksley, 1993). Para ello, se realizó un ANOVA a un criterio de clasificación, en el cuál los diferentes marcadores fueron las fuentes de variación. Se estableció un valor de probabilidad de  $p < 0,001$  como límite para definir las diferencias entre las medias de los caracteres según el marcador (variable clasificatoria), de manera de minimizar el Error de Tipo-1 en la identificación de *QTLs* no verdaderos que pudieran aparecer por el alto número de comparaciones a efectuar (este valor correspondería a un *LOD-score* de 2,4 Grandillo y Tanksley, 1996b). Sin embargo, también se registraron con un fin exploratorio aquellos *QTLs* detectados con una probabilidad de  $p < 0,05$ , dado que podrían ser validados en otras generaciones del cruzamiento. Se utilizó el valor de  $R^2$  para estimar el porcentaje de variancia fenotípica total explicada para el *QTL* estudiado por cada marcador (Liu, 1998). En aquellos casos en los que se detectó más de un marcador asociado a un mismo carácter se llevó a cabo un ANOVA a dos criterios de clasificación para comprobar el efecto conjunto de los marcadores y segregar el efecto de la interacción.

Para la validación de regiones genómicas asociadas a caracteres de calidad del fruto se compararon los *QTLs* detectados en las nueve familias BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> con una probabilidad menor a 0,05 con los encontrados previamente en la BC<sub>1</sub>, BC<sub>1</sub>S<sub>1</sub> o BC<sub>2</sub> del cruzamiento (Pereira da Costa *et al.*, 2013). Un *QTL* fue validado cuando la asociación se halló en dos o más generaciones diferentes.

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el *software* InfoStat Versión 1.0 (Di Renzo *et al.*, 2001).

## RESULTADOS

### - EVALUACIÓN POR CARACTERES DE CALIDAD DE FRUTO DE FAMILIAS BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub>

El análisis de Shapiro-Wilk indicó distribución normal de todos los caracteres con valores de W cercanos a 1, con excepción del número de lóculos. Para los análisis realizados, este carácter fue transformado con la función logarítmica. En la Tabla I.5 se presentan los valores medios, el error estándar y el rango de variación de cada variable para las nueve familias BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub>. Los rangos de variación fueron amplios para la mayoría de los caracteres en cada una de las familias. Se encontraron diferencias altamente significativas entre familias ( $F > 5,95$ ) y dentro de cada una de las familias ( $F > 5,65$ ) para todos los caracteres.

**Tabla I.5-** Valor medio, error estándar y rango de variación para cada una de las variables en las familias BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> y los progenitores (Caimanta y LA722 de *S. pimpinellifolium*) empleados como testigos.

Carácter	Familia VII-39			Familia VII-48			Familia VII-21		
	Media	Mín	Máx	Media	Mín	Máx	Media	Mín	Máx
Diámetro (cm)	3,68 ± 0,06a	2,94	4,23	4,58 ± 0,10b	3,63	5,10	5,87 ± 0,25c	3,59	7,53
Altura (cm)	3,13 ± 0,04a	2,66	3,58	3,99 ± 0,08de	3,35	4,88	4,25 ± 0,11ef	2,99	5,40
Forma	0,85 ± 0,01d	0,80	0,94	0,88 ± 0,01d	0,82	0,99	0,74 ± 0,02ab	0,58	0,89
Peso (g)	25,47 ± 1,09a	13,73	35,93	48,04 ± 2,64b	26,07	65,21	88,35 ± 8,80d	25,73	162,30
n° Lóculos	2,94 ± 0,08a	2,33	3,67	3,09 ± 0,12ab	2,33	3,83	4,11 ± 0,56bc	2,17	9,00
Esp. Pericarpio (cm)	0,21 ± 0,01a	0,13	0,47	0,36 ± 0,03d	0,17	0,53	0,32 ± 0,02cd	0,21	0,48
Vida poscosecha (días)	10,20 ± 0,26bcde	6,67	13,00	16,45 ± 0,84f	9,40	24,00	11,30 ± 0,49de	6,25	16,42
L	40,44 ± 0,33a	37,39	44,75	42,20 ± 0,34a	39,51	44,84	40,49 ± 0,31a	38,63	42,36
a/b	1,22 ± 0,02c	0,95	1,44	1,10 ± 0,03c	0,89	1,28	1,20 ± 0,02c	1,08	1,31
Firmeza	50,29 ± 0,96a	41,17	63,67	53,52 ± 1,31ab	45,75	63,50	52,95 ± 1,53ab	44,42	61,08
Sólidos solubles (°Brix)	6,87 ± 0,18d	5,50	9,23	4,78 ± 0,13a	4,07	6,10	5,93 ± 0,34bc	4,13	8,05
pH	4,59 ± 0,02cde	4,41	4,86	4,76 ± 0,05e	4,45	5,17	4,67 ± 0,05de	4,33	5,04
Acidez titulable	0,40 ± 0,02a	0,27	0,60	0,32 ± 0,02a	0,23	0,45	0,40 ± 0,03a	0,29	0,59

Carácter	Familia VII-24			Familia VII-2			Familia VII-7		
	Media	Mín	Máx	Media	Mín	Máx	Media	Mín	Máx
Diámetro (cm)	4,77 ± 0,23b	2,73	8,23	4,45 ± 0,14b	3,13	5,76	4,50 ± 0,29b	2,41	7,10
Altura (cm)	3,49 ± 0,13bc	2,51	5,57	3,60 ± 0,11bc	2,69	4,71	3,42 ± 0,17ab	1,90	5,03
Forma	0,76 ± 0,01b	0,63	0,93	0,81 ± 0,01c	0,75	0,88	0,78 ± 0,02bc	0,64	0,92
Peso (g)	56,81 ± 8,45bc	11,15	212,15	45,30 ± 3,89b	17,49	91,71	48,96 ± 8,55b	6,47	149,17
n° Lóculos	4,42 ± 0,47cd	2,83	10,67	4,13 ± 0,20cd	2,67	5,17	5,19 ± 0,56de	3,33	9,83
Esp. Pericarpio (cm)	0,28 ± 0,02bc	0,10	0,44	0,24 ± 0,02ab	0,13	0,38	0,25 ± 0,02ab	0,16	0,41
Vida poscosecha (días)	8,30 ± 0,49ab	5,09	14,60	10,29 ± 1,17cde	4,11	26,00	11,56 ± 1,00e	4,50	24,27
L	40,78 ± 0,40a	37,84	44,04	46,64 ± 1,81b	40,16	61,41	50,10 ± 2,47c	39,35	65,58
a/b	1,14 ± 0,03c	0,82	1,48	0,83 ± 0,13b	-0,15	1,29	0,59 ± 0,15a	-0,11	1,34
Firmeza	50,51 ± 1,58a	37,33	62,50	50,35 ± 1,74a	37,08	61,67	55,92 ± 2,01b	42,92	70,90
Sólidos solubles (°Brix)	5,87 ± 0,29bc	3,63	8,60	6,62 ± 0,31cd	4,97	8,67	6,43 ± 0,28cd	4,83	8,05
pH	4,66 ± 0,09de	4,04	5,90	4,42 ± 0,11abc	3,87	5,31	4,27 ± 0,07ab	3,77	4,62
Acidez titulable	0,40 ± 0,03a	0,24	0,81	0,66 ± 0,07c	0,32	1,29	0,55 ± 0,06b	0,32	1,05

**Mín.:** Valor mínimo de la variable. **Máx.:** Valor máximo de la variable. **L:** porcentaje de reflectancia. **a/b:** índice de color.

Entre las familias BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub>, letras distintitas indican diferencias significativas según el test de Duncan ( $p < 0,05$ ). Los progenitores Caimanta y LA722 se compararon entre sí mediante una prueba *t-Student* (letras diferentes indican diferencias significativas,  $p < 0,01$ ).

Tabla I.5- (continuación)

Carácter	Familia VII-8			Familia VII-12			Familia VII-17		
	Media	Mín	Máx	Media	Mín	Máx	Media	Mín	Máx
Diámetro (cm)	6,33 ± 0,30c	4,20	8,85	4,94 ± 0,23b	3,75	8,48	5,62 ± 0,16c	3,15	7,75
Altura (cm)	4,45 ± 0,19f	3,15	6,20	3,80 ± 0,12cd	3,06	5,11	4,18 ± 0,12ef	2,45	5,29
Forma	0,72 ± 0,01a	0,65	0,80	0,79 ± 0,02bc	0,63	0,88	0,75 ± 0,01ab	0,66	0,86
Peso (g)	107,14 ± 13,38e	31,33	254,05	62,01 ± 9,40bc	29,59	214,79	75,83 ± 5,55cd	15,18	164,36
nº Lóculos	7,94 ± 0,49e	5,17	10,67	4,64 ± 0,62cd	3,17	12,25	3,38 ± 0,10bc	2,50	4,00
Esp. Pericarpio (cm)	0,27 ± 0,02abc	0,17	0,35	0,35 ± 0,02d	0,18	0,46	0,42 ± 0,02e	0,27	0,54
Vida poscosecha (días)	7,57 ± 0,82a	4,08	16,75	8,93 ± 0,57abc	5,60	13,33	9,55 ± 0,50bcd	4,33	15,08
L	48,14 ± 2,41bc	38,92	60,94	43,15 ± 0,74a	39,72	51,32	41,57 ± 0,41a	39,52	45,62
a/b	0,56 ± 0,19a	-0,32	1,35	1,00 ± 0,04bc	0,68	1,28	1,16 ± 0,03c	0,89	1,43
Firmeza	62,28 ± 2,24c	52,20	76,92	53,64 ± 1,33ab	42,13	63,58	61,96 ± 1,01c	55,50	71,42
Sólidos solubles (°Brix)	5,04 ± 0,28a	3,53	6,90	5,20 ± 0,19ab	4,13	6,60	5,44 ± 0,23ab	3,70	7,85
pH	4,26 ± 0,04a	4,07	4,55	4,48 ± 0,06bcd	4,27	4,92	4,49 ± 0,05bcd	4,23	4,96
Acidez titulable	0,54 ± 0,04b	0,38	0,82	0,36 ± 0,01a	0,26	0,43	0,36 ± 0,02a	0,29	0,55

Carácter	Caimanta	LA722
Diámetro (cm)	7,42 ± 0,23a	1,29 ± 0,03b
Altura (cm)	5,31 ± 0,14a	1,18 ± 0,02b
Forma	0,72 ± 0,01b	0,91 ± 0,01a
Peso (g)	163,54 ± 13,20a	1,21 ± 0,06b
nº Lóculos	7,89 ± 0,89a	2,07 ± 0,05b
Esp. Pericarpio (cm)	0,37 ± 0,04a	0,11 ± 0,004b
Vida poscosecha (días)	8,92 ± 0,59b	11,08 ± 0,46a
L	45,40 ± 1,48a	38,72 ± 0,32b
a/b	0,62 ± 0,05b	1,36 ± 0,03a
Firmeza	51,91 ± 2,37b	58,98 ± 0,93a
Sólidos solubles (°Brix)	4,46 ± 0,18b	7,52 ± 0,18a
pH	4,69 ± 0,09a	4,29 ± 0,05b
Acidez titulable	0,32 ± 0,01b	1,02 ± 0,08a

Mín.: Valor mínimo de la variable. Máx.: Valor máximo de la variable. L: porcentaje de reflectancia. a/b: índice de color. Entre las familias BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub>, letras distintitas indican diferencias significativas según el test de Duncan (p < 0,05). Los progenitores Caimanta y LA722 se compararon entre sí mediante una prueba *t-Student* (letras diferentes indican diferencias significativas, p < 0,01).

Las fotos de la Figura I.12 muestran frutos representativos de diferentes plantas de cada familia BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub>. Se puede observar la segregación de tamaño, forma y color para cada una de las familias estudiadas.

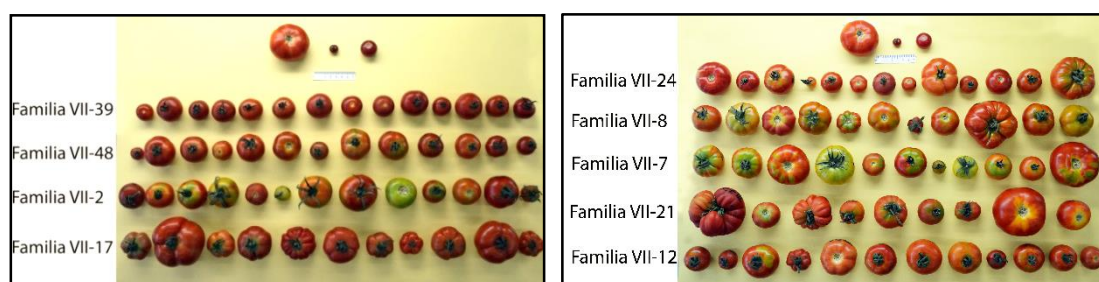


Figura I.12- Frutos representativos de diferentes plantas de cada familia BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub>. En la parte superior se presentan frutos representativos de Caimanta, de LA722 y de la F<sub>1</sub> entre ellos.

Una particularidad observada fue que para el color de fruto tres familias (VII-2, VII-7 y VII-8) exhibieron algunas plantas con frutos de color amarillo, mientras que ambos

progenitores del cruzamiento inicial (Caimanta y LA722) y también las plantas BC<sub>2</sub> que originaron estas familias presentan frutos de color rojo. El análisis del color de fruto en estas familias, a través de los parámetros L y a/b, mostró la existencia de grupos discretos que se corresponden con las plantas de frutos amarillos diferenciándose de las de frutos rojos, como se puede apreciar en los histogramas de frecuencias (Figura I.13). Los frutos amarillos se evidencian en valores altos para el parámetro L y valores mínimos, en general negativos, para el índice de color a/b. En base a lo observado, se aplicó un análisis de Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) para probar la bondad de ajuste de los datos a diversos modelos de segregación basados en uno o dos genes para la determinación del color de fruto en estos materiales de tomate. En las tres familias, las plantas evaluadas ajustaron a una proporción de 3:1 frutos rojos a frutos amarillos ( $\chi^2 < 1,067$ ), indicando que un único *locus* podría ser el responsable de la segregación en el color de fruto. Esto sugiere, en principio, que un único *locus* con dos alelos (rojo dominante sobre amarillo) podría estar explicando las variaciones en el color de fruto en estos materiales. De todas maneras, debe destacarse que el número de plantas evaluadas fue bajo para este tipo de determinaciones y más estudios deben realizarse.

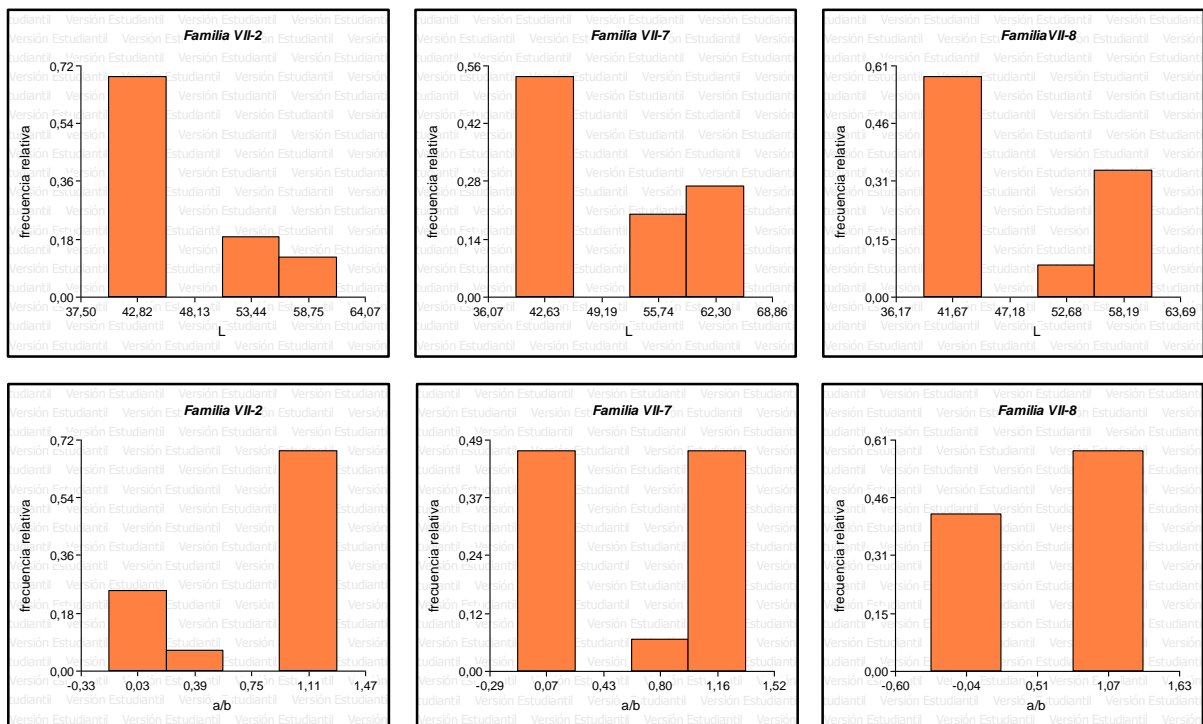


Figura I.13- Histograma de Frecuencias para los parámetros de color, L y a/b, en las familias BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> que presentaron plantas con frutos rojos y plantas con frutos amarillos (VII-2, VII-7 y VII-8).

La variación dentro de cada una de las familias resultó significativa para todos los caracteres ( $p < 0,01$ ), con excepción de tres familias para el número de lóculos (VII-24, VII-7 y VII-12). La Tabla I.6 muestra los porcentajes de la variación fenotípica atribuible a variación genética (% VG/VF) para cada carácter en cada familia.

**Tabla I.6-** Porcentaje de variación fenotípica explicado por la variación genética.

Carácter	%VG/VF								
	Familia BC <sub>2</sub> S <sub>1</sub>								
	VII-39	VII-48	VII-21	VII-24	VII-2	VII-7	VII-8	VII-12	VII-17
Díámetro (cm)	29,9	27,9	47,6	53,7	27,0	67,2	48,6	41,2	43,8
Altura (cm)	23,6	29,3	23,7	47,1	24,8	55,2	48,0	24,4	41,5
Forma	28,4	39,1	63,5	40,6	14,5	60,6	18,5	51,7	37,5
Peso (g)	31,8	27,0	38,6	56,2	28,2	61,7	45,9	45,6	32,0
n° Lóculos	25,6	28,9	74,5	---	45,8	---	24,6	---	15,6
Esp. Pericarpio (cm)	67,3	60,8	36,2	69,7	58,8	47,3	16,4	59,7	27,0
Vida poscosecha (días)	24,7	30,3	17,3	40,2	46,9	34,1	22,5	21,9	27,1
L	46,2	49,8	23,7	62,9	94,1	95,0	91,5	56,6	29,9
a/b	57,4	50,0	26,9	65,5	96,8	97,1	95,7	51,1	40,1
Firmeza	47,8	49,5	41,1	62,0	55,9	58,6	46,6	22,8	30,5
Sólidos solubles (°Brix)	81,9	73,9	83,2	90,8	79,7	83,6	79,5	79,6	68,0
pH	26,0	73,1	23,1	85,1	89,9	84,8	45,5	46,6	58,2
Acidez titulable	69,3	65,9	41,9	85,8	88,9	79,4	57,1	53,9	55,9

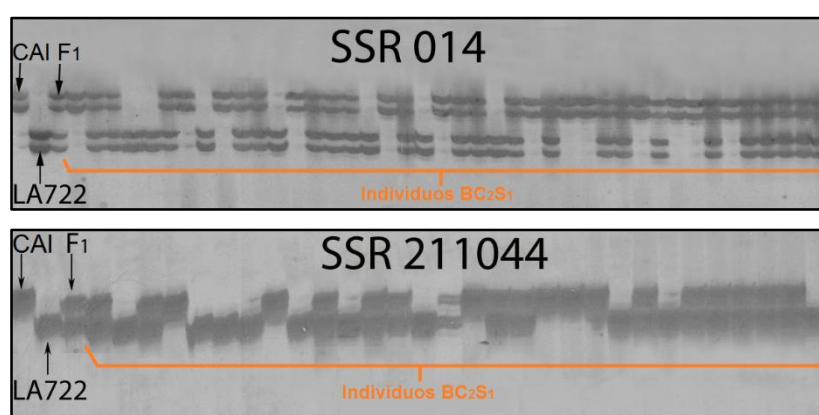
L: porcentaje de reflectancia. a/b: índice de color. (---): variación no significativa dentro de la familia.

Si se comparan los % VG/VF, se observa que en las familias BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> VII-2, VII-7 y VII-8 la variación en el color se atribuye esencialmente a componentes genéticos, a diferencia del resto de las familias que presentaron valores más bajos para estos parámetros. Cuando se analiza la variación en el carácter vida poscosecha en la mayoría de las familias se encuentra que se debió principalmente a variaciones ambientales, sin embargo existen diferencias entre las familias para el carácter ( $p < 0,01$ ), siendo la familia VII-2 la que exhibió el valor más alto (47 %). Por el contrario, para el contenido en sólidos solubles hubo un importante componente genético en la variación fenotípica observada en todas las familias evaluadas. En cuanto a los caracteres relacionados a la forma y tamaño del fruto, los %VG/VF fueron variables entre las familias, encontrándose en la familia VII-7 los valores más altos.

Estos resultados muestran la existencia de variabilidad entre estas familias BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> y dentro de ellas para caracteres de calidad del fruto. Además, esta variabilidad observada en los caracteres estudiados se debe en gran parte a componentes genéticos.

**- CARACTERIZACIÓN POR MARCADORES MOLECULARES DE FAMILIAS BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub>**

Se caracterizaron por marcadores moleculares de ADN del tipo *SSR* cada una de las plantas correspondientes a las nueve familias BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> (total: 206 plantas). De los 28 marcadores *SSR* iniciales, dos resultaron monomórficos en la generación BC<sub>2</sub> (*SSR009* y *SSR344*). En las familias BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> se evaluaron los 26 *SSR* restantes, analizándose en cada familias BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> solo aquellos *SSR* heterocigotas en la planta BC<sub>2</sub> que le dio origen (ver Tabla I.2). La Figura I.14 presenta, a modo de ejemplo, fragmentos de geles de acrilamida para dos de los *SSR* (*SSR014* y *SSR211044*) en algunas plantas de las familias BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub>.



**Figura I.14-** Marcadores *SSR014* y *SSR211044* probados en los progenitores, la F<sub>1</sub> y las familias BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> del cruzamiento entre Caimanta de *S. lycopersicum* (CAI) y LA722 de *S. pimpinellifolium*. Las flechas indican los progenitores (CAI y LA722) y la F<sub>1</sub> utilizados como testigos. A continuación se presentan los genotipos encontrados en la generación BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub>, donde observamos individuos homocigotas para el alelo de CAI, individuos homocigotas para el alelo de LA722 e individuos heterocigotas.

La segregación mendeliana de los *SSR* analizados fue probada en cada familia y se muestra en la Tabla I.7, indicándose el cromosoma donde se encuentra el marcador, el número total de plantas evaluadas, el número de individuos observado para cada genotipo y el valor de  $\chi^2$ . Los *SSR* resaltados en amarillo no ajustaron a la segregación mendeliana esperada (1:2:1). Sólo cuatro de los *SSR* mostraron segregación distorsionada en cinco de las familias BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub>. El *SSR162* presentó una reducción de la cantidad de individuos homocigotas para alelos silvestres acompañado de un aumento de homocigotas para alelos de Caimanta en comparación a lo esperado en dos familias (VII-21 y VII-24). Por el contrario, los *SSRG036* y *SSR286* exhibieron una disminución de homocigotas para alelos de Caimanta junto a un exceso de homocigotas para alelos de LA722 respecto a lo esperado en tres familias (VII-2, VII-7 y VII-8). El *SSR327* manifestó un exceso de plantas homocigotas de los dos tipos frente a las heterocigotas en la familia BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> VII-24.

**Tabla I.7-** Segregación de los marcadores *SSR* (*Simple Sequence Repeat*) en cada familia BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> del cruzamiento entre Caimanta de *S. lycopersicum* y LA722 de *S. pimpinellifolium*.

Familia VII-39						
<i>SSR</i>	Cr	n° Total	nCC	nCP	nPP	$\chi^2$
095	1	30	5	15	10	1,67ns
220060	1	30	7	15	8	0,07ns
295	2	30	12	11	7	3,80ns
320	3	30	4	16	10	2,53ns
045	7	24	9	10	5	2,00ns
063	8	30	6	17	7	0,60ns
038	8	30	6	16	8	0,40ns
596	10	30	6	19	5	2,20ns
318	10	30	5	19	6	2,20ns
080	11	30	8	17	5	1,13ns
Familia VII-48						
<i>SSR</i>	Cr	n° Total	nCC	nCP	nPP	$\chi^2$
095	1	20	9	8	3	4,40ns
220060	1	20	8	8	4	2,40ns
295	2	20	1	11	8	5,10ns
320	3	18	4	9	5	0,11ns
014	3	20	5	9	6	0,30ns
115	5	20	6	8	6	0,80ns
596	10	20	5	14	1	4,80ns
318	10	19	1	14	4	5,21ns
080	11	19	6	10	3	1,00ns
Familia VII-21						
<i>SSR</i>	Cr	n° Total	nCC	nCP	nPP	$\chi^2$
295	2	20	9	9	2	5,10ns
598	2	20	7	11	2	2,70ns
320	3	20	5	9	6	0,30ns
014	3	20	6	8	6	0,80ns
115	5	20	7	9	4	1,10ns
162	5	20	10	10	0	10,00*
045	7	19	8	9	2	3,84ns
327	8	20	8	5	7	5,10ns
Familia VII-24						
<i>SSR</i>	Cr	n° Total	nCC	nCP	nPP	$\chi^2$
095	1	30	8	20	2	5,73ns
220060	1	30	8	19	3	3,80ns
295	2	30	5	15	10	1,67ns
320	3	30	9	18	3	3,60ns
014	3	30	9	18	3	3,60ns
115	5	30	5	17	8	1,13ns
162	5	30	13	14	3	6,80*
211044	6	30	6	14	10	1,20ns
128	6	29	8	9	12	5,28ns
327	8	30	12	8	10	6,80*
069	9	28	7	17	4	1,93ns
080	11	30	5	17	8	1,13ns
G036	11	30	8	15	7	0,07ns
1061	11	30	7	15	8	0,07ns
Familia VII-2						
<i>SSR</i>	Cr	n° Total	nCC	nCP	nPP	$\chi^2$
162	5	20	8	10	2	3,06ns
286	7	20	1	14	5	4,80ns
276	7	18	5	8	5	0,22ns
070	9	20	5	13	2	2,70ns
080	11	20	1	12	7	4,40ns
G036	11	20	0	11	9	8,30*

Cr: cromosoma. n°: número total de individuos. nCC: número de individuos homocigotas para el alelo de Caimanta (C). nCP: número de individuos heterocigotas. nPP: número de individuos homocigotas para el alelo de LA722.  $\chi^2$ : valor de chi-cuadrado. ns: no significativo. \*: significativo ( $p < 0,05$ ). En amarillo se destacan aquellos *SSR* que no presentaron segregación 1:2:1 en alguna familia BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub>.

Tabla I.7- (continuación)

Familia VII-7						
SSR	Cr	n° Total	nCC	nCP	nPP	$\chi^2$
286	7	19	1	8	10	9,00*
276	7	17	3	8	6	1,12ns
045	7	19	3	13	3	2,58ns
596	10	20	5	10	5	0ns
318	10	20	3	13	4	1,90ns
080	11	20	2	11	7	2,70ns
G036	11	20	4	12	4	0,80ns
Familia VII-8						
SSR	Cr	n° Total	nCC	nCP	nPP	$\chi^2$
320	3	20	5	10	5	0ns
014	3	20	4	12	4	0,80ns
162	5	20	3	15	2	5,10ns
286	7	20	0	11	9	8,30*
276	7	18	7	5	6	3,67ns
045	7	18	5	6	7	2,44ns
Familia VII-12						
SSR	Cr	n° Total	nCC	nCP	nPP	$\chi^2$
162	5	20	7	7	6	1,90ns
276	7	16	7	6	3	3,00ns
080	11	20	1	11	8	5,10ns
G036	11	20	2	9	9	5,10ns
Familia VII-17						
SSR	Cr	n° Total	nCC	nCP	nPP	$\chi^2$
598	2	30	6	21	3	5,40ns
115	5	30	5	17	8	1,13ns
069	9	29	7	16	6	0,38ns
070	9	29	7	16	6	0,38ns
034	10	30	7	19	4	2,73ns
318	10	30	5	16	9	1,20ns
080	11	30	8	16	6	0,40ns

Cr: cromosoma. n°: número total de individuos. nCC: número de individuos homocigotas para el alelo de Caimanta (C). nCP: número de individuos heterocigotas. nPP: número de individuos homocigotas para el alelo de LA722.  $\chi^2$ : valor de chi-cuadrado. ns: no significativo. \*: significativo ( $p < 0,05$ ). En amarillo se destacan aquellos SSR que no presentaron segregación 1:2:1 en alguna familia BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub>.

El análisis molecular por marcadores SSR reveló la existencia de variabilidad en la composición genética en las familias BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub>.

### **- DETECCIÓN DE QTLs EN LAS FAMILIAS BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub>**

Una vez caracterizadas las familias BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> se procedió a estudiar la asociación entre los datos fenotípicos y genotípicos con el fin de detectar QTLs de interés agronómico. Se hallaron 20 QTLs ( $p \leq 0,01$ ), de los cuales cinco (25 %) fueron altamente significativos ( $p < 0,001$ ) (mostrados en gris en la Tabla I.8). Se encontraron QTLs para el diámetro, altura, forma, peso, número de lóculos, parámetro de color a/b, firmeza y acidez titulable. La forma del fruto fue el carácter con más QTLs asociados (seis). La variación fenotípica explicada por los QTLs estuvo en un rango de 29 a 83 %. Es importante resaltar que 12 de estos 20 QTLs (60 %) habían sido

detectados previamente en alguna generación BC<sub>1</sub>, BC<sub>2</sub> o BC<sub>1</sub>S<sub>1</sub> de este cruzamiento (mostrados en amarillo en la Tabla I.8).

**Tabla I.8-** Asociaciones detectadas entre marcadores SSR y caracteres fenotípicos en las familias BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> con  $p \leq 0,01$ .

SSR	Cr	Carácter	Flia BC <sub>2</sub> S <sub>1</sub>	Media CC	nCC	Media CP	nCP	Media PP	nPP	R <sup>2</sup>	p
1 <i>G036</i>	11	Diámetro	VII-7	6,35 ± 0,47b	4	4,16 ± 0,27a	12	3,67 ± 0,47a	4	0,54	0,0013
			VII-12	6,96 ± 0,53b	2	4,92 ± 0,26a	8	4,51 ± 0,25a	9	0,52	0,0027
			VII-24	5,86 ± 0,39b	8	4,51 ± 0,29a	15	4,07 ± 0,42a	7	0,30	0,0085
2 <i>220060</i>	1	Altura	VII-39	3,26 ± 0,08b	7	3,17 ± 0,05b	15	2,92 ± 0,07a	8	0,29	0,0098
3 <i>596</i>	10	Altura	VII-39	3,41 ± 0,08b	6	3,08 ± 0,04a	19	2,95 ± 0,09a	5	0,39	0,0011
			VII-48	4,41 ± 0,13b	5	3,87 ± 0,08ab	14	3,53 ± 0,29a	1	0,47	0,0043
4 <i>318</i>	10	Altura	VII-39	3,33 ± 0,09b	5	3,14 ± 0,05b	19	2,91 ± 0,09a	6	0,30	0,0087
5 <i>295</i>	2	Forma	VII-21	0,68 ± 0,02a	8	0,79 ± 0,02b	9	0,82 ± 0,05b	2	0,47	0,0061
6 <i>069</i>	9	Forma	VII-17	0,80 ± 0,02b	7	0,73 ± 0,01a	16	0,74 ± 0,02a	6	0,36	0,0033
7 <i>070</i>	9	Forma	VII-17	0,79 ± 0,02b	7	0,73 ± 0,01a	16	0,74 ± 0,02a	6	0,30	0,0091
8 <i>034</i>	10	Forma	VII-17	0,81 ± 0,02b	7	0,74 ± 0,01a	19	0,71 ± 0,02a	4	0,42	0,0007
9 <i>080</i>	11	Forma	VII-17	0,79 ± 0,02b	8	0,72 ± 0,01a	16	0,78 ± 0,02b	6	0,34	0,0033
10 <i>G036</i>	11	Forma	VII-7	0,66 ± 0,02a	4	0,80 ± 0,01b	12	0,84 ± 0,02b	4	0,68	0,0001
			VII-12	0,64 ± 0,03a	2	0,78 ± 0,01b	8	0,83 ± 0,01b	9	0,73	<0,0001
11 <i>596</i>	10	Peso	VII-39	32,00 ± 2,05b	6	24,39 ± 1,15a	19	21,72 ± 2,24a	5	0,34	0,0037
12 <i>318</i>	10	Peso	VII-39	30,79 ± 2,32b	5	25,70 ± 1,19ab	19	20,31 ± 2,12a	6	0,29	0,0091
13 <i>G036</i>	11	Peso	VII-7	96,29 ± 15,45b	4	41,20 ± 8,92a	12	25,38 ± 15,45a	4	0,42	0,0093
			VII-12	137,42 ± 23,06b	2	59,05 ± 11,53a	8	47,88 ± 10,87a	9	0,44	0,0100
			VII-24	100,94 ± 13,69b	8	43,62 ± 10,00a	15	34,63 ± 14,64a	7	0,35	0,0031
14 <i>1061</i>	11	Peso	VII-24	102,28 ± 14,93b	7	48,08 ± 10,20a	15	33,38 ± 13,96a	8	0,32	0,0053
15 <i>276</i>	7	n° Lóculos	VII-2	4,17 ± 0,27b	4	4,36 ± 0,20b	7	2,94 ± 0,31a	3	0,58	0,0084
			VII-7	9,25 ± 1,03b	2	5,29 ± 0,59a	6	3,71 ± 0,65a	5	0,67	0,0037
16 <i>G036</i>	11	n° Lóculos	VII-7	8,11 ± 0,91b	3	4,88 ± 0,56a	8	3,63 ± 0,79a	4	0,61	0,0037
			VII-12	9,88 ± 0,79b	2	4,31 ± 0,50a	5	3,54 ± 0,39a	8	0,83	<0,0001
17 <i>069</i>	9	Color: a/b	VII-17	0,98 ± 0,04a	4	1,18 ± 0,03b	7	1,26 ± 0,04b	5	0,66	0,0008
18 <i>596</i>	10	Firmeza	VII-39	56,54 ± 1,94c	4	50,18 ± 0,89b	19	44,54 ± 1,94a	4	0,45	0,0009
19 <i>162</i>	5	Ac. Titulable	VII-12	0,31 ± 0,02a	5	0,39 ± 0,02b	5	0,38 ± 0,02b	5	0,54	0,0100
20 <i>034</i>	10	Ac. Titulable	VII-17	0,36 ± 0,03a	3	0,34 ± 0,02a	11	0,51 ± 0,04b	2	0,59	0,0029

Cr: cromosoma. Media CC o PP: valor medio del carácter para individuos homocigotas para alelos de Caimanta o LA722. nCC o PP: número de individuos homocigotas. Media CP: valor medio del carácter para individuos heterocigotas. nCP: número de individuos heterocigotas. R<sup>2</sup>: fracción de la variación fenotípica explicada. p: probabilidad asociada. Letras distintas indican diferencias significativas entre las medias según el test de Duncan ( $p < 0,05$ ). En gris se destacan aquellas asociaciones detectadas con  $p < 0,001$ . En amarillo se indican aquellos *QTLs* encontrados en alguna generación previa.

Para el diámetro de los frutos, se identificó un *QTL* en el cromosoma 11, el cual fue detectado en tres (VII-7, VII-12 y VII-24) de las cuatro familias BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> en las que estaba segregando el marcador correspondiente (*SSRG036*). En la cuarta familia (VII-2), este marcador mostró una segregación distorsionada ya que no se hallaron individuos homocigotas para los alelos de Caimanta entre las plantas evaluadas. Para la altura de los frutos, tres *QTLs* fueron encontrados, uno en el cromosoma 1 y dos en el cromosoma 10. En todos ellos, el efecto de los alelos silvestres disminuyó el valor medio del carácter. Para la forma del fruto, se

localizaron *QTLs* en los cromosomas 2, 9, 10 y 11. En algunos de estos *QTLs* los alelos silvestres aumentaron el índice de forma, mientras que en otros redujeron este valor de manera contraria a lo esperado según los fenotipos progenitores. En cuanto al peso del fruto, se identificaron cuatro asociaciones y en todas ellas la presencia de alelos silvestres disminuyó el peso del fruto de acuerdo a lo esperado según los parentales.

Dos *QTLs* para el número de lóculos, que explicaron altos porcentajes de la variación fenotípica para el carácter, se localizaron en el cromosoma 7 y 11. Para el índice a/b de color, se detectó un *QTL* altamente significativo ( $p < 0,001$ ) en el cromosoma 9 que explicó el 66 % de la variación fenotípica y en el cual los alelos silvestres aumentaron la media del parámetro. Respecto a la firmeza, un *QTL* altamente significativo se encontró en el cromosoma 10, pero en este caso la presencia de alelos silvestres redujo la firmeza de los frutos.

Finalmente, dos *QTLs* se hallaron para la acidez titulable (cromosomas 5 y 10), en los cuales los alelos silvestres incrementaron el valor medio de acidez de los frutos en concordancia con el fenotipo observado en los progenitores.

Por otra parte, en las familias BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> ninguna de las interacciones evaluadas para los diversos marcadores asociados a un mismo carácter resultó significativa, no encontrándose evidencias de epistasis entre los marcadores analizados.

### **- VALIDACIÓN DE *QTLs* ASOCIADOS A CARACTERES DE CALIDAD DE FRUTO**

La comparación de los *QTLs* hallados en las familias BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> ( $p < 0,05$ ) con aquellos detectados previamente en las generaciones BC<sub>1</sub>, BC<sub>1</sub>S<sub>1</sub> y BC<sub>2</sub> permitió la validación de 27 regiones genómicas asociadas a diversos caracteres de calidad del fruto. En la Tabla I.9 se presentan aquellos *QTLs* encontrados en las familias BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> que fueron validados, indicándose las generaciones en las que se detectaron. Se validaron asociaciones al diámetro, altura, forma, peso, parámetro L y a/b de color, firmeza, vida poscosecha, sólidos solubles y acidez titulable de los frutos. De hecho, se validaron regiones relacionadas a la mayoría de los caracteres estudiados, con excepción del pH de los frutos. Además, los *QTLs* para el espesor de pericarpio y el número de lóculos no pudieron validarse porque estos rasgos no se evaluaron en las generaciones precedentes.

**Tabla I.9-** Asociaciones validadas en diversas generaciones del cruzamiento entre Caimanta y LA722 de *S. pimpinellifolium*.

<b>QTLs</b>				
<b>Cr</b>	<b>Carácter</b>	<b>SSR</b>	<b>Generación (p)</b>	<b>Efecto alelo LA722</b>
<b>1</b>	Diámetro	<b>220060</b>	<b>BC2</b> (0,0199) <b>BC2S1</b> VII-39 (0,0142)	disminuye disminuye
	Altura	<b>095</b>	<b>BC1S1</b> VII-91 (0,0110) <b>BC2S1</b> VII-39 (0,0268) / <b>BC2S1</b> VII-24 (0,0367)	disminuye disminuye/disminuye
		<b>220060</b>	<b>BC1S1</b> VII-31 (0,0409) / <b>BC2</b> (0,0023) <b>BC2S1</b> VII-39 (0,0098)	disminuye/disminuye disminuye
	Peso	<b>220060</b>	<b>BC1</b> (0,0303) / <b>BC1S1</b> IX-14 (0,0280) / <b>BC2</b> (0,0067) <b>BC2S1</b> VII-39 (0,0127)	disminuye/disminuye/disminuye disminuye
<b>2</b>	Peso	<b>295</b>	<b>BC1S1</b> IX-14 (0,0391) <b>BC2S1</b> VII-21 (0,0444)	disminuye disminuye
<b>5</b>	Ac. Titulable	<b>162</b>	<b>BC1S1</b> VII-91 (0,0113) <b>BC2S1</b> VII-12 (0,0100)	Sin diferencias entre individuos PP y CC aumenta
<b>6</b>	Color: L	<b>211044</b>	<b>BC1</b> (0,0344) <b>BC2S1</b> VII-24 (0,0445)	aumenta Sin diferencias entre individuos PP y CC
<b>9</b>	Forma	<b>070</b>	<b>BC1</b> (0,0228) <b>BC2S1</b> VII-17 (0,0091)	disminuye disminuye
	Color: a/b	<b>070</b>	<b>BC1</b> (0,0058) <b>BC2S1</b> VII-17 (0,0152)	aumenta aumenta
<b>10</b>	Diámetro	<b>596</b>	<b>BC1</b> (0,0107) <b>BC2S1</b> VII-39 (0,0157)	disminuye disminuye
		<b>318</b>	<b>BC1</b> (0,0027) <b>BC2S1</b> VII-39 (0,0247)	disminuye disminuye
	Altura	<b>596</b>	<b>BC1</b> (0,0010) / <b>BC1S1</b> VII-51 (0,0476) / <b>BC2</b> (0,0483) <b>BC2S1</b> VII-39 (0,0011) / <b>BC2S1</b> VII-48 (0,0043)	disminuye/disminuye/disminuye disminuye/disminuye
		<b>318</b>	<b>BC1</b> (0,0056) / <b>BC2</b> (0,0483) <b>BC2S1</b> VII-39 (0,0087)	disminuye/disminuye disminuye
	Forma	<b>034</b>	<b>BC1</b> (0,0007) / <b>BC1S1</b> VII-51 (0,0495) <b>BC2S1</b> VII-17 (0,0007)	disminuye/Sin diferencias entre PP y CC disminuye
	Peso	<b>596</b>	<b>BC1</b> (0,0019) <b>BC2S1</b> VII-39 (0,0037) / <b>BC2S1</b> VII-48 (0,0449)	disminuye disminuye/disminuye
		<b>318</b>	<b>BC1</b> (0,0009) <b>BC2S1</b> VII-39 (0,0091)	disminuye disminuye
	Vida poscosecha	<b>318</b>	<b>BC2</b> (0,0470) <b>BC2S1</b> VII-39 (0,0347)	aumenta Sin diferencias entre individuos PP y CC
	Firmeza	<b>596</b>	<b>BC2</b> (0,0010) <b>BC2S1</b> VII-39 (0,0009)	disminuye disminuye
	Ac. Titulable	<b>034</b>	<b>BC1S1</b> III-21 (0,0064) / <b>BC1S1</b> IX-14 (0,0021) <b>BC2S1</b> VII-17 (0,0029)	aumenta/aumenta aumenta
<b>11</b>	Diámetro	<b>G036</b>	<b>BC1</b> (0,0274) <b>BC2S1</b> VII-24 (0,0085) / VII-7 (0,0013) / VII-12 (0,0027)	aumenta disminuye/disminuye/disminuye
	Altura	<b>G036</b>	<b>BC1</b> (0,0247) <b>BC2S1</b> VII-24 (0,0158)	aumenta disminuye
		<b>1061</b>	<b>BC1S1</b> VII-91 (0,0340) <b>BC2S1</b> VII-24 (0,0423)	disminuye disminuye
	Forma	<b>1061</b>	<b>BC1S1</b> VII-91 (0,0008) <b>BC2S1</b> VII-24 (0,0480)	Sin diferencias entre individuos PP y CC aumenta
	Peso	<b>G036</b>	<b>BC1</b> (0,0263) <b>BC2S1</b> VII-24 (0,0031) / VII-7 (0,0093) / VII-12 (0,0100)	aumenta disminuye/disminuye/disminuye
	Vida poscosecha	<b>080</b>	<b>BC1S1</b> VII-51 (0,0483) <b>BC2S1</b> VII-17 (0,0458)	Sin diferencias entre individuos PP y CC Sin diferencias entre individuos PP y CC
	Sólidos solubles	<b>080</b>	<b>BC1</b> (0,0454) / <b>BC1S1</b> VII-31 (0,0182) <b>BC2S1</b> VII-7 (0,0377)	aumenta/aumenta Sin diferencias entre individuos PP y CC
	Ac. Titulable	<b>080</b>	<b>BC2</b> (0,0407) <b>BC2S1</b> VII-24 (0,0118)	aumenta disminuye

Cr: cromosoma. Se indica la generación en la que fue detectado el *QTL* y entre paréntesis la probabilidad asociada. Se muestra el efecto sobre el fenotipo del alelo del progenitor LA722 de *S. pimpinellifolium*.

El marcador *SSR220060* se asoció al peso del fruto en todas las generaciones estudiadas hasta este momento. Además, asociaciones al diámetro y la altura, caracteres altamente vinculados con el peso de los frutos, se validaron para este marcador. El *SSR596*, localizado en el cromosoma 10, fue hallado relacionado a la altura de los frutos en las diferentes generaciones evaluadas. Conjuntamente, este marcador se asoció al diámetro, al peso y a la firmeza de los frutos en algunas de las generaciones. Sumados a estos, el *SSR318* del cromosoma 10 y los *SSRG036* y *SSR1061* del cromosoma 11 también se validaron para determinaciones en caracteres relacionados al tamaño del fruto. Dos *QTLs* asociados a la vida poscosecha (*SSR318* cromosoma 10 y *SSR080* cromosoma 11) fueron detectados en diversas generaciones, si bien debe notarse que sus probabilidades fueron bajas. Para los parámetros L y a/b de color, se validaron regiones en el cromosoma 6 (*SSR211044*) y en el cromosoma 9 (*SSR070*) respectivamente. En relación al contenido en sólidos solubles se validó un *QTL* en el cromosoma 11 indicado por el *SSR080*, y tres asociaciones para la acidez de los frutos fueron encontradas en los cromosomas 5 (*SSR162*), 10 (*SSR034*) y 11 (*SSR080*) en distintas generaciones de estas retrocruzas.

En la Tabla I.9 se presenta además los efectos del alelo silvestre para cada asociación detectada. En general, los efectos fueron consistentes en las diferentes generaciones. No obstante, en algunos casos el efecto mostrado por los alelos silvestres varió según la generación en la cual se encontró la asociación, como se observó para varios de los *QTLs* hallados en el cromosoma 11. En cuanto a las asociaciones que mostraron más consistencia, podría resaltarse los *QTLs* validados en relación al parámetro a/b de color en el cromosoma 9 (*SSR070*) y a la acidez titulable en el cromosoma 10 (*SSR034*), en los cuales la presencia de alelos silvestres aumentó el valor medio del carácter.

## DISCUSIÓN

Dentro de un programa de mejoramiento, el análisis de *QTLs* en cruzamientos interespecíficos y generaciones de retrocruzas resulta una herramienta muy útil para explorar el aporte del germoplasma silvestre a la mejora de diversos caracteres y avanzar hacia el desarrollo de nuevas variedades. Tradicionalmente, los estudios de *QTLs* se han llevado a cabo en poblaciones donde alelos de ambos progenitores se hallan relativamente en alta frecuencia (por ejemplo  $F_2$ ,  $BC_1$ , *RILs*), lo cual presenta algunas desventajas a la hora de detectar *QTLs* y también al intentar transferirlos a otro genotipo de interés. La gran variancia genética y fenotípica generada por la elevada segregación de alelos donantes enmascara efectos pleiotrópicos sutiles, interacciones epistáticas e incluso puede reducir seriamente caracteres de valor. En relación a estos, los estudios en generaciones de retrocruzas avanzadas como la  $BC_2$  o  $BC_3$ , que presentan una menor proporción del genoma donante, posibilitan una mayor precisión en la determinación y localización de los *QTLs* (Tanksley y Nelson, 1996). No obstante, en una retrocruza ( $BC_x$ ) encontraremos solo dos genotipos posibles para cada *locus* (homocigotas para alelos del padre recurrente o heterocigotas), y por lo tanto, la ausencia de homocigotas para alelos del progenitor donante reduce la diversidad genética disponible. Frente a ello, la autofecundación de una retrocruza permite la manifestación de la condición homocigota para alelos del donante, posibilitando la exposición de genes o *QTLs* aportados por el dador con algún grado de acción génica recesiva (Tanksley y Nelson, 1996). En este trabajo, el análisis de las familias generadas por autofecundación de la segunda retrocruza ( $BC_2S_1$ ) del cruzamiento entre Caimanta y LA722 resultó muy valioso para los estudios iniciales sobre estos materiales. Contribuyó a la exploración de los aportes del germoplasma silvestre, posibilitando conocer el efecto de diversas regiones genómicas de *S. pimpinellifolium* sobre el fondo genético del material cultivado. Además, ya que una retrocruza es una generación segregante que impide el ensayo replicado, analizar las familias derivadas de su autofecundación resulta una manera alternativa de confirmar o verificar *QTLs*, es decir, validarlos en diferentes generaciones. El estudio de las familias  $BC_2S_1$  permitió detectar nuevos *QTLs* y también validar algunos hallados previamente.

La autofecundación de una retrocruza permite la expresión de la recombinación entre *loci* en ambos gametos progenitores, incrementando de esta manera la variabilidad manifestada.

En todas las familias BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> evaluadas en este trabajo se observó la existencia de variancia genética significativa. Cada una de las familias se originó a partir de plantas BC<sub>2</sub> que presentaron un determinado porcentaje del genoma de Caimanta recuperado (mayor al 74%), y por ende una determinada fracción de alelos de LA722 segregando, lo cual se relaciona con los diferentes valores de variancia genética encontrados en las diversas familias. Un mayor porcentaje recuperado del padre recurrente conlleva a una mayor homocigosis y esto se corresponde con una menor variancia genética. En este sentido, se advirtió que los porcentajes de variación genética en general fueron menores respecto de los observados en las familias BC<sub>1</sub>S<sub>1</sub> derivadas del mismo cruzamiento, en las cuales la proporción del genoma recurrente recuperada es notablemente menor (Pereira da Costa, 2012). Además, si bien el porcentaje de Caimanta recuperado puede ser similar en distintas familias BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub>, esto no significa que sean las mismas regiones del genoma las que se hayan fijado ni las mismas fracciones del germoplasma silvestre que se encuentren segregando en cada una ellas. De este modo, los porcentajes de variación fenotípica atribuible a variación genética dependieron de la familia BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> y también del carácter en estudio (resultados Tabla I.6). No obstante, de forma genérica, en la mayoría de las familias la variación en la vida poscosecha de los frutos se debió principalmente a variaciones ambientales (17,3 % < % VG/VF < 46,9 %, Tabla I.6), mientras que en otros caracteres, como el contenido en sólidos solubles, hubo un importante componente genético en la variación fenotípica en todas las familias (68,0 % < % VG/VF < 90,8 %, Tabla I.6). Estas observaciones coinciden con lo indicado en las familias BC<sub>1</sub>S<sub>1</sub> (Pereira da Costa, 2012). En un estudio previo, Pratta *et al.* (2011a) reportaron que la vida poscosecha de los frutos resultaba muy afectada por las condiciones ambientales propias de cada año, sin embargo algunas regiones cromosómicas parecían mantener un efecto estable en diferentes ciclos del cultivo. Al mismo tiempo, Pratta *et al.* (2011b) encontraron valores bajos de heredabilidad en sentido estricto (menor a 0,25) para la vida poscosecha, al evaluar 16 *RILs* de tomate, derivadas de un cruzamiento entre los mismos progenitores (Caimanta y LA722), reforzando la idea de que este es un carácter complejo y altamente influenciado por variaciones ambientales.

Para varios de los caracteres de calidad de fruto estudiados se encontraron individuos con fenotipos extremos, superiores o inferiores a las líneas parentales, lo cual se conoce con el nombre de “*segregación transgresiva*”. Esto resultó bien evidente en el caso de los frutos con fenotipos de color amarillo y también en aquellos frutos con una elevada vida poscosecha o alto

contenido en sólidos solubles en relación a los progenitores. Numerosas interpretaciones han sido sugeridas para explicar este fenómeno de segregación transgresiva: una elevada tasa de mutación, efectos alélicos *interloci* o epistasia, efectos alélicos *intralocus* o sobredominancia, o la acción complementaria de alelos aditivos que están dispersos entre las líneas parentales. Entre estas, la idea de una acción génica complementaria ha sido frecuente en la interpretación del fenómeno de transgresión en plantas, tanto a partir de estudios de genética clásica (Grant, 1975; Vega y Frey, 1980) como de estudios moleculares (de Vicente y Tanksley, 1993; Monforte *et al.*, 1997). Se postula que los progenitores presentan combinaciones diferentes de genes con efectos positivos y negativos, de manera que logran medias fenotípicas similares, y su recombinación en las generaciones segregantes origina la presencia de fenotipos extremos. Desde otro punto de vista, la hipótesis de acciones génicas no aditivas de interacciones *inter* o *intralocus*, también puede explicar la presencia de fenotipos transgresivos en los cruzamientos interespecíficos, particularmente por efectos de la combinación de estos genomas tan divergentes. De todos modos, y más allá de cual sean las bases genéticas que expliquen su origen, la presencia de estos fenotipos transgresivos mostró que la recombinación de los genomas de ambos progenitores tuvo efectos positivos generándose nueva variabilidad.

En las nueve familias BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> evaluadas se hallaron **20 QTLs** ( $p \leq 0,01$ ), de los cuales cinco (25 %) fueron altamente significativos ( $p < 0,001$ ) (resultados Tabla I.8). Se localizaron QTLs para el diámetro, altura, forma, peso, número de lóculos, parámetro de color a/b, firmeza y acidez titulable de los frutos. Además, la comparación de los QTLs hallados en las familias BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> con aquellos encontrados previamente en la BC<sub>1</sub>, BC<sub>1</sub>S<sub>1</sub> y/o BC<sub>2</sub> permitió la validación de **12** de estas regiones genómicas, junto a otras 15 detectadas, con una probabilidad menor al 0,05 en las familias BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> (resultados Tabla I.9). La forma de los frutos fue el carácter con más asociaciones detectadas en las familias BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> (seis), en los cromosomas 2, 9, 10 y 11. En algunos de estos QTLs (*SSR295*, *SSR080* y *SSRG036*) los alelos silvestres aumentaron el índice de forma, mientras que en otros (*SSR069*, *SSR070*, *SSR034*) disminuyeron este valor de manera contraria a lo esperado, según el fenotipo de los progenitores. No obstante, dos de estos (*SSR070* y *SSR034*) fueron validados en otras generaciones derivadas de este cruzamiento entre Caimanta y LA722. Para el diámetro, la altura y el peso de los frutos se observaron asociaciones con el cromosoma 1 (*SSR220060*), cromosoma 10 (*SSR596* y *SSR318*) y cromosoma 11 (*SSRG036*), algunas con  $p < 0,05$ , pero todas validadas a través de diversas generaciones.

Podemos destacar que el marcador *SSR220060* se vinculó al peso del fruto en todas las generaciones estudiadas hasta este momento, como también el *SSR596* a la altura. En la gran mayoría de estos *QTLs* la presencia de alelos silvestres redujo la media del carácter de acuerdo a lo esperado según los parentales. Esto coincide con diversos estudios en los cuales los híbridos  $F_1$  del cruzamiento entre una especie de frutos grandes y una especie silvestre de frutos chicos exhibieron típicamente frutos pequeños, postulándose que en las especies silvestres existen genes dominantes o parcialmente dominantes responsables de la reducción del peso de los frutos (Weller *et al.*, 1988; Grandillo *et al.*, 1999b; Pereira da Costa *et al.*, 2009). Por otra parte, estas asociaciones conjuntas entre caracteres correspondientes al tamaño del fruto son esperables dada la estrecha relación que existe entre ellos, por ejemplo un aumento en el diámetro y/o la altura de los frutos resultará en un incremento concomitante en el peso. De este modo, resulta probable que se trate de efectos pleiotrópicos sobre la altura, el diámetro y el peso, y no de la existencia de distintos *QTLs* en la misma región cromosómica. No obstante, más estudios son necesarios para dilucidar entre estas alternativas. Dos *QTLs* se identificaron para el número de lóculos, en los cromosomas 7 (*SSR276*) y 11 (*SSRG036*), los cuales explicaron altos porcentajes de la variación fenotípica para el carácter. Estos *QTLs* no pudieron validarse debido a que el número de lóculos no fue estudiado en las primeras generaciones de estos cruzamientos.

Para el parámetro a/b de color, un *QTL* altamente significativo ( $p < 0,001$ ) se detectó en el cromosoma 9 (*SSR069*) en la  $BC_2S_1$ , el cual no había sido observado previamente. Este *QTL* explicó el 66 % de la variación fenotípica y la presencia de alelos silvestres en la región aumentó la media del parámetro a/b. Además, otra asociación con una  $p < 0,05$  fue validada para el índice a/b en el cromosoma 9 (*SSR070*), la cual mostró el mismo efecto de los alelos silvestres, resultando ambas de interés desde el punto de vista agronómico. Según Sacks y Francis (2001), el ideotipo de color consiste en valores altos de a/b y bajos de L.

Respecto a la firmeza, se halló un *QTL* altamente significativo para el *SSR596* en el cromosoma 10, en el cual los alelos silvestres determinaron una disminución en la firmeza de los frutos. Este efecto, validado en una generación anterior, no sería deseado desde el punto de vista de la calidad de los frutos y su comercialización. Por otro lado, el *SSR596* se asoció también a caracteres relacionados al tamaño del fruto, lo cual podría explicarse por la presencia de distintos *QTLs* cercanos en esta región cromosómica o la acción de un único *QTL* con efectos pleiotrópicos sobre estos rasgos.

Finalmente, dos asociaciones a la acidez titulable se localizaron en los cromosomas 5 (*SSR162*) y 10 (*SSR034*), en donde los alelos silvestres incrementaron los valores medios de acidez de los frutos en concordancia con lo esperado en base al fenotipo de los progenitores. Ambos *QTLs* fueron validados en alguna generación anterior de estas retrocruzas.

En adición, el análisis de los *QTLs* detectados con  $p < 0,05$  en las familias BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> en comparación con aquellos hallados previamente permitió señalar dos *QTLs* para la vida poscosecha de los frutos (*SSR318* cromosoma 10 y *SSR080* cromosoma 11). Si bien debe advertirse que sus probabilidades fueron bajas, estas asociaciones se validaron en distintas generaciones. Del mismo modo, un *QTL* para el contenido en sólidos solubles fue validado en el cromosoma 11 (*SSR080*), aunque sus efectos fueron menos estables entre las generaciones.

Estos resultados señalan que la especie silvestre de tomate *S. pimpinellifolium* constituye un recurso genético muy valioso permitiendo ampliar la reducida variación genética existente en las variedades cultivadas y mejorar la calidad de los frutos.

En los últimos 25 años, una enorme cantidad de *QTLs* implicados en distintos aspectos de la calidad del fruto se han descrito en tomate (Foolad, 2007; Grandillo *et al.*, 2011; Grandillo *et al.*, 2013; Monforte *et al.*, 2014). Numerosos factores influyen en el poder de detección de un *QTL*, incluyendo la heredabilidad del rasgo, la acción génica, el tipo de población de mapeo, la cobertura de los marcadores, la magnitud de los efectos del *QTL*, la distancia entre el *locus* marcador y el *QTL*, los efectos ambientales, entre otros (Tanksley, 1993; Collard *et al.*, 2005). Ciertamente, la detección de un *QTL* puede verse afectada tanto por causas biológicas como experimentales. En este trabajo, y coincidiendo con lo observado en casi prácticamente todos los estudios de *QTLs*, se encontraron alelos de la especie silvestre que tenían efectos contrarios a lo esperado en base al fenotipo silvestre. De hecho, notamos la existencia de alelos con efectos diversos en ambos progenitores, ratificando la complejidad en la herencia de los caracteres cuantitativos con influencias de múltiples *loci* y efectos ambientales. En algunos casos, el comportamiento del alelo resultó el esperado de acuerdo al fenotipo de los progenitores y en otros fue opuesto, señalando que para un carácter pueden hallarse alelos positivos o negativos en ambos progenitores y estos se combinarán en formas variadas y con diversas interacciones epistáticas. De Vicente y Tanksley (1993) afirmaron que cualquier padre, incluso el de menor valor para un rasgo, puede llevar alelos que mejoren ese carácter, aunque esos genes solo se expresen de manera adecuada en determinados *background*

genéticos al recombinar con genes del otro padre. De este modo, se vuelve difícil predecir el valor de un genotipo únicamente en base a las propiedades fenotípicas de los progenitores (Lynch y Walsh, 1998). En este contexto, los marcadores moleculares y los análisis de *QTLs* a través de las generaciones resultaron herramientas muy valiosas ayudando a identificar algunos *loci* con efectos deseados para el mejoramiento, incluso bajo fenotipos desfavorables.

## CONCLUSIONES PARCIALES

---

- El análisis de familias derivadas de la autofecundación de la segunda retrocruza (BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub>) entre el cultivar Caimanta y la entrada LA722 de la especie silvestre *S. pimpinellifolium* mostró la existencia de variabilidad genética para caracteres de calidad del fruto en estos materiales que puede ser aprovechada.
  
- Se identificaron diversas regiones genómicas asociadas a caracteres de calidad del fruto en las familias BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> del cruzamiento interespecífico entre Caimanta y LA722, explorando los aportes de la especie silvestre y sus interacciones con el genotipo cultivado.
  
- La comparación a través de distintas generaciones del cruzamiento entre Caimanta y LA722 posibilitó la validación de diversas regiones genómicas asociadas a caracteres de calidad del fruto.

## **CAPÍTULO II**

### **DESARROLLO DE *NILs*: OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE GENERACIONES BC<sub>3</sub> Y BC<sub>4</sub>**

## INTRODUCCIÓN

---

En los últimos años ha habido muchos trabajos sobre el uso de métodos basados en marcadores moleculares para detectar, mapear y caracterizar *loci* responsables de caracteres cuantitativos en los cultivos. Sin embargo, a pesar de estos, hay pocos ejemplos en los que las técnicas de marcadores moleculares hayan llevado a la creación de nuevas variedades. Un factor central de este bajo impacto de los análisis de *QTLs*, a partir de marcadores, en el desarrollo de nuevos materiales, está relacionado con el hecho de que las investigaciones de *QTLs* y el desarrollo de variedades se realizan como procesos separados. Por lo general, primero se estudian los *QTLs* y una vez que se detecta alguno potencialmente valioso, nuevos cruzamientos son necesarios para la obtención de cultivares comerciales. Esta separación en pasos discretos y secuenciales no solo aumenta el tiempo necesario sino también reduce la probabilidad de utilizar con éxito la información del *QTL* para conseguir una variedad superior. Frente a esta situación, Tanksley y Nelson (1996) propusieron una estrategia denominada “*Análisis de QTLs en retrocruzas avanzadas (AB-QTL)*” que combina e integra el estudio de *QTLs* con el desarrollo de variedades en un mismo proceso. Esta estrategia se basa en la obtención y análisis de poblaciones de retrocruzas interespecíficas para la investigación y transferencia de *QTLs* simultáneamente. Marcadores moleculares se emplean para identificar en las poblaciones segregantes alelos del germoplasma exótico con potencial para mejorar caracteres agronómicos, los cuales serán evaluados en las distintas generaciones de retrocruzas, a la vez que estarán siendo transferidos a la línea elite. La metodología *AB-QTL* propuesta por Tanksley y Nelson (1996) se compone básicamente de las siguientes fases: (1) generación del híbrido entre una variedad elite y, generalmente, una especie silvestre; (2) retrocruzamiento hacia el padre elite para obtener las poblaciones BC<sub>1</sub> (primera retrocruza o *backcross1*) y BC<sub>2</sub> (segunda retrocruza o *backcross2*), que estarán sujetas a selección fenotípica o por marcadores contra alelos indeseables del donante; (3) caracterización por marcadores moleculares de la BC<sub>2</sub> y la BC<sub>3</sub> (tercera retrocruza o *backcross3*); (4) obtención de familias BC<sub>3</sub> o BC<sub>4</sub> (cuarta retrocruza o *backcross4*) que se evalúan fenotípicamente y se analizan *QTLs*; (5) selección asistida por marcadores de regiones genómicas que contienen alelos favorables del donante para la producción de líneas casi isogénicas (*NILs*) en el fondo genético elite; y (6) evaluación del comportamiento agronómico de las nuevas líneas en ensayos replicados. Este proceso conduce a una mejora gradual de variedades elite a través de la introgresión de *QTLs* aportados por algún

pariente silvestre, combinando los estudios de *QTLs* con el desarrollo de diferentes líneas mejoradas (Grandillo y Tanksley, 2005). Esta metodología presenta varias ventajas en comparación con los análisis convencionales de *QTLs*: (1) Se reduce la probabilidad de detectar *QTLs* con interacciones epistáticas entre alelos del padre silvestre debido a la alta proporción del genoma elite recurrente en las retrocruzas utilizadas. En lugar de ello, habrá mayor posibilidad de hallar *QTLs* aditivos con más chances que funcionen según lo previsto en el contexto cultivado. (2) La partición del genoma donante en pequeños componentes permite una caracterización más precisa de los *QTLs* y sus efectos génicos. (3) Es más probable que se perciban efectos pleiotrópicos sutiles debido a la mayor homogeneidad del fondo genético. (4) Pueden identificarse aquellos alelos favorables en el germoplasma exótico que solo se manifiestan en fenotipos superiores luego de ser aislados de otras regiones del donante. (5) La población de trabajo resulta más similar a la línea elite, minimizándose efectos deletéreos del donante silvestre. (6) Es posible producir líneas casi isogénicas (*NILs*) para un *QTL* en solo una o unas pocas generaciones después de su detección. Es decir, una vez identificado un *QTL* de interés, se necesitan pocas generaciones adicionales para desarrollar líneas (llamadas *NILs*) que contengan únicamente el fragmento cromosómico del donante conteniendo el *QTL* y el resto del genoma sea isogénico al cultivar elite. Estas *NILs* son candidatas para nuevas variedades con atributos mejorados, lo cual representa una importante ventaja frente al análisis convencional de *QTLs* que puede requerir hasta cinco años adicionales para crear nuevas variedades (Tanksley y Nelson, 1996). Siguiendo el *AB-QTL análisis*, Tanksley *et al.* (1996) detectaron diversos *QTLs* con efectos favorables para caracteres agronómicos y desarrollaron nuevas líneas con aportes de *S. pimpinellifolium* LA1589, mostrando los beneficios de esta metodología y la contribución de la especie silvestre a la mejora del tomate cultivado.

La estrategia a seguir en un programa de mejoramiento es una elección muy importante, en la que influyen diversos factores como los objetivos, los costos, el tiempo y los recursos disponibles, las oportunidades, los criterios del mejorador, entre otros. Los marcadores moleculares se convierten en una apreciada herramienta para la selección asistida (*MAS*, *Marker Assisted Selection*) dentro de un programa de mejoramiento, ya que una vez que se detectan marcadores estrechamente ligados a genes o *QTLs* pueden usarse los alelos marcadores específicos para identificar los individuos que llevan esos genes o *QTLs* de interés. En esencia, el marcador se emplea como criterio de selección indirecta, permitiendo la determinación de un carácter basado en el genotipo del marcador asociado en lugar del rasgo en sí (Foolad, 2007).

La selección asistida por marcadores puede aumentar en gran medida la eficiencia y eficacia en el mejoramiento en comparación con los métodos tradicionales. En el caso del *retrocruzamiento asistido por marcadores*, se utilizan marcadores estrechamente ligados a un *QTL* de interés, junto con marcadores uniformemente espaciados en el resto de los cromosomas. La selección de plantas en una retrocruza se lleva a cabo en base a la presencia de *QTLs* de importancia y al mismo tiempo que posean el menor porcentaje de alelos del progenitor donante en el resto de los marcadores distribuidos en el genoma. Los ahorros de tiempo con esta metodología pueden ser considerables en relación al retrocruzamiento convencional. Se estima que de seis a ocho generaciones de retrocruzas son necesarias para recuperar el genoma del padre recurrente a través de procesos convencionales: considerando poblaciones grandes, la proporción teórica del genoma recurrente después de  $n$  generaciones de retrocruzas es dada por:  $(2n+1)/2^{n+1}$  (Tabla II.1). Sin embargo, si se utilizan marcadores moleculares la introgresión de *QTLs* y la recuperación del genoma del progenitor recurrente pueden acelerarse (Collard *et al.*, 2005).

**Tabla II.1-** Porcentaje teórico del genoma recurrente recuperado luego de diversas retrocruzas por métodos tradicionales.

Generación	Genoma del padre recurrente (%)
BC <sub>1</sub>	75.0
BC <sub>2</sub>	87.5
BC <sub>3</sub>	93.8
BC <sub>4</sub>	96.9
BC <sub>5</sub>	98.4
BC <sub>6</sub>	99.2

Así, por ejemplo, para una generación BC<sub>1</sub> se espera un porcentaje promedio del genoma del padre recurrente del 75 %, no obstante algunas plantas recuperarán más del genoma recurrente y otras menos. Los marcadores moleculares permiten distinguir estas plantas, facilitando el avance hacia la recuperación del genoma recurrente. El genotipado sumado al fenotipado de las poblaciones de retrocruzas posibilita detectar plantas con introgresiones de interés y a su vez con un número mínimo de regiones del dador no deseadas, a partir de las cuales se pueden derivar nuevas líneas en un corto período, con mayor eficacia y rapidez (Tanksley y Nelson, 1996). De hecho, diversos estudios han mostrado que estas técnicas disminuyen considerablemente el número de generaciones necesarias para el desarrollo de nuevos materiales respecto a métodos tradicionales. Se ha indicado que después de una genotipificación y selección en la BC<sub>1</sub> se requieren solo dos ciclos adicionales de

retrocruzamientos acompañados de selección genotípica y fenotípica, pudiéndose hallar precursores de diversas *NILs* en la generación  $BC_3$  (Eshed y Zamir, 1995). Según Tanksley y Nelson (1996), aplicando esta metodología se pueden derivar *NILs* directamente de las generaciones  $BC_3$ - $BC_5$ , aún con un número relativamente pequeño de plantas. De esta manera, y siguiendo las bases del *AB-QTL análisis*, el empleo de información fenotípica y molecular dentro de un programa de mejoramiento basado en retrocruzas puede brindarnos numerosos beneficios, logrando un proceso más dirigido y optimizando espacios y recursos en el desarrollo de nuevas variedades.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

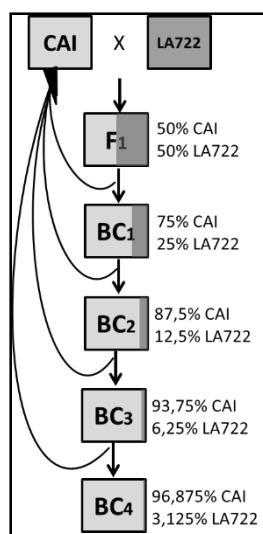
---

- Obtener la tercera retrocruza (BC<sub>3</sub>) del cruzamiento entre el cultivar Caimanta y la accesión LA722 de *S. pimpinellifolium*, mediante asistencia de marcadores moleculares y caracteres fenotípicos.
- Evaluar la generación BC<sub>3</sub>, derivada del cruzamiento entre Caimanta y LA722, mediante marcadores moleculares de ADN y caracteres fenotípicos de calidad de fruto.
- Detectar *QTLs* asociados a caracteres de la calidad de fruto, en la generación BC<sub>3</sub>, y validar las asociaciones halladas, a través de la comparación en las diversas generaciones del cruzamiento entre Caimanta y LA722.
- Avanzar hacia la cuarta retrocruza (BC<sub>4</sub>) del cruzamiento entre el cultivar Caimanta y la accesión LA722 de *S. pimpinellifolium* para alcanzar líneas casi isogénicas a Caimanta.
- Conseguir diversas líneas casi isogénicas a Caimanta (*NILs*) con introgresiones de la especie silvestre *S. pimpinellifolium*.
- Ampliar la caracterización molecular de las *NILs* obtenidas con nuevos marcadores de tipo *INDELs* y algunos marcadores funcionales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### MATERIAL VEGETAL

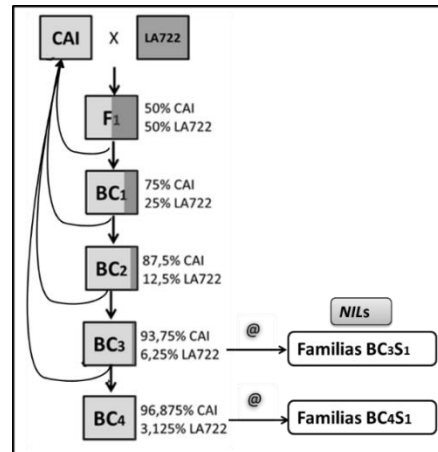
Previo a este trabajo, se realizó el cruzamiento inicial entre Caimanta de *S. lycopersicum* (CAI) y LA722 de *S. pimpinellifolium*, y luego empleando a Caimanta como parental recurrente se consiguieron las generaciones BC<sub>1</sub> y BC<sub>2</sub> correspondientes (Pereira da Costa, 2012). A continuación, como objetivos específicos de esta tesis, se avanzó en las generaciones de retrocruzas hacia Caimanta. Siguiendo la estrategia diseñada con asistencia de marcadores moleculares y caracteres fenotípicos, se obtuvieron las generaciones BC<sub>3</sub> y BC<sub>4</sub> del cruzamiento entre Caimanta y LA722. En la Figura II.1 se muestra el esquema de cruzamientos para este proceso y los porcentajes teóricos esperados del genoma de cada progenitor en cada generación. Sin embargo, la selección asistida nos permite avanzar más rápido y más eficientemente en la selección de plantas de interés y en la recuperación del genoma del padre recurrente.



**Figura II.1-** Diagrama de cruzamientos para la obtención de las generaciones BC<sub>3</sub> y BC<sub>4</sub> a partir del cultivar Caimanta (CAI) de *S. lycopersicum* y LA722 de *S. pimpinellifolium*. Distintos tonos de gris indican el porcentaje teórico del genoma de cada progenitor en cada generación.

Siguiendo esta metodología se lograron obtener líneas casi isogénicas (*NILs*) a Caimanta, a partir de las generaciones BC<sub>3</sub> y BC<sub>4</sub>. Es decir, la selección asistida posibilitó la identificación en la generación BC<sub>3</sub> y/o BC<sub>4</sub> de plantas con solo un segmento de LA722 introgresado (en base a los marcadores *SSR* analizados) en el contexto genético de Caimanta. Por tratarse de una retrocruza hacia el progenitor cultivado, el segmento proveniente de la

especie silvestre se presenta en condición heterocigota. Por consiguiente, la obtención de la *NIL* homocigota requirió la identificación, en la autofecundación de plantas homocigotas, para los alelos del dador en el segmento de interés, y homocigotas para los alelos del padre recurrente en todas las otras regiones genómicas no ligadas (Figura II.2).



**Figura II.2-** Diagrama de cruces para la obtención de las *NILs* a partir del cultivar Caimanta (CAI) y LA722. Distintos tonos de gris indican el porcentaje teórico del genoma de cada progenitor en cada generación.

Todos los cruces se realizaron en forma manual siguiendo la técnica descrita por Rick (1973). La emasculación de las flores femeninas se realizó aproximadamente un día antes de la apertura de la flor (estimado por el cambio de color de la corola de amarillo pálido a amarillo crema). Con ayuda de una pinza se eliminaron los estambres, dejando únicamente los órganos femeninos de la flor, protegidos por los pétalos y sépalos. Para llevar a cabo la polinización, se tomó una flor completamente madura del parental masculino (color de la corola amarillo intenso) y, tras realizarle una incisión en el cono de anteras, se extrajo el polen utilizando una pinza (Figura II.3). A continuación, se depositó el polen sobre el estigma de las flores femeninas previamente emasculadas. Finalmente, las flores polinizadas se ensobraron para evitar la llegada de polen no deseado, ya sea mediante insectos polinizadores o por el viento. Los sobres fueron retirados aproximadamente una semana después de la polinización para permitir el crecimiento del fruto.



**Figura II.3-** Imágenes de la metodología para los cruzamientos dirigidos: emasculación de flores que serán utilizadas como progenitor femenino y captura de polen de flores del progenitor masculino.

Luego de obtenidas las semillas, se sembraron en *speedlings* para su germinación en los meses de Julio/Agosto (*campañas 2011/2012 y 2013/2014*). Los plantines fueron trasplantados en invernadero, en un diseño completamente aleatorizado, cuando presentaron cuatro hojas verdaderas totalmente desplegadas. La distancia entre plantas fue de 35 cm y la distancia entre surcos de 1 m (Figura II.4). Previo al trasplante, se realizó una fertilización orgánica del suelo. Las plantas fueron regadas tres veces por semana, lo suficiente para evitar el estrés durante el período de crecimiento.



**Figura II.4-** Imágenes de los *speedlings* utilizados para la germinación y del invernadero.

### - Generación BC<sub>3</sub>

En la *campaña 2010/2011*, diversas plantas de la generación BC<sub>2</sub> fueron cruzadas hacia el progenitor recurrente Caimanta obteniéndose la semilla BC<sub>3</sub>. Para los cruzamientos manuales se empleó el cultivar Caimanta como progenitor masculino y las diferentes plantas BC<sub>2</sub> como progenitores femeninos. Todos los cruzamientos BC<sub>2</sub> x Caimanta que resultaron exitosos y dieron semilla fueron estudiados (un total de 43). De este modo, en la *campaña 2011/2012* se procedió a la evaluación de 43 familias BC<sub>3</sub>, sembrándose entre cinco y diez plantas por familia bajo invernadero, en un diseño completamente aleatorizado. De cada una de las plantas BC<sub>3</sub> se recolectó tejido de hoja para la caracterización molecular y se tomaron datos fenotípicos de caracteres de calidad de fruto.

Para la caracterización molecular se evaluaron 274 plantas, correspondientes a las 43 familias de la tercera retrocruza (BC<sub>3</sub>), y se emplearon marcadores de ADN del tipo *SSR*. Para la evaluación de los caracteres fenotípicos se estudiaron 178 plantas, correspondientes a las 40 familias BC<sub>3</sub> que prosperaron, y un total de 1.722 frutos.

#### **- Obtención de líneas casi isogénicas (generaciones BC<sub>3</sub> y BC<sub>4</sub>)**

Como se mencionó anteriormente, la selección de plantas asistida con marcadores *SSR* y caracteres fenotípicos dirigió el avance en las generaciones de retrocruzas y la obtención de *NILs*. Una vez alcanzada la tercera retrocruza, diversas plantas BC<sub>3</sub> seleccionadas se retrocruzaron hacia Caimanta (nuevamente actuando como progenitor masculino) lográndose la cuarta retrocruza (BC<sub>4</sub>). La evaluación de las generaciones BC<sub>3</sub> y BC<sub>4</sub> posibilitó la identificación de plantas con la introgresión de algún segmento de *S. pimpinellifolium* y altos porcentajes del genoma de Caimanta recuperado. El avance en las retrocruzas se apoyó en información molecular y fenotípica para escoger las plantas más promisorias para continuar en cada generación. En una primera etapa, las plantas que llevaban alelos de *S. pimpinellifolium* en marcadores de interés eran preseleccionadas. Luego, en una segunda etapa, se elegían aquellas con la menor proporción de alelos del dador, en el resto de los marcadores fuera de la región diana u objetivo. Cuando aun así se disponía de diversas plantas con una condición similar, se utilizaba la información de los caracteres fenotípicos de cada planta como criterio de selección conjunto. De este modo, se fue avanzando en las retrocruzas hasta alcanzar líneas casi isogénicas (*NILs*) a Caimanta. Es decir, hasta obtener diversas plantas con regiones únicas introgresadas de *S. pimpinellifolium* LA722 en el contexto genético del cultivar Caimanta.

#### **CARACTERES FENOTÍPICOS**

Siguiendo las técnicas detalladas en la sección Materiales y Métodos del Capítulo I, en cada planta se cosecharon de 10 a 12 frutos al estado *pintón* y se evaluaron los caracteres: peso (g), diámetro (cm), altura (cm), forma (altura/diámetro) y vida poscosecha (días). En frutos cosechados al estado rojo maduro, se midió: el contenido en sólidos solubles (°Brix), la firmeza y el color (a través del porcentaje de reflectancia (L) y el cociente a/b). La firmeza y el color del fruto se determinaron en seis frutos por planta, mientras que para el contenido en sólidos solubles la unidad experimental fue una muestra de jugo, obtenida a partir de 3 a 8 frutos por planta, y se realizaron tres repeticiones a partir de tres muestras de jugo independientes.

## **MARCADORES MOLECULARES**

En los análisis de las generaciones BC<sub>3</sub> y BC<sub>4</sub> se emplearon los marcadores moleculares *SSR* descritos en el Capítulo I. Para evaluar cada generación, se examinaron solo aquellos marcadores *SSR* que resultaron heterocigota en la planta que dio origen a la familia en estudio. El resto de los marcadores habría fijado los alelos de Caimanta y, por lo tanto, no estarían segregando en la progenie derivada. Para la extracción de ADN, la amplificación por *PCR* y la visualización de los *SSR* se siguieron los procedimientos detallados en la sección Materiales y Métodos del Capítulo I.

### **- Caracterización molecular complementaria mediante INDELS y marcadores funcionales**

Durante el desarrollo de esta tesis, el grupo de trabajo realizó la secuenciación del genoma de Caimanta y de la accesión LA722 de *S. pimpinellifolium*. La obtención de estas secuencias genómicas permitió estudiar en forma precisa el polimorfismo existente entre los progenitores y confeccionar nuevos marcadores moleculares (Cambiaso *et al.*, 2015). De la comparación entre las secuencias de ambos genomas se consiguió una lista de inserciones y deleciones (*INDEL*), las cuales fueron utilizadas para el desarrollo de marcadores moleculares de tipo *INDEL*. En estos marcadores, el polimorfismo derivado de las inserciones/deleciones que diferencian los genomas es revelado mediante una amplificación por *PCR* con *primers* que flanquean la región y posterior resolución de los fragmentos de diferentes tamaños en geles de agarosa. Sus ventajas radican en la simplicidad del proceso y la facilidad de obtención por *PCR* y de visualización mediante geles de agarosa, sumadas a la posibilidad de realizar *PCR* múltiples y correr varios *INDELS* en un mismo gel de agarosa. En la tabla II.2 se presentan las secuencias de los *primers INDELS* empleados y su ubicación cromosómica. Se analizaron entre cuatro y siete *INDELS* por cromosoma, distribuidos equitativamente en el genoma, y cubriendo otras regiones genómicas a las ya marcadas o estudiadas por los *SSR*.

**Tabla II.2-** Marcadores *INDELS* y *funcionales* utilizados para la caracterización de las *NILs*, indicando su ubicación cromosómica, el rango de tamaño entre alelos silvestres y cultivados y la secuencias de los *primers forward* y *reverse*.

Marcador	Cr	Tamaño	Secuencia Primer Forward (5'-3')	Secuencia Primer Reverse (5'-3')
IND1-0149	1	106-133	TTGTTTCTAAGTTTIGATTTCATCACC	GGTCTACTCCTTTTTCAAAACCTCG
IND1-0317	1	228-261	TGTAACTTTTCCCTCTCAG	AACACAGCACAGAACCAACG
IND1-0512	1	103-127	GAAAATCTACTTGTAAGCACACTCG	AAACTCGCGTTTAAAAATGGTG
IND1-8018	1	248-275	AAACAAGGGGTGGAACCTGTG	TATTCAGCATCTGGGCATGT
IND1-9461	1	405-450	CATGACCTCGTAACTGCCCTC	ACAGATTGGGACCAGTGTACT
IND2-2019	2	223-264	CAGGGAGGCTTCTCAACATAA	GCATGGATGTCCTCCATCTT
IND2-3976	2	208-240	GGCTGAATCTTTCCATTTT	TCATCAACTTTTAGTGGCGTTC
IND2-4384	2	118-136	TGTTACAACTCACCCACTGC	TGATTTTCATAACAAAGTAATGCTGCT
lc	2	260-235	GCCGAACACATCAACATTTT	CCTTTTCCTAAAAGATTTGGCATGAAG
IND2-4465	2	163-142	TGGTGAATTGTAATAACTTGTCTTG	CAGCTTGGCTAAGCATACTTTT
fw2.2	2	168-149	CATATAAAGTGTACTGACCGTCA	CTGTCCTATTCAAGAGGTAATGAG
IND3-0117	3	417-478	GGGAAGCAAAGTGTCTTCA	GCCATAAGCCAAGTCACTTCA
IND3-0448	3	222-250	AGAAGATTCCGCGCCATTAT	GCCACATGTAGGGTCTTTGG
IND3-5470	3	100-115	TGTTGGTTTTGCAAATCAGG	TGCAGCCAGAGTTCAGACAT
IND3-6289	3	207-230	TGCTCCAAGAACTCCGGTAA	ATGGTTCGATCTTCGTTGC
IND3-7057	3	130-147	TCCAGACCATATACAGCACCTAAA	CTCCAATGGGACCCTGTCT
fw3.2	3	326-304	AAAGTCGAATAAATTAGATGAACCTTGA	ATTGGGTCTCTCCTCGCTCT
IND4-0238	4	141-118	TCACAATGGTAGGGGTAAGGTC	CAAAGCATGTCAAGGTCTTCAA
IND4-0954	4	238-269	CAGCAATCCCTTGAAAGTGC	AATCTTTCCCAAGACATGC
IND4-3519	4	400-449	AGGCATGTGCTTCCATTTTT	ACAACCTGGCTACGATCCTGAA
IND4-4286	4	402-446	AAGACTGGTGTGCGGTGATT	CCAATTTGAGAGCGATAGGC
IND4-6168	4	212-240	GGGAGATAACCTGCCATCAG	TGCACCAGAGGTAAGTTAGGC
IND5-0325	5	119-142	CGGAACCGGCTTCTTTACC	CGTGTGTAAGTTTTGTGCATTG
IND5-0697	5	203-230	CACCTCTCCGCTCCATCATT	CATGTTTTTGCCATGGATGA
IND5-1450	5	408-451	TTGGAGGCATGCTCACTCCTT	GCAATTTCCGCCCTTCTAC
IND5-4612	5	209-248	AGGTGATGGCTTTGAGTGTG	CACATCAATCTGCTCCATGC
IND5-5411	5	388-450	CATCAGACACCTCAAACACGA	GAGAATTTGACACTCGAAACGA
IND5-6112	5	143-113	CGGTGGGAGGTGAAAGGTA	CCACTTGTTTTCCAAATCAATACA
IND6-3385	6	208-236	AATCGCAACTGCAAAAAGAAGA	TATGGGCAAAAATGGATTGG
IND6-3717	6	403-460	TGGTTCATCTATGCCGGATT	TCTCCAAATGCCAAGACAAA
IND6-4186	6	129-108	GGTTGGAATAAATTCTAAAACAACATT	ACAATGCTTCTCTATTAGGCAAA
IND6-4561	6	139-124	TGGTTTCAATGGGAGATTCA	CGTGTCTAGCAATGATGGTG
IND7-0050	7	150-132	CTTGACCTATTAGCCAAGTTTATAC	TCTTTTCCAATGATCTAGCTGAGTA
IND7-0918	7	225-264	GTCCCAAACCAGAAATCGAGA	CATTTTGCACCACATCCAGA
IND7-1436	7	211-250	GAGAACTTGTTCGCGTGTCTTG	CAGACGACAACCGTGCAGGA
IND7-4808	7	401-451	GCTGACTGGTCTGGATGGAT	CACGTATGAATTGGGCAACA
IND7-6266	7	204-232	CCAGCAGTTGTGTCATTAGAGC	AAATAAGTTGGCGGTCATGAT
IND7-6489	7	122-143	GGGAATGGAATGATGGTTTG	CATCCAGGCCAGGTTGAA
IND7-6590	7	133-158	GTTGTGAACTTAACCGTTCAAAG	CCCATGCTTGGAAATTTGTGA
IND8-0171	8	119-99	AAGATAGCAAGGAAGTTGAAGATCA	AGTTGAACCTGCCGTGTGAA
IND8-0357	8	110-95	CTCTGCTGCTGCTGTCGT	CTCACTACTCTCACCCTGACC
IND8-5616	8	389-445	CACCTCTCAAGTCTTGIGTCATATTCA	CCTCTAATTTCTGGCAAGTGTA
IND8-6049	8	386-446	ATGAATAAAATATAGGAAGTCGCACA	GAAAGAGCGAGCCTGCTG
IND8-6206	8	213-250	CCTCTGCTTGTATCCCTTC	ACGCTTAGCTTACAACACTACATCTTG
IND8-6582	8	224-258	AGCGAAAAGTGTACCCATTGA	GGGTTGCATGAAATCTGGAC
IND9-0093	9	124-149	AACACGATGGGGTGAAATGT	GGAAGAATATTTTCATGATGATTTTGGAG
IND9-0232	9	156-138	ATGACTTAATTCGTTAACATATGACTG	GACTCACATAAATTGAAGTTCATTCG
IND9-0744	9	402-445	CTCTATGACCAGGCCAACG	TTGGAGTTGTCATTTTCTGTGG
IND9-5909	9	401-453	AAAATGGGAAATGGCCAAAC	AGACAGACCCTGCTAATACCA
IND10-0015	10	141-122	TTGAGAATGAGGGGTGTTC	TAACCAACCCACGACTTAGCC
IND10-0429	10	459-407	ATATTCGGCGTCATTTAGGC	GGTCGATCGTTTACTTTTCGAT
IND10-0939	10	213-243	CACAAACTTGCACAACCTCAA	TGACCTTTATTGAGGCTGGTG
IND10-6196	10	114-93	GGGGTCAGTGGAACAGAAGA	TCCTTCCCCACCCTCTTTTA
IND11-0017	11	134-114	CATTCCTGTGAAGGCAATATGA	GATGTGCTATCAAATAGATGGATGA
IND11-0530	11	204-232	TTTATCTTGCAATTTGGTGTGG	ACCCAGCTAAAAGAATGAAGTCG
IND11-4108	11	383-446	GTTCATTAATTTTGTGGGGAGT	TGTTTAGTCGAAACTTCACTATCTCC
IND11-5266	11	209-235	CAATTGACACAGTGGAGATAAGTTG	TGCATTATCTTGGCAGAAA
IND11-5323	11	130-111	AAGACAAACATGCCAGCCTTA	TTGGAATAAACAACCAACCAATCA
fas	11	466-335	CCAATGATAATTAAGATATTGTGACG	ATGGTGGGGTTTCTGTTC
IND12-0038	12	127-108	GACGAAGCATCTCAGATTCACA	TCTTTTGTTGGGTTTTGTCTC
IND12-0379	12	221-247	AGGGTCTGGCTTAGGCAAAT	TGCTATTTTTATGAGCAGATGGTT
IND12-0670	12	405-445	AGGCTTGTTTGGGTGTATCG	TGCTAACAAACAAGGCATTC
IND12-1197	12	235-270	GGCATTCTTAGGCAACAGC	GCCAGCTAGCTCGATTTGTC
IND12-6230	12	120-141	ACCTCATGTTCTCAACCCACTT	AATCAAGGATAAGTTGTGGTGTCT

Cr: cromosoma. El tamaño de los alelos es indicado en pares de bases.

Para los procedimientos moleculares se utilizaron protocolos estándares y puestos a punto en el laboratorio. En la reacción de *PCR* para los *INDELS*, cada muestra (20 µl de volumen final) consistió de 40 ng de ADN genómico, 2,5 mM de dNTPs, 40 mM de cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>), 10 µM de cada primer, 2 µl de Taq buffer 10X y 1,5 unidades de Taq polimerasa. Se utilizó el siguiente protocolo de amplificación: una desnaturalización inicial de 5 min a 94 °C y luego se repitieron los siguientes tres pasos: 30 s a 94 °C, 30 s a la *temperatura de annealing* y 1 min a 72 °C durante 32 ciclos, finalizando con un paso de elongación de 5 min a 72 °C. La *temperatura de annealing* varió de acuerdo al *INDEL* amplificado, encontrándose en un rango de 52 a 56 °C.

La visualización de los productos de *PCR* se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 %, 2 % o 3 % (dependiendo de la diferencia en los tamaños de los productos de amplificación). Para la siembra se añadieron 4 µl de *loading* buffer 5X a 15 µl del producto de *PCR*. Los geles fueron teñidos con SYBR Safe y la separación se llevó a cabo con un voltaje de 120 V en una cuba de electroforesis horizontal.

Los *marcadores funcionales* están basados en el polimorfismo de genes que producen un cambio fenotípico. Son *QTLs* cuyos genes subyacentes ya fueron identificados y pueden proporcionar información muy útil en la caracterización de nuevos materiales. En este trabajo se disponía de marcadores funcionales para genes que controlan el tamaño y la forma del fruto: *fw2.2* (*fruit weight 2.2*; Frary *et al.*, 2000), *fw3.2* (*fruit weight 3.2*; Chakrabarti *et al.*, 2013), *fas* (*fasciated*; Rodríguez *et al.*, 2011) y *lc* (*locule number*; Muños *et al.*, 2011). Estos marcadores funcionales fueron empleados, junto a los *INDELS*, para complementar el estudio de las *NILs* obtenidas (Tabla II.2).

### **ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

Para el estudio de los caracteres fenotípicos se siguieron las metodologías clásicas de la genética cuantitativa (Kearsey y Pooni, 1996). La distribución normal de los caracteres cuantitativos se verificó a través de la prueba de Shapiro-Wilk (1965). En las distintas generaciones se analizaron los patrones de distribución de frecuencias de las variables y se estimó la variancia genética, calculándose los porcentajes de variancia fenotípica atribuible a

variancia genética (%VG/VF) mediante un análisis de la variancia (ANOVA) (adaptado de Mariotti y Collavino, 2014).

Para los análisis moleculares, y dada la naturaleza codominante de los microsatélites, se probó la segregación mendeliana esperada para una generación de retrocruza (BC<sub>x</sub>) (1:1, homocigotas CC: heterocigotas CP) a través de una prueba de  $\chi^2$  (Snedecor, 1964).

El porcentaje de germoplasma de Caimanta recuperado fue calculado a partir de los datos de los *SSR* evaluados, y se obtuvo como:

$$\% GR = \left[ \sum_{i=1}^N \left( \frac{n_{CC} \times 2 + n_{CP}}{n_M \times 2} \times 100 \right) \right] \times \frac{1}{N}$$

Donde % *GR* es el porcentaje de germoplasma del padre recurrente (Caimanta) recuperado en una determinada generación, *nCC* el número de marcadores *SSR* que fueron homocigotas para el alelo de Caimanta en el individuo *i*, *nCP* el número de marcadores *SSR* que fueron heterocigotas para el individuo *i*, *nM* número totales de marcadores *SSR* evaluados en el individuo *i* y *N* es el número de individuos evaluados. Además, con base en esto, se graficó la distribución de frecuencias para el porcentaje del genoma de Caimanta recuperado en cada planta BC.

La asociación entre los marcadores moleculares *SSR* y los caracteres fenotípicos se determinó a través del método de un solo punto (*single point analysis*, Tanksley, 1993), como se especificó en la sección Materiales y Métodos del Capítulo I. Cuando más de un marcador se asoció a un mismo carácter, se aplicó un ANOVA a dos criterios de clasificación para comprobar el efecto conjunto de los marcadores y segregar el efecto de la interacción.

Para la validación de regiones genómicas asociadas a caracteres de calidad de fruto, se compararon los *QTLs* encontrados previamente en la BC<sub>1</sub>, BC<sub>1</sub>S<sub>1</sub> o BC<sub>2</sub> del cruzamiento (Pereira da Costa *et al.*, 2013) y los detectados en este trabajo, tanto en las generaciones BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> como BC<sub>3</sub>, con una probabilidad menor a 0,05. Un *QTL* se consideró validado si dicha asociación se halló en dos o más generaciones diferentes.

Luego de la caracterización molecular complementaria de las líneas obtenidas, el nuevo porcentaje de germoplasma de Caimanta recuperado fue calculado, a partir de los datos de los todos los marcadores evaluados (*SSR*, *INDELS* y *funcionales*), empleando la fórmula descrita anteriormente.

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el *software* InfoStat Versión 1.0 (Di Renzo *et al.*, 2001).

## RESULTADOS

### **PARTE I: ANÁLISIS DE LA GENERACIÓN BC<sub>3</sub>**

#### **- Evaluación de caracteres fenotípicos en la generación BC<sub>3</sub>**

La prueba de Shapiro-Wilk verificó que todos los caracteres cuantitativos se distribuyeron normalmente, con valores de W cercanos a 1 y no significativos, con excepción de la vida poscosecha de los frutos. Para los análisis realizados, la vida poscosecha fue transformada con la función logarítmica. La Figura II.5 muestra frutos representativos de diferentes plantas de la generación BC<sub>3</sub>. Se puede observar la segregación de tamaño, forma y color para las familias estudiadas.



**Figura II.5-** Frutos correspondientes a diferentes plantas de la generación BC<sub>3</sub>.

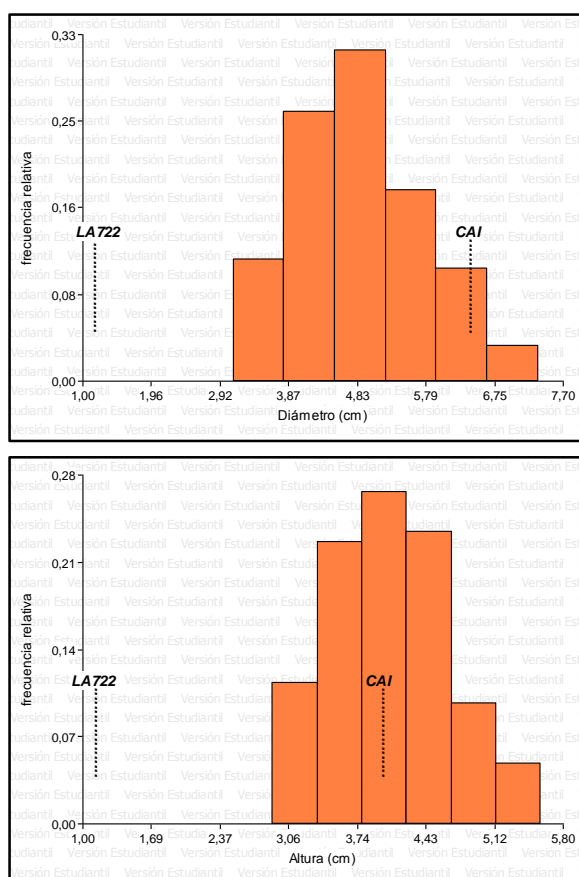
Como se advierte en la imagen de los frutos, en esta generación BC<sub>3</sub> se observó una importante recuperación del tamaño y peso de los frutos, lo cual coincide con lo esperado para una tercera retrocruza hacia el genotipo de mayor peso. Avalando esto, las distribuciones de frecuencias (Figura II.6) para caracteres relacionados al tamaño del fruto como el diámetro y la altura mostraron un importante sesgo hacia el progenitor cultivado. Para el peso de los frutos, los individuos también se distribuyeron más cercanos a Caimanta, con una media de 60 gramos aproximadamente. Contrariamente, la forma del fruto exhibió un sesgo en la distribución hacia el padre silvestre, apoyando una dominancia hacia LA722 en este carácter.

Para la vida poscosecha de los frutos, la mayoría de los individuos se ubicaron dentro del rango de valores comprendido entre los progenitores, sin embargo también se encontraron

algunos individuos transgresivos, incluso con valores bastante elevados de vida poscosecha. Es importante mencionar que aquellos individuos que manifestaron una vida poscosecha muy prolongada generalmente se correspondían con plantas cuyos frutos fueron de color amarillo.

En cuanto al color, en esta generación BC<sub>3</sub> se hallaron algunas plantas con frutos de color amarillo, lo cual es evidenciado en valores mínimos y, en general, negativos para el índice a/b y valores altos para L. Las distribuciones de frecuencias para los parámetros L y a/b de color mostraron dos grupos de individuos relativamente diferenciados, vinculados principalmente a la existencia de plantas con frutos rojos y plantas con frutos amarillos.

Para la firmeza, la distribución de frecuencias reveló un desplazamiento hacia el progenitor silvestre, siendo este el de mayor valor. En el caso del contenido en sólidos solubles, se observó una apertura de la variación fenotípica en la generación BC<sub>3</sub> respecto de los valores de los progenitores (Figura II.6).



**Figura II.6-** Distribución de frecuencias para los caracteres fenotípicos en la generación BC<sub>3</sub>, junto a los valores medios de los progenitores Caimanta (CAI) y LA722 de *S. pimpinellifolium* indicados en líneas punteadas.

Figura II.6- (continuación)

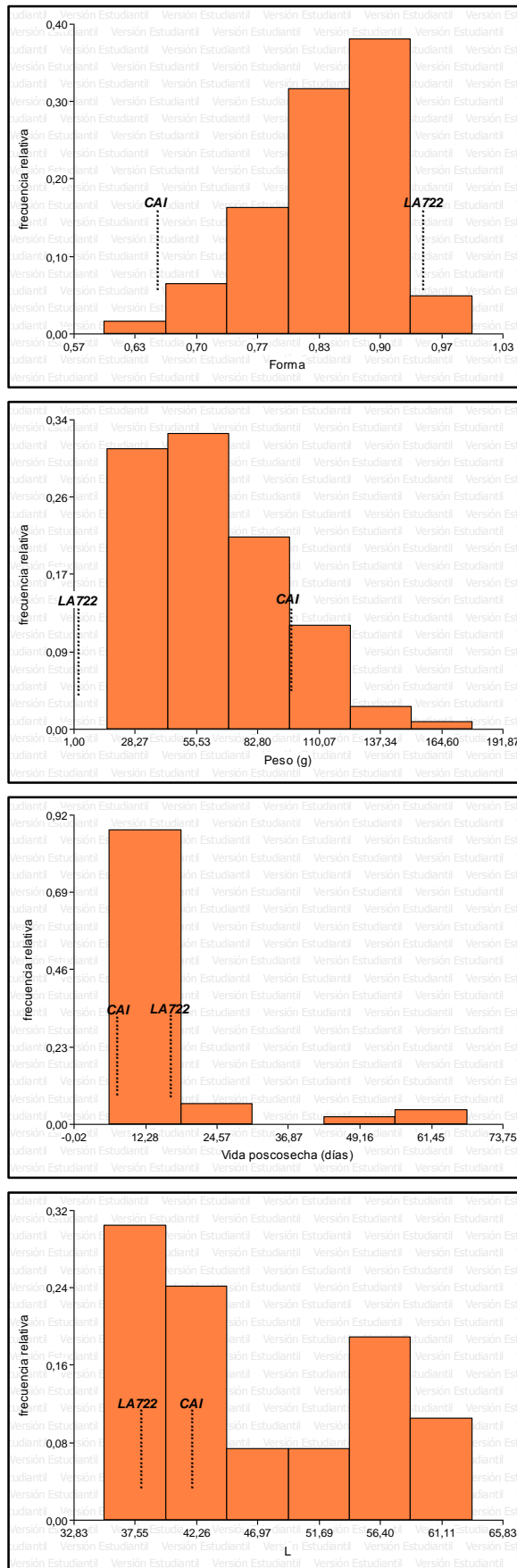


Figura II.6- Distribución de frecuencias para los caracteres fenotípicos en la generación BC<sub>3</sub>, junto a los valores medios de los progenitores Caimanta (CAI) y LA722 de *S. pimpinellifolium* indicados en líneas punteadas.

Figura II.6- (continuación)

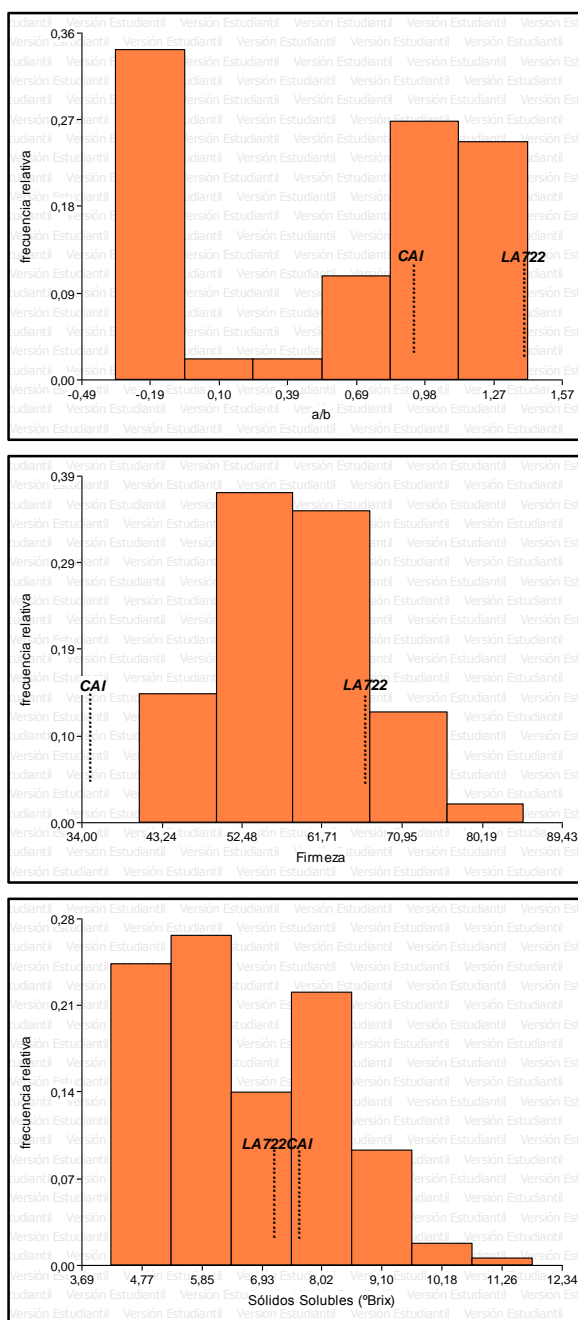


Figura II.6- Distribución de frecuencias para los caracteres fenotípicos en la generación BC<sub>3</sub>, junto a los valores medios de los progenitores Caimanta (CAI) y LA722 de *S. pimpinellifolium* indicados en líneas punteadas.

En la Tabla II.3 se muestra el valor medio junto con el error estándar para cada carácter y los valores máximos y mínimos observados en la generación BC<sub>3</sub>. Además, se indican los porcentajes de variación fenotípica atribuible a variación genética (% VG/VF) para cada variable estudiada. Los rangos de variación fueron amplios en todas las variables medidas.

**Tabla II.3-** Valores fenotípicos medios, mínimos y máximos de la generación BC<sub>3</sub>, junto al porcentaje de variación fenotípica atribuible a variación genética de cada carácter.

Carácter	BC <sub>3</sub>				
	Media	n	Mín	Máx	%VG/VF
Diámetro (cm)	4,89 ± 0,08	122	3,10	7,35	68,5
Altura (cm)	4,09 ± 0,05	122	2,90	5,58	70,5
Forma	0,85 ± 0,01	122	0,60	1,00	50,5
Peso (g)	62,76 ± 2,75	122	15,73	178,32	64,0
Vida poscosecha (días)	15,14 ± 1,73	49	6,13	67,60	68,9
L	46,56 ± 0,88	94	35,19	63,47	90,1
a/b	0,60 ± 0,06	94	-0,34	1,42	95,2
Firmeza	59,40 ± 1,25	49	40,72	85,00	43,9
Sólidos solubles (°Brix)	6,62 ± 0,12	170	4,23	11,80	89,6

**Mín.:** Valor mínimo de la variable. **Máx.:** Valor máximo de la variable. **n:** número de plantas evaluadas. **%VG/VF:** porcentaje de variación fenotípica atribuible a variación genética. **L:** porcentaje de reflectancia. **a/b:** índice de color.

La variación dentro de la generación BC<sub>3</sub> resultó significativa para todos los caracteres ( $p < 0,0001$ ) y los porcentajes de variación fenotípica atribuible a variación genética fueron elevados. Los parámetros de color (L y a/b) junto al contenido en sólidos solubles presentaron los valores más altos (90, 95 y 90 %, respectivamente), mientras que la firmeza de los frutos fue el carácter con el menor valor (44 %).

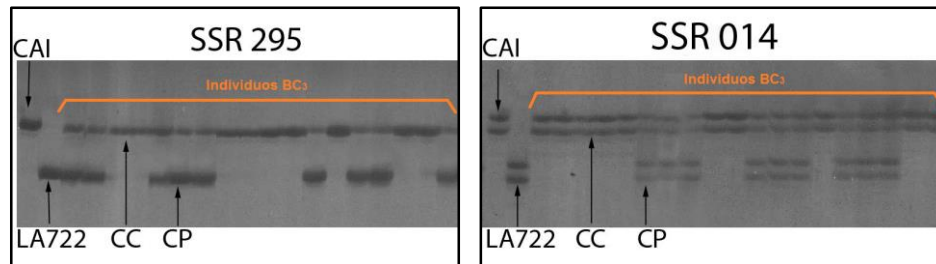
### - Caracterización por marcadores moleculares de ADN de la generación BC<sub>3</sub>

Se caracterizaron por marcadores moleculares de ADN del tipo *SSR* cada una de las plantas correspondientes a la generación BC<sub>3</sub> (total: 274 plantas). De los 28 marcadores *SSR* empleados inicialmente en las generaciones BC<sub>1</sub> y BC<sub>1</sub>S<sub>1</sub> para detectar *QTLs*, dos resultaron monomórficos en la BC<sub>2</sub>. En la generación BC<sub>3</sub> se evaluaron los 26 *SSR* restantes, analizándose en cada familia BC<sub>3</sub> solo aquellos *SSR* que fueron heterocigotas en la planta BC<sub>2</sub> que le dio origen. De los 26 *SSR* analizados, dos fijaron los alelos de Caimanta en todas las familias estudiadas (*SSR288* y *SSRH301*), mientras que el resto de los marcadores mostró segregación en algunas de las 43 familias BC<sub>3</sub> (Tabla II.4).

**Tabla II.4-** Cantidad de familias BC<sub>3</sub> en las que segregó cada marcador.

<i>SSR</i>	095	220060	288	295	598	320	014	115	162	211044	128	286	276
<b>Cromosoma</b>	1	1	1	2	2	3	3	5	5	6	6	7	7
Nº Familias BC <sub>3</sub> en que segregó el <i>SSR</i>	17	17	0	20	3	23	21	18	8	2	2	9	9
<i>SSR</i>	045	327	063	038	069	070	034	596	318	080	G036	1061	H301
<b>Cromosoma</b>	7	8	8	8	9	9	10	10	10	11	11	11	12
Nº Familias BC <sub>3</sub> en que segregó el <i>SSR</i>	19	5	7	8	7	4	3	10	11	24	12	6	0

La siguiente figura presenta, a modo de ejemplo, fragmentos de geles de acrilamida al 6 % para dos de los *SSR* examinados en la generación  $BC_3$ , donde CC son los individuos homocigotas para el alelo de Caimanta y CP son individuos heterocigotas para el *locus* microsatélite mostrado (Figura II.7).



**Figura II.7-** Marcadores *SSR295* y *SSR014* analizados en los progenitores y la generación  $BC_3$  del cruzamiento entre Caimanta de *S. lycopersicum* (CAI) y LA722 de *S. pimpinellifolium*. Las flechas indican los progenitores utilizados como testigos (CAI y LA722) y los genotipos encontrados en la generación  $BC_3$ , donde C representa el alelo de Caimanta y P el alelo de LA722 para el *locus* microsatélite.

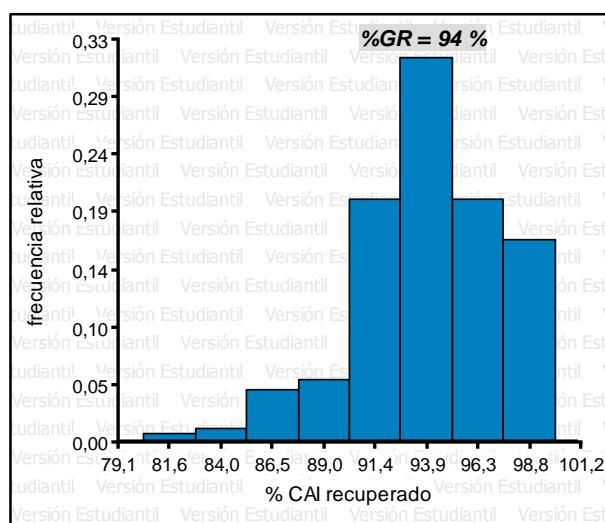
La segregación mendeliana de los *SSR* en estudio, dentro de la generación  $BC_3$ , fue analizada. La Tabla II.5 muestra la segregación para cada *SSR* en la  $BC_3$ , indicando el cromosoma donde se localiza, el número total de plantas evaluadas, el número de individuos para cada genotipo observado y el valor de  $\chi^2$ . Como se señaló anteriormente, los *SSR288* y *SSRH301* no segregaron en las plantas  $BC_3$  examinadas, habiéndose fijado en todas ellas los alelos de Caimanta. De los 24 *SSR* restantes, solo dos (8 %) mostraron segregación distorsionada, de los cuales el *SSR162* presentó un exceso de homocigotas (individuos con el genotipo de Caimanta) mientras que el *SSRG036* exhibió un exceso de heterocigotas.

**Tabla II.5-** Segregación de los marcadores *SSR* (*Simple Sequence Repeat*) en la generación BC<sub>3</sub> del cruzamiento entre CAI de *S. lycopersicum* y LA722 de *S. pimpinellifolium*.

SSR	Cr	n	nCC	nCP	χ <sup>2</sup>
SSR095	1	120	64	56	0,53ns
SSR220060	1	100	44	56	1,44ns
SSR288	1	12	12	0	no segrega
SSR295	2	140	66	74	0,46ns
SSR598	2	23	12	11	0,04ns
SSR320	3	154	77	77	0ns
SSR014	3	150	79	71	0,43ns
SSR115	5	114	61	53	0,56ns
SSR162	5	121	96	25	41,66*
SSR211044	6	12	7	5	0,33ns
SSR128	6	19	13	6	2,58ns
SSR286	7	51	24	27	0,18ns
SSR276	7	54	23	31	1,19ns
SSR045	7	126	73	53	3,17ns
SSR327	8	42	27	15	3,43ns
SSR063	8	43	23	20	0,21ns
SSR038	8	41	20	21	0,02ns
SSR069	9	54	34	20	3,63ns
SSR070	9	30	17	13	0,53ns
SSR034	10	23	15	8	2,13ns
SSR596	10	60	31	29	0,07ns
SSR318	10	60	30	30	0ns
SSR080	11	169	83	86	0,05ns
SSRG036	11	92	36	56	4,35*
SSR1061	11	51	23	28	0,49ns
SSRH301	12	91	91	0	no segrega

Cr: cromosoma. n: número total de individuos. nCC: número de individuos homocigotas para el alelo de Caimanta (C). nCP: número de individuos heterocigotas. χ<sup>2</sup>: valor de chi-cuadrado. ns: no significativo. \*: significativo (p < 0,05). En amarillo se destacan aquellos SSR que no presentaron segregación 1:1 en la generación BC<sub>3</sub>.

El porcentaje del genoma del padre recurrente recuperado (% GR) en la generación BC<sub>3</sub> fue 94 %, variando entre el 80 % y el 100 % (Figura II.8). Este porcentaje coincidió con el teórico esperado para una tercera retrocruza (93,75 %). En la Figura II.8 se presenta la distribución de frecuencias del porcentaje de Caimanta recuperado en cada planta.



**Figura II.8-** Distribución de frecuencias para el porcentaje de genoma de Caimanta recuperado en la generación BC<sub>3</sub>.

**- Detección de QTLs en la generación BC<sub>3</sub>**

En el estudio de las asociaciones entre los datos fenotípicos y moleculares, para cada marcador se consideraron todas aquellas plantas de la generación BC<sub>3</sub> que pertenecían a familias que segregaban para el *locus* marcador en cuestión, las cuales derivaban de plantas BC<sub>2</sub> heterocigotas en la región. El análisis de los caracteres fenotípicos junto a los marcadores moleculares en la generación BC<sub>3</sub> permitió identificar diversas regiones genómicas asociadas a caracteres de calidad de fruto en esta retrocruza avanzada. Se detectaron **20 QTLs** asociados a los caracteres de calidad con  $p < 0,05$ , de los cuales nueve fueron significativos al 1 % y solo uno al 0,1 % (Tabla II.6). Es importante destacar que 15 de estos 20 QTLs (75 %) habían sido hallados previamente en alguna generación anterior del cruzamiento (indicados en amarillo en la Tabla II.6).

**Tabla II.6-** Asociaciones detectadas entre marcadores SSR y caracteres fenotípicos en la generación BC<sub>3</sub> con  $p < 0,05$ .

SSR	Cr	Carácter	Media CC	nCC	Media CP	nCP	R <sup>2</sup>	p
1 095	1	Diámetro	4,89 ± 0,12b	40	4,36 ± 0,12a	38	0,11	0,0032
2 220060	1	Diámetro	4,88 ± 0,14b	26	4,40 ± 0,12a	31	0,11	0,0115
3 G036	11	Diámetro	6,10 ± 0,22b	13	5,16 ± 0,18a	20	0,26	0,0022
4 095	1	Altura	4,07 ± 0,09b	40	3,79 ± 0,09a	38	0,06	0,0258
5 095	1	Forma	0,84 ± 0,01a	40	0,88 ± 0,01b	38	0,10	0,0057
6 220060	1	Forma	0,84 ± 0,01a	26	0,87 ± 0,01b	31	0,08	0,0347
7 034	10	Forma	0,87 ± 0,01b	6	0,74 ± 0,02a	3	0,81	0,0009
8 G036	11	Forma	0,77 ± 0,02a	13	0,86 ± 0,01b	20	0,28	0,0014
9 095	1	Peso	61,87 ± 3,83b	40	46,02 ± 3,93a	38	0,10	0,0050
10 220060	1	Peso	60,02 ± 4,04b	26	46,90 ± 3,7a	31	0,09	0,0200
11 G036	11	Peso	104,11 ± 8,47b	13	72,13 ± 6,83a	20	0,22	0,0062
12 115	5	Vida poscosecha	10,73 ± 3,48a	15	21,62 ± 3,27b	17	0,22	0,0072
13 095	1	Color L	46,91 ± 1,53b	26	42,33 ± 1,59a	24	0,08	0,0433
14 080	11	Color L	43,81 ± 1,33a	32	47,93 ± 1,25b	36	0,07	0,0273
15 080	11	Color a/b	0,82 ± 0,1b	32	0,44 ± 0,1a	36	0,09	0,0107
16 095	1	Firmeza	63,43 ± 1,75b	20	56,85 ± 1,67a	22	0,16	0,0095
17 596	10	Firmeza	62,70 ± 1,51b	28	55,00 ± 1,74a	21	0,19	0,0016
18 318	10	Firmeza	61,89 ± 1,66b	26	56,59 ± 1,76a	23	0,09	0,0335
19 220060	1	Sólidos solubles	6,60 ± 0,25a	31	7,43 ± 0,21b	46	0,08	0,0127
20 069	9	Sólidos solubles	5,80 ± 0,32a	15	7,12 ± 0,44b	8	0,21	0,0262

Cr: cromosoma. Media CC: valor medio del carácter para individuos homocigotas para alelos de Caimanta. nCC: número de individuos homocigotas. Media CP: valor medio del carácter para individuos heterocigotas. nCP: número de individuos heterocigotas. R<sup>2</sup>: fracción de la variación fenotípica explicada. p: probabilidad asociada. Letras distintitas indican diferencias significativas entre las medias según el test de Duncan ( $p < 0,05$ ). En gris se destacan aquellas asociaciones detectadas con  $p < 0,001$ . En amarillo se indican aquellos QTLs encontrados en alguna generación previa.

Para el diámetro y la altura de los frutos, *QTLs* que habían sido encontrados en alguna generación previa fueron detectados en la BC<sub>3</sub> (tres para el diámetro, en los cromosomas 1 y 11, y uno para la altura, en el cromosoma 1). En estos *QTLs*, los alelos silvestres disminuyeron la media del carácter, en concordancia con lo esperado según los fenotipos de los progenitores. Cuatro *QTLs* se identificaron para la forma del fruto, los cuales mostraron efectos diversos. En uno de ellos, ubicado en el cromosoma 10, el efecto del alelo de LA722 redujo el índice de forma, mientras que en los tres restantes ocasionó un incremento de este índice. Para todos los *QTLs* detectados en relación al peso del fruto (dos en el cromosoma 1 y uno en el cromosoma 11) la presencia de alelos silvestres representó una disminución en el peso del fruto, de acuerdo con lo esperado en base a los parentales.

En esta generación BC<sub>3</sub>, un *QTL* para la vida poscosecha de los frutos fue hallado en el cromosoma 5, el cual explicó el 22 % de la variación fenotípica observada. La presencia del alelo silvestre en esta región heterocigota causó un aumento significativo de la vida poscosecha de los frutos.

En cuanto al color, dos asociaciones se encontraron para el parámetro L (cromosomas 1 y 11) y una para el índice a/b (cromosoma 11). Estos *QTLs* explicaron bajos porcentajes de la variación fenotípica y el efecto de los alelos silvestres fue diferente en los dos *QTLs* para L, mientras que para a/b redujeron este índice de manera opuesta a lo esperado según los fenotipos progenitores. Para la firmeza de los frutos, tres *QTLs* fueron identificados (uno en el cromosoma 1 y dos en el cromosoma 10) y en todos ellos la presencia de alelos silvestres disminuyó la firmeza del fruto.

Finalmente, dos *QTLs* fueron asociados a los sólidos solubles localizados en los cromosomas 1 y 9, y en los cuales los alelos de LA722 aumentaron significativamente el contenido en sólidos solubles de los frutos.

De todas las interacciones examinadas entre aquellos marcadores asociados a un mismo carácter, solo uno de los casos manifestó interacciones significativas al 5 %. El ANOVA a dos criterios de clasificación mostró evidencias de epistasis entre los marcadores *SSR095* y *SSR318* para la firmeza de los frutos (Tabla II.7). Los efectos individuales de los marcadores permanecieron significativos a pesar de la epistasis encontrada. Los dos *SSR* en conjunto explicaron un mayor porcentaje (44 %) de la variación fenotípica que en forma individual. La Tabla II.7 muestra el cuadro de análisis de la variancia para esta interacción.

**Tabla II.7-** Cuadro de análisis de la variancia a dos criterios de clasificación para la firmeza de los frutos.

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Firmeza	42	0,44	0,40	10,96

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1285,49	3	428,50	10,10	<0,0001
SSR095	472,44	1	472,44	11,14	0,0019
SSR318	564,86	1	564,86	13,32	0,0008
SSR095*SSR318	291,27	1	291,27	6,87	0,0125
Error	1611,4	38	42,41		
Total	2896,89	41			

N: número de plantas. R<sup>2</sup>: coeficiente de determinación del modelo. R<sup>2</sup> Aj: R<sup>2</sup> ajustado. CV: coeficiente de variación. F.V.: fuente de variación. SC: sumas de cuadrados. gl: grados de libertad. CM: cuadrados medios. F: valor F de Snedecor. p: probabilidad asociada. En gris se destaca la probabilidad asociada para la interacción de los SSR.

**- Validación de QTLs asociados a caracteres de calidad de fruto**

La evidencia de un QTL en distintas generaciones representa una alternativa para validar asociaciones encontradas cuando se trabaja con poblaciones segregantes que impiden replicar el ensayo. La comparación entre los QTLs detectados en la BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> y en la BC<sub>3</sub> en este trabajo, y también con la BC<sub>1</sub>, BC<sub>1</sub>S<sub>1</sub> y BC<sub>2</sub> de un estudio previo, permitió confirmar diversas regiones genómicas asociadas a caracteres de calidad del fruto, a través de estas generaciones derivadas del cruzamiento entre Caimanta y LA722, posibilitando la validación de **38 QTLs**. Se validaron asociaciones a casi todos los caracteres de calidad en estudio, con excepción del espesor de pericarpio y el pH. La Tabla II.8 presenta los 38 QTLs validados, indicando las generaciones en las que fueron hallados, seguidas de su probabilidad asociada.

**Tabla II.8-** Asociaciones validadas en diversas generaciones del cruzamiento entre Caimanta y LA722 de *S. pimpinellifolium*, mostrando las generaciones en las que fueron detectadas y el efecto sobre el fenotipo del alelo de LA722.

QTLs					
Cr	Carácter	SSR	Generación (p)	Efecto alelo LA722	
1	Diámetro	095	BC <sub>1</sub> S <sub>1</sub> VII-91 (0,0017) BC <sub>3</sub> (0,0032)	disminuye disminuye	
		220060	BC <sub>2</sub> (0,0199) / BC <sub>2</sub> S <sub>1</sub> VII-39 (0,0142) BC <sub>3</sub> (0,0115)	disminuye/disminuye disminuye	
	Altura	095	BC <sub>1</sub> S <sub>1</sub> VII-91 (0,0110) BC <sub>2</sub> S <sub>1</sub> VII-39 (0,0268) / BC <sub>2</sub> S <sub>1</sub> VII-24 (0,0367) BC <sub>3</sub> (0,0258)	disminuye disminuye/disminuye disminuye	
		220060	BC <sub>1</sub> S <sub>1</sub> VII-31 (0,0409) BC <sub>2</sub> (0,0023) / BC <sub>2</sub> S <sub>1</sub> VII-39 (0,0098)	disminuye disminuye/disminuye	
	Peso	095	BC <sub>1</sub> S <sub>1</sub> VII-91 (0,0062) BC <sub>3</sub> (0,0050)	disminuye disminuye	
		220060	BC <sub>1</sub> (0,0303) / BC <sub>1</sub> S <sub>1</sub> IX-14 (0,0280) BC <sub>2</sub> (0,0067) / BC <sub>2</sub> S <sub>1</sub> VII-39 (0,0127) BC <sub>3</sub> (0,0200)	disminuye/disminuye disminuye/disminuye disminuye	
	Firmeza	095	BC <sub>2</sub> S <sub>1</sub> VII-48 (0,0118) BC <sub>3</sub> (0,0095)	disminuye disminuye	
	Sólidos solubles	220060	BC <sub>1</sub> S <sub>1</sub> IX-14 (0,0168) BC <sub>3</sub> (0,0127)	Sin diferencias entre PP y CC aumenta	
	2	Peso	295	BC <sub>1</sub> S <sub>1</sub> IX-14 (0,0391) BC <sub>2</sub> S <sub>1</sub> VII-21 (0,0444)	disminuye disminuye

Cr: cromosoma. Se indica la generación en la que fue detectado el QTL y entre paréntesis la probabilidad asociada.

Tabla II.8- (continuación)

Cr	Carácter	SSR	Generación (p)	Efecto alelo LA722
5	Ac. Titulable	162	BC1S1 VII-91 (0,0113)	Sin diferencias entre PP y CC aumenta
			BC2S1 VII-12 (0,0100)	
6	Color: L	211044	BC1 (0,0344)	aumenta
			BC2S1 VII-24 (0,0445)	Sin diferencias entre PP y CC
7	nº Lóculos	276	BC2S1 VII-2 (0,0084) / BC2S1 VII-7 (0,0037)	disminuye/disminuye
9	Forma	070	BC1 (0,0228) BC2S1 VII-17 (0,0091)	disminuye disminuye
	Color: a/b	070	BC1 (0,0058) BC2S1 VII-17 (0,0152)	aumenta aumenta
10	Diámetro	596	BC1 (0,0107) BC2S1 VII-39 (0,0157)	disminuye disminuye
		318	BC1 (0,0027) BC2S1 VII-39 (0,0247)	disminuye disminuye
	Altura	596	BC1 (0,0010) / BC1S1 VII-51 (0,0476) BC2 (0,0483) / BC2S1 VII-39 (0,0011) / BC2S1 VII-48 (0,0043)	disminuye/disminuye disminuye/disminuye/disminuye
		318	BC1 (0,0056) BC2 (0,0483) / BC2S1 VII-39 (0,0087)	disminuye disminuye/disminuye
	Forma	034	BC1 (0,0007) / BC1S1 VII-51 (0,0495) BC2S1 VII-17 (0,0007) BC3 (0,0009)	disminuye/ Sin diferencias entre PP y CC disminuye disminuye
	Peso	596	BC1 (0,0019) BC2S1 VII-39 (0,0037) / BC2S1 VII-48 (0,0449)	disminuye disminuye/disminuye
		318	BC1 (0,0009) BC2S1 VII-39 (0,0091)	disminuye disminuye
	Vida poscosecha	318	BC2 (0,0470) BC2S1 VII-39 (0,0347)	aumenta Sin diferencias entre PP y CC
	Firmeza	596	BC2 (0,0010) / BC2S1 VII-39 (0,0009) BC3 (0,0016)	disminuye/disminuye disminuye
		318	BC2 (0,0010) BC3 (0,0335)	disminuye disminuye
	Ac. Titulable	034	BC1S1 III-21 (0,0064) / BC1S1 IX-14 (0,0021) BC2S1 VII-17 (0,0029)	aumenta/aumenta aumenta
		596	BC2S1 VII-39 (0,0469) / BC2S1 VII-48 (0,0223)	Sin diferencias entre PP y CC/disminuye
11	Diámetro	G036	BC1 (0,0274) BC2S1 VII-24 (0,0085) / BC2S1 VII-7 (0,0013) / BC2S1 VII-12 (0,0027) BC3 (0,0022)	aumenta disminuye/disminuye/disminuye disminuye
			BC1 (0,0247) BC2S1 VII-24 (0,0158)	aumenta disminuye
	Altura	G036	BC1S1 VII-91 (0,0340) BC2S1 VII-24 (0,0423)	disminuye disminuye
		1061	BC2S1 VII-7 (0,0001) / BC2S1 VII-12 (<0,0001) BC3 (0,0014)	aumenta aumenta/aumenta
	Forma	G036	BC1S1 VII-91 (0,0008) BC2S1 VII-24 (0,0480)	Sin diferencias entre PP y CC aumenta
		1061	BC1 (0,0263) BC2S1 VII-24 (0,0031) / BC2S1 VII-7 (0,0093) / BC2S1 VII-12 (0,0100) BC3 (0,0062)	aumenta disminuye/disminuye/disminuye disminuye
	Vida poscosecha	080	BC1S1 VII-51 (0,0483) BC2S1 VII-17 (0,0458)	Sin diferencias entre PP y CC Sin diferencias entre PP y CC
	nº Lóculos	G036	BC2S1 VII-24 (0,0123) / BC2S1 VII-7 (0,0037) / BC2S1 VII-12 (<0,0001)	disminuye/disminuye/disminuye
	Color: L	080	BC1S1 III-21 (0,0423) BC3 (0,0273)	Sin diferencias entre PP y CC aumenta
	Color: a/b	080	BC2S1 VII-24 (0,0408) BC3 (0,0107)	aumenta disminuye
	Sólidos solubles	080	BC1 (0,0454) / BC1S1 VII-31 (0,0182) BC2S1 VII-7 (0,0377)	aumenta/aumenta Sin diferencias entre PP y CC
	Ac. Titulable	080	BC2 (0,0407) / BC2S1 VII-24 (0,0118)	aumenta/disminuye

Cr: cromosoma. Se indica la generación en la que fue detectado el *QTL* y entre paréntesis la probabilidad asociada.

De las 38 asociaciones validadas, 15 fueron detectadas en más de dos generaciones o familias a lo largo del proceso. Dentro de estas 15, nueve fueron halladas en tres, dos en cuatro y cuatro en cinco de las diversas poblaciones o familias estudiadas. En la Tabla II.8 se presenta también el efecto de los alelos silvestres sobre la media del carácter en cada generación. Para muchos de los *QTLs* (24 de 38) los efectos fueron consistentes a través de las generaciones, sin embargo, para otros ciertas discrepancias fueron observadas. Podemos notar que mayormente estas diferencias no correspondieron a efectos opuestos (es decir, aumento/disminución de la media), sino que fueron discrepancias en las que en alguna generación los alelos silvestres aumentan o disminuyen la media y en otra el efecto principal es causado por el heterocigota, no habiendo diferencia entre los individuos homocigotas.

La asociación entre el peso y el *SSR220060* (cromosoma 1) fue detectada en las tres generaciones BC<sub>1</sub>, BC<sub>2</sub> y BC<sub>3</sub>, y también en algunas familias BC<sub>1</sub>S<sub>1</sub> y BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub>. Para este *QTL*, los efectos fueron estables a lo largo de todas las generaciones evaluadas. Los alelos silvestres redujeron significativamente el peso del fruto, de acuerdo a lo esperado en base a los fenotipos parentales. Además, esta región se asoció a otros rasgos estrechamente vinculados al peso, como el diámetro y la altura. Los marcadores *SSR596* y *SSR318*, localizados en el cromosoma 10, también se encontraron relacionados a caracteres del tamaño del fruto en diversas generaciones. Asimismo, para estos marcadores se validó una asociación a la firmeza del fruto, donde los alelos silvestres disminuyeron este rasgo, lo cual no sería deseable desde el interés comercial. La misma tendencia se observó para el *SSR095*, localizado en el cromosoma 1. El *SSRG036* también estuvo asociado al diámetro, altura y peso de los frutos en diversas generaciones, pero en este caso los efectos fueron menos consistentes.

Dos *QTLs* fueron validados para la vida poscosecha de los frutos, uno en el cromosoma 10 y otro en el 11. Para el *SSR080* (cromosoma 11), los efectos fueron estables, siendo el heterocigota quien presentó ventajas significativas, aumentando el valor de la vida poscosecha, mientras que los individuos homocigotas no difirieron para el carácter.

Respecto a las asociaciones validadas para los sólidos solubles, tanto en el cromosoma 1 como en el 11, los alelos de LA722 aumentaron este carácter, advirtiéndose que en algunas generaciones fue el heterocigota quien manifestó mayor contenido en sólidos solubles, sin diferencias entre los homocigotas. Para los *QTLs* validados en relación al color y la acidez titulable, los efectos de los alelos silvestres fueron variables en las diversas generaciones.

## **PARTE II: OBTENCIÓN DE LÍNEAS CASI ISOGÉNICAS**

Como se señaló anteriormente, la selección de plantas asistida con marcadores *SSR* y caracteres fenotípicos permitió identificar líneas casi isogénicas a Caimanta, con aportes de *S. pimpinellifolium*, en las generaciones  $BC_3$  y  $BC_4$  del cruzamiento. Los datos moleculares y fenotípicos asistieron en la introgresión de regiones genómicas de LA722 y en la recuperación del genoma de Caimanta, lográndose un proceso más dirigido y una mejora significativa en la eficiencia en cuanto a tiempos y cantidad de materiales requeridos.

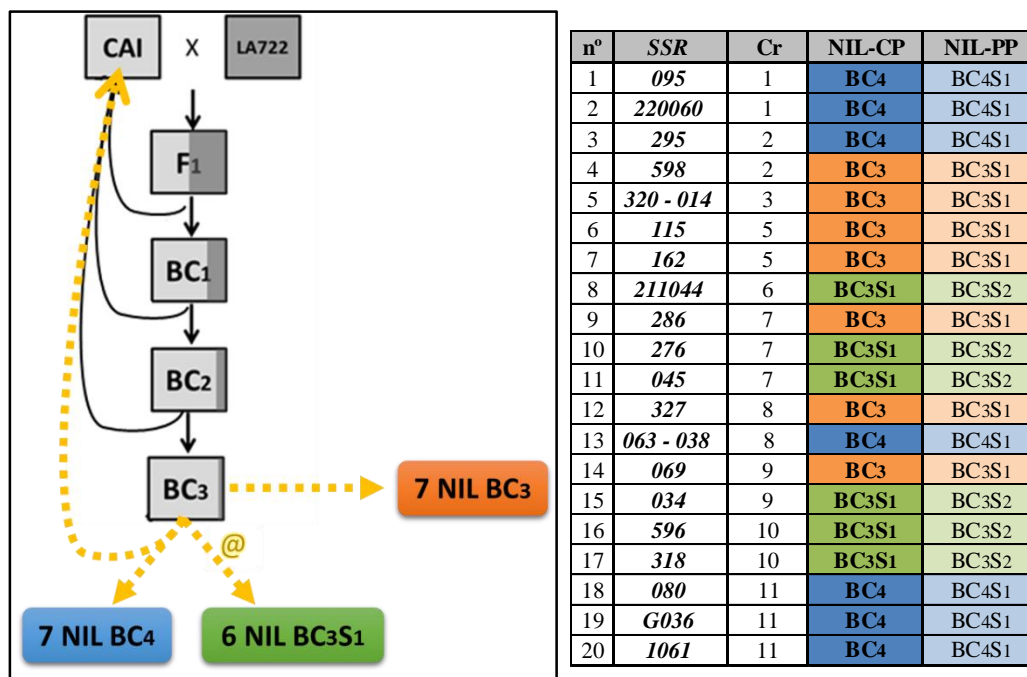
En la *campaña 2011/2012* se evaluó la generación  $BC_3$  y utilizando la información brindada por los caracteres moleculares y fenotípicos se escogieron diversas plantas  $BC_3$ :

- Por un lado, pudieron hallarse en la generación  $BC_3$  plantas que presentaron solo un marcador con alelos silvestres, siendo el resto como el genoma de Caimanta. Estas plantas representan líneas casi isogénicas a Caimanta, en las que cada una lleva un único fragmento de LA722 introgresado (en base a los *SSR* analizados en este proceso). De esta manera, se encontraron siete plantas  $BC_3$ , con regiones únicas de LA722, determinadas por un *SSR* particular en el contexto de Caimanta. Al tratarse de una retrocruza, estas *NILs*  $BC_3$  llevan el fragmento de LA722 en condición heterocigota (“CP”, donde C representa el alelo de Caimanta y P el alelo de LA722 para un *locus* microsatélite dado) (*NIL-CP*) y generarán la *NIL* homocigota (*NIL-PP*) luego de la autofecundación ( $BC_3S_1$ ). Así, en la generación  $BC_3$  se alcanzaron las primeras siete *NILs* (indicadas en naranja en la Figura II.9).

- Por otro lado, se seleccionaron plantas  $BC_3$  que no constituían *NILs* pero resultaban muy prometedoras debido a la alta proporción del genoma de Caimanta recuperado. Se dividieron en dos grupos: (1) aquellas que poseían la introgresión de algún segmento de *S. pimpinellifolium* de interés, y no más de dos introgresiones adicionales del dador fuera de la región diana, fueron autofecundadas avanzando hacia la  $BC_3S_1$ . A partir del análisis de estas plantas  $BC_3S_1$ , en la *campaña 2013/2014*, se consiguieron seis nuevas *NILs* (indicadas en verde en la Figura II.9); (2) aquellas que presentaron más de dos introgresiones adicionales a la región de interés, fueron retrocruzadas nuevamente hacia el progenitor recurrente Caimanta para obtener la semilla  $BC_4$ . A partir del estudio de las familias  $BC_4$ , en la *campaña 2013/2014*, se seleccionaron siete *NILs* adicionales (indicadas en azul en la Figura II.9). En estas *NILs*  $BC_3S_1$  y  $BC_4$  la introgresión silvestre se presenta en condición heterocigota (*NIL-CP*), generándose la *NIL* homocigota (*NIL-PP*) luego de la autofecundación ( $BC_3S_2$  y  $BC_4S_1$ ).

En síntesis, finalizado este proceso se consiguieron 20 genotipos con regiones únicas introgresadas de *S. pimpinellifolium* LA722 en el contexto genético del cultivar Caimanta (Figura II.9).

**Figura II.9-** Diagrama de cruzamientos para la obtención de las NILs, a partir del cultivar Caimanta (CAI) y LA722, y Tabla indicando la generación en la cual se obtuvieron las diferentes NILs para cada SSR particular.

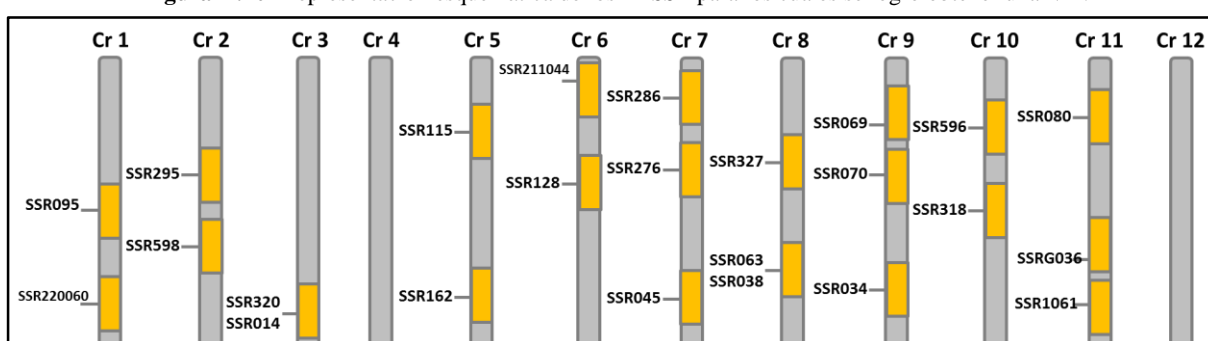


De los 28 marcadores SSR empleados inicialmente, dos (*SSR009* y *SSR344*) resultaron monomórficos en la generación BC<sub>2</sub> y otros dos (*SSR288* y *SSRH301*) en la generación BC<sub>3</sub>. Estos marcadores fijaron los alelos de Caimanta en todas las plantas evaluadas, perdiéndose la posibilidad de alcanzar NILs con introgresiones silvestres en esos segmentos cromosómicos. Luego, para 22 de los 24 SSR restantes se lograron obtener 20 NILs (Figura II.9), de las cuales 18 presentan una introgresión silvestre en un único *locus* marcador, y en las otras dos la región introgresada comprende dos *loci* marcadores cercanos entre sí. Es decir, para 18 de los 22 SSR se consiguió alguna planta en la generación BC<sub>3</sub>, BC<sub>3</sub>S<sub>1</sub> o BC<sub>4</sub> que presentó solo ese marcador, con alelos silvestres, siendo el resto como el genoma de Caimanta. Por otra parte, para los otros cuatro SSR (*SSR320-SSR014* y *SSR063-SSR038*) el segmento de LA722 introgresado abarcó dos marcadores que no lograron recombinarse debido a encontrarse muy próximos entre sí. De esta manera, las NIL320-014 y NIL063-038 llevan un segmento cromosómico silvestre que incluye a ambos marcadores contiguos. Por otro lado, recientemente, en un análisis de plantas

BC<sub>3</sub>S<sub>2</sub> pudieron identificarse *NILs* para los dos *SSR* faltantes del grupo de 24 (*NIL128* y *NIL070*), sin embargo por cuestiones de tiempo estas no llegaron a ser evaluadas dentro de la presente tesis.

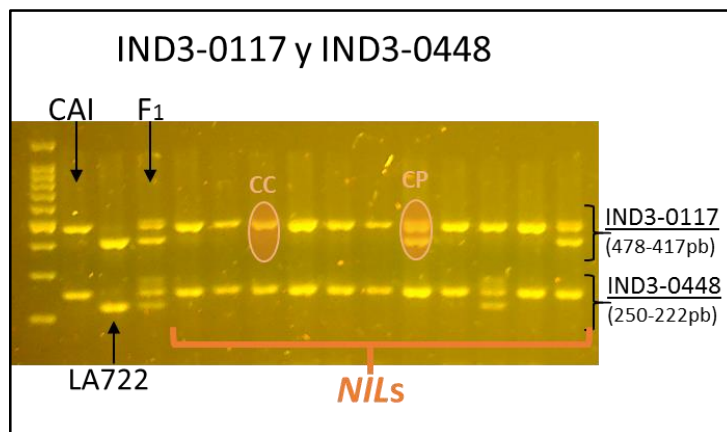
Como resultado final, luego de todo el proceso de selección se lograron obtener **22 *NILs***. Es decir, se generaron 22 líneas casi isogénicas en las que cada una lleva un fragmento único de *S. pimpinellifolium* LA722 introgresado (determinado por un marcador *SSR* particular) en el contexto genético del cultivar argentino Caimanta (Figura II.10).

**Figura II.10-** Representación esquemática de los 24 *SSR* para los cuales se logró obtener una *NIL*.



## CARACTERIZACIÓN MOLECULAR COMPLEMENTARIA DE LAS *NILs*

El desarrollo de nuevos marcadores moleculares, gracias a la secuenciación de los parentales, permitió estudiar en mayor profundidad la constitución genómica de las líneas generadas y avanzar en su caracterización genotípica. Para ello, cada una de las 22 líneas obtenidas en una primera instancia, derivadas de las generaciones BC<sub>3</sub>, BC<sub>4</sub>, BC<sub>3</sub>S<sub>1</sub> o BC<sub>3</sub>S<sub>2</sub> y que llamamos *NILs-CP* por presentar la región *SSR* introgresada de LA722 en condición heterocigota, fueron evaluadas mediante nuevos marcadores *INDELS* y algunos marcadores funcionales. En la Figura II.11 se muestra, a modo de ejemplo, un fragmento de gel de agarosa al 2 % en el cual se analizaron dos *INDELS* del cromosoma 3, IND3-0117 y IND3-0448, que fueron amplificados en una misma *PCR* (multiplex) y se separaron en el gel debido a sus diferentes tamaños. Como se observa, en las nuevas regiones examinadas la mayoría de las *NILs* exhibieron alelos de Caimanta (CC), no obstante algunas presentaron introgresiones adicionales de LA722 en estas regiones genómicas (principalmente heterocigotas, CP).



**Figura II.11-** Marcadores *IND3-0117* y *IND3-0448* en los progenitores (Caimanta (CAI) y LA722 de *S. pimpinellifolium*), F<sub>1</sub> y algunas de las *NILs* obtenidas. Las flechas indican los progenitores y F<sub>1</sub> utilizados como testigos. A continuación se presentan los genotipos encontrados en algunas *NILs*, principalmente individuos homocigotas para el alelo de CAI (CC) y algunos individuos heterocigotas (CP).

A continuación, la Tabla II.9 presenta el genotipo de cada una de las 22 *NILs*, para los nuevos marcadores, junto a los *SSR* utilizados a lo largo del proceso de selección. Se indican los marcadores analizados, el cromosoma al que pertenecen y el genotipo manifestado por cada *NIL*, donde C representa el alelo de Caimanta y P el alelo de LA722 para un *locus* dado. Para cada línea, en naranja se marca la región determinada por un *SSR* particular, por la cual había sido seleccionada esa línea, y que corresponde al fragmento introgresado de *S. pimpinellifolium* LA722 (considerado como único hasta ese momento). En amarillo se señalan nuevas introgresiones provenientes de la especie silvestre detectadas mediante los marcadores *INDELS* y los marcadores funcionales.

Tabla II.9- Perfil de marcadores SSR, INDELS y funcionales de las 22 líneas obtenidas.

	NIL-CP		095	220060	295	598	320	115	162	211044	128	286	276	045	327	063	069	070	034	596	318	080	G036	1061	
	Cr	1	2	2	3	5	5	6	7	7	7	7	7	7	8	8	9	9	9	10	10	11	11	11	
CROMOSOMA 1	IND1-0149	CC	CC	CC	CP	CC	CC	CC	CP	CC	CC	CC	sd	CC	sd	CC	CC	sd	CC	CC	CC	CC	CC	sd	CC
	IND1-0317	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	sd	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	IND1-0512	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	PP	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	SSR095 (7770)	CP	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	IND1-8018	CP	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	SSR220060 (8170)	CC	CP	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	IND1-9461	CC	CP	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	sd	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	SSR288 (9692)	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
CROMOSOMA 2	IND2-2019	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CP	CC	PP	CC	CC	CC	CC	CP	CC	CP	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	SSR295 (3791)	CC	CC	CP	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	IND2-3976	CC	CC	CP	CC	CC	CC	CC	CP	CC	CC	CC	CC	CC	sd	CC	CP	CC	CC	CC	CC	CC	CP	CP	CC
	IND2-4348	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	sd	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	lc	CP	CP	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CP	CC	CC	CC	CC	sd	CP	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	IND2-4465	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	sd	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	SSR598 (4585)	CC	CC	CC	CP	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	fw2.2	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	sd	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
CROMOSOMA 3	IND3-0117	CC	CC	CC	CP	CC	CC	CC	CP	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	IND3-0448	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	IND3-5470	CP	PP	CP	PP	CP	CP	CP	PP	PP	PP	PP	PP	CP	CP	PP	PP	CP	CC	CC	CC	CC	CP	PP	CC
	IND3-6289	CP	CP	CC	CP	CP	CC	PP	PP	CC	PP	CC	CC	CC	CC	CP	CP	CP	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	SSR320 (6916)	CC	CC	CC	CC	CC	CP	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	SSR014 (6976)	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	IND3-7057	CC	CC	CC	CC	CC	CP	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	fw3.2	CC	CC	CP	CC	CC	CP	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	sd	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CP	PP	CC
CROMOSOMA 4	IND4-0238	CC	CC	CC	CP	CP	CC	PP	CP	CC	CC	CC	CC	CC	CP	CP	CP	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	IND4-0954	CP	CC	CC	CP	CC	CC	CP	CP	CC	PP	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	IND4-3519	CP	CC	CC	CP	CC	CC	CC	CP	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	IND4-4286	CP	CC	CC	CP	CC	CC	CC	CP	CC	PP	CC	CC	sd	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
CROMOSOMA 5	IND4-6168	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	SSR115 (0273)	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CP	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	IND5-0325	CC	sd	CC	CC	CC	CC	CP	CP	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	IND5-0697	CP	sd	CC	CC	CC	CC	CC	CC	sd	CC	CC	CC	sd	CC	CC	sd	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	sd
	IND5-1450	CP	sd	CC	CP	CC	CC	CC	CP	sd	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	sd	PP	CP	CC	CC	CC	CC	sd
	IND5-4612	CP	CP	CC	CP	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	IND5-5411	CP	CP	CC	CP	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	IND5-6112	CP	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
CROMOSOMA 6	SSR162 (6547)	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CP	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	SSR211044 (0100)	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CP	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	IND6-3385	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	PP	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	IND6-3717	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	PP	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	SSR128 (3763)	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	PP	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	IND6-4186	CP	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CP	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
CROMOSOMA 7	IND6-4561	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	IND7-0050	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	sd	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	sd	CC	CC
	SSR286 (0187)	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	SSR276 (0739)	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	IND7-0918	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	IND7-1436	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	IND7-4808	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	IND7-6266	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	sd	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	IND7-6489	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	sd	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	SSR045 (6500)	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
CROMOSOMA 8	IND7-6590	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	sd	CP	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	IND8-0171	sd	sd	CC	CC	sd	CC	CC	CC	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	PP	PP	sd	sd	sd
	IND8-0367	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	SSR327 (5258)	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	IND8-5616	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	IND8-6049	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	SSR063 (6110)	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	SSR038 (6143)	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
CROMOSOMA 9	IND8-6206	CC	CP	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	IND8-6582	CC	CC	CC	CC	CC	CP	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	PP	CC	CC	CC
	IND9-0093	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	sd	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	IND9-0232	CC	sd	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	sd	sd	CP	CC	CC	CC	CC	CC	CC	sd	CC
	SSR069 (0354)	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	SSR070 (0362)	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	IND9-0744	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	IND9-5909	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
CROMOSOMA 10	SSR110 (6426)	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	IND10-0015	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	PP	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	SSR596 (0283)	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	IND10-0429	CC	CP	CP	CP	CP	CP	CP	PP	PP	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	IND10-0939	CC	CC																						

Como se advierte en la Tabla II.9, al lograr una mayor cobertura del genoma con nuevos marcadores moleculares, se encontraron varias introgresiones adicionales. Se detectaron segmentos silvestres adicionales en las 22 líneas desarrolladas, hallándose un total de 120 introgresiones no-diana en todo el conjunto y un promedio de 5,5 por línea. La mayor cantidad de introgresiones adicionales (12) se observó en la *NIL162* y la menor cantidad (dos) en las líneas *NIL276*, *NIL045*, *NIL080* y *NIL1061*. Del total, la mayoría de las regiones (94) presentaron una condición heterocigota (CP) y solo el 28 % (26 regiones) fueron homocigotas para los alelos de LA722 (PP). Algunas de las nuevas introgresiones resultaron extensas, abarcando varios marcadores contiguos, e incluso se reveló que en varias *NILs* los segmentos diana determinados por los *SSR* comprendían más marcadores adyacentes. Además, puede notarse que el cromosoma 4, para el cual no se disponía de marcadores *SSR* y por ende no estuvo sometido a selección durante el proceso, fue uno de los que mostró más introgresiones adicionales.

En la Tabla II.9 se presenta también para cada línea el nuevo porcentaje del genoma de Caimanta recuperado, calculado en base a las nuevas introgresiones detectadas. Estos porcentajes variaron entre un 90,6 % y un 98,3 % dependiendo la línea, lo cual indica una buena recuperación del genoma de Caimanta a pesar de las introgresiones adicionales encontradas.

## DISCUSIÓN

### **(I) DETECCIÓN DE OTLs EN GENERACIONES DE RETROCRUZAS AVANZADAS**

Las diversas poblaciones de retrocruzas derivadas del cruzamiento inicial entre Caimanta y *S. pimpinellifolium* además de representar recursos para el desarrollo de nuevas variedades comerciales, posibilitaron la investigación del germoplasma silvestre, sus contribuciones y sus interacciones en el contexto cultivado. Las generaciones de retrocruzas avanzadas, como la BC<sub>3</sub>, presentan una baja proporción del genoma donante brindando un *background* genético adecuado para los estudios de regiones genómicas aportadas por la especie silvestre. En este trabajo, el análisis de la BC<sub>3</sub> reveló que si bien existe variabilidad en esta generación, las plantas y sus frutos comienzan a parecerse más al progenitor cultivado, lo cual se corresponde con el aumento en la recuperación de este genoma recurrente en relación a las retrocruzas anteriores. El porcentaje promedio del genoma de Caimanta en la BC<sub>3</sub> fue de 94 %. Además, al resultar más similar a la línea elite se facilita el manejo agronómico y el trabajo con esta población. Las distribuciones de frecuencias para los caracteres de calidad de fruto observadas en esta generación BC<sub>3</sub>, dependen no solo de los grados de dominancia para un carácter, sino también de las proporciones de los genomas parentales (resultados Figura II.6). En este sentido, para caracteres como el diámetro, la altura y el peso de los frutos se observó un sesgo hacia el progenitor cultivado. Contrariamente, la distribución para la forma de los frutos se volcó hacia el progenitor silvestre, apoyando la idea de una dominancia de LA722 en este carácter. En un estudio previo, Pereira da Costa (2012) informó la dominancia completa de LA722 sobre Caimanta para la forma del fruto, en el cálculo de los grados de dominancia entre estos parentales y la F<sub>1</sub>. Para la vida poscosecha de los frutos, la mayoría de los individuos se ubicaron dentro del rango comprendido entre los valores de los progenitores. Sin embargo, también se encontraron algunos individuos transgresivos, incluso con valores bastante elevados de vida poscosecha. Para otros caracteres, como el contenido en sólidos solubles, se observó una importante apertura de la variación fenotípica en la generación BC<sub>3</sub>. Como se advirtió a partir de estos resultados, la *segregación transgresiva* percibida para caracteres relacionados al tamaño y forma del fruto fue menor en relación a otros caracteres, como los bioquímicos, de color o la vida poscosecha. Esto podría explicarse basándonos en el modelo de la complementariedad génica de alelos aditivos. Siguiendo esta idea de una acción complementaria, la segregación transgresiva sería resultado de la combinación en la generación

segregante de alelos aditivos, con efectos positivos o con efectos negativos, que estarían dispersos entre las líneas parentales, originándose fenotipos extremos. En el tomate, los caracteres del tamaño de fruto han sufrido una fuerte selección direccional durante su domesticación, fijándose alelos que aumentan el peso del fruto en los genotipos cultivados (Paterson *et al.*, 1991). Debido a esto, en las especies silvestres se encontrarían alelos opuestos a los de la especie cultivada para el tamaño y peso de los frutos, de modo que en los cruzamientos interespecíficos estos se combinarían resultando en fenotipos intermedios, más que en individuos transgresivos. Por otro lado, para caracteres no influenciados por la selección, la deriva génica podría haber fijado diferentes alelos positivos y negativos en ambos progenitores, que al combinarse bajo una acción génica aditiva resulten en fenotipos superiores o inferiores (Rieseberg *et al.*, 1999). Por otra parte, las acciones génicas no aditivas de interacciones *inter* o *intralocus* también pueden ser importantes en la determinación de fenotipos transgresivos en los cruzamientos interespecíficos. Nuevas combinaciones de *loci* o de alelos pueden aparecer en la asociación de estos genomas divergentes, provocando la presencia de nuevos fenotipos. Dentro de la generación BC<sub>3</sub>, la variación resultó significativa para todos los caracteres ( $p < 0,0001$ ) y los porcentajes de variación fenotípica atribuible a variación genética fueron elevados (siendo el mayor valor para a/b de 95 % y el menor de 44 % para la firmeza) (resultados Tabla II.3). Generalmente, una retrocruza no es la generación más adecuada para el cálculo de la variancia genética, pues en ella hay solo dos genotipos posibles para cada *loci* que determina un carácter (homocigotas para alelos del padre recurrente y heterocigotas), y por lo tanto, la variancia genética será subestimada debido a la ausencia de homocigotas para alelos del progenitor donante. No obstante, es posible que la selección aplicada en la obtención de las diferentes plantas BC<sub>3</sub>, buscando mantener diferentes orígenes y diversas regiones de LA722, haya contribuido a la variabilidad observada dentro de esta generación.

En la BC<sub>3</sub> se detectaron **diez QTLs** asociados a caracteres de calidad de fruto con  $p < 0,01$ , de los cuales solo uno resultó significativo al 0,1 % (resultados Tabla II.6). El menor número de asociaciones halladas en la BC<sub>3</sub>, en relación a las generaciones más tempranas, puede explicarse, al menos en parte, por el menor porcentaje de LA722 que está segregando en la BC<sub>3</sub>, aproximadamente un 6 %. Si en la población de estudio una región genómica ha fijado alelos (no está segregando), no se detectará su efecto, aun si lo tuviese, sobre algún carácter.

Sin embargo, es importante destacar que de 20 *QTLs* detectados con una  $p < 0,05$ , el 75 % (15 *QTLs*) pudieron ser validados al haberse observado en alguna generación anterior del cruzamiento (BC<sub>1</sub>, BC<sub>1</sub>S<sub>1</sub>, BC<sub>2</sub> y/o BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub>). Para el diámetro de los frutos, *QTLs* que habían sido encontrados en generaciones previas fueron detectados en la BC<sub>3</sub>, indicados por los *SSR095* y *SSR220060* del cromosoma 1 y el *SSRG036* del cromosoma 11. El *SSR095* también se asoció a la altura y el peso de los frutos, y los *SSR220060* y *SSRG036* al peso. En estos casos resulta difícil definir si es el mismo *QTL* que exhibe efectos pleiotrópicos o si son varios *QTLs* estrechamente ligados. Sin embargo, al observar que los efectos para estos rasgos del tamaño del fruto altamente relacionados ocurren en la misma dirección, resulta probable que se trate de efectos pleiotrópicos. En estos *QTLs*, los alelos silvestres disminuyeron la media del carácter, en concordancia con lo esperado, según los fenotipos de los progenitores y con lo reportado en trabajos previos que postulan que los genes silvestres presentan efectos dominantes o parcialmente dominantes, causantes de la reducción en el tamaño y peso de los frutos en los cruzamientos interespecíficos (Weller *et al.*, 1988; Grandillo *et al.*, 1999b; Pereira da Costa *et al.*, 2009). Conjuntamente, los *SSR095*, *SSR220060* y *SSRG036* se hallaron relacionados a la forma del fruto, en donde los alelos silvestres determinaron un aumento de este índice, conforme a lo esperado en base a los parentales. Un cuarto *QTL* para la forma, localizado en el cromosoma 10 (*SSR034*), presentó un efecto opuesto disminuyendo este valor. Una región del cromosoma 5 indicada por el *SSR115* se asoció a la vida poscosecha de los frutos, donde la presencia del alelo silvestre causó un aumento significativo de este carácter, resultando de gran interés desde el punto de vista comercial. En cuanto al color del fruto, dos *QTLs* se encontraron para el parámetro L (*SSR095* cromosoma 1 y *SSR080* cromosoma 11) y uno para el índice a/b (*SSR080*), cuyas probabilidades fueron bajas y sus efectos se mostraron variables entre las generaciones. Para la firmeza de los frutos, tres *QTLs* fueron identificados (*SSR095* en el cromosoma 1 y *SSR596* y *SSR318* ambos en el cromosoma 10) y en todos ellos la presencia de alelos silvestres redujo la firmeza del fruto, lo cual no sería deseable desde el punto de vista agronómico. Como puede notarse, el *SSR095* se asoció a varios caracteres, requiriendo más estudios para dilucidar si se trata de efectos pleiotrópicos o de diferentes *QTLs* ligados en una región genómica. Finalmente, dos *QTLs* fueron detectados para el contenido en sólidos solubles, en los cromosomas 1 (*SSR220060*) y 9 (*SSR069*), en los cuales los alelos de LA722 aumentaron significativamente el contenido en sólidos solubles de los frutos, resultando atractivos para el mejoramiento. No obstante, el *SSR220060* se relacionó además con una

disminución en el peso del fruto, reduciendo el valor agronómico de dicho *QTL*. Esto concuerda con varios trabajos previos donde se han descrito correlaciones negativas entre el peso y el contenido en sólidos solubles, atribuyendo el aumento en los sólidos solubles a disminuciones del peso del fruto y viceversa (Tanksley *et al.*, 1996; Chen y Foolad, 1999; Bernacchi *et al.*, 1998b; Doganlar *et al.*, 2002; Tieman *et al.*, 2017). Sin embargo, el *SSR069* no manifestó relación con el tamaño del fruto, indicando que sería posible encontrar otras regiones para aumentar los sólidos solubles, sin efectos negativos sobre el tamaño. En esta generación BC<sub>3</sub>, y de manera similar a lo observado en las familias BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub>, advertimos la existencia de alelos con efectos diversos en ambos progenitores, incluso con efectos opuestos a lo esperado en base a sus fenotipos. Esto refuerza la idea, ya mencionada, de que alelos favorables pueden esconderse bajo fenotipos desfavorables y que el fenotipo no siempre es un buen predictor del potencial de un determinado genotipo, confiriéndole gran valor a las técnicas basadas en marcadores moleculares y análisis de *QTLs*.

Los estudios y comparaciones de las distintas generaciones de retrocruzas derivadas del cultivar Caimanta (progenitor recurrente) y la especie silvestre *S. pimpinellifolium* permitieron la **validación** de diversos *QTLs*. Se validaron 38 regiones genómicas asociadas a caracteres de calidad de fruto, de las cuales 15 fueron detectadas en más de dos generaciones o familias a lo largo del proceso (resultados Tabla II.8). Para el cromosoma 1, dos regiones genómicas indicadas por los *SSR095* y *SSR220060* fueron validadas para la determinación del diámetro, la altura y el peso de los frutos. Como se mencionó anteriormente, es factible que estas asociaciones simultáneas correspondan a efectos pleiotrópicos más que a diferentes *QTLs* en la misma región. Para estos *QTLs*, los efectos fueron estables a través de las generaciones, mostrando una reducción significativa del tamaño del fruto por la presencia de alelos silvestres, en concordancia a lo esperado, en base al fenotipo de los progenitores y lo reportado en estudios previos (Weller *et al.*, 1988; Grandillo *et al.*, 1999b; Pereira da Costa *et al.*, 2009). Una tendencia similar fue encontrada para el cromosoma 10, donde los marcadores *SSR596* y *SSR318* fueron validados para asociaciones al diámetro, la altura y el peso de los frutos, nuevamente observándose una disminución en la media de estos caracteres por los alelos silvestres consistente en las distintas generaciones. En el cromosoma 11, el *SSRG036* también se halló asociado al diámetro, la altura y el peso, pero en este caso sus efectos fueron menos estables a través de las generaciones. En adición para el *SSRG036*, sus asociaciones a la forma

y al número de lóculos de los frutos fueron validadas, donde los alelos silvestres aumentaron el índice de forma y disminuyeron el número de lóculos. Otras asociaciones para la forma del fruto se validaron en el cromosoma 11 (*SSR1061*) y también en los cromosomas 9 (*SSR070*) y 10 (*SSR034*), pero en estos últimos dos alelos silvestres redujeron este índice. Un *QTL* adicional, para el peso de los frutos en el cromosoma 2 (*SSR295*), mostró el efecto esperado para los alelos de LA722 reduciendo este rasgo en diversas familias. Los caracteres relacionados al tamaño y la forma del fruto han sido bastante investigados en tomate. Estudios de mapeo molecular han revelado la presencia de *QTLs* relacionados a estos caracteres en los 12 cromosomas del tomate, algunos con efectos importantes (Grandillo *et al.*, 1999b). Entre los numerosos *QTLs* identificados para el peso del fruto en tomate, seis *loci* se han postulado como *QTLs* mayores: *fw1.1*, *fw2.2*, *fw2.3*, *fw3.1/fw3.2*, *fw4.1* y *fw9.1*. A su vez, los *QTLs* principales para la forma del fruto incluyen *ovate* (cromosoma 2), *locule number* (*lc*, número de lóculos, cromosoma 2), *sun* (cromosoma 7), *fs8.1* (cromosoma 8) y *fasciated* (*fas*, fasciado, cromosoma 11); aunque también se han detectado regiones con efectos menores en los cromosomas 1, 2, 8, 9, 10, 11 y 12 (Grandillo *et al.*, 1999b; Tanksley, 2004; Rodríguez *et al.*, 2011; Chakrabarti *et al.*, 2013; van der Knaap *et al.*, 2014). Respecto al peso, *fw2.2* y *fw3.2* corresponden a dos *QTLs* claves en la domesticación y diversificación del tomate. Varios estudios informaron que *fw2.2* contribuye a la importante diferencia en el tamaño de los frutos que existe entre la mayoría de los genotipos cultivados y sus parientes silvestres, pudiendo ocasionar un aumento de hasta un 30 % en el tamaño. El clonado de *fw2.2* (*fruit weight 2.2*) reveló que uno de los primeros pasos en la evolución hacia frutos de tomate más grande habría sido la mutación en este gen involucrado en el control del ciclo celular. *FW2.2* codifica un represor negativo de la división celular y su mutación origina frutos más grande por una mayor actividad mitótica durante la fase de división celular del desarrollo de los frutos (Frary *et al.*, 2000; Cong *et al.*, 2002). Por su parte, *FW3.2* (*fruit weight 3.2*) codifica un ortólogo de KLUH, SIKLUH, una enzima P450 de la subfamilia de CYP78A. SIKLUH afecta la división celular observándose un aumento del tamaño del fruto debido a la producción de capas extras de células en el pericarpio después de la fecundación (Chakrabarti *et al.*, 2013). Otros dos *loci*, *fas* y *lc*, controlan el número de lóculos de los frutos, afectando tanto la forma como el peso. Ambos favorecen una forma de fruto aplanada, pero se ha indicado que el *locus fas* tiene un efecto más fuerte sobre la morfología del fruto que *lc*. Plantas que llevan la mutación *fas* pueden desarrollar más de 15 lóculos, sin embargo, aquellos frutos cuyo peso sea superior a 500 gramos son el resultado de los efectos

acumulativos de ambos *loci* (Lippman y Tanksley, 2001; Barrero y Tanksley, 2004; Muñoz *et al.*, 2011; Rodríguez *et al.*, 2011). El gen *FAS* codifica para un factor de transcripción YABBY y la disminución de la expresión del gen es causada por una inserción en el primer intrón que deriva en frutos con mayor número de lóculos y en consecuencia más grandes (Cong *et al.*, 2008). Huang y van der Knaap (2011) demostraron que otro *locus*, también del cromosoma 11 y no alélico de *fas* (como se pensó inicialmente), *fw11.3*, influye sobre el peso de los frutos. El clonado reciente de *fw11.3* indicó que se trata de un gen, denominado *CSR* (*Cell Size Regulator*) que codifica para una proteína poco caracterizada que controla el peso del fruto en tomate regulando el tamaño celular. El alelo mutante derivado (*CSR-D*) codifica una proteína más corta debido a una deleción de 1,4 kb, que conduce a un incremento en el peso del fruto, mediante el agrandamiento celular a nivel del pericarpio. El pericarpio expandido resulta del aumento del tamaño de las células mesocarpianas y no del aumento del número de capas celulares (Mu *et al.*, 2017). En relación a la forma del fruto, *OVATE* controla una mayor o menor elongación asimétrica, dando lugar a una forma perita más o menos pronunciada (Ku *et al.*, 1999). Curiosamente, la mutación conduce a diferentes morfologías, dependiendo del contexto genético en el que se exprese, sugiriendo que *ovate* interacciona con algún otro *locus* no conocido (van der Knaap y Tanksley, 2001; Tanksley, 2004). El *fs8.1* es responsable del tomate “cuadrado”, el cual ha sido un derivado de la adaptación para la cosecha mecánica (Grandillo *et al.*, 1996). La mutación *sun* induce un incremento en la longitud del fruto pero, a diferencia de *ovate*, la elongación ocurre en ambas direcciones longitudinales, confiriéndole una simetría bilateral (van der Knaap y Tanksley, 2001). Algunos de los *QTLs* identificados en este trabajo podrían corresponderse con alelos de los *loci* descritos. Por ejemplo, las asociaciones detectadas en el cromosoma 11 posiblemente se relacionen con el *locus fas*, o podría ser también con el *fw11.3*. No obstante, las variaciones en la forma observadas en nuestra población no se deben a variaciones en el crecimiento longitudinal, como ocurre en los mutantes *ovate* o *sun*, sino a variaciones en el eje ecuatorial, sugiriendo que diferentes *loci* estarían implicados en estos aspectos. Si bien *QTLs* mayores se han encontrado para el tamaño y la forma de los frutos, otros *QTLs* con efectos menores pueden interactuar con estos y tener un rol importante en el fenotipo final de los frutos, como podría ser el caso de algunas asociaciones halladas en este trabajo.

El color de los frutos es un atributo de calidad importante. En los últimos años, la atención al color se ha acentuado debido a los conocimientos cada vez mayores de los

beneficios para la salud de los diferentes carotenoides. El licopeno es un potente antioxidante natural y numerosos estudios han demostrado que la ingesta dietética de alimentos ricos en licopeno da lugar a una disminución de la incidencia de ciertos tipos de cáncer, incluidos cánceres de próstata, pulmón, boca y colon, y de enfermedades coronarias, de cataratas y degeneración macular (Foolad, 2007). Frutos más rojos señalan un mayor contenido en licopeno, y de este modo, el índice de color a/b tiene una relación lineal con el contenido en licopeno (Hyman *et al.*, 2004). Además, se ha indicado que el ideotipo de color consiste en valores altos de a/b y bajos de L (Sacks y Francis, 2001). En el presente trabajo, dos *QTLs* para el índice a/b de color fueron validados, uno en el cromosoma 9 (*SSR070*), en el cual la presencia de alelos silvestres aumentó este carácter, resultando de interés para el mejoramiento, y otro en el cromosoma 11 (*SSR080*) para el cual los efectos fueron variables en las generaciones. El *SSR080* también se validó para el parámetro L de color, sumado al *SSR211044* del cromosoma 6. En tomate varios mutantes que afectan el color del fruto han sido identificados, entre ellos: *r* (*yellow flesh* cromosoma 3, el fruto maduro tiene la pulpa amarilla), *sh* (*sherry* cromosoma 10, el fruto muestra un color amarillo con tintes rojizos), *hp-1* (*high pigment 1* cromosoma 2, el fruto presenta elevadas concentraciones de clorofila, carotenoides y ácido ascórbico), *hp-2* (*high pigment 2* cromosoma 1, el fruto posee elevados carotenoides y otros fitonutrientes), *t* (*tangerine* cromosoma 10, la pulpa del fruto y los estambres de la flor son de color naranja), *B* (*beta-carotene* cromosoma 6, el fruto exhibe coloración naranja con elevado contenido en  $\beta$ -caroteno), *at* (*apricot* cromosoma 5, el fruto luce una coloración amarilla-rosada), *og* (*old gold* cromosoma 6, el fruto posee cantidades elevadas de licopeno) y *Del* (*delta* cromosoma 12, el fruto cuando madura tiene un color rojizo anaranjado). Si bien las dos mutaciones espontáneas *hp-1* y *hp-2* contribuyen al aumento del nivel de licopeno, algunos efectos pleiotrópicos negativos se han percibido en estos casos (Jarret *et al.*, 1984). El mutante *r* afecta a un gen que codifica la fitoeno sintasa (PSY1), enzima que cataliza la primera etapa de la ruta de biosíntesis de carotenoides resultando en frutos amarillos (Fray y Grierson, 1993). El color naranja del mutante *t* se debe a la acumulación de pro-licopeno y el gen mutado corresponde a una isomerasa de carotenoides (Isaacson *et al.*, 2002). Tanto las mutaciones *Del* como *B* afectan genes que codifican una licopeno ciclasa, caracterizándose por la acumulación de altos niveles de  $\delta$ -caroteno el primero y de  $\beta$ -caroteno el segundo (Lewinsohn *et al.*, 2005). Como vemos, varios genes principales se han descrito para el color en tomate, sin embargo se cree que existen genes adicionales aun no caracterizados que afectan el color de los frutos. De hecho,

*QTLs* relacionados al color se han encontrado en los 12 cromosomas del tomate en diversos estudios (Foolad, 2007). Por ejemplo, en las generaciones BC<sub>2</sub> y BC<sub>3</sub> de un cruzamiento entre *S. pimpinellifolium* LA1589 y *S. lycopersicum* M82, Tanksley *et al.* (1996) detectaron cinco *QTLs* para el color en los cromosomas 2, 3, 4, 7 y 8. En este trabajo, se validaron *QTLs* en los cromosomas 6, 9 y 11. No obstante, considerando la segregación en frutos rojos y amarillos observada, se sugiere que habría más genes afectando el color de los frutos en nuestros materiales que no están siendo identificados.

Uno de los enfoques en el mejoramiento del tomate ha sido el desarrollo de nuevos cultivares con larga vida poscosecha, lo cual favorece su comercialización y distribución. En *S. lycopersicum* se conocen algunos genes mutantes como *rin* (*ripening inhibitor*, cromosoma 5), *nor* (*non ripening*, cromosoma 10) o *nr* (*never ripe*, cromosoma 9) que prolongan la vida poscosecha de los frutos (Giovannoni, 2004). Los tres mutantes extienden la vida poscosecha, pero a su vez ejercen efectos negativos reduciendo otros atributos de la calidad del fruto. Como alternativa, Zorzoli *et al.* (2000), Pereira da Costa *et al.* (2009) y Rodríguez *et al.* (2010) han demostrado la utilidad de las especies silvestres de tomate, como fuentes de genes que alargan la vida poscosecha de los frutos, sin los efectos indeseables que provocan los genes como el *rin* o *nor* sobre la calidad. En el trabajo previo a esta tesis, se mostró que Caimanta y *S. pimpinellifolium* LA722 son significativamente distintos para la vida poscosecha de los frutos, presentando LA722 el mayor valor ( $V_p = 15,26 \pm 0,60$  días). Además, la F<sub>1</sub> entre ellos no manifestó diferencias significativas, con el progenitor silvestre, indicando dominancia completa hacia LA722 para este rasgo (Pereira da Costa, 2012). Estos datos avalan la idea de que las especies silvestres, y en particular *S. pimpinellifolium*, son recursos genéticos alternativos para los programas de mejoramiento en los que se intenta aumentar este carácter. En las generaciones de retrocruzas analizadas en este trabajo, dos *QTLs* fueron validados para la vida poscosecha de los frutos, uno en el cromosoma 10 (*SSR318*) y otro en el 11 (*SSR080*). Para el *SSR080*, los efectos fueron estables en las generaciones, siendo el heterocigota quien presentó ventajas significativas extendiendo la vida poscosecha de los frutos frente a los homocigotas. En base a esto, podría plantearse que la combinación y la interacción entre estos genomas divergentes serían responsables de la mejora en este carácter. Rodríguez *et al.* (2006) y Pratta *et al.* (2011b) propusieron que la vida poscosecha de los frutos de tomate podía prolongarse por genes de ambos padres (tanto el de más corta como el de más larga vida poscosecha), lo que explicaba la segregación transgresiva detectada para este rasgo en la F<sub>2</sub> y en algunas *RILs* derivadas del

cruzamiento entre *S. pimpinellifolium* y Caimanta. Plantearon que ambos progenitores posiblemente lleven algunos genes con efectos positivos y otros con efectos negativos sobre este carácter, cuya segregación y recombinación originarían la variación transgresiva observada. Además, de manera similar a lo percibido en este trabajo, estos autores afirmaron que la vida poscosecha del fruto es un carácter complejo y resulta muy influenciado por las condiciones ambientales.

La firmeza del fruto de tomate no solo afecta las preferencias del consumidor, sino también otros atributos importantes como la resistencia a enfermedades o la vida poscosecha. El aumento de la firmeza es una característica deseada dado que reduce el daño de los frutos durante el transporte para su comercialización en el mercado en fresco, simplificando la logística de la cadena de distribución y reduciendo el desperdicio poscosecha. La firmeza es un carácter complejo que involucra diversos genes y rutas metabólicas (Brummell y Harpster, 2001), siendo influenciada por factores como la estructura de la pared celular, la turgencia (Saladié *et al.*, 2007) y propiedades de la cutícula (Chaïb *et al.*, 2007). Tradicionalmente, la vida poscosecha se ha vinculado estrechamente al ablandamiento de los frutos, siendo este atribuido exclusivamente al metabolismo de la pared celular. Algunos estudios han mostrado que habría diversos factores involucrados en estos procesos y que, si bien se hallan relacionados, la vida poscosecha y la firmeza podrían controlarse en forma independiente. Mutschler *et al.* (1992) obtuvieron un incremento en la vida poscosecha de los frutos, en el híbrido entre un mutante con genes *alc* (*alcobaca*, alelo de *nor*) y un cultivar normal para la madurez, sin modificaciones en su firmeza. En nuestras retrocruzas derivadas de Caimanta y LA722 se validaron tres asociaciones a la firmeza del fruto, una en el cromosoma 1 (*SSR095*) y dos en el cromosoma 10 (*SSR596* y *SSR318*). En estos *QTLs* los alelos silvestres disminuyeron la media del carácter, lo cual no sería deseable desde el interés comercial. La región señalada por el *SSR318* se halló asociada también a la vida poscosecha de los frutos, pero en este caso los alelos silvestres determinaron un aumento de la misma. Si bien la reducción de la firmeza no sería lo buscado, esto apoya la idea de que la vida poscosecha y la firmeza pueden modificarse en forma independiente. Doganlar *et al.* (2002) detectaron *QTLs* para la firmeza del fruto en los cromosomas 2 y 10 de tomate. De manera similar a lo observado en este trabajo, el *QTL* del cromosoma 10 (*firm10.1*) mostró una disminución en la firmeza por efecto de los alelos de *S. pimpinellifolium*, coincidiendo también con un *QTL* identificado previamente en un estudio con *S. neorickii* (LA1223) (Fulton *et al.*, 2000).

Los sólidos totales representan entre el 4 y 7,5 % del peso fresco del fruto de tomate, dividiéndose en sólidos solubles (un 75 %, principalmente glucosa y fructuosa) y sólidos insolubles (un 25 %, que incluyen proteínas, celulosa, hemicelulosa, pectina y polisacáridos). Jones y Scott (1984) señalaron que altos contenidos de azúcares incrementan el gusto y el sabor del tomate. Dentro de los cultivares comerciales, se estima que el contenido en sólidos solubles se encuentra cerca del 4,6 % del peso fresco, para cultivares de consumo en fresco, y del 6,3 % para los destinados a industria. Sin embargo, en algunas accesiones silvestres, que incluyen las especies *S. pimpinellifolium*, *S. chmielewskii* y *S. cheesmaniae*, se han identificado concentraciones de entre 9 y 15 % de sólidos solubles (Hewitt y Garvey, 1987; Foolad, 2007). Al presente, se han realizado muchas investigaciones de *QTLs* para el contenido en sólidos solubles en tomate, las cuales han asociado diferentes regiones a lo largo de sus 12 cromosomas a este carácter (Foolad, 2007). Uno de los más estudiados ha sido el *QTL Brix 9-2-5* (cromosoma 9) que incrementa el contenido de azúcar en un 25 % y el gen responsable corresponde a una invertasa apoplástica (*lin5*) que modula la partición de azúcares en el fruto (Fridman *et al.*, 2000). Sin embargo, y a pesar de la existencia de valiosa variabilidad genética en este carácter, el éxito en la mejora ha sido limitado, principalmente debido a la correlación negativa encontrada entre el contenido en sólidos solubles y caracteres como el rendimiento y/o el peso del fruto. Muchos estudios han revelado que *QTLs* que influyen positivamente en el contenido en sólidos solubles se localizan en las mismas regiones cromosómicas que *QTLs* que impactan negativamente en el peso del fruto, atribuyendo el aumento en los sólidos solubles a disminuciones del peso y viceversa (Tanksley *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1999; Bernacchi *et al.*, 1998b; Doganlar *et al.*, 2002). De hecho, recientemente Tieman *et al.* (2017) mostraron que la fuerte correlación negativa entre el peso del fruto y el contenido en sólidos solubles en *S. lycopersicum* estaría relacionada con la pérdida de alelos, para alto contenido en azúcares, simultánea a la selección para frutos más grandes durante la domesticación y mejora. En este estudio, se afirma que *loci* genéticos involucrados en la determinación del contenido en azúcares se encuentran dentro de regiones fuertemente seleccionadas por la búsqueda de frutos más grandes. De este modo, la domesticación y mejora hacia alelos cultivados de frutos más grandes en estas regiones llevó a que la mayoría de cultivares modernos contengan los alelos de reducción del contenido de azúcares en estos *loci*, resultando en la alta correlación negativa observada entre el tamaño y el contenido de sólidos solubles de los frutos. En particular, el *locus* previamente identificado del cromosoma 9 (*lin5*) sería una muestra clara de esto (Tieman

*et al.*, 2017). En el presente trabajo, un *QTL* para el contenido en sólidos solubles se validó en el cromosoma 1 (*SSR220060*), donde la presencia de alelos de LA722 en la región aumentó este rasgo, pero también produjo una reducción en el tamaño del fruto. No obstante, otra asociación se validó en el cromosoma 11 (*SSR080*), la cual pareciera no afectar el tamaño del fruto, apoyando la idea de que es posible encontrar *QTLs* para aumentar el contenido en sólidos solubles, sin efectos negativos sobre el peso (Barrantes *et al.*, 2016). Además, coincidiendo con Barrantes (2014), se advirtió que en la mayoría de los *QTLs* detectados para los sólidos solubles los alelos silvestres determinaron un aumento de este carácter, resultando de gran valor agronómico.

El sabor de los frutos de tomate se relaciona fundamentalmente con el contenido de azúcares solubles, ácidos grasos y compuestos volátiles (Saliba-Colombani *et al.*, 2001). La relación entre azúcares y ácidos determina la intensidad del sabor, de manera que altos contenidos de azúcares y altos niveles de ácidos serían necesarios para alcanzar un mejor sabor en el fruto (Grierson y Kader, 1986). Diversos investigadores sostienen que un aumento en alguno de estos compuestos produce una mejora en la calidad del sabor (Stevens *et al.*, 1977; Jones y Scott, 1983). Además, la acidez del fruto repercute en la capacidad de almacenamiento del tomate procesado, ya que un pH más bajo reduce el riesgo de crecimiento de patógenos en los productos de tomate. Por estas razones, un pH inferior a 4,5 y un ácido cítrico superior a 0,35 g / 100 g de peso fresco del fruto son deseables (Foolad, 2007). En las diversas generaciones de las retrocruzas derivadas de Caimanta y LA722, se validaron cuatro asociaciones a la acidez titulable de los frutos, correspondientes a los cromosomas 5 (*SSR162*), 10 (*SSR034* y *SSR596*) y 11 (*SSR080*). En algunas de estas asociaciones, los efectos de los alelos silvestres fueron variables a través de las generaciones, pero en general promovieron un aumento de la acidez del fruto, volviéndose de interés agronómico. Previamente, Causse *et al.* (2004) detectaron 15 *QTLs* para la acidez (cromosomas 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11 y 12) y 11 para el pH (cromosomas 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11 y 12) en *NILs* de *S. pennellii* LA716, señalando cinco *QTLs* comunes para ambos caracteres donde los alelos de *S. pennellii* aumentaron la acidez y redujeron el pH.

En las comparaciones a través de las generaciones de retrocruzas en este trabajo se advirtieron diferencias en cuanto a la detección y a la estabilidad de diversos *QTLs*. Estas discrepancias observadas pueden atribuirse tanto a causas biológicas como experimentales. La no detección de un *QTL* que había sido reportado en una generación anterior puede deberse a

la pérdida de la asociación entre el marcador y el *QTL*, como consecuencia de la recombinación durante los cruzamientos. Incluso, debido a esta recombinación, podría formarse alguna nueva asociación, observándose *QTLs* no revelados anteriormente. Además, al avanzar en las generaciones, la recombinación genera diferentes *background* genéticos que pueden alterar la expresión de un *QTL*. Es decir, la falta de consistencia de los *QTLs* puede atribuirse a cambios en el fondo genético y en las interacciones epistáticas que experimentan. En adición, Chaïb *et al.* (2006) postularon que nuevos *QTLs* pueden evidenciarse debido a la fijación de *QTLs* mayores que previamente segregaban. Esta fijación de regiones con efectos mayores permite la expresión de otras que se encontraban enmascaradas. Sumado a todo esto, las influencias ambientales sobre un *QTL* pueden ser significativas. De este modo, diversos *QTLs* se fueron perdiendo y otros nuevos fueron apareciendo a través de las generaciones, principalmente como consecuencia de las recombinaciones, las variaciones en el fondo genético y/o los efectos ambientales. Al mismo tiempo, algunos *QTLs*, si bien fueron hallados en diversas generaciones, manifestaron diferencias en sus efectos. La mayoría de los *QTLs* validados en este trabajo (24 de 38) mostraron efectos consistentes a través de las generaciones, sin embargo algunos presentaron ciertas discrepancias (resultados Tabla II.8). En relación a esto, Chaïb *et al.* (2006) compararon los *QTLs* detectados en una población de *RILs* con aquellos hallados en la generación BC<sub>3</sub>S<sub>1</sub> y en las *NILs*, encontrando grandes diferencias en el efecto alélico de los *QTLs* en los distintos *background* genéticos. Por su parte, Asíns *et al.* (1994) evaluaron 15 caracteres cuantitativos, durante tres años, detectando 17 *QTLs* putativos, de los cuales solamente tres tuvieron efectos consistentes en los tres años. Los autores señalaron que además del poder del test estadístico o el grado de contribución de un *QTL* a la variación genética del carácter, la interacción con el ambiente resulta transcendental en relación a la estabilidad de los *QTLs*.

## **(II) DESARROLLO Y OBTENCIÓN DE NILs**

En Argentina, la producción de nuevas variedades vegetales ha estado muy relegada, y las necesidades y demandas de nuestros productores y consumidores se han visto desatendidas. Impulsar el desarrollo y la producción dentro del cinturón hortícola de Rosario implica atender las problemáticas regionales, revalorizar las capacidades y materiales locales, y dirigir el crecimiento hacia el beneficio tanto de productores como consumidores. En este sentido, el

desarrollo de nuevos materiales vegetales para el cultivo de tomate es una de las principales contribuciones de esta tesis, constituyendo un aporte a la comunidad y al progreso regional y nacional. Además, la semilla mejorada genéticamente representa el principal vehículo de agregación de valor en productos primarios agrícolas. Como fruto de este trabajo, se consiguieron 22 nuevas líneas de tomate a partir del cruzamiento interespecífico entre el cultivar argentino Caimanta de *S. lycopersicum* y la accesión LA722 de *S. pimpinellifolium*. Para el desarrollo de estas líneas se realizaron tres o cuatro ciclos de retrocruzas hacia el padre recurrente Caimanta, utilizando la especie silvestre *S. pimpinellifolium* como padre donante. Se alcanzaron diversas líneas con regiones genómicas silvestres introgresadas en el contexto genético cultivado. Estas representan líneas casi isogénicas a Caimanta (*NILs*), con nuevos atributos aportados por la especie silvestre, y constituyen potenciales cultivares comerciales o bien progenitores de programas de mejoramiento. Además, son recursos genéticos sumamente valiosos para continuar estudiando las bases genéticas del proceso de madurez del fruto, y aquellos componentes que definen caracteres de importancia agronómica y de la calidad, tales como el peso, la vida poscosecha, el color, el sabor y la textura de los frutos en tomate. Existen numerosas ventajas de contar con una población de *NILs*. El aislamiento de distintas regiones del donante silvestre y su introgresión en el *background* de interés puede revelar *QTLs* o interacciones epistáticas que de otra manera quedarían enmascarados bajo la alta proporción del genoma donante y efectos de solapamiento. La exposición de nuevos fenotipos, no presentes en las líneas parentales, a causa de nuevas combinaciones e interacciones entre alelos del donante y el *background* receptor puede generar una variabilidad no imaginada (Lippman *et al.*, 2007). Las *NILs* resultan muy útiles para los estudios de *QTLs*, obteniéndose estimaciones bastante precisas al aislarse del contexto genético del dador y facilitándose su aplicación al desarrollo de variedades comerciales al trabajar directamente sobre el cultivar de mejora (Eshed y Zamir, 1996). En adición, la inmortalidad de las *NILs* permite tomar medidas fenotípicas en repeticiones múltiples, replicando ensayos en más de una ubicación y con el tiempo. Esto reduce las variaciones, aumenta el poder estadístico y posibilita la estimación de interacciones ambientales, consideraciones importantes cuando se trabaja con caracteres de herencia compleja (Paterson *et al.*, 1991; Eshed *et al.*, 1996; Gur y Zamir, 2004).

Otro aporte a destacar de este trabajo es la metodología aplicada para el desarrollo de las *NILs*, que al utilizar caracteres fenotípicos y moleculares permitió optimizar la selección de

plantas, lográndose una mejora significativa de la eficiencia en cuanto a tiempos y cantidad de materiales requeridos. Simultáneamente, durante el proceso se adquirió un buen conocimiento de los materiales vegetales. Con esta estrategia de trabajo, basada en el *AB-QTL análisis* propuesto por Tanksley y Nelson (1996), se acoplaron los estudios de *QTLs* al desarrollo de nuevas variedades. En cada retrocruza, se escogieron aquellas plantas que presentaban alguna introgresión silvestre de interés y, a su vez, las que mostraban el menor porcentaje del genoma donante fuera de la región diana y caracteres fenotípicos promisorios, en especial para la vida poscosecha de los frutos. Así, los datos moleculares y fenotípicos asistieron en la introgresión de regiones genómicas asociadas a caracteres de calidad de fruto y en la recuperación del genoma de Caimanta, avanzando más rápido y más eficientemente. De esta manera, se lograron obtener nuevas líneas en un número de generaciones relativamente bajo (tres o cuatro retrocruzas y alguna autofecundación), alcanzándose las primeras *NILs* en generaciones tempranas de forma análoga a lo informado por Eshed y Zamir (1995) y Tanksley y Nelson (1996) quienes aplicaron estrategias similares. Además de los beneficios en cuanto a tiempo y recursos, un número bajo de generaciones supone una baja frecuencia de doble recombinaciones, y por tanto, conlleva a una buena calidad en la recuperación del fondo genético cultivado. Otro aspecto a mencionar es que durante el desarrollo de estas líneas no se presentaron problemas de recombinación o compatibilidad entre los genomas parentales.

La secuenciación de los genomas de Caimanta y LA722 permitió el desarrollo de nuevos marcadores (Cambiaso, 2017), gracias a lo cual fue posible realizar una mayor caracterización molecular de las líneas obtenidas, complementando los análisis conducidos con los marcadores microsatélites. Como resultado se detectaron varias introgresiones adicionales en cada una de las líneas (resultados Tabla II.9). La presencia de introgresiones no-diana se debe, principalmente, al número limitado de marcadores disponibles al momento de comenzar el proceso de desarrollo de las *NILs*. Varias regiones del genoma quedaron sin una adecuada cobertura, y por lo tanto, sin ser sometidas a una presión de selección fijaron alelos en forma aleatoria. En nuestros materiales esto se evidenció claramente en el cromosoma 4, el cual al no contar con ningún *SSR* durante el proceso de selección resultó con una elevada proporción de introgresiones silvestres adicionales. La presencia de introgresiones no-diana en el desarrollo de *NILs* ha sido reportada por varios autores. De hecho, Mahone *et al.* (2013) plantearon que las líneas ideales que contienen solamente un único segmento cromosómico del progenitor

exótico por lo general en la práctica no están disponibles, ya sea porque existen múltiples segmentos y/o largos segmentos están presentes. Eichten *et al.* (2011) y Pea *et al.* (2013) desarrollaron *NILs* de maíz sin controlar el fondo genético y, luego de realizar un genotipado de alto rendimiento de las líneas obtenidas, encontraron que el número de introgresiones todavía era relativamente alto (un promedio de ocho para Eichten *et al.* (2011) y entre 10-19 introgresiones por *NIL* para Pea *et al.* (2013)). Estos autores afirmaron la importancia de controlar el trasfondo genético, durante el procedimiento de introgresión, para garantizar la homogeneidad del genoma recurrente en el fondo genético de las *NILs*. En el desarrollo de unas líneas de arroz mediante selección asistida por marcadores *AFLP* (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*) y microsatélites, Falke *et al.* (2008) detectaron segmentos adicionales del dador no revelados previamente luego de escanear el genoma completo de sus líneas con *SSR* complementarios (entre 77 y 114 *SSR* nuevos). Hallaron entre una y nueve introgresiones del parental dador en las líneas seleccionadas, las cuales catalogaron como candidatos para futuras líneas de introgresión, denominadas pre-*NILs*, debido a su alto potencial. Situaciones similares se observaron en las colecciones de introgresión de von Korff *et al.* (2004) en cebada y Liu *et al.* (2006) en trigo. Según Falke *et al.* (2008), el número de segmentos cromosómicos del dador por pre-*NIL*, aun relativamente grande, es en parte debido a los largos tramos del genoma que quedaron cubiertos solo por un marcador. Esto representa un fuerte indicio de que durante el proceso de introgresión el número restringido de marcadores representa una limitación y es importante saturar con marcadores para el adecuado control de la recuperación del genoma recurrente y de la calidad de las líneas (Falke *et al.*, 2008). En este trabajo detectamos introgresiones adicionales en las 22 líneas desarrolladas, con un total de 120 introgresiones no-diana en todo el conjunto y un promedio de 5,5 por línea (resultados Tabla II.9). Del total, 94 introgresiones presentaron una condición heterocigota y 26 fueron homocigotas para los alelos de LA722. La mayor cantidad de introgresiones adicionales halladas en una línea fue 12 y la menor cantidad dos. Schmalenbach *et al.* (2011) al realizar un genotipado de alto rendimiento de sus *NILs* de cebada encontraron que el 76 % contenía de una a cuatro introgresiones adicionales no detectadas con los 98 *SSR* utilizados en el desarrollo de las misma. Xu *et al.* (2010), en un proceso asistido con marcadores (*SSR* e *INDELs*) a una densidad media de 1,46 Mb por marcador, obtuvieron una colección de 128 líneas de introgresión de arroz. Estudios posteriores de estas líneas con una mayor cobertura revelaron 117 introgresiones no-diana en la colección, donde el 50 % de la población mostró de dos a seis introgresiones no

detectadas previamente. En este sentido, el monitoreo con marcadores genéticos a mediana densidad ciertamente reduce el número de introgresiones no-diana, si bien no garantiza que sean completamente eliminadas. Las nuevas tecnologías de genotipado masivo de alta densidad, con varios miles de marcadores o de re-secuenciación de genomas, permiten determinar la calidad de la constitución genómica, con una resolución impensable hasta hace unos años atrás. La aplicación de estas tecnologías en líneas obtenidas usando mapas genéticos de media densidad ha mostrado que en general la uniformidad del fondo genético es menor de la esperada, con más introgresiones no-diana que las que originalmente se habían detectado con mapas menos saturados (Xu *et al.*, 2010; Schmalenbach *et al.*, 2011). Más recientemente, Barrantes *et al.* (2014) demostraron que la inclusión de estas tecnologías de genotipado masivo de alto rendimiento en etapas tempranas, de un plan de mejora para la obtención de *NILs* de tomate, puede garantizar la integridad de los fragmentos de introgresión, optimizar la recuperación del *background* recurrente y reducir los doble recombinantes que llevan a introgresiones adicionales. En la colección de 53 *NILs* derivada de este proceso, Barrantes *et al.* (2014) detectaron solo 37 introgresiones no-diana, con un promedio de 0,7 introgresiones extra por *NIL*, en general de tamaño pequeño (más del 90 % inferior a 2 Mb) y solo algunas de mayor longitud en regiones centroméricas de baja recombinación y no cubiertas por el mapa genético inicial. Esta estrategia, además de reducir el tiempo en el desarrollo de *NILs*, aumentó en gran medida la calidad de las líneas obtenidas, ratificando nuevamente la importancia de controlar el fondo genético eficientemente (Barrantes, 2014).

En este trabajo, si bien la caracterización molecular complementaria de las líneas obtenidas no se realizó mediante un genotipado de alta densidad, como se propone en varios estudios, debe destacarse que los marcadores *INDELS* empleados fueron seleccionados considerando tanto distancias físicas como genéticas. La selección de marcadores basados únicamente en su posición física introduciría un sesgo en el diseño ya que las regiones heterocromáticas con poca recombinación (como las centroméricas) podrían resultar sobre-representadas dando información redundante y, a su vez, la densidad de marcadores en las regiones eucromáticas con elevada recombinación podría no ser suficiente. Por su parte, los marcadores seleccionados solo en función de un mapa genético también introducirían errores, porque si bien las regiones eucromáticas resultarán saturadas en marcadores, las regiones heterocromáticas, que pueden ser grandes segmentos, podrían no quedar adecuadamente cubiertas. En este sentido, el empleo en forma conjunta de distancias físicas y genéticas para la

selección de los marcadores *INDELS* permitió un diseño más eficaz del ensayo de genotipado para ampliar la caracterización molecular de las nuevas líneas.

Como se determinó a partir de los últimos análisis moleculares, las líneas obtenidas hasta aquí no constituyen *NILs* en el sentido estricto del término. No obstante, estas líneas tienen una alta proporción del genoma cultivado y una baja frecuencia de alelos deletéreos o perjudiciales del progenitor silvestre. El porcentaje del genoma de Caimanta recuperado determinado en base a los nuevos datos moleculares resultó entre un 90,6 % y un 98,3 %, dependiendo la línea (resultados Tabla II.9). Estos materiales, que ahora podríamos catalogar como **pre-*NILs***, acercan la diversidad genética silvestre al germoplasma cultivado, volviéndose muy útiles para estudiar regiones genómicas o *QTLs* involucrados en la determinación de caracteres de interés y para el desarrollo de nuevas variedades comerciales. Falke *et al.* (2008) resaltaron la importancia y el valor de las pre-*NILs*. Estas líneas hacen rápidamente disponible una amplia gama de variación genética inexplorada a los fitomejoradores y genetistas. Son recursos dinámicos, que pueden fomentar futuros programas de mejoramiento y proporcionar información valiosa en investigaciones genéticas. De hecho, diversos estudios se han realizado con pre-*NILs*, con introgresiones múltiples, e incluso se ha indicado que en ciertas ocasiones pueden resultar más convenientes que trabajar con las *NILs* (Mahone *et al.*, 2013; Ofner *et al.*, 2016). Al mismo tiempo, aquellas pre-*NILs* que manifiesten características superiores al padre elite pueden usarse en forma directa o mediante la recombinación con otros materiales para el desarrollo de nuevas variedades (Falke *et al.*, 2008). En nuestras pre-*NILs* de tomate, la gran proporción del genoma cultivado junto al aporte de alguna región silvestre, las convierte en potenciales nuevos cultivares. Ciertamente, son excelentes materiales de pre-mejora para continuar trabajando y estudiando, y en uno o unos pocos ciclos de retrocruzas o autofecundaciones anexos pueden conseguirse auténticas *NILs* recuperando el genoma de Caimanta en las regiones no-diana. Como ventaja adicional, con pocos pasos complementarios, podrían generarse nuevas *NILs* para los segmentos detectados mediante los marcadores *INDELS*, ampliando la población de mejora.

## CONCLUSIONES PARCIALES

---

- Se obtuvieron las generaciones BC<sub>3</sub> y BC<sub>4</sub> del cruzamiento entre el cultivar Caimanta y la accesión LA722 de *S. pimpinellifolium*, mediante un proceso asistido con marcadores moleculares y caracteres fenotípicos. La información molecular y fenotípica favoreció la selección de plantas con introgresiones de interés y con una buena recuperación del genoma recurrente, haciendo el proceso más dirigido y eficiente.
  
- El análisis de la generación BC<sub>3</sub> reveló diversas regiones genómicas asociadas a caracteres de calidad del fruto en esta retrocruza avanzada, mostrando la existencia de variabilidad genética beneficiosa en estos materiales de tomate.
  
- La comparación a través de las distintas generaciones de retrocruzas derivadas de Caimanta y LA722 posibilitó la validación 38 regiones genómicas asociadas a diversos caracteres de calidad de fruto. Estos estudios aportaron a los conocimientos básicos de los determinantes genéticos que hacen a la calidad del fruto en nuestros materiales y en el tomate.
  
- A partir de las generaciones BC<sub>3</sub> y BC<sub>4</sub> lograron derivarse 22 líneas casi isogénicas a Caimanta, mediante un proceso dirigido por marcadores *SSR* y caracteres fenotípicos. Se desarrollaron 22 líneas con el contexto genético del cultivar Caimanta que difieren en solo una de las regiones cromosómicas indicadas por los *SSR* y aportadas por LA722 de *S. pimpinellifolium*.
  
- Una caracterización molecular complementaria reveló que las líneas obtenidas conservaban aún diversas introgresiones no-diana de *S. pimpinellifolium*, categorizándolas como pre-*NILs*. Estas 22 pre-*NILs* de tomate cuentan con ciertas fracciones del genoma silvestre de *S. pimpinellifolium* en el fondo genético cultivado, constituyendo nuevos recursos vegetales muy valiosos para estudios genéticos de caracteres de calidad de fruto y para el desarrollo de nuevas variedades comerciales.

## **CAPÍTULO III**

### **EVALUACIÓN Y VALORACIÓN DE pre-NILs**

## INTRODUCCIÓN

---

Las *líneas casi isogénicas* (*NILs*) son líneas que contienen un fragmento cromosómico único de un progenitor que actúa como donante dentro del fondo genético de otro progenitor que actúa como receptor (Zamir, 2001; Lippman et al., 2007). El desarrollo de *NILs*, utilizando como receptor un cultivar o variedad elite y como donante una especie silvestre, facilita la introducción de nueva variabilidad genética en el germoplasma elite. Estas líneas con introgresiones silvestres en el contexto cultivado permiten estudiar el aporte de genes o *QTLs* silvestres en un fondo genético apropiado. Mediante esta estrategia, es posible revelar alelos silvestres beneficiosos y alcanzar nuevos cultivares con una actuación superior, mejorando variedades elite y enriqueciendo la diversidad del germoplasma cultivado. Además, cada línea llevará solo una pequeña fracción del genoma silvestre, por lo cual se eliminan gran parte de los problemas asociados al uso de especies exóticas, evitándose así posibles complicaciones de esterilidad, combinaciones deletéreas o efectos indeseables del arrastre por ligamiento que pueden ocurrir en cruces distantes que implican especies silvestres. Al mismo tiempo, algunos rasgos y el manejo agronómico de las plantas serán más similares a los de la especie cultivada, representando una ventaja en la conducción de los ensayos (Lippman et al., 2007).

Las *NILs* constituyen una herramienta muy valiosa para la identificación y localización de *loci* de caracteres cuantitativos (*QTLs*) (Zamir, 2001). Por un lado, el mapeo de *QTLs* se ve simplificado ya que las *NILs* difieren del padre recurrente solo en un fragmento de ADN aportado por el padre donante, y por lo tanto, las diferencias fenotípicas pueden atribuirse directamente al segmento introgresado (Eshed y Zamir, 1995). Todos los efectos de la variación fenotípica están asociados con el segmento introducido y la potencia para la detección de *QTLs* individuales se incrementa. Además, al presentar solo una pequeña proporción del genoma dador, en comparación con otras poblaciones segregantes, en las *NILs* se reduce notablemente la variación genética adicional no asociada al segmento de interés y el enmascaramiento debido a interacciones epistáticas entre genes del dador. Esto las convierte en un sistema único y altamente eficiente para la identificación de *QTLs* (Eshed et al., 1996; Schauer et al., 2006; Lippman et al., 2007). En adición, un gran beneficio de las *NILs* radica en que conforman una población de mapeo eterna. El efecto del segmento introgresado puede ser evaluado en distintas localidades y años, permitiendo el análisis en diversos ambientes y condiciones (Schauer et al., 2006). No menos importante, es su aplicabilidad inmediata en el mejoramiento y en el

desarrollo de nuevos materiales. Si el padre recurrente es una variedad elite, las *NILs* derivadas representarán la base directa para un nuevo cultivar. De este modo, no se requieren programas adicionales para la transferencia de *QTLs* al material de mejora y se evita el riesgo de que alelos de *QTLs* pierdan sus efectos al ser llevados a un nuevo fondo genético (Tanksley y Nelson, 1996).

Frente a los numerosos beneficios de las *NILs*, el principal inconveniente es el largo tiempo y la cantidad de trabajo requeridos para su desarrollo. En los últimos años, las estrategias basadas en marcadores moleculares han facilitado su obtención, y diversas poblaciones de líneas casi isogénicas fueron conseguidas tanto con fines básicos de investigación como aplicados para la creación de nuevos cultivares. En tomate, la primera colección de *NILs* se desarrolló entre *S. pennelli* LA716 y *S. lycopersicum* (cv. M82) (Eshed y Zamir, 1995; Zamir, 2001). Esta población exhibió un mayor poder de mapeo de *QTLs*, en comparación con una población bialélica derivada del mismo cruzamiento, y fue exitosa en la identificación de diversas regiones asociadas a caracteres de fruto y otros de importancia agronómica y nutricional. Otras poblaciones de *NILs* se diseñaron luego con varias especies, entre ellas *S. pimpinellifolium* LA1589 (Tanksley *et al.*, 1996; Bernachi *et al.*, 1998b), LA2093 (Kindale y Foolad, 2013) y más recientemente TO-937 (Barrantes *et al.*, 2014); *S. pennellii* LA0716 (Eshed y Zamir, 1995); *S. habrochaites* LA1777 (Monforte y Tanksley, 2000a), LA0407 (Francis *et al.*, 2001) y LYC4 (Finkers *et al.*, 2007) y *S. lycopersicoides* (Chetelat y Meglic, 2000; Canady *et al.*, 2005). Estas colecciones de *NILs* han demostrado ser extremadamente útiles en diversas investigaciones genéticas, en los análisis de *QTLs*, en el mapeo fino de caracteres y, muy importante, en la introducción de nueva variabilidad genética proveniente de las especies silvestres en el germoplasma elite (Barrantes *et al.*, 2014).

Las *NILs* son llamadas así porque son líneas muy similares que difieren solo en un segmento genómico, idealmente en uno o unos pocos genes. Sin embargo, en la práctica estas líneas ideales que contienen un único segmento cromosómico del padre donante resultan difíciles de alcanzar (Mahone *et al.*, 2013). De hecho, en los últimos años las nuevas tecnologías de genotipado masivo de alto rendimiento y de secuenciación han mostrado que diversas poblaciones de líneas de introgresión contenían, en realidad, varias introgresiones no-diana adicionales, no detectadas previamente con métodos de menor cobertura genómica (Xu *et al.*, 2010; Schmalenbach *et al.*, 2011). A partir de estos conocimientos, los materiales con

introgresiones múltiples se han clasificado como **pre-NILs**, ajustándose sus análisis y obteniéndose representaciones más certeras y no menos valiosas. Las pre-NILs comparten muchas de las ventajas que presentan las NILs. Ciertamente, las pre-NILs exhiben también una baja proporción del genoma donante, por lo que permiten estudios de *QTLs* más precisos, favorecen diversas investigaciones genéticas, facilitan el manejo de las poblaciones de trabajo y contribuyen directamente al mejoramiento. Diversos estudios se han llevado a cabo con líneas con introgresiones múltiples e incluso se ha indicado que en ciertas ocasiones pueden resultar más convenientes que las NILs. Ofner *et al.* (2016) propusieron que una colección de *BILs*, con introgresiones múltiples, puede generar mapas de mayor resolución, en comparación con un número similar de NILs. Las *BILs*, definidas como líneas de retrocruzas endocriadas, tienen una baja proporción del genoma donante silvestre en un fondo genético uniforme con altos niveles de homocigosis, lo cual las vuelve muy precisas en la identificación, caracterización y localización de *QTLs* (Foolad, 2007). A diferencia de las *BILs*, las NILs poseen un único segmento introgresado del donante silvestre, de manera que toda su caracterización fenotípica y molecular proporcionará información sobre una sola región. Esto puede resultar bastante costoso e incluso derrochador, ya que si en su lugar empleamos una *BIL* con múltiples segmentos introgresados es posible escanear una serie de regiones genómicas a la vez. Las *BILs* deben incluir varias introgresiones por línea, pero no demasiadas, de manera tal que la epistasis se mantenga razonablemente baja y se facilite la asociación de los rasgos a un segmento genómico definido. Ofner *et al.* (2016) desarrollaron un conjunto de 446 *BILs*, derivadas de *S. pennellii* (LA0716) y M82, a partir de dos o tres generaciones de retrocruzas, seguidas por ocho autofecundaciones, y demostraron la eficacia de estas *BILs* para el mapeo de caracteres simples y complejos, derivados de la especie silvestre en tomate. En otro trabajo, Mahone *et al.* (2013) establecieron un procedimiento de análisis para determinar *QTLs* en forma precisa, en líneas con múltiples segmentos cromosómicos del dador introgresados. La combinación de una prueba de Dunnett con un modelo lineal constituyó una valiosa herramienta para identificar y localizar un *QTL* entre las diversas introgresiones presentes en estas pre-NILs. Al mismo tiempo, estas exploraciones favorecen en gran medida el desarrollo de futuras NILs, ya que solo los segmentos con un efecto significativo precisan ser aislados, eliminando la necesidad de evaluar todos los segmentos cromosómicos introgresados, reduciendo tiempos y recursos (Mahone *et al.*, 2013). De esta manera, la evaluación y caracterización de colecciones de pre-NILs resultan muy convenientes y pueden derivar en grandes aportes a estudios genéticos y programas de

mejoramiento, permitiendo comprender mejor la utilidad del germoplasma silvestre a la mejora de la especie cultivada y avanzar de manera más eficiente hacia la obtención de nuevas variedades.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

---

- Caracterizar fenotípicamente pre-*NILs* de tomate que comparten el fondo genético del cultivar Caimanta y difieren en regiones cromosómicas aportadas por la especie silvestre *S. pimpinellifolium*.
- Evaluar el efecto de regiones de interés introgresadas desde LA722 en el fondo genético de Caimanta, señaladas por los marcadores *SSR* en las diversas pre-*NILs* obtenidas.
- Validar *QTLs* hallados en las pre-*NILs*, a través de la comparación con las generaciones precedentes de retrocruzas, derivadas del cruzamiento entre Caimanta y LA722.
- Determinar el comportamiento integral de las pre-*NILs* en relación al cultivar Caimanta.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### MATERIAL VEGETAL

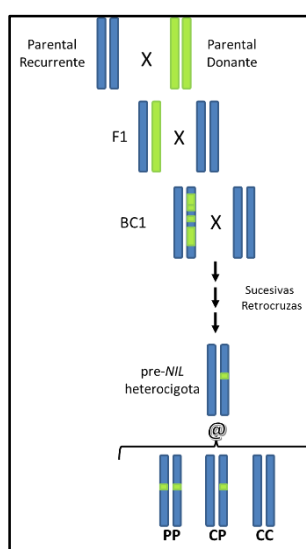
Diversas pre-*NILs* fueron obtenidas mediante un programa de retrocruzas asistido con datos moleculares y fenotípicos. Como se detalló en el Capítulo II, siguiendo un proceso de selección basado en marcadores *SSR* y caracteres de calidad de fruto, se generaron **22 pre-*NILs*** muy similares a Caimanta. En adelante, cada pre-*NIL* será nombrada en base al *SSR* que marca el segmento cromosómico de *S. pimpinellifolium* para el cual fue seleccionada dicha línea, independientemente de las introgresiones adicionales que presenten en otras regiones del genoma. Además, como se describió en el Capítulo II, para dos pares de *SSR* (*SSR320-SSR014* y *SSR063-SSR038*) que se encuentran muy próximos entre sí, los segmentos cromosómicos no lograron recombinarse y en las pre-*NILs* derivadas el segmento de LA722 introgresado abarcó los dos marcadores *SSR* contiguos. De aquí en adelante, estos *SSR* se considerarán en forma conjunta como un único segmento. Por otro lado, al tratarse de una retrocruza hacia el genotipo cultivado, las pre-*NILs* identificadas en las generaciones BC<sub>3</sub> o BC<sub>4</sub> presentaron el segmento *SSR* introgresado en estado heterocigota (“CP”, C representa el alelo de Caimanta y P el alelo de LA722 para el *locus* microsatélite correspondiente) y serán nombradas pre-*NIL-CP*. Una generación de autofecundación fue requerida para identificar las líneas propiamente dichas, con la condición homocigota para el segmento *SSR* proveniente de la especie silvestre, denominadas pre-*NIL-PP*.

Una vez conseguidas las pre-*NILs* se procedió a su evaluación y análisis. En la *campana* 2014/2015 se estudiaron nueve de las 22 pre-*NILs* obtenidas, y en la *campana* 2015/2016 se evaluaron 11 de las 13 restantes (dos, pre-*NIL128* y pre-*NIL070*, no llegaron a ser evaluadas dentro de este trabajo debido a cuestiones de tiempo y demoras en su obtención).

Para la caracterización de cada pre-*NIL* se llevaron a cabo dos tipos de análisis.

(1)- Por un lado, y en parte debido al conocimiento de que la región introgresada a partir de la especie silvestre no era única, se decidieron hacer estudios dentro de familias generadas a partir de cada pre-*NIL*, intentando disminuir las posibles fuentes de variación al comparar las plantas dentro de una familia. Advirtiendo que el fondo genético en cada pre-*NIL* no es tan uniforme, la evaluación de familias pre-*NILs*, considerando el segmento *SSR* de interés como fuente de variación, buscó conocer el efecto del segmento silvestre en ese entorno particular. Para ello,

cada una de las 20 pre-NIL en condición heterocigota para su segmento SSR proveniente de LA722 (pre-NIL-CP) se autofecundó, dando origen a una familia pre-NIL, la cual segrega para ese fragmento SSR particular (Figura III.1). Es decir, las familias pre-NILs estuvieron formadas por plantas con una constitución del fondo genético muy similar a Caimanta, pero que segrean en la región SSR introgresada desde LA722 (CC, CP y PP; C representa el alelo de Caimanta y P el alelo de LA722 para el *locus* microsatélite), independientemente de las otras introgresiones adicionales. Para el análisis, se llevó a cabo un ANOVA dentro de estas familias pre-NILs, utilizando como fuente de variación el segmento segregante correspondiente al SSR particular por el que fue seleccionada dicha línea. La evaluación de estas familias permite conocer el efecto del segmento SSR de interés en un contexto similar a Caimanta.



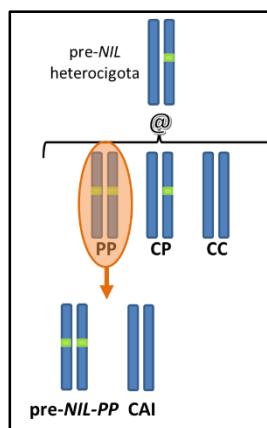
**Figura III.1-** Esquema de obtención de las familias pre-NILs segregantes para el segmento SSR.

Se sembraron 30 plantas por familia de cada pre-NIL y 10 plantas del progenitor Caimanta como testigo, en invernadero y bajo un diseño completamente aleatorizado en el que las unidades experimentales fueron las plantas. Se evaluaron 232 plantas y un total de 3.303 frutos, en la *campaña 2014/2015*, y 307 plantas y 3.896 frutos en la *campaña 2015/2016* (Tabla III.1).

**Tabla III.1-** Número total de plantas y de frutos evaluados en *S. lycopersicum* (Caimanta) y en las familias pre-NILs.

Campaña 2014/2015					Campaña 2015/2016				
Genotipo	Cr	Familia	n° Plantas	n° Frutos	Genotipo	Cr	Familia	n° Plantas	n° Frutos
Caimanta		progenitor	5	50	Caimanta		progenitor	9	120
pre-NIL095	1	BC <sub>4</sub> S <sub>1</sub>	26	417	pre-NIL598	2	BC <sub>3</sub> S <sub>1</sub>	29	382
pre-NIL220060	1	BC <sub>4</sub> S <sub>1</sub>	24	418	pre-NIL320-014	3	BC <sub>3</sub> S <sub>1</sub>	30	402
pre-NIL295	2	BC <sub>4</sub> S <sub>1</sub>	25	344	pre-NIL162	5	BC <sub>3</sub> S <sub>1</sub>	28	374
pre-NIL115	5	BC <sub>3</sub> S <sub>1</sub>	28	428	pre-NIL286	7	BC <sub>3</sub> S <sub>1</sub>	26	316
pre-NIL211044	6	BC <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	25	369	pre-NIL045	7	BC <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	26	322
pre-NIL276	7	BC <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	20	246	pre-NIL063-038	8	BC <sub>4</sub> S <sub>1</sub>	25	290
pre-NIL327	8	BC <sub>3</sub> S <sub>1</sub>	27	321	pre-NIL034	9	BC <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	18	222
pre-NIL069	9	BC <sub>3</sub> S <sub>1</sub>	26	410	pre-NIL596	10	BC <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	27	336
pre-NIL080	11	BC <sub>4</sub> S <sub>1</sub>	26	300	pre-NIL318	10	BC <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	30	414
<b>TOTAL</b>			<b>232</b>	<b>3.303</b>	pre-NILG036	11	BC <sub>4</sub> S <sub>1</sub>	29	352
					pre-NIL1061	11	BC <sub>4</sub> S <sub>1</sub>	30	366
					<b>TOTAL</b>			<b>307</b>	<b>3.896</b>

(2)- Por otro lado, también resulta de interés conocer el comportamiento de los nuevos materiales en relación al progenitor cultivado Caimanta. Para ello, de las plantas sembradas y caracterizadas molecularmente se seleccionaron aquellas que resultaron homocigotas para los alelos de *S. pimpinellifolium*, en el segmento *SSR* de interés, pre-NIL-PP (P, representa los alelos de LA722 para el locus microsatélite), que representan la pre-NIL propiamente dicha. Cada pre-NIL-PP (alelos silvestres en el segmento *SSR* introgresado) fue comparada con el cultivar Caimanta, mediante una prueba t-Student (Figura III.2). Aproximadamente cinco plantas de cada pre-NIL-PP se compararon con Caimanta. Este estudio nos brinda información acerca del comportamiento general de la nueva pre-NIL, en el cual participa todo el genoma, con los diversos fragmentos introgresados y sus interacciones.



**Figura III.2-** Esquema de comparación de la pre-NIL-PP con Caimanta (CAI).

### **CARACTERES FENOTÍPICOS**

Como se detalló en la sección Materiales y Métodos del Capítulo I, en cada planta se cosecharon de 10 a 12 frutos al estado *pintón* y se evaluaron los caracteres: peso (g), diámetro (cm), altura (cm), forma (altura/diámetro), espesor del pericarpio (cm), número de lóculos y vida poscosecha (días). En frutos cosechados al estado rojo maduro, se midió: contenido en sólidos solubles (°Brix), acidez, pH, firmeza y color (a través del porcentaje de reflectancia (L) y el cociente a/b). La firmeza y el color del fruto se determinaron en seis frutos por planta, mientras que para el contenido en sólidos solubles, pH y acidez la unidad experimental fue una muestra de jugo obtenida a partir de 3 a 8 frutos por planta, dependiendo del tamaño del fruto, y se realizaron tres repeticiones por planta, a partir de tres muestras de jugo independientes.

### **MARCADORES MOLECULARES**

Se emplearon los marcadores moleculares *SSR* descritos en el Capítulo I. Como se indicó anteriormente, cada familia derivada de una pre-*NIL-CP* segrega solo para uno de los 28 marcadores *SSR* utilizados en el proceso de selección. En la caracterización genotípica de cada familia pre-*NIL*, se analizó solo aquel *SSR* que fue heterocigota en la planta que le dio origen, determinándose así el genotipo de cada planta en dicho *locus* microsatélite (CC, CP o PP; C representa el alelo de Caimanta y P el de LA722). El resto de los marcadores *SSR* habrían fijado los alelos de Caimanta y no estarían segregando en la familia en estudio. La extracción de ADN, la amplificación y la visualización de los *SSR* se llevaron a cabo siguiendo los procedimientos detallados en la sección Materiales y Métodos del Capítulo I.

### **ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

Para el estudio de los caracteres fenotípicos se siguieron las metodologías clásicas de la genética cuantitativa (Kearsey y Pooni, 1996), como se indicó en la sección Materiales y Métodos del Capítulo I. En las distintas familias pre-*NILs* se estimó la variancia genética, calculándose los porcentajes de variancia fenotípica atribuible a variancia genética (%VG/VF), mediante un análisis de la variancia (ANOVA) (adaptado de Mariotti y Collavino, 2014). Las medias entre las diferentes familias se compararon mediante el test de Duncan.

La segregación mendeliana se examinó para cada *SSR*, probando la proporción esperada para la autofecundación de una planta heterocigota, pre-*NIL-CP*, (1:2:1, homocigotas CC:

heterocigotas CP: homocigotas PP, donde C representa el alelo de Caimanta y P el alelo de LA722 para el *locus* microsatélite) a través de una prueba de  $\chi^2$  (Snedecor, 1964).

Para evaluar el efecto de cada segmento *SSR* introgresado en las distintas pre-*NILs*, la asociación entre el marcador molecular *SSR* y los caracteres fenotípicos se determinó en la familia pre-*NIL* correspondiente, a través del método de un solo punto (*single point analysis*, Tanksley, 1993), considerando el *SSR* respectivo como fuente de variación y siguiendo los parámetros detallados en la sección Materiales y Métodos del Capítulo I.

La validación de las regiones genómicas asociadas a caracteres de calidad del fruto en las pre-*NILs* se realizó comparando los *QTLs* encontrados en estas líneas con los detectados previamente en las generaciones BC<sub>1</sub>, BC<sub>1</sub>S<sub>1</sub>, BC<sub>2</sub> (Pereira da Costa *et al.*, 2013), BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> y BC<sub>3</sub> (de este trabajo), con una probabilidad menor a 0,05. Un *QTL* se consideró validado cuando la asociación hallada en la pre-*NIL* se presentó en alguna generación adicional.

Para conocer la actuación general de las diferentes pre-*NILs*, en relación al cultivar Caimanta, se compararon cinco plantas de cada pre-*NIL* homocigota con Caimanta, para los alelos de *S. pimpinellifolium* en el segmento *SSR* introgresado (pre-*NIL-PP*), mediante la prueba t-Student (Snedecor, 1964). Para la mayoría de los caracteres estudiados, el valor de Caimanta se mantuvo estable en las dos campañas (2014/2015 y 2015/2016), no mostrando diferencias según el año de evaluación. En estos casos, se realizó el promedio de los valores del cultivar para ambas campañas y las comparaciones con las diferentes pre-*NILs-PP* se efectuaron en relación a este valor medio. No obstante, para el pH y la acidez titulable, Caimanta manifestó diferencias significativas entre los años de evaluación. Para estos rasgos, se informa el valor medio de Caimanta, correspondiente a cada campaña, y las comparaciones con las pre-*NILs-PP* se realizaron con el valor del testigo respectivo a su año de evaluación. Por otro lado, el espesor de pericarpio y el número de lóculos solo fueron examinados en Caimanta en la campaña 2015/2016. Para conocer la tendencia presentada y considerando que se trata de rasgos poco influenciados por el ambiente, todas las pre-*NILs-PP* se compararon con el valor de este año.

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el *software* InfoStat Versión 1.0 (Di Renzo *et al.*, 2001).

## RESULTADOS

### **PARTE I: EVALUACIÓN DE FAMILIAS pre-NILs**

#### **- Evaluación por caracteres fenotípicos de las familias pre-NILs**

Como se describió en la sección Materiales y Métodos, cada familia pre-NIL se compone de plantas que segregan en un determinado segmento SSR, proveniente de *S. pimpinellifolium* (CC, CP o PP), en el contexto genético del cultivar Caimanta (aunque notamos que el *background* no es tan uniforme debido a la presencia de introgresiones adicionales).

Si bien los caracteres vegetativos no fueron medidos en este trabajo, es importante mencionar que resultó llamativa la diversidad en estructura de plantas, altura, tipo de crecimiento y cantidad de frutos, entre otros rasgos, que presentaron estas familias (imágenes de las mismas pueden encontrarse en el ANEXO). Esto señala la existencia de variabilidad para estas propiedades y la posibilidad de conducir nuevas investigaciones y desarrollos a partir de estos materiales. Algunas que podrían distinguirse son las familias pre-NIL220060, pre-NIL295, pre-NIL211044, pre-NIL115, pre-NILG036 y pre-NIL1061 que manifestaron plantas con un buen porte vegetativo y, entre ellas la pre-NIL115 mostró un buen número de frutos por racimo.

Para los caracteres de fruto, el análisis de Shapiro-Wilk indicó distribución normal de todos los caracteres, con valores de W cercanos a 1 dentro de todas las familias, con algunas excepciones menores. En la Tabla III.2 se muestran los valores medios y el error estándar de cada carácter en las 20 familias pre-NILs. Los valores medios de las familias fueron variables y se encontraron diferencias significativas ( $F > 3,52$ ;  $p < 0,001$ ) entre las familias para todos los caracteres analizados. Los rangos de variación fueron amplios para la mayoría de los caracteres en las 20 familias.

Advirtiendo que, además de la existencia de introgresiones no-diana, una familia incluye los tres genotipos para el segmento de interés y los efectos en la media de un carácter pueden confundirse, en una primera exploración, podemos señalar que las familias pre-NIL095, pre-NIL115, pre-NIL211044, pre-NIL276, pre-NIL069 y pre-NIL034 manifestaron una buena vida poscosecha de los frutos. Estas familias mostraron plantas con frutos de color rojo y también plantas con frutos de color amarillo, con excepción de las familias pre-NIL211044 y pre-NIL034 que fueron exclusivamente rojas y la pre-NIL276 amarilla. Para las familias pre-NIL276 y pre-NIL320, el hecho de que todas sus plantas presentaran frutos de color amarillo

se evidenció en un valor medio negativo de a/b y un alto valor de L. Las familias pre-NIL211044 y pre-NIL034, además de buena vida poscosecha, exhibieron una alta firmeza y buenos atributos en cuanto al color y aspectos bioquímicos como el contenido en sólidos solubles.

Tabla III.2- Valor medio y error estándar para cada una de las variables en las 20 familias pre-NILs.

pre-NIL	Cr	Diámetro (cm)	Altura (cm)	Forma	Peso (g)	Vida poscosecha (días)
095	1	5,53 ± 0,23 abcd	4,51 ± 0,15 efgh	0,83 ± 0,01 ghi	83,91 ± 9,16 bcde	17,15 ± 1,92 ef
220060	1	5,40 ± 0,24 abcd	4,39 ± 0,16 defg	0,83 ± 0,01 hi	82,38 ± 9,54 bcde	13,44 ± 2,00 bcde
295	2	6,14 ± 0,24 defg	4,74 ± 0,15 gh	0,79 ± 0,01 fgh	116,20 ± 9,34 fgghi	14,56 ± 1,96 cde
598	2	4,82 ± 0,22 a	3,46 ± 0,14 a	0,74 ± 0,01 bc	52,24 ± 8,68 a	10,32 ± 1,82 abcd
320	3	5,25 ± 0,22 ab	4,04 ± 0,14 cde	0,79 ± 0,01 efg	69,50 ± 8,53 abc	16,10 ± 1,79 def
115	5	5,31 ± 0,22 abc	4,36 ± 0,15 defg	0,84 ± 0,01 i	78,04 ± 8,83 abcd	22,06 ± 1,85 f
162	5	5,08 ± 0,22 ab	3,96 ± 0,15 bcd	0,78 ± 0,01 defg	64,65 ± 8,83 ab	9,71 ± 1,85 abc
211044	6	6,02 ± 0,24 cdef	5,59 ± 0,15 i	0,93 ± 0,01 j	125,23 ± 9,34 ghi	17,23 ± 1,96 ef
286	7	6,08 ± 0,23 defg	4,09 ± 0,15 cde	0,68 ± 0,01 a	102,29 ± 8,99 defg	7,22 ± 1,88 ab
276	7	6,76 ± 0,28 gh	4,59 ± 0,18 fgh	0,68 ± 0,02 a	141,94 ± 11,01 i	30,57 ± 2,31 g
045	7	6,90 ± 0,23 h	4,89 ± 0,15 h	0,72 ± 0,01 ab	134,04 ± 8,99 hi	16,95 ± 1,92 ef
327	8	5,60 ± 0,23 bcde	4,32 ± 0,15 defg	0,79 ± 0,01 fghi	82,52 ± 9,16 bcde	13,04 ± 1,92 bcde
063	8	5,13 ± 0,23 ab	4,11 ± 0,15 cdef	0,81 ± 0,01 fghi	71,84 ± 8,99 abc	8,97 ± 1,88 abc
069	9	6,34 ± 0,23 efgh	4,29 ± 0,15 defg	0,69 ± 0,01 a	110,49 ± 9,16 efgh	29,87 ± 1,92 g
034	9	4,80 ± 0,26 a	3,40 ± 0,17 a	0,72 ± 0,02 ab	49,17 ± 10,19 a	21,83 ± 2,24 f
596	10	4,84 ± 0,22 a	3,68 ± 0,15 abc	0,77 ± 0,01 cdef	58,90 ± 8,83 ab	6,53 ± 1,85 a
318	10	4,82 ± 0,22 a	3,56 ± 0,14 ab	0,74 ± 0,01 bcd	52,39 ± 8,53 a	9,18 ± 1,79 abc
080	11	5,74 ± 0,25 bcdef	4,03 ± 0,16 cde	0,71 ± 0,02 ab	84,91 ± 9,74 bcde	13,79 ± 2,04 cde
G036	11	6,45 ± 0,22 fgh	4,65 ± 0,14 gh	0,74 ± 0,01 bcde	113,97 ± 8,53 fgghi	10,10 ± 1,79 abcd
1061	11	5,80 ± 0,22 bcdef	4,64 ± 0,14 gh	0,81 ± 0,01 fghi	95,33 ± 8,53 cdef	14,40 ± 1,79 cde

pre-NIL	Cr	a/b	L	Firmeza	nº Lóculos	Esp. Pericarpio (cm)
095	1	0,64 ± 0,08 bc	45,67 ± 1,10 ef	52,19 ± 2,39 abcde	3,84 ± 0,41 ab	0,59 ± 0,03 ghi
220060	1	0,94 ± 0,08 de	41,17 ± 1,10 abcd	48,69 ± 2,39 abc	3,34 ± 0,41 ab	0,56 ± 0,03 efgh
295	2	0,52 ± 0,09 b	45,64 ± 1,21 ef	50,10 ± 2,62 abcd	5,90 ± 0,45 cde	0,44 ± 0,03 abcd
598	2	0,59 ± 0,08 b	43,11 ± 1,06 bcdef	61,29 ± 2,29 f	4,77 ± 0,39 bc	0,59 ± 0,03 ghi
320	3	-0,25 ± 0,08 a	56,85 ± 1,02 g	58,73 ± 2,20 def	4,61 ± 0,38 bc	0,58 ± 0,03 fghi
115	5	0,64 ± 0,08 bc	46,59 ± 1,08 f	59,37 ± 2,34 ef	3,57 ± 0,40 ab	0,59 ± 0,03 ghi
162	5	1,06 ± 0,08 e	39,82 ± 1,08 ab	53,53 ± 2,34 abcdef	4,53 ± 0,40 bc	0,62 ± 0,03 hi
211044	6	0,95 ± 0,09 de	43,51 ± 1,15 bcdef	55,52 ± 2,50 bcdef	3,00 ± 0,43 a	0,68 ± 0,03 i
286	7	0,92 ± 0,09 de	41,07 ± 1,24 abcd	54,03 ± 2,70 abcdef	8,83 ± 0,46 f	0,43 ± 0,03 abc
276	7	-0,26 ± 0,11 a	60,73 ± 1,46 h	61,32 ± 3,17 f	10,08 ± 0,55 f	0,42 ± 0,04 ab
045	7	0,63 ± 0,09 bc	45,76 ± 1,21 ef	52,95 ± 2,62 abcdef	6,96 ± 0,45 e	0,52 ± 0,03 bcdefg
327	8	0,71 ± 0,10 bcd	44,17 ± 1,41 cdef	47,41 ± 3,06 ab	6,30 ± 0,53 de	0,49 ± 0,04 abcdef
063	8	0,94 ± 0,10 de	40,23 ± 1,36 abc	56,99 ± 2,95 cdef	2,94 ± 0,51 a	0,54 ± 0,03 defgh
069	9	-0,08 ± 0,08 a	54,76 ± 1,13 g	59,57 ± 2,44 ef	9,91 ± 0,42 f	0,41 ± 0,03 a
034	9	0,94 ± 0,11 de	41,24 ± 1,46 abcd	59,91 ± 3,17 ef	6,62 ± 0,55 de	0,52 ± 0,04 bcdefg
596	10	0,97 ± 0,09 de	38,91 ± 1,18 a	48,01 ± 2,56 ab	3,42 ± 0,44 ab	0,52 ± 0,03 cdefgh
318	10	0,88 ± 0,07 cde	42,11 ± 0,98 abcde	45,94 ± 2,12 a	5,42 ± 0,36 cd	0,41 ± 0,02 a
080	11	0,57 ± 0,10 b	45,74 ± 1,41 ef	53,58 ± 3,06 abcdef	8,77 ± 0,53 f	0,47 ± 0,04 abcde
G036	11	0,61 ± 0,09 bc	43,32 ± 1,18 bcdef	46,37 ± 2,56 a	4,64 ± 0,44 bc	0,59 ± 0,03 fghi
1061	11	0,51 ± 0,09 b	45,01 ± 1,18 def	52,71 ± 2,56 abcdef	4,52 ± 0,45 bc	0,60 ± 0,03 ghi

L: porcentaje de reflectancia. a/b: índice de color. Letras distintitas indican diferencias significativas entre las familias según el test de Duncan (p < 0,05).

Tabla III.2- (continuación)

pre-NIL	Cr	Sólidos Solubles (°Brix)	pH	Acidez Titulable
095	1	5,50 ± 0,27 bc	4,67 ± 0,06 efg	0,38 ± 0,04 a
220060	1	5,69 ± 0,27 bc	4,58 ± 0,06 cdef	0,49 ± 0,04 abcd
295	2	5,73 ± 0,29 bc	4,49 ± 0,06 bcde	0,48 ± 0,04 abcd
598	2	5,71 ± 0,26 bc	4,76 ± 0,06 fg	0,39 ± 0,04 a
320	3	6,28 ± 0,25 cd	4,83 ± 0,05 g	0,39 ± 0,03 a
115	5	6,42 ± 0,26 cd	4,67 ± 0,06 efg	0,40 ± 0,04 a
162	5	5,57 ± 0,26 bc	4,71 ± 0,06 efg	0,41 ± 0,04 ab
211044	6	6,22 ± 0,28 cd	4,52 ± 0,06 cde	0,48 ± 0,04 abcd
286	7	6,20 ± 0,30 cd	4,18 ± 0,07 a	0,72 ± 0,04 e
276	7	6,75 ± 0,35 d	4,51 ± 0,08 cde	0,56 ± 0,05 cd
045	7	5,55 ± 0,29 bc	4,65 ± 0,07 defg	0,36 ± 0,04 a
327	8	6,22 ± 0,34 cd	4,70 ± 0,08 efg	0,39 ± 0,05 a
063	8	4,61 ± 0,33 a	4,76 ± 0,07 fg	0,35 ± 0,05 a
069	9	5,95 ± 0,27 cd	4,39 ± 0,06 bc	0,59 ± 0,04 d
034	9	5,64 ± 0,35 bc	4,62 ± 0,08 defg	0,43 ± 0,05 abc
596	10	6,25 ± 0,29 cd	4,68 ± 0,06 efg	0,54 ± 0,04 bcd
318	10	6,73 ± 0,24 d	4,30 ± 0,05 ab	0,82 ± 0,03 e
080	11	5,78 ± 0,34 bc	4,45 ± 0,08 bcd	0,48 ± 0,05 abcd
G036	11	5,45 ± 0,29 abc	4,62 ± 0,06 defg	0,48 ± 0,04 abcd
1061	11	4,90 ± 0,29 ab	4,59 ± 0,06 cdef	0,47 ± 0,04 abcd

L: porcentaje de reflectancia. a/b: índice de color. Letras distintas indican diferencias significativas entre las familias según el test de Duncan ( $p < 0,05$ ).

En las fotos de la Figura III.3 se presentan frutos representativos de diferentes plantas, de cada familia, correspondiente a las 20 pre-NILs evaluadas. Como puede observarse existe cierto grado de variación fenotípica dentro de las familias pre-NILs, sin embargo debe destacarse que la variación fenotípica entre frutos de diferentes plantas, dentro de una familia, es bastante menor comparada con la encontrada en familias de retrocruzas más tempranas. Para ocho de las familias analizadas, todas las plantas mostraron frutos de color rojo, mientras que dos familias (pre-NIL320 y pre-NIL276) exhibieron frutos amarillos en todas sus plantas y diez manifestaron segregación con algunas plantas de frutos rojos y otras de frutos amarillos. Otro aspecto importante a mencionar es que en la mayoría de las familias se evidencia una importante recuperación del peso y tamaño del fruto, asemejándose más al progenitor Caimanta, como cabe esperar debido a la alta proporción del *background* genético del mismo en estas líneas.

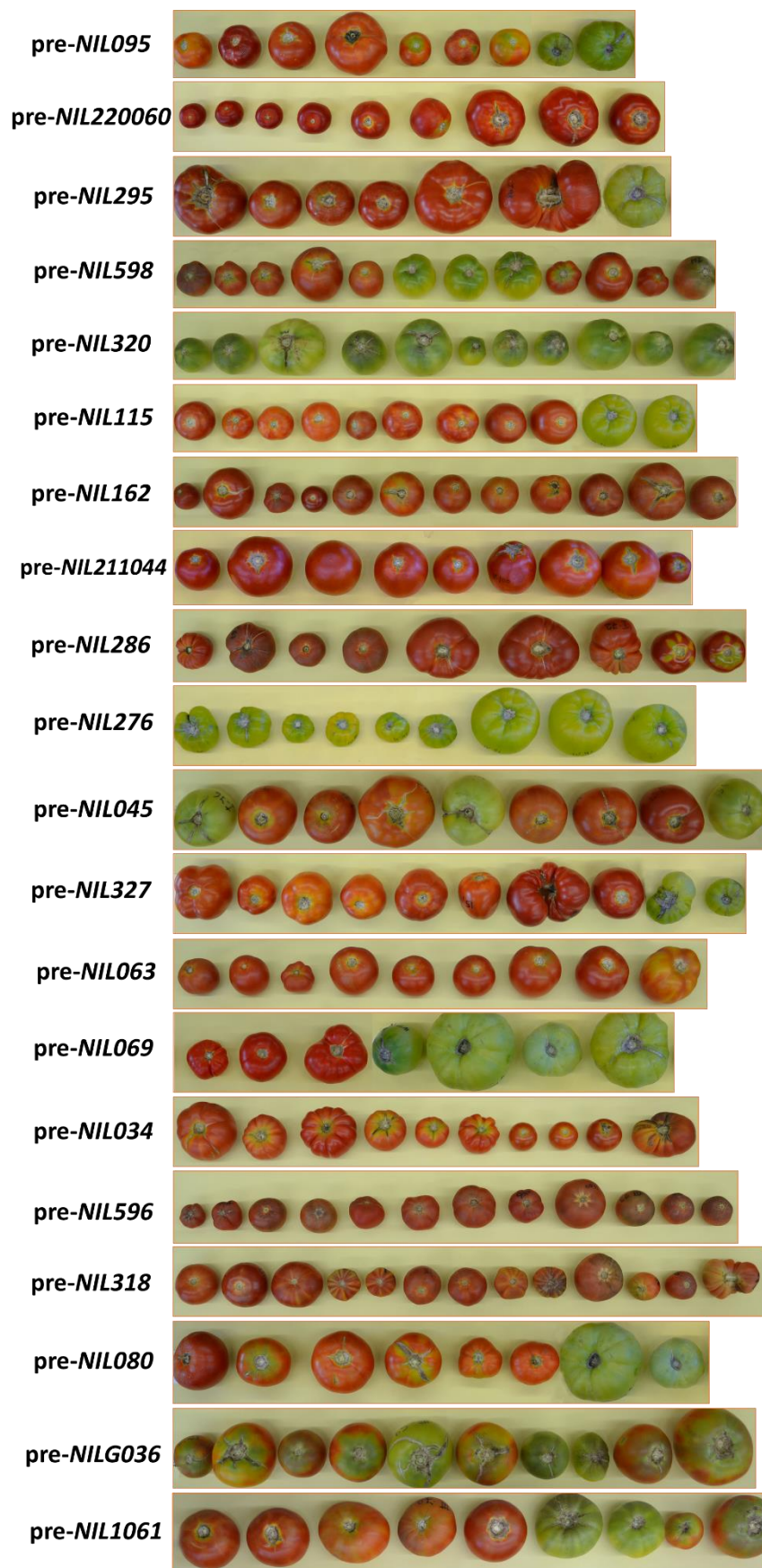


Figura III.3- Frutos representativos de las 20 familias pre-NILs evaluadas.

En cada una de las familias se estimaron los porcentajes de variación genética (%VG). La Tabla III.3 muestra los porcentajes de la variación fenotípica atribuible a variación genética para cada carácter en cada familia pre-NIL.

**Tabla III.3-** Porcentaje de variación fenotípica explicado por la variación genética.

pre-NIL	%VG/VF												
	Diámetro	Altura	Forma	Peso	n° Lóculos	E Pericarpio	Vp	L	a/b	Firmeza	S. solubles	pH	Ac. Titulable
095	44,70	65,96	57,34	41,93	72,52	73,45	62,55	91,83	96,51	70,35	96,22	89,42	90,75
220060	81,71	85,62	66,54	72,02	78,51	80,99	34,82	62,20	53,30	50,81	87,76	82,35	78,57
295	69,84	61,64	37,31	61,28	80,91	78,56	42,46	81,94	87,42	77,26	92,69	86,76	89,97
598	58,39	53,12	64,77	49,70	87,23	53,90	78,52	81,11	91,49	63,69	86,87	88,81	85,09
320	54,20	46,63	51,47	42,35	88,14	66,00	46,13	43,52	51,66	57,65	92,01	87,24	79,49
115	59,70	52,81	56,00	54,59	79,65	79,94	69,06	90,83	92,72	82,12	93,84	85,18	94,99
162	54,83	49,09	25,11	46,90	53,70	64,00	35,88	38,51	-----	64,12	86,15	69,27	82,50
211044	70,14	76,09	18,80	64,05	62,68	75,00	50,83	64,22	52,07	24,77	89,83	77,21	57,53
286	54,59	51,86	35,89	37,93	81,60	87,44	58,21	74,59	80,49	65,27	91,26	86,80	89,26
276	71,31	75,36	11,26	53,36	28,02	60,82	30,39	39,04	48,15	41,26	95,69	46,76	58,43
045	-----	17,51	-----	15,32	47,24	-----	58,61	85,31	93,82	38,21	88,16	63,64	64,80
327	64,31	58,50	34,32	55,30	77,13	76,98	28,87	92,27	97,21	72,36	88,52	85,17	89,60
063	63,44	66,89	50,38	47,77	72,19	39,47	35,08	38,95	61,35	37,87	72,91	87,93	69,23
069	73,78	69,13	32,10	59,81	60,08	70,04	49,93	86,00	96,18	56,55	93,97	63,68	48,89
034	55,70	35,42	54,83	44,29	86,05	68,42	88,85	26,86	52,70	-----	67,24	92,86	57,78
596	69,87	60,65	50,78	71,95	35,58	68,38	38,99	41,55	56,91	69,19	93,24	93,15	86,07
318	56,19	63,95	62,47	59,38	84,67	72,50	54,84	73,45	70,59	63,36	88,81	90,74	92,45
080	50,39	60,58	22,63	48,45	31,13	36,21	70,55	92,59	96,48	63,35	93,16	81,18	72,11
G036	-----	18,64	22,06	15,76	75,65	37,27	-----	80,64	97,34	44,02	73,51	79,25	68,57
1061	16,70	-----	46,43	12,62	74,11	43,85	56,13	74,14	97,59	68,17	77,14	74,77	64,94

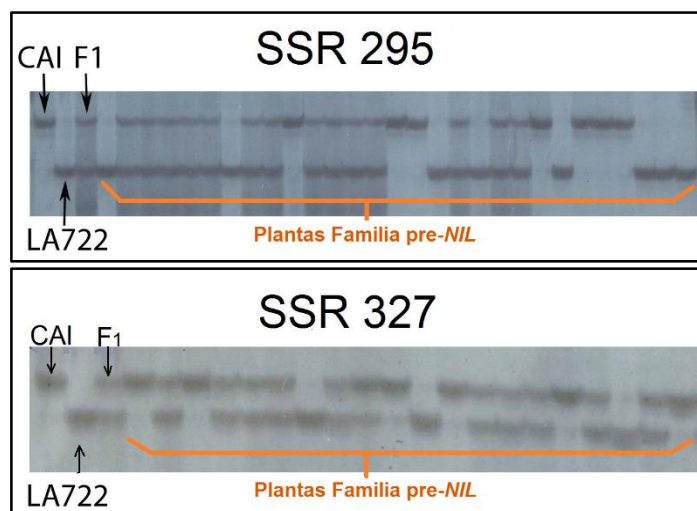
Vp: vida poscosecha de los frutos. L: porcentaje de reflectancia. a/b: índice de color. (-----): variación no significativa dentro de la familia.

En general, la variación dentro de cada una de las familias resultó significativa para la mayoría de los caracteres ( $p < 0,01$ ). Aquellos casos en los cuales la variación dentro de una familia no fue significativa se indican con guiones en la tabla III.3. Los porcentajes de la variación fenotípica atribuible a variación genética fueron variables dependiendo del carácter y la familia en estudio. Para el contenido en sólidos solubles, pH y acidez se encontró un importante componente genético en la variación fenotípica observada en todas las familias, mientras que para los caracteres relacionados a la forma y tamaño del fruto el componente genético fue menor. Por otro lado, si se comparan los porcentajes de variación genética para el color entre las familias, se advierte que aquellas que presentaron segregación del color de fruto (pre-NIL095, pre-NIL295, pre-NIL598, pre-NIL115, pre-NIL045, pre-NIL327, pre-NIL069, pre-NIL080, pre-NILG036 y pre-NIL1061) mostraron los mayores porcentajes de variación fenotípica atribuible a variación genética. Cuando se analiza la variación en el carácter vida poscosecha, en la mitad de las familias se observa que el componente ambiental fue importante,

no obstante existieron diferencias entre las familias, destacándose la pre-*NIL034* con el mayor valor seguido por las familias pre-*NIL598*, pre-*NIL080* y pre-*NIL115*.

#### - Caracterización por marcadores SSR de las familias pre-*NILs*

Para la caracterización molecular, en cada familia pre-*NIL* se analizó solo aquel *SSR* que fue heterocigota en la pre-*NIL* y le dio origen, e indica el segmento proveniente de LA722 de interés en esa familia, determinándose el genotipo de cada planta en dicho *locus* microsatélite (CC, CP o PP). Es decir, en cada familia se estudió la segregación para uno de los 28 marcadores *SSR* utilizados en el proceso de selección, con excepción de los *SSR320-014* y *SSR063-038* que se consideraron en forma conjunta. En la Figura III.4 se exhiben, a modo de ejemplo, fragmentos de geles de poliacrilamida para dos de los *SSR* (*SSR295* y *SSR327*) evaluados en plantas de la familia correspondiente (pre-*NIL295* y pre-*NIL327*).



**Figura III.4-** Marcadores *SSR295* y *SSR327* probados en los progenitores (Caimanta (CAI) y LA722 de *S. pimpinellifolium*), la  $F_1$  y la familia pre-*NIL* correspondiente. Las flechas indican los progenitores (CAI y LA722) y la  $F_1$  utilizados como testigos. A continuación se presentan los genotipos encontrados en la familia pre-*NIL*, donde observamos individuos homocigotas para el alelo de CAI, individuos homocigotas para el alelo de LA722 e individuos heterocigotas.

La segregación mendeliana de cada *SSR* fue probada en la familia correspondiente y se muestra en la Tabla III.4, indicándose el marcador, la familia pertinente, el cromosoma que lleva el segmento *SSR*, el número total de plantas evaluadas, el número de individuos para cada genotipo observado y el valor de  $\chi^2$ . Los *SSR* resaltados en amarillo no ajustaron a la segregación mendeliana esperada (1:2:1). Sólo tres de los *SSR* manifestaron segregación

distorsionada (*SSR598*, *SSR115* y *SSR162*). En los tres casos, se observó un aumento de individuos homocigotas para los alelos de Caimanta en comparación a lo esperado.

**Tabla III.4-** Segregación de los marcadores *SSR* (*Simple Sequence Repeat*) en cada familia pre-*NIL*.

<i>SSR</i>	pre- <i>NIL</i>	Cr	n° Total	nCC	nCP	nPP	$\chi^2$
<i>SSR 095</i>	095	1	25	4	13	8	1,32ns
<i>SSR 220060</i>	220060	1	24	6	11	7	0,25ns
<i>SSR 295</i>	295	2	25	5	14	6	0,44ns
<i>SSR 598</i>	598	2	28	15	10	3	12,57*
<i>SSR 320</i>	320	3	30	10	13	7	1,13ns
<i>SSR 115</i>	115	5	28	13	10	5	6,86*
<i>SSR 162</i>	162	5	28	15	9	4	12,21*
<i>SSR 211044</i>	211044	6	25	5	11	9	1,64ns
<i>SSR 286</i>	286	7	26	4	16	6	1,69ns
<i>SSR 276</i>	276	7	18	8	7	3	3,67ns
<i>SSR 045</i>	045	7	26	9	8	9	3,84ns
<i>SSR 327</i>	327	8	26	10	13	3	3,77ns
<i>SSR 063</i>	063	8	25	3	15	7	2,28ns
<i>SSR 069</i>	069	9	23	5	9	9	2,48ns
<i>SSR 034</i>	034	9	18	5	11	2	1,89ns
<i>SSR 596</i>	596	10	27	7	12	8	0,41ns
<i>SSR 318</i>	318	10	30	10	16	4	2,53ns
<i>SSR 080</i>	080	11	25	4	12	9	2,04ns
<i>SSR G036</i>	036	11	29	9	15	5	1,14ns
<i>SSR 1061</i>	1061	11	30	5	16	9	1,20ns

Cr: cromosoma. n°: número total de individuos. nCC: número de individuos homocigotas para el alelo de Caimanta (C). nCP: número de individuos heterocigotas. nPP: número de individuos homocigotas para el alelo de LA722.  $\chi^2$ : valor de chi-cuadrado. ns: no significativo. \*: significativo ( $p < 0,05$ ). En amarillo se destacan aquellos *SSR* que no presentaron segregación 1:2:1.

### ***- Detección de QTLs en las familias pre-NILs***

El análisis de los datos fenotípicos junto con los moleculares en las familias pre-*NILs* permitió estudiar la asociación entre los marcadores (el *SSR* segregante en cada familia) y los caracteres fenotípicos, con el fin de detectar *QTLs* de interés agronómico aportados por la región *SSR* introgresada en cada pre-*NIL*. Se detectaron **30 *QTLs*** asociados a caracteres de calidad del fruto ( $p < 0,05$ ), de los cuales 6 (20 %) fueron altamente significativos ( $p < 0,001$ ) (Tabla III.5). Dieciocho de estos 30 *QTLs* (60 %) fueron hallados en alguna generación anterior de las retrocruzas derivadas del cruzamiento entre Caimanta y LA722 (indicados en amarillo en la Tabla III.5).

**Tabla III.5-** Asociaciones detectadas entre marcadores SSR y caracteres fenotípicos en las familias pre-NILs con  $p < 0,05$ .

pre-NIL	Cr	SSR	Carácter	Media CC	nCC	Media CP	nCP	Media PP	nPP	R <sup>2</sup>	p
220060	1	SSR 220060	Color: L	43,04 ± 1,04 b	6	39,62 ± 0,77 a	11	42,13 ± 1,04 ab	6	0,29	0,0329
		SSR 220060	Sólidos Solubles	4,52 ± 0,28 a	6	5,87 ± 0,21 b	11	6,55 ± 0,28 b	6	0,57	0,0002
		SSR 220060	Acidez Titulable	0,35 ± 0,07 a	6	0,46 ± 0,05 a	11	0,68 ± 0,07 b	6	0,39	0,0071
598	2	SSR 598	Color: L	40,17 ± 1,44 a	12	43,44 ± 1,67 a	9	49,95 ± 2,89 b	3	0,31	0,0193
320	3	SSR 320	Diámetro	5,40 ± 0,32 b	10	5,61 ± 0,28 b	13	4,37 ± 0,38 a	7	0,21	0,0423
		SSR 320	Acidez Titulable	0,45 ± 0,03 b	9	0,35 ± 0,03 a	11	0,36 ± 0,03 a	7	0,24	0,0378
115	5	SSR 115	Color: a/b	0,76 ± 0,09 b	11	0,95 ± 0,10 b	8	-0,15 ± 0,13 a	5	0,70	<0,0001
		SSR 115	Color: L	44,95 ± 1,61 a	11	41,80 ± 1,89 a	8	57,88 ± 2,39 b	5	0,59	0,0001
		SSR 115	Firmeza	56,26 ± 2,75 a	11	54,48 ± 3,23 a	8	74,03 ± 4,08 b	5	0,44	0,0023
		SSR 115	Vida poscosecha	21,51 ± 3,71 a	13	15,86 ± 4,23 a	10	35,93 ± 5,98 b	5	0,23	0,0371
		SSR 115	pH	4,63 ± 0,06 a	11	4,87 ± 0,07 b	8	4,45 ± 0,09 a	5	0,41	0,0041
211044	6	SSR 211044	Altura	5,76 ± 0,43 ab	5	6,09 ± 0,29 b	11	4,90 ± 0,32 a	9	0,26	0,0351
		SSR 211044	Peso	136,06 ± 21,20 ab	5	148,19 ± 14,30 b	11	91,15 ± 15,80 a	9	0,25	0,0398
		SSR 211044	n° Lóculos	4,06 ± 0,36 b	3	2,81 ± 0,20 a	10	2,83 ± 0,22 a	8	0,36	0,0191
		SSR 211044	Esp. Pericarpio	0,61 ± 0,08 ab	3	0,78 ± 0,05 b	10	0,56 ± 0,05 a	8	0,37	0,0149
045	7	SSR 045	Firmeza	48,82 ± 2,82 a	6	59,08 ± 2,62 b	7	49,93 ± 2,82 a	6	0,35	0,0302
063	8	SSR 063	Color: L	41,51 ± 1,83 a	1	39,08 ± 0,61 a	9	42,04 ± 0,82 a	5	0,43	0,0360
327	8	SSR 327	Vida poscosecha	10,76 ± 1,10 a	10	14,00 ± 0,96 ab	13	16,44 ± 2,01 b	3	0,26	0,0304
034	9	SSR 034	Forma	0,72 ± 0,03 a	5	0,70 ± 0,02 a	10	0,86 ± 0,04 b	2	0,45	0,0156
080	11	SSR 080	Vida poscosecha	11,33 ± 3,03 ab	4	18,10 ± 1,91 b	10	10,09 ± 2,02 a	9	0,31	0,0236
G036	11	SSR G036	Diámetro	6,81 ± 0,30 b	9	6,52 ± 0,23 b	15	5,47 ± 0,40 a	5	0,23	0,0349
		SSR G036	Forma	0,67 ± 0,02 a	9	0,76 ± 0,01 b	15	0,83 ± 0,02 c	5	0,59	<0,0001
		SSR G036	Peso	128,50 ± 10,03 b	9	113,78 ± 7,77 b	15	82,56 ± 13,45 a	5	0,22	0,0368
		SSR G036	n° Lóculos	6,54 ± 0,63 b	5	4,18 ± 0,42 a	11	3,54 ± 0,70 a	4	0,43	0,0087
1061	11	SSR 1061	Diámetro	6,54 ± 0,22 b	5	5,77 ± 0,12 a	16	5,46 ± 0,16 a	9	0,37	0,0018
		SSR 1061	Forma	0,71 ± 0,02 a	5	0,81 ± 0,01 b	16	0,86 ± 0,01 c	9	0,62	<0,0001
		SSR 1061	Peso	116,33 ± 9,34 b	5	94,87 ± 5,22 a	16	84,47 ± 6,96 a	9	0,22	0,0366
		SSR 1061	n° Lóculos	8,00 ± 0,78 b	2	4,40 ± 0,32 a	12	3,40 ± 0,49 a	5	0,61	0,0005
		SSR 1061	Color: a/b	-0,30 ± 0,38 a	2	0,44 ± 0,15 ab	13	1,00 ± 0,24 b	5	0,34	0,0280
		SSR 1061	Color: L	52,91 ± 3,98 b	2	45,77 ± 1,56 ab	13	39,89 ± 2,52 a	5	0,33	0,0340

Cr: cromosoma. Media CC o PP: valor medio del carácter para individuos homocigotas para alelos de Caimanta o LA722. nCC o PP: número de individuos homocigotas. Media CP: valor medio del carácter para individuos heterocigotas. nCP: número de individuos heterocigotas. R<sup>2</sup>: fracción de la variación fenotípica explicada. p: probabilidad asociada.

Se encontraron *QTLs* relacionados a caracteres del fruto en 12 de las 20 familias pre-NILs. La familia pre-NIL1061 fue la que más asociaciones presentó, destacándose la forma y el número de lóculos, con probabilidades menores al 0,1 % y porcentajes de variación fenotípica explicada de 62 % y 61 % respectivamente. En la familia pre-NILG036 también se detectaron asociaciones a variables relacionadas con el tamaño del fruto (diámetro, forma, peso y número de lóculos), donde la asociación a la forma resultó altamente significativa ( $p < 0,001$ ), siendo los alelos silvestres responsables del aumento en la media de este carácter, lo cual es esperable en base a los fenotipos de los progenitores. En la familia pre-NIL220060 se manifestaron *QTLs* para el contenido en sólidos solubles, la acidez titulable y el parámetro L de color. El *QTL* vinculado a los sólidos solubles explicó el 57 % de la variación fenotípica y

la presencia de alelos silvestres incrementó el contenido en sólidos solubles de los frutos. En la familia pre-NIL320, asociaciones al diámetro y la acidez titulable fueron encontradas, en donde los alelos de LA722 ocasionaron una disminución en la media para ambos caracteres. La familia pre-NIL115 reveló *QTLs* para el color, la firmeza, el pH y la vida poscosecha de los frutos. Las asociaciones a los parámetros a/b y L de color presentaron probabilidades menores al 0,1 % y porcentajes de variación fenotípica explicada de 70 % y 59 % respectivamente. En el *QTL* para la vida poscosecha de los frutos la presencia de alelos silvestres aumentó la media de este rasgo, lo que se corresponde con lo observado en los fenotipos parentales. Asociaciones a la vida poscosecha fueron halladas también en las familias pre-NIL327 y pre-NIL080. En la familia pre-NIL327, los alelos silvestres fueron responsables del incremento en la vida poscosecha, mientras que en la familia pre-NIL080 el mayor valor fue presentado por la condición heterocigota, propiedades que habían sido advertidas en generaciones anteriores del cruzamiento. Por otra parte, en la familia pre-NIL211044 se encontraron *QTLs* relacionados a la altura, el peso, el número de lóculos y el espesor de pericarpio. Estas asociaciones, con probabilidades menores al 5 % y porcentajes de variación fenotípica explicada que variaron entre 25 % y 37 %, no habían sido halladas en generaciones previas.

#### **- Validación de *QTLs* asociados a caracteres de calidad de fruto**

La comparación entre los *QTLs* detectados en las *pre-NILs*, y los hallados previamente en las generaciones anteriores de este cruzamiento entre Caimanta y LA722 (BC<sub>1</sub>, BC<sub>1</sub>S<sub>1</sub>, BC<sub>2</sub>, BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> o BC<sub>3</sub>), permitió confirmar la asociación de diversas regiones genómicas a caracteres de calidad de fruto en estas líneas. La evidencia de un *QTL*, en alguna retrocruza precedente, valida la asociación encontrada en la *pre-NIL* derivada. **Dieciocho *QTLs*** hallados en las *pre-NILs* fueron validados gracias a los estudios previos. Se validaron asociaciones a diversos caracteres de calidad de fruto para ocho de las *pre-NILs* desarrolladas (*pre-NIL220060*, *pre-NIL320*, *pre-NIL115*, *pre-NIL327*, *pre-NIL034*, *pre-NIL080*, *pre-NILG036* y *pre-NIL1061*). La Tabla III.6 muestra los *QTLs* validados, indicando las generaciones en las que fueron detectados, seguidos de su probabilidad asociada. De las 18 asociaciones validadas, 12 fueron observadas en una generación adicional a la *pre-NIL*, y seis en dos o más generaciones adicionales a lo largo del proceso. En la Tabla III.6 se presenta también el efecto de los alelos silvestres sobre la media del carácter en cada generación. Para varios de los *QTLs* (10 de 18) los efectos fueron consistentes a través de las generaciones. Para otros, como el *SSRG036*, el

SSR1061 y el SSR220060 algunas diferencias menores se presentaron, si bien fueron estables en muchas de las generaciones encontradas; mientras que otros, como el SSR320 en relación a la acidez, el SSR115 al color y el SSR034 a la forma, mostraron mayores discrepancias.

**Tabla III.6-** Asociaciones validadas en las pre-NILs y diversas generaciones del cruzamiento entre Caimanta y LA722 de *S. pimpinellifolium*, indicando las generaciones en las que fueron detectadas y el efecto sobre el fenotipo del alelo de LA722.

QTLs					
pre-NIL	Cr	Carácter	SSR	Generación (p)	Efecto alelo LA722
220060	1	Sólidos solubles	220060	BC1S1 IX-14 (0,0168) BC3 (0,0127) pre-NIL220060 (0,0002)	Sin diferencias entre PP y CC aumenta aumenta
		Acidez titulable	220060	BC2 (0,0210) pre-NIL220060 (0,0071)	aumenta aumenta
320	3	Diámetro	320	BC2 (0,0117) pre-NIL320 (0,0423)	disminuye disminuye
		Acidez titulable	320	BC2 (0,0082) pre-NIL320 (0,0378)	aumenta disminuye
115	5	Color: a/b	115	BC1S1 III-21 (0,0093) pre-NIL115 (<0,0001)	aumenta disminuye
		Color: L	115	BC1S1 III-21 (0,0183) pre-NIL115 (0,0001)	disminuye aumenta
		Vida poscosecha	115	BC3 (0,0072) pre-NIL115 (0,0371)	aumenta aumenta
327	8	Vida poscosecha	327	BC1S1 VII-31 (0,0331) pre-NIL327 (0,0304)	aumenta aumenta
034	9	Forma	034	BC1 (0,0007) / BC1S1 VII-51 (0,0495) BC2S1 VII-17 (0,0007) BC3 (0,0009) pre-NIL034 (0,0156)	disminuye/ Sin diferencias entre PP y CC disminuye disminuye aumenta
080	8	Vida poscosecha	080	BC1S1 VII-51 (0,0483) pre-NIL080 (0,0236)	Sin diferencias entre PP y CC Sin diferencias entre PP y CC
G036	11	Diámetro	G036	BC1 (0,0274) BC2S1 VII-24 (0,0085) / BC2S1 VII-7 (0,0013) / BC2S1 VII-12 (0,0027) BC3 (0,0022) pre-NILG036 (0,0349)	aumenta disminuye/disminuye/disminuye disminuye disminuye
		Forma	G036	BC2S1 VII-7 (0,0001) / BC2S1 VII-12 (<0,0001) BC3 (0,0014) pre-NILG036 (<0,0001)	aumenta aumenta/aumenta aumenta
		Peso	G036	BC1 (0,0263) BC2S1 VII-24 (0,0031) / BC2S1 VII-7 (0,0093) / BC2S1 VII-12 (0,0100) BC3 (0,0062) pre-NILG036 (0,0368)	aumenta disminuye/disminuye/disminuye disminuye disminuye
		n° Lóculos	G036	BC2S1 VII-24 (0,0123) / BC2S1 VII-7 (0,0037) / BC2S1 VII-12 (<0,0001) pre-NILG036 (0,0087)	disminuye/disminuye/disminuye disminuye
1061	11	Diámetro	1061	BC2S1 VII-24 (0,0123) pre-NIL1061 (0,0018)	disminuye disminuye
		Forma	1061	BC1S1 VII-91 (0,0008) BC2S1 VII-24 (0,0480) pre-NIL1061 (<0,0001)	Sin diferencias entre PP y CC aumenta aumenta
		Peso	1061	BC2S1 VII-24 (0,0053) pre-NIL1061 (0,0368)	disminuye disminuye
		n° Lóculos	1061	BC2S1 VII-24 (0,0147) pre-NIL1061 (0,0005)	disminuye disminuye

Cr: cromosoma. Se indica la generación en la que fue detectado el QTL y entre paréntesis la probabilidad asociada.

En relación al tamaño y la forma del fruto, dos pre-*NILs* con introgresiones silvestres en el cromosoma 11, pre-*NILG036* y pre-*NIL1061*, fueron asociadas al diámetro, la forma, el peso y el número de lóculos de los frutos, a través de diferentes generaciones de las retrocruzas derivadas del cruzamiento entre Caimanta y LA722. En ellas, si bien se observaron algunas discrepancias menores, los efectos fueron sostenidos a través de generaciones. Principalmente, la presencia de alelos silvestres redujo el diámetro, el peso y el número de lóculos y aumentó el índice de forma de los frutos. Otra asociación a la forma de los frutos fue validada en la pre-*NIL034*, no obstante, en ella los efectos fueron menos estables a través de las generaciones. Para la vida poscosecha de los frutos, tres pre-*NILs* manifestaron *QTLs* en la región *SSR* introgresada en diversas generaciones, con efectos bastante consistentes. En la pre-*NIL115* y la pre-*NIL327*, los alelos silvestres ocasionaron un incremento de la vida poscosecha, resultando de gran valor agronómico. Para la pre-*NIL080*, la ventaja significativa fue mostrada por el heterocigota, no hallándose diferencias entre los individuos homocigotas para este rasgo. Por otro lado, en relación a la pre-*NIL115* también se validó la asociación de dicha introgresión *SSR* a los parámetros a/b y L de color, sin embargo en este caso los efectos fueron menos firmes. Para la pre-*NIL220060*, su asociación al contenido en sólidos solubles y la acidez titulable de los frutos fue detectada en diversas retrocruzas, donde los alelos silvestres ocasionaron un aumento de ambos caracteres, conllevando a una mejora desde el punto de vista de la calidad de los frutos. Además, para la acidez se validó la pre-*NIL320*, pero esta región *SSR* exhibió más variaciones en sus efectos entre las generaciones.

## **PARTE II: EVALUACIÓN DE pre-*NILs-PP***

Cada familia pre-*NIL* segrega para un segmento introgresado de LA722, determinado por un *SSR* particular, encontrándose en cada familia plantas con los diferentes genotipos para ese *locus* microsatélite: CC, CP o PP, donde C representa el alelo de Caimanta y P el alelo de LA722. Entre estas plantas, aquellas donde la introgresión presenta una condición homocigota para los alelos silvestres (llamadas pre-*NIL-PP*) son las que resultan de interés apuntando al desarrollo de nuevas líneas. Estas pre-*NILs-PP* constituyen líneas con una región *SSR* aportada por la especie silvestre, en condición homocigota, y una constitución del fondo genético muy similar a Caimanta. Resulta de utilidad analizar estas pre-*NILs-PP*, estudiar sus características y su comportamiento en relación al cultivar Caimanta. Para ello, de las plantas sembradas y caracterizadas molecularmente en cada familia pre-*NIL* se seleccionaron aquellas que

resultaron PP y se calcularon los valores medios de todos los caracteres fenotípicos evaluados para cada una de las 20 pre-NILs-PP (Tabla III.7).

Tabla III.7- Valores medios y error estándar de cada carácter fenotípico para cada pre-NIL-PP.

pre-NIL	Diámetro	Altura	Forma	Peso	Vida poscosecha
095	5,26 ± 0,27 abcd	4,41 ± 0,19 cdefgh	0,84 ± 0,02 def	73,51 ± 11,09 abcd	12,84 ± 1,13 ab
220060	5,44 ± 0,60 bcde	4,34 ± 0,35 bcdefgh	0,82 ± 0,03 de	85,18 ± 25,41 abcde	13,62 ± 1,51 ab
295	5,56 ± 0,74 bcde	4,27 ± 0,45 bcdefgh	0,78 ± 0,02 cd	92,73 ± 30,86 abcde	12,65 ± 0,92 ab
598	5,33 ± 0,98 abcde	3,40 ± 0,31 abc	0,67 ± 0,08 a	63,15 ± 25,20 abc	8,11 ± 0,56 ab
320	4,37 ± 0,25 ab	3,70 ± 0,17 abcde	0,86 ± 0,04 def	42,89 ± 7,49 abc	17,53 ± 5,24 b
115	5,70 ± 0,76 bcde	4,55 ± 0,29 efgh	0,83 ± 0,05 de	101,12 ± 38,81 bcde	35,93 ± 8,04 cd
162	4,74 ± 0,60 abc	3,65 ± 0,44 abcde	0,78 ± 0,02 bcd	53,98 ± 19,55 abc	12,34 ± 2,68 ab
211044	5,34 ± 0,43 abcde	4,90 ± 0,39 fgh	0,92 ± 0,01 f	91,15 ± 16,91 abcde	15,24 ± 1,21 ab
286	6,20 ± 0,35 cde	4,18 ± 0,26 abcdefg	0,68 ± 0,01 a	103,73 ± 17,01 bcde	6,30 ± 0,37 a
276	7,86 ± 0,50 f	5,31 ± 0,26 h	0,69 ± 0,02 a	188,10 ± 28,51 f	37,20 ± 2,39 d
045	6,87 ± 0,24 def	4,89 ± 0,13 fgh	0,72 ± 0,01 abc	135,14 ± 10,07 def	14,51 ± 1,74 ab
327	4,70 ± 0,43 abc	4,09 ± 0,41 abcdefg	0,88 ± 0,01 ef	52,33 ± 15,02 abc	16,44 ± 2,42 ab
063	4,74 ± 0,53 abc	3,84 ± 0,40 abcdef	0,83 ± 0,04 de	61,31 ± 13,36 abc	9,04 ± 1,66 ab
069	6,22 ± 0,73 cde	4,15 ± 0,41 acbdefg	0,69 ± 0,02 a	111,70 ± 30,10 cde	27,23 ± 3,39 c
034	3,70 ± 0,22 a	3,16 ± 0,12 a	0,86 ± 0,02 def	26,37 ± 3,64 a	58,44 ± 12,94 e
596	4,17 ± 0,19 ab	3,27 ± 0,13 ab	0,79 ± 0,01 cd	35,36 ± 4,09 ab	5,84 ± 0,38 a
318	4,77 ± 0,43 abc	3,42 ± 0,32 abcd	0,72 ± 0,02 abc	49,07 ± 11,20 abc	7,14 ± 0,79 ab
080	5,53 ± 0,38 bcde	3,82 ± 0,27 abcdef	0,70 ± 0,01 ab	75,06 ± 14,53 abcd	10,09 ± 0,95 ab
G036	5,47 ± 0,29 bcde	4,52 ± 0,28 defgh	0,83 ± 0,02 de	82,56 ± 11,93 abcde	9,02 ± 1,31 ab
1061	5,46 ± 0,12 bcde	4,66 ± 0,09 efgh	0,86 ± 0,01 def	84,47 ± 5,81 abcde	17,63 ± 5,22 b
Caimanta	7,04 ± 0,18 ef	5,10 ± 0,13 gh	0,73 ± 0,01 abc	145,39 ± 10,07 ef	9,70 ± 0,83 ab

pre-NIL	nº Lóculos	Esp. Pericarpio	a/b	L
095	3,77 ± 0,55 abc	0,57 ± 0,07 abcd	0,81 ± 0,07 bc	43,75 ± 1,04 a
220060	2,95 ± 0,24 ab	0,50 ± 0,09 abc	0,93 ± 0,02 bc	42,13 ± 0,84 a
295	6,93 ± 2,12 cdefg	0,38 ± 0,06 a	0,66 ± 0,13 b	42,85 ± 1,11 a
598	6,47 ± 1,35 bcdef	0,59 ± 0,03 abcd	0,11 ± 0,41 a	49,95 ± 5,84 b
320	4,46 ± 1,00 abcd	0,50 ± 0,06 abc	-0,23 ± 0,03 a	55,19 ± 0,58 bc
115	5,20 ± 1,79 abcde	0,67 ± 0,02 cd	-0,15 ± 0,04 a	57,88 ± 1,50 cd
162	5,13 ± 1,11 abcde	0,52 ± 0,08 abc	1,17 ± 0,05 c	39,43 ± 0,75 a
211044	2,83 ± 0,22 a	0,56 ± 0,06 abcd	1,00 ± 0,08 bc	43,93 ± 1,69 a
286	9,84 ± 1,33 fg	0,43 ± 0,04 ab	0,86 ± 0,17 bc	41,91 ± 2,17 a
276	10,17 ± 0,73 g	0,37 ± 0,07 a	-0,27 ± 0,02 a	61,67 ± 1,42 d
045	7,31 ± 0,50 defg	0,53 ± 0,01 abc	0,89 ± 0,06 bc	41,81 ± 0,59 a
327	5,50 ± 0,00 abcde	0,74 ± 0,00 d	-0,28 ± 0,00 a	54,93 ± 0,00 bc
063	2,61 ± 0,19 a	0,48 ± 0,05 abc	0,79 ± 0,12 bc	42,04 ± 1,23 a
069	9,51 ± 1,29 fg	0,41 ± 0,04 a	-0,10 ± 0,17 a	55,67 ± 2,95 bc
034	3,00 ± 0,17 ab	0,46 ± 0,03 abc	0,94 ± 0,03 bc	41,70 ± 1,11 a
596	3,56 ± 0,19 abc	0,56 ± 0,04 abcd	0,91 ± 0,04 bc	38,87 ± 0,63 a
318	5,73 ± 1,08 abcde	0,38 ± 0,02 a	0,95 ± 0,04 bc	39,91 ± 0,55 a
080	7,92 ± 1,31 efg	0,53 ± 0,04 abc	0,61 ± 0,15 b	44,29 ± 1,91 a
G036	3,54 ± 0,14 abc	0,59 ± 0,03 abcd	0,59 ± 0,29 b	43,02 ± 2,87 a
1061	3,40 ± 0,38 ab	0,63 ± 0,03 bcd	1,00 ± 0,05 bc	39,89 ± 0,30 a
Caimanta	8,33 ± 0,44 efg	0,38 ± 0,04 a	0,79 ± 0,10 bc	43,43 ± 1,17 a

L: porcentaje de reflectancia. a/b: índice de color. Letras distintitas indican diferencias significativas entre las pre-NIL-PP según el test de Duncan (p < 0,05).

Tabla III.7- (continuación)

pre-NIL	Firmeza	Sólidos solubles	pH	Acidez Titulable
095	47,81 ± 1,82 abcde	4,86 ± 0,32 abc	4,83 ± 0,10 bcde	0,36 ± 0,04 a
220060	47,63 ± 2,78 abcde	6,55 ± 0,47 bc	4,43 ± 0,07 abc	0,68 ± 0,09 bc
295	39,91 ± 2,98 abc	5,25 ± 0,32 abc	4,61 ± 0,10 bcde	0,37 ± 0,03 a
598	61,64 ± 9,83 efg	5,11 ± 0,25 abc	4,48 ± 0,21 abc	0,49 ± 0,15 abc
320	55,84 ± 8,42 cdef	6,05 ± 0,73 abc	5,06 ± 0,18 e	0,36 ± 0,04 a
115	74,03 ± 2,94 g	6,15 ± 0,77 abc	4,45 ± 0,10 abc	0,47 ± 0,02 ab
162	56,34 ± 3,57 cdef	5,59 ± 0,53 abc	4,56 ± 0,16 bcd	0,46 ± 0,06 ab
211044	54,97 ± 1,37 bcdef	6,48 ± 0,69 abc	4,50 ± 0,04 abcd	0,51 ± 0,03 abc
286	55,71 ± 5,19 cdef	7,04 ± 0,86 c	4,03 ± 0,18 a	0,97 ± 0,23 d
276	62,67 ± 1,54 efg	7,20 ± 1,50 c	4,43 ± 0,06 abc	0,67 ± 0,14 bc
045	49,93 ± 2,81 abcdef	4,98 ± 0,29 abc	4,50 ± 0,12 abcd	0,40 ± 0,05 ab
327	66,92 ± 0,00 fg	5,07 ± 0,00 abc	4,98 ± 0,00 de	0,36 ± 0,00 a
063	52,36 ± 5,28 bcdef	4,09 ± 0,57 a	4,90 ± 0,20 cde	0,30 ± 0,04 a
069	65,19 ± 3,59 efg	5,43 ± 0,31 abc	4,42 ± 0,10 abc	0,54 ± 0,05 abc
034	58,42 ± 1,50 defg	6,17 ± 0,07 abc	4,88 ± 0,24 bcde	0,32 ± 0,07 a
596	51,58 ± 5,02 bcdef	5,82 ± 0,63 abc	4,66 ± 0,07 bcde	0,52 ± 0,05 abc
318	34,01 ± 6,65 a	6,86 ± 0,12 c	4,50 ± 0,20 abcd	0,78 ± 0,15 cd
080	52,77 ± 3,11 bcdef	5,49 ± 0,61 abc	4,41 ± 0,08 abc	0,48 ± 0,07 ab
G036	50,31 ± 2,61 abcdef	5,81 ± 0,53 abc	4,45 ± 0,12 abc	0,43 ± 0,03 ab
1061	41,91 ± 4,88 abcd	4,38 ± 0,28 ab	4,48 ± 0,11 abc	0,50 ± 0,10 abc
Caimanta	37,90 ± 2,45 ab	5,76 ± 0,46 abc	4,38 ± 0,09 ab	0,50 ± 0,07 abc

L: porcentaje de reflectancia. a/b: índice de color. Letras distintitas indican diferencias significativas entre las pre-NIL-PP según el test de Duncan ( $p < 0,05$ ).

Podemos notar que aquellas pre-NILs-PP que exhibieron los mayores valores de vida poscosecha, pre-NIL115, pre-NIL276 y pre-NIL069, se correspondieron con líneas cuyos frutos resultaron ser de color amarillo (denotado por valores negativos del índice a/b y altos de L). Por otro lado, la pre-NIL034 también manifestó un elevado valor de vida poscosecha, sin embargo sus frutos lucieron un tamaño bastante pequeño. Otras líneas, que presentaron una vida poscosecha intermedia, pero mejores atributos en cuanto al tamaño y el color del fruto, fueron la pre-NIL211044 y la pre-NIL1061. De estas, la pre-NIL211044 mostró además mayor firmeza y contenido en sólidos solubles.

Las fotos de la Figura III.5 muestran frutos representativos de cada una de las pre-NILs-PP. Puede advertirse, que si bien hubo una importante recuperación del peso del fruto en la mayoría de las líneas, algunas de ellas (como la pre-NIL320, pre-NIL162, pre-NIL327, pre-NIL034, pre-NIL596 y pre-NIL318) presentaron frutos de tamaño pequeño. Además, en las pre-NIL598 y pre-NILG036 se observó segregación en el color, encontrándose algunas plantas con frutos rojos y otras con frutos amarillos.

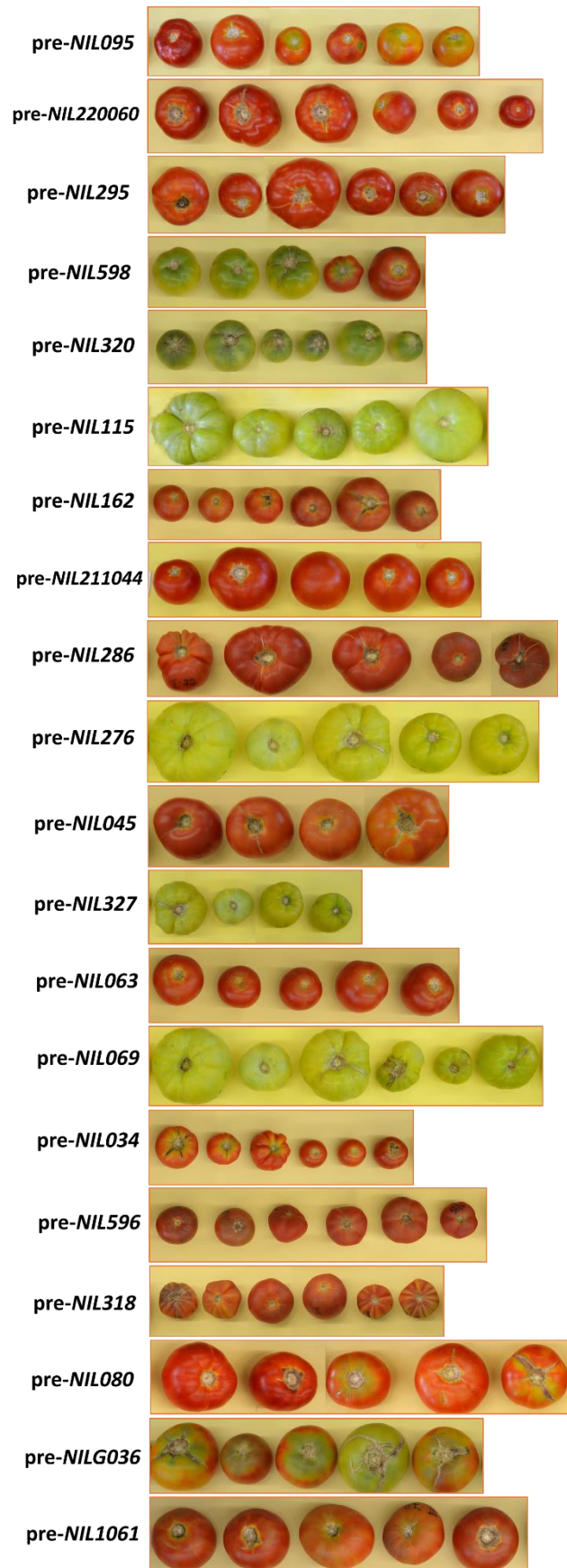
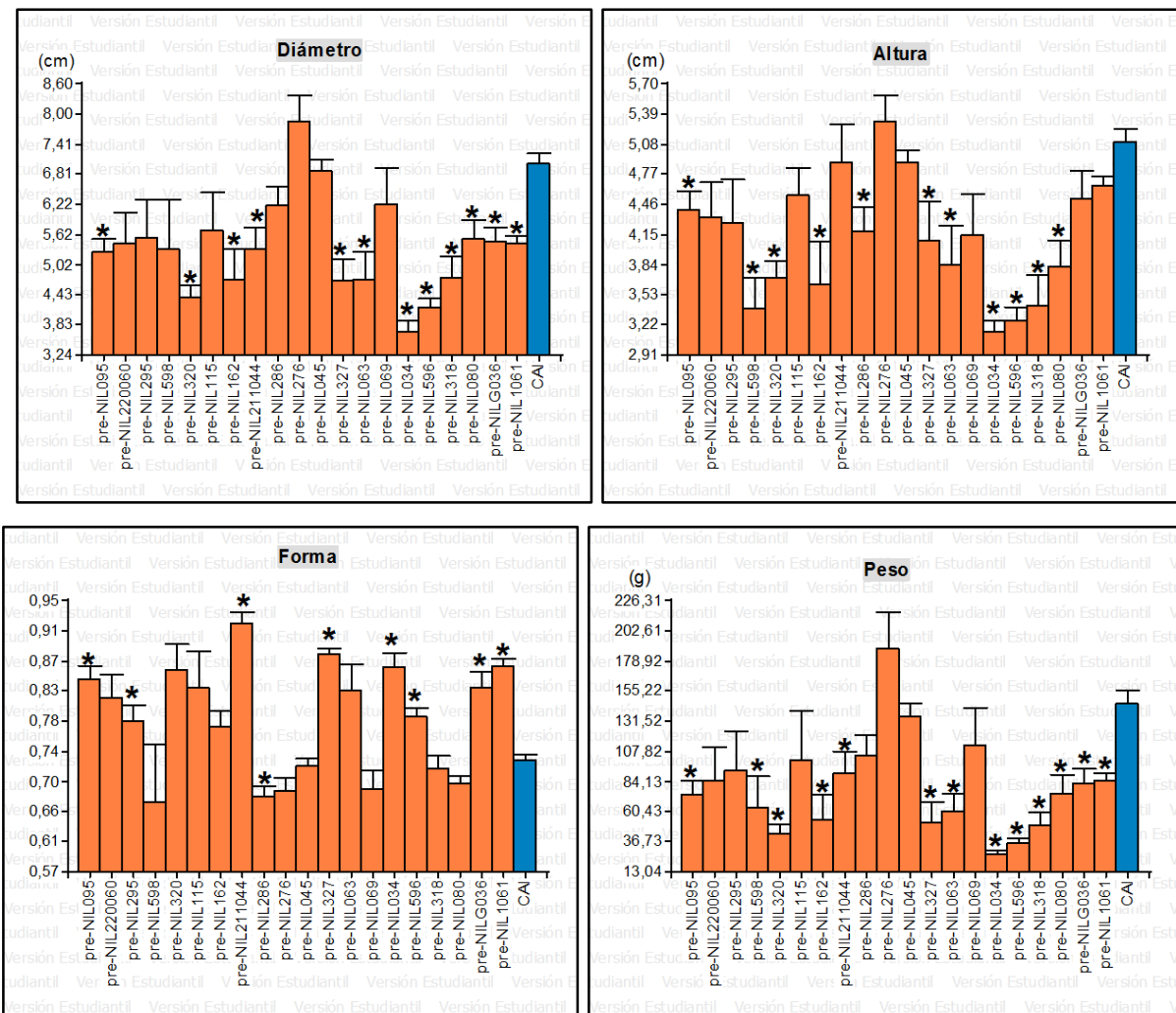


Figura III.5- Frutos representativos de las 20 pre-NILs-PP evaluadas.

Para evaluar el desempeño de estas pre-NILs, se comparó cada pre-NIL-PP, en relación al progenitor cultivado Caimanta. En la Figura III.6 se presentan gráficos de barra para cada carácter, mostrando el valor medio y el error estándar de cada línea junto a Caimanta (indicado en color azul). Para la mayoría de los caracteres estudiados, Caimanta no mostró diferencias entre los distintos años de evaluación y en los gráficos se exhibe el valor promedio de las dos campañas, con excepción del pH y la acidez titulable de los frutos, en los que sí se encontraron diferencias entre los años, y se presenta el valor de Caimanta relativo a cada campaña. Con un asterisco se señalan aquellas pre-NILs-PP que manifestaron diferencias significativas respecto a Caimanta ( $p < 0,01$ ).



**Figura III.6-** Diagramas de los valores medios y error estándar para caracteres de calidad en cada pre-NIL-PP y Caimanta. \* diferencias significativas entre la pre-NIL-PP y Caimanta ( $p < 0,01$ ).

Figura III.6- (continuación)

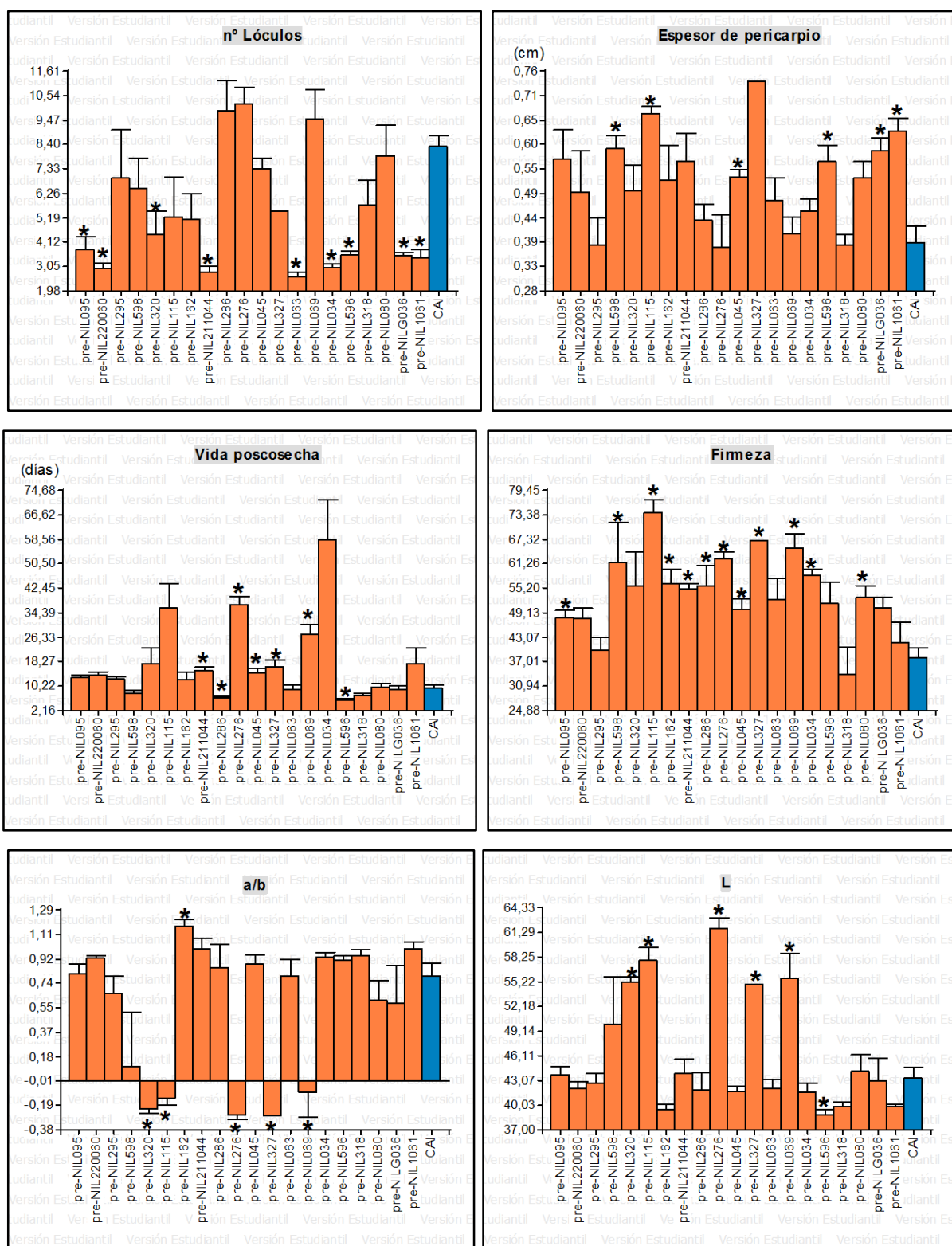


Figura III.6- Diagramas de los valores medios y error estándar para caracteres de calidad en cada pre-NIL-PP y Caimanta. \* diferencias significativas entre la pre-NIL-PP y Caimanta (p < 0,01).

Figura III.6- (continuación)

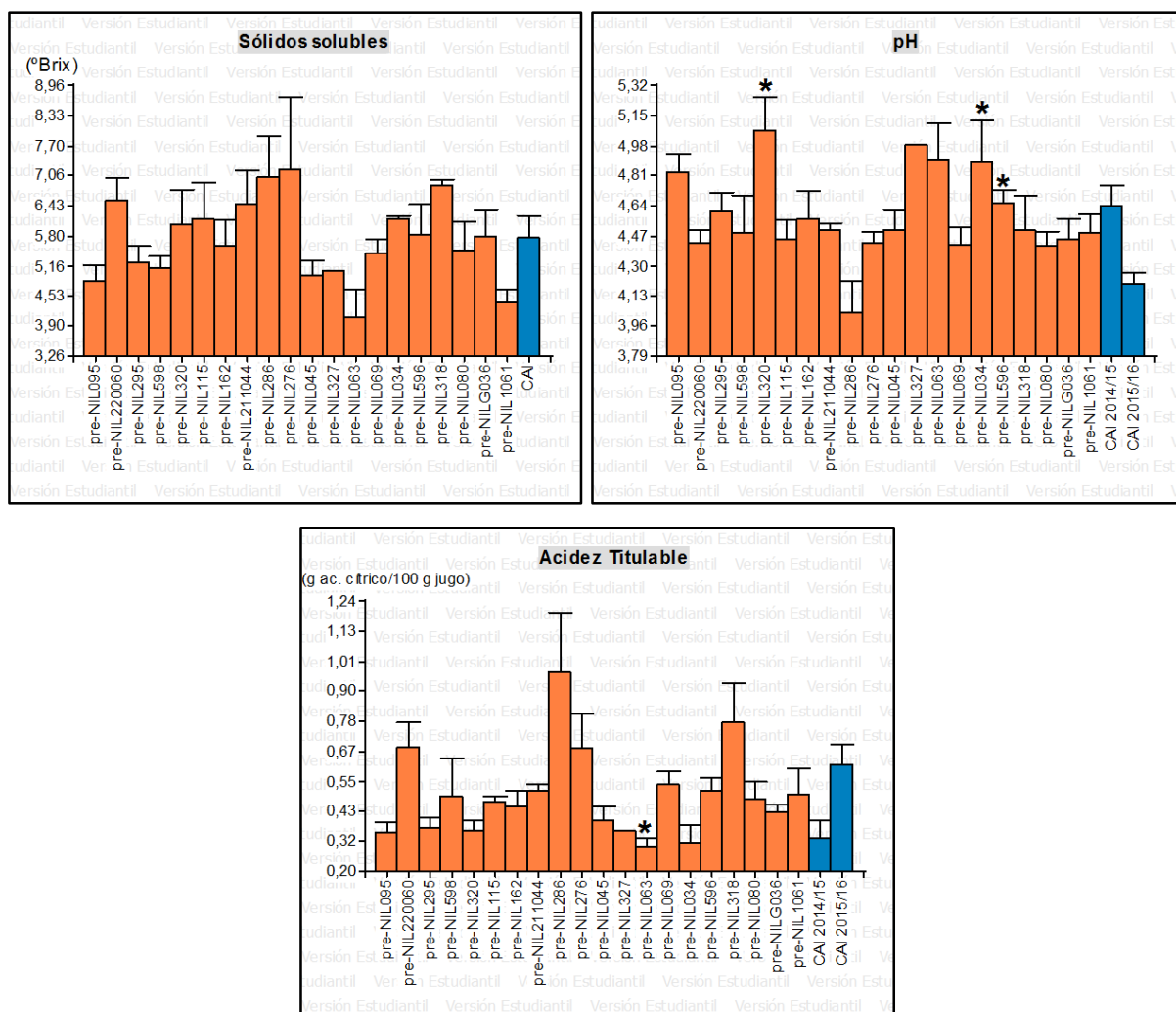


Figura III.6- Diagramas de los valores medios y error estándar para caracteres de calidad en cada pre-NIL-PP y Caimanta. \* diferencias significativas entre la pre-NIL-PP y Caimanta (p < 0,01).

Estos análisis revelaron que todas las pre-NILs-PP mostraron alguna diferencia con Caimanta, en relación a los caracteres de calidad de fruto estudiados. Las mayores discrepancias con Caimanta fueron encontradas para caracteres relacionados al tamaño y la forma del fruto, siendo superior la cantidad de pre-NILs-PP que difirieron significativamente de Caimanta, en comparación, principalmente, con los caracteres bioquímicos para los cuales se hallaron pocas diferencias. Por lo general, estas pre-NILs-PP exhibieron un tamaño menor y un índice de forma mayor (frutos más redondos) que Caimanta, lo cual concuerda con la influencia del progenitor silvestre sobre estos rasgos. Respecto al color, los mayores contrastes se observaron en relación a las líneas que manifestaron frutos de color amarillo, señalado por un valor negativo de a/b y

alto de L. En cuanto a la firmeza, la mayoría de las pre-NILs-PP presentaron mayor firmeza que Caimanta, sugiriendo que varias regiones a través del genoma controlarían este carácter. En relación a la vida poscosecha de los frutos, aquellas que mostraron valores más elevados, y significativamente diferentes de Caimanta, fueron algunas líneas de frutos amarillos (pre-NIL276 y pre-NIL069), como se observó anteriormente. No obstante, la pre-NIL211044 y la pre-NIL045 también superaron al progenitor cultivado para este carácter, siendo ambas de frutos rojos y con buenos atributos de calidad.

## DISCUSIÓN

---

Las pre-*NILs* representan líneas con múltiples segmentos cromosómicos de un progenitor que actúa como dador dentro de un fondo genético de interés. Si bien estas líneas poseen varios fragmentos del dador introgresados, también manifiestan una elevada proporción del genoma del progenitor recurrente, generalmente una variedad elite, lo cual las vuelve materiales con numerosos beneficios y un alto potencial para programas de mejora. Los estudios de pre-*NILs* resultan muy valiosos, pudiendo aportar a diversas investigaciones genéticas y también dirigir el desarrollo de nuevas variedades comerciales en un corto tiempo. De hecho, alguna pre-*NIL* que presente propiedades superiores al cultivar elite puede usarse directamente para la obtención de nuevos cultivares (Falke *et al.*, 2008). En este trabajo, para la caracterización y evaluación de las pre-*NILs* se condujeron dos tipos de análisis. Por un lado, un ANOVA dentro de familias derivadas de una pre-*NIL* heterocigota para el fragmento *SSR* introgresado, utilizando como fuente de variación dicho *SSR*, permitió examinar el efecto del segmento *SSR* de interés en cada pre-*NIL*. Por otro lado, la comparación de cada pre-*NIL* en condición homocigota, con alelos silvestres en el segmento *SSR* introgresado (pre-*NIL-PP*), con el cultivar Caimanta brindó información acerca del comportamiento general de la nueva pre-*NIL*. Estos dos análisis resultan complementarios, ya que por un lado exploramos el efecto del segmento *SSR* particular y por el otro la actuación de la pre-*NIL* de manera integral, permitiéndonos conocer mejor estos recursos genéticos.

Considerando cada pre-*NIL* en particular podemos hacer algunas reflexiones. En el caso de la **pre-*NIL095*** observamos que presentó diferencias significativas de Caimanta en relación al diámetro, la altura, la forma, el peso, el número de lóculos y la firmeza de los frutos, no obstante esas diferencias no pudieron atribuirse a la región señalada por el *SSR095*, debido a que el análisis de *QTLs* para esta región no mostró ninguna asociación a los caracteres evaluados. No puede descartarse, sin embargo, que dicha región participe en la determinación de alguno de los caracteres con efectos menores o interacciones epistáticas no detectados en este estudio. La pre-*NIL* homocigota para la introgresión silvestre (pre-*NIL-PP*) presentó frutos de menor tamaño y forma más esférica que el cultivar. La caracterización molecular complementaria reveló varias introgresiones silvestres adicionales en esta pre-*NIL*, en los cromosomas 2, 3, 4, 5, 6 y 11, que podrían estar afectando estos rasgos. De hecho, los *loci fas*

y *lc* exhibieron alelos silvestres, de manera que resulta muy probable que, al menos en parte, sean los responsables de las diferencias observadas entre la pre-*NIL* y el progenitor cultivado, en cuanto a caracteres relacionados con la forma y el tamaño del fruto. Como se ha descrito anteriormente, los *loci fas* (fasciado) y *lc* (número de lóculos) originan cambios en el tamaño del fruto, a través de la modificación del número de carpelos de la flor, y contribuyen a las notables diferencias en el tamaño entre los frutos de genotipos silvestres y cultivados. La presencia de alelos silvestres en ellos disminuye el tamaño de los frutos de tomate (Lippman y Tanksley, 2001; Barrero y Tanksley, 2004; Rodríguez *et al.*, 2011).

Para la **pre-*NIL220060***, el análisis de *QTLs* indicó una alta asociación de esta región del cromosoma 1, correspondiente al *SSR220060*, al contenido en sólidos solubles y la acidez titulable de los frutos, las cuales se habían detectado en generaciones precedentes (*BC<sub>1</sub>S<sub>1</sub>/BC<sub>3</sub>* y *BC<sub>2</sub>*, respectivamente). Para esta región, la presencia de alelos silvestres aumentó de forma significativa el contenido en sólidos solubles y la acidez, lo cual resulta de interés desde el punto de vista del mejoramiento de la calidad del fruto. Con este estudio no es posible diferenciar si se trata de efectos pleiotrópicos sobre ambos caracteres o si se deben a diferentes *QTLs* ligados en esa región cromosómica. Diversos trabajos han hallado *QTLs* relacionados al contenido en sólidos solubles en el cromosoma 1 de tomate, utilizando cruzamientos con distintas especies silvestres, entre ellas *S. pennellii* (Eshed y Zamir, 1994), *S. pimpinellifolium* (Chen *et al.*, 1999), *S. habrochaites* (Monforte y Tanksley, 2000b), *S. chmielewskii* (Frary *et al.*, 2003) y *S. peruvianum* (Fulton *et al.*, 1997). La comparación de los sólidos solubles y la acidez, entre la pre-*NIL* homocigota para la introgresión silvestre (pre-*NIL-PP*) y Caimanta, no reveló diferencias significativas. Sin embargo, los valores para esta pre-*NIL-PP* fueron de los más elevados en el conjunto de líneas desarrolladas (6,55 °Brix de sólidos solubles y 0,68 de acidez titulable, resultados Tabla III.7) y resultan de valor agronómico. Debemos aclarar que en estas evaluaciones Caimanta exhibió un contenido en sólidos solubles y una acidez relativamente más altos de los que se tenían como referencia para este cultivar (4,26 °Brix de sólidos solubles y 0,43 de acidez, Pratta *et al.*, 2011b), lo cual pudo influir en el hecho de que la mayoría de las pre-*NILs* no mostraran diferencias con Caimanta para estos caracteres, a pesar de manifestar valores elevados. Esto reafirma la complejidad y la influencia ambiental de los caracteres cuantitativos. Por otro lado, la región *SSR220060* se había relacionado a caracteres del tamaño de fruto, en generaciones anteriores, y la pre-*NIL-PP* discrepó de Caimanta respecto al número de lóculos. No obstante, en el análisis de *QTLs* en la pre-*NIL* esta región no se asoció a dichos

rasgos, indicando que otras regiones genómicas estarían involucradas. Varias introgresiones silvestres adicionales fueron detectadas en la pre-*NIL* (cromosomas 2, 3, 5, 8, 10, 11 y 12), y en particular, los *loci fas* y *lc* presentaron alelos silvestres. Es posible que estos estén implicados en los efectos previamente observados en relación al tamaño del fruto. Además, los altos valores de porcentajes de variación genética (% VG/VF) para los caracteres de tamaño en esta familia (resultados Tabla III.3) podrían también estar vinculados a la segregación de estos *loci* particulares.

En relación a la **pre-*NIL295***, la región marcada por el *SSR295* (cromosoma 2) había sido relacionada al peso de los frutos en otras generaciones (*BC<sub>1</sub>S<sub>1</sub>* y *BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub>*), sin embargo en los estudios de *QTLs* para la pre-*NIL*, no se encontró ninguna asociación de esta región a los caracteres de calidad de fruto. Además, la pre-*NIL-PP* (homocigota para la introgresión silvestre) se diferenció de Caimanta en cuanto a la forma, luciendo frutos más esféricos que el cultivar. Si bien no puede descartarse algún efecto menor o interacción para la región *SSR295*, estas cuestiones estarían señalando el efecto de alguna región genómica adicional. En este sentido, entre otras regiones, los *loci fw3.2* y *fas* presentaron introgresiones silvestres. Ambos *loci* afectan en gran medida caracteres relacionados al tamaño de los frutos, siendo probablemente responsables, al menos en parte, de los fenotipos observados. Por su lado, *fw3.2* ha sido descrito como un *QTL* clave en la domesticación y diversificación del tomate que, a diferencia de *fas*, actúa principalmente sobre el peso del fruto, sin modificación del número de lóculos (Chakrabarti *et al.*, 2013).

En el estudio de la **pre-*NIL598***, una asociación al parámetro L de color se encontró para esta región del cromosoma 2. Este *QTL* no había sido detectado previamente, lo cual puede deberse a que otras regiones genómicas enmascaraban sus efectos en generaciones anteriores, y/o nuevas interacciones se originan con el cambio en el contexto genético, a medida que se reduce la proporción del genoma dador. La pre-*NIL598* homocigota para la introgresión silvestre (pre-*NIL-PP*) discrepó de Caimanta respecto a la altura, el peso, el espesor de pericarpio y la firmeza de los frutos. En el caso de la firmeza, la pre-*NIL-PP* manifestó un aumento considerable de este carácter, resultando en un beneficio agronómico. Más estudios son necesarios para localizar adecuadamente las regiones responsables de estas modificaciones y para determinar si presentan alguna interacción con la región *SSR598*. Por su parte, las introgresiones adicionales de LA722, detectadas en el análisis molecular en esta pre-*NIL*

(cromosomas 1, 3, 4, 5, 10 y 11), podrían estar implicadas en alguna de las diferencias observadas respecto al progenitor cultivado.

Para la **pre-NIL320**, asociaciones al diámetro y a la acidez titulable de los frutos fueron detectadas en la región del cromosoma 3, indicada por el *SSR320*, las cuales habían sido encontradas previamente en las generaciones BC<sub>2</sub>/BC<sub>3</sub> y BC<sub>2</sub> respectivamente. En esta región, la presencia de alelos silvestres redujo ambos caracteres, y si bien el valor de acidez de la *pre-NIL-PP* no fue significativamente diferente de Caimanta, esos efectos no serían deseables dentro de un programa de mejoramiento. El análisis molecular reveló que el segmento silvestre introgresado en la *pre-NIL320* fue extenso, abarcando diversos marcadores contiguos. De este modo, sería factible que varios *QTLs* se hallaran en esta región. No obstante, más estudios son necesarios para comprobar si se trata de la existencia de distintos *QTLs* cercanos o de efectos pleiotrópicos sobre ambos caracteres. Algunos trabajos con *S. pimpinellifolium* reportaron *QTLs* en el cromosoma 3, relacionados al diámetro de los frutos (Chen *et al.*, 1999; Lippman y Tanksley, 2001), y otros a la acidez titulable, utilizando a *S. pennellii* (Causse *et al.*, 2004). La *pre-NIL* homocigota, para la introgresión silvestre, se diferenció de Caimanta en relación al diámetro, altura, peso, número de lóculos, color y pH de los frutos. Es posible que los efectos altamente correlacionados, en caracteres del tamaño de fruto, sean los responsables de algunas de estas diferencias ya que, por ejemplo, variaciones en el diámetro causarían consecuentemente variaciones en el peso. Además, otras regiones genómicas podrían estar influenciado estos caracteres, como algunas de las introgresiones silvestres adicionales detectadas en los cromosomas 4, 10, 11 y 12, entre las cuales se encuentra el *locus fas*. Asimismo, un rasgo que estaría siendo afectado por alguna región adicional en esta *pre-NIL* es el color de los frutos, ya que todas las plantas presentaron frutos de color amarillo (Figura III.5).

El análisis de *QTLs* en la **pre-NIL115** reveló una fuerte asociación de la región *SSR115* del cromosoma 5 al color del fruto, observándose que la presencia de alelos silvestres, en condición homocigota, determinaba frutos de color amarillo. Además, esta región se encontró asociada a la firmeza y la vida poscosecha de los frutos, advirtiéndose que los alelos silvestres aumentaron ambos caracteres. Es factible que se trate de efectos pleiotrópicos en los frutos amarillos que promueven también una mayor firmeza y vida poscosecha, aunque no puede descartarse que existan diversos *QTLs* en la región. Además, estas propiedades hacen pensar que algún gen involucrado en los procesos de madurez del fruto podría estar siendo afectado. En el brazo corto del cromosoma 5 fue descrito *rin* (*ripening inhibitor*), que codifica un factor

de transcripción MADS-BOX, necesario para activar la respiración climatérica y la biosíntesis de etileno, relacionada con la maduración (Vrebalov *et al.*, 2002). Los mutantes en este gen presentan frutos verdes, que más tarde se vuelven de color amarillo brillante, con una maduración retardada. Dado las características de la *pre-NIL115*, podría plantearse que los efectos observados se corresponden con alguna alteración en el *locus rin*. Además, los altos porcentajes de variación fenotípica, atribuible a variación genética para el color, estimados dentro de esta familia (resultados Tabla III.3), podrían vincularse con este *locus*. La *pre-NIL-PP* de frutos amarillos (Figura III.5), con elevada firmeza y vida poscosecha, difirió de Caimanta para el color y la firmeza, mientras que para la vida poscosecha las diferencias no se hallaron significativas, a pesar de que su valor para este rasgo resultó bastante elevado (36 días en promedio, resultados Tabla III.7). Es posible que la alta dispersión de los datos para este carácter haya interferido en la prueba t-Student. Por otro lado, esta *pre-NIL* presentó algunas introgresiones silvestres adicionales (cromosomas 3, 8, 10 y 11) que podrían influenciar también en estas determinaciones.

En relación a la ***pre-NIL162***, ninguna asociación a los caracteres de calidad de fruto fue encontrada para esta región de la base del cromosoma 5. No obstante, debe mencionarse que la cantidad de plantas homocigotas con alelos de LA722 (PP) fue baja, en relación a lo esperado, y las plantas homocigotas con alelos de Caimanta (CC) estuvieron en exceso, indicando un sesgo hacia los alelos cultivados para esta región marcada por el *SSR162* (resultados Tabla III.4). Esta segregación distorsionada también se observó en las familias BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> y en la generación BC<sub>3</sub>. La segregación distorsionada de un carácter o marcador puede deberse a una multitud de factores, de origen genético, ambiental o producto de la interacción entre ambos (Xu *et al.*, 1997; Vancetovic, 2008; Bintou *et al.*, 2012). Muchos factores genéticos han sido descritos, y van desde diferencias estructurales entre los cromosomas, que pueden llevar a una amplia gama de anomalías citogenéticas, hasta incompatibilidades alélicas concretas. Dentro de los factores ambientales, Wang *et al.* (2004) mencionan la presión de selección que se ejerce sobre alelos menos adaptados a condiciones ambientales específicas o la selección debido a la endogamia. Por su parte, Livingstone *et al.* (1999) señalan la deriva genética producida durante la gametogénesis, como factor ambiental que puede conducir a la segregación distorsionada. Entre ellos, resulta difícil separar los efectos genéticos y los factores ambientales, siendo a menudo la segregación distorsionada una consecuencia de la interacción de ambos (Xu *et al.*, 1997; Vancetovic, 2008). A pesar de no manifestar ningún efecto significativo esta región, la

pre-*NIL-PP* difirió de Caimanta en varios aspectos, como el diámetro, la altura, el peso, el color (a/b) y la firmeza de los frutos. Esto podría deberse a que la segregación distorsionada afectó los análisis de las asociaciones o también a la existencia de regiones silvestres adicionales que actúen sobre estos caracteres. De hecho, notamos que esta pre-*NIL* fue una de las líneas que más introgresiones adicionales presentó (cromosomas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 11 y 12), las cuales afectarían su comportamiento integral. Además, advertimos que en particular el *locus fas* fijó los alelos de LA722, siendo responsable, al menos en parte, de la reducción en el tamaño observada para la pre-*NIL162*.

Para la **pre-*NIL211044*** se encontró que la región del cromosoma 6, indicada por el *SSR211044*, estaba asociada a caracteres relacionados al tamaño del fruto, como la altura, el peso, el número de lóculos y el espesor de pericarpio. Sin embargo, estas asociaciones fueron débiles y no habían sido detectadas previamente. Una explicación podría ser que los efectos de esta región se encontraban enmascarados por otras regiones, manifestándose solo al disminuir la proporción del genoma dador. También podrían atribuirse a nuevas interacciones en el contexto genético que va cambiando al avanzar en las retrocruzas hacia el cultivado. Por otro lado, esta pre-*NIL* presentó varias introgresiones silvestres adicionales, entre ellas en los *loci lc* y *fas* para los cuales es conocida su influencia sobre los caracteres de tamaño y forma. Con estos datos resulta difícil discernir el verdadero efecto de la región *SSR211044*, o su interacción con otras regiones genómicas, en la determinación del tamaño de los frutos. Otros autores han reportado *QTLs* relacionados al peso del fruto, en el cromosoma 6 de tomate, en cruzamientos con diversas especies silvestres, entre ellas *S. cheesmaniae* (Goldman *et al.*, 1995), *S. pennellii* (Causse *et al.*, 2004) y *S. pimpinellifolium* (Chen *et al.*, 1999). Como resultaba esperable, la pre-*NIL* homocigota para la introgresión silvestre (pre-*NIL-PP*) discrepó de Caimanta en cuanto al tamaño y forma de los frutos, pero también mostró diferencias para la vida poscosecha y la firmeza, rasgos que parecerían estar siendo afectados por otras regiones genómicas. La pre-*NIL-PP* exhibió un aumento, tanto de la vida poscosecha como de la firmeza, en relación al cultivar, características que la vuelven promisoría desde el punto de vista comercial. De este modo, resulta interesante continuar estudiando esta línea por sus atributos favorables de calidad, y para profundizar en las bases genéticas que regulan caracteres complejos como la vida poscosecha del fruto.

En la **pre-*NIL286***, ninguna asociación a los caracteres de calidad de fruto fue detectada para la región del cromosoma 7, señalada por el *SSR286*, no obstante las plantas homocigotas

para la introgresión silvestre (pre-*NIL-PP*) mostraron algunas distinciones respecto del cultivar. Se diferenciaron de Caimanta en cuanto a la altura, la forma y la firmeza de los frutos. Aunque no es posible descartar que la región *SSR286* intervenga con efectos menores o interaccione con otras partes del genoma, estos estudios parecerían indicar que alguna región genómica adicional estaría afectando esos caracteres. De hecho, esta pre-*NIL* presentó varias introgresiones silvestres adicionales (cromosomas 3, 4, 7, 11 y 12) que podrían ejercer alguna influencia sobre los rasgos mencionados, destacándose por ejemplo segmentos del cromosoma 3 y 4 que fijaron los alelos de LA722. Por otro lado, esta pre-*NIL* manifestó una baja vida poscosecha y una alta firmeza. Si bien la reducción en la vida poscosecha no sería deseable en un programa de mejoramiento, esto corrobora la idea de que la firmeza y la vida poscosecha de los frutos pueden modificarse en forma independiente, como había sido afirmado por Mutschler *et al.* (1992), Rodríguez *et al.* (2010), y también en generaciones previas de este trabajo.

El análisis de *QTLs* en la pre-*NIL276* no detectó ninguna asociación de esta región del cromosoma 7 a los caracteres de calidad de fruto. No obstante, las plantas de esta pre-*NIL* presentaron frutos de color amarillo (Figura III.3), con elevada firmeza y vida poscosecha, difiriendo significativamente de Caimanta. Si bien no puede desestimarse algún efecto menor de la región *SSR276*, esto nos lleva a suponer que alguna región genómica adicional estaría implicada en la determinación de estas características. Además, en base al fenotipo amarillo, de elevada firmeza y vida poscosecha de los frutos, podría pensarse que algún gen involucrado en la maduración sería responsable de los efectos observados. Con los marcadores moleculares empleados se hallaron solo dos introgresiones silvestres adicionales en esta línea (cromosomas 3 y 11), siendo posible que alguna mutación no detectada haya ocurrido o que otras regiones no reveladas estén participando en las propiedades de esta pre-*NIL*. En el brazo corto del cromosoma 3 fue descrito el mutante *r* (*yellow flesh*), cuyos frutos maduros presentan un color amarillo, debido a que la síntesis de licopeno se encuentra inhibida al verse afectado el gen de la *fitoeno sintasa* (*PSY1*), enzima que cataliza la primera etapa de la ruta de biosíntesis de carotenoides (Fray y Grierson, 1993). La pre-*NIL276* mostró una introgresión silvestre homocigota (*PP*) en el cromosoma 3, sin embargo esta también fue observada en varias líneas que no manifestaron frutos amarillos. Más estudios se requieren para dilucidar si la pre-*NIL276* sufrió algún tipo de alteración en el cromosoma 3, vinculado a la *fitoeno sintasa* y la síntesis de carotenoides, o si el fenotipo se debe a otro u otros genes diferentes.

Para la **pre-NIL045**, un *QTL* relacionado a la firmeza de los frutos fue encontrado en esta región del cromosoma 7, marcada por el *SSR045*, donde la combinación del alelo silvestre y cultivado, en la condición heterocigota, fue la que mostró ventajas significativas respecto a los homocigotas que no presentaron diferencias entre ellos para la firmeza. Este hecho lo vuelve valioso para la producción de híbridos, sin embargo reduce su aplicabilidad en un programa de mejora donde se busquen líneas. Además, este *QTL* fue detectado con una baja probabilidad y no había sido hallado en generaciones previas. Es factible que la recombinación y las nuevas interacciones entre los genomas, al ir modificándose el fondo genético, estén involucradas en estos efectos. Cuando se comparó la *pre-NIL* homocigota, para la introgresión silvestre (*pre-NIL-PP*) con Caimanta, se observaron diferencias significativas para la firmeza de los frutos. Esto sugiere la contribución de alguna región adicional, debido a que la presencia de alelos silvestres en condición homocigota en este *QTL*, no presentó efectos significativos en el análisis de *QTLs*. Además, apoya la idea previamente planteada de que diversas regiones a lo largo del genoma controlarían la firmeza de los fruto en tomate. Por otro lado, esta *pre-NIL-PP* se diferenció del cultivar para la vida poscosecha y el espesor de pericarpio, indicando en principio que existiría alguna otra región influyendo en estos caracteres. La caracterización molecular con marcadores *INDELS* reveló pocas introgresiones silvestres no-diana en esta línea (solo dos). La buena recuperación del genoma de Caimanta, junto a los favorables atributos de calidad (buen peso, vida poscosecha, firmeza y color), convierten a esta *pre-NIL045* en una línea promisoría para seguir estudiando y en un material de interés y valor agronómico.

En relación a la **pre-NIL327**, se encontró asociación de esta región del cromosoma 8, indicada por el *SSR327*, a la vida poscosecha, donde la presencia de alelos silvestres extendió la vida poscosecha de los frutos. Este *QTL* había sido reportado previamente, en la generación  $BC_1S_1$  de estas retrocruzas, y resulta de interés para estudios genéticos y programas de mejora. La *pre-NIL* homocigota para la introgresión silvestre difirió significativamente de Caimanta para este rasgo, mostrando una vida poscosecha de 16 días aproximadamente (resultados Tabla III.7), lo cual resulta de importancia y valor agronómico. Sin embargo, debe aclararse que el número de plantas homocigotas para la introgresión silvestre (PP) fue bajo para una estimación precisa. Por otro lado, hallamos que la *pre-NIL-PP* se diferenció de Caimanta, respecto al diámetro, la altura, la forma, el peso, la firmeza y el color de los frutos. En relación al color, en la familia *pre-NIL* se observó segregación (Figura III.3), encontrándose plantas con frutos rojos y plantas con frutos amarillos, pero de forma no correlacionada con el segmento *SSR327*. Esto

estaría indicando la existencia de otras regiones involucradas en el control del color, de la firmeza y de los rasgos del tamaño del fruto en esta pre-*NIL*. De hecho, en el análisis molecular se detectaron algunas introgresiones silvestres adicionales que podrían estar participando en estas determinaciones.

La **pre-*NIL063*** mostró una asociación de la región *SSR063* del cromosoma 8 al índice de color L. Esta asociación resultó débil y las diferencias entre los genotipos fueron pequeñas. Es probable que estos efectos se hicieran evidente solo luego de disminuir la proporción del genoma dador en esta generación o que se trate de alguna asociación espuria. La pre-*NIL* homocigota para la introgresión silvestre (pre-*NIL-PP*) manifestó diferencias con Caimanta, en relación al diámetro, la altura, el peso, el número de lóculos y la acidez de los frutos. Si bien no puede descartarse algún efecto menor de la región *SSR063*, pareciera que otras regiones genómicas estarían determinando las características de esta pre-*NIL*. De hecho, el análisis molecular reveló varias introgresiones silvestres no-diana en los cromosomas 2, 3, 4, 5, 10, 11 y 12. Entre estas, se destacan los *loci lc* y *fas* que, en base a lo que se conoce sobre sus efectos, posiblemente resulten implicados en el menor tamaño del fruto de la pre-*NIL063* en relación al cultivar.

En cuanto a la **pre-*NIL069***, no se detectó ningún *QTL* relacionado a los caracteres de calidad de fruto para la región correspondiente al *SSR069* del cromosoma 9. No obstante, esta pre-*NIL*, en condición homocigota para la introgresión silvestre, difirió significativamente de Caimanta, al presentar algunas plantas con frutos amarillos (Figura III.5), que a su vez mostraban mayor firmeza y vida poscosecha. Dentro de la familia pre-*NIL069* la presencia de estos rasgos varió de una manera no correlacionada con el genotipo del segmento cromosómico *SSR069*, por lo cual podría plantearse que no sería un efecto de dicha introgresión y que alguna otra región genómica estaría involucrada. Además, el fenotipo de frutos amarillos con elevada firmeza y vida poscosecha hace pensar que podría tratarse de alguna alteración en los procesos de madurez del fruto. En tomate, numerosos estudios fisiológicos y genéticos han identificado y caracterizado diversos genes mutantes que afectan la maduración del fruto, prolongando su vida poscosecha pero, en la mayoría, manifestando a su vez otras alteraciones que repercuten negativamente en la calidad (Foolad, 2007). De manera similar a la pre-*NIL115* y la pre-*NIL276*, las características en la pre-*NIL069* llevan a inferir una posible vinculación con alguna vía relacionada a la madurez del fruto, suponiendo que alguna mutación puede haber ocurrido o que alguna región de la especie silvestre no identificada está implicada. Más estudios

ayudarán a entender qué procesos resultan afectados en estas líneas, si corresponden a alelos de los mismos genes o se trata de vías diferentes, favoreciendo la comprensión de la genética detrás de estas determinaciones.

En la **pre-NIL034**, un *QTL* relacionado a la forma de los frutos fue detectado en esta región del cromosoma 9, correspondiente al *SSR034*, en la cual la presencia de alelos silvestres aumentó el índice de forma, resultando en frutos más esféricos. Esta asociación había sido hallada anteriormente en diversas generaciones de estas retrocruzas ( $BC_1$ ,  $BC_1S_1$ ,  $BC_2S_2$  y  $BC_3$ ). Además, *QTLs* relacionados a la forma del fruto, en el cromosoma 9 de tomate, han sido descritos por otros autores empleando las especies silvestres *S. peruvianum*, *S. habrochaites* y *S. pimpinellifolium* (Fulton *et al.*, 1997; Bernacchi *et al.*, 1998a; Chen *et al.*, 1999). Asimismo, la *pre-NIL* homocigota en la introgresión silvestre difirió de Caimanta para la forma del fruto, pero también lo hizo para el diámetro, la altura, el peso, el número de lóculos, la firmeza y el pH. Es factible que los efectos sobre los caracteres del tamaño del fruto se relacionen entre sí, por ejemplo un cambio en el índice de forma puede implicar una modificación en el diámetro, la altura y/o el peso de los frutos. De todas maneras, y al tratarse de caracteres de herencia cuantitativa, es probable que también otras regiones estén controlando estas características. El análisis molecular complementario reveló la existencia de algunas introgresiones silvestres adicionales en esta línea (cromosomas 2, 4, 5 y 10), las cuales podrían tener alguna participación en estos rasgos. Por otra parte, es importante mencionar que la *pre-NIL-PP* manifestó un elevado valor de vida poscosecha, sin embargo el número de plantas homocigotas para la introgresión silvestre fue bajo para una buena estimación, y además presentaron frutos bastantes pequeños (Figura III.5), reduciendo su valor agronómico.

En relación a la **pre-NIL596**, no se encontró asociación de esta región del cromosoma 10, señalada por el *SSR596*, a ninguno de los caracteres de calidad de fruto, a pesar de que sí había sido relacionada a rasgos del tamaño en diversas generaciones anteriores de estos cruzamientos. Además, la *pre-NIL* homocigota para la introgresión silvestre (*pre-NIL-PP*) se diferenció de Caimanta en cuanto al diámetro, la altura, la forma, el peso, el número de lóculos y el espesor de pericarpio, entre otros. Estas observaciones sugieren que los efectos en el tamaño del fruto serían resultado de otras regiones genómicas o de diversas interacciones entre los dos genomas, si bien no puede descartarse algún efecto menor de la región *SSR596*. La caracterización molecular detectó varias introgresiones silvestres adicionales en esta *pre-NIL* (cromosomas 3, 4, 5, 8 y 11). De hecho, los *loci fw3.2* y *fas* presentaron alelos de

LA722, siendo responsables, al menos en parte, del menor tamaño del fruto exhibido por esta línea en relación al cultivar. Por otro lado, esta *pre-NIL-PP* manifestó una muy baja vida poscosecha de los frutos, reduciendo su utilidad en futuros programas de mejoramiento.

En el análisis de *QTLs* para la **pre-NIL318** no se halló asociación de esta región *SSR318* del cromosoma 10 a ninguno de los caracteres de calidad de fruto, mientras que en generaciones anteriores había sido vinculada con rasgos relacionados al tamaño de los frutos, de forma similar a lo observado para la *pre-NIL596*. En este caso, la *pre-NIL-PP* difirió de Caimanta respecto al diámetro, la altura y el peso de los frutos, caracteres altamente relacionados. Si bien no puede desestimarse algún efecto menor o alguna interacción para la región *SSR318*, estos datos sugieren que otras regiones genómicas serían responsables de las determinaciones en el tamaño. El análisis molecular reveló que no fueron muchas las introgresiones silvestres adicionales que presentó esta *pre-NIL* (cromosomas 3, 4 y 8), sin embargo en su mayoría fijaron los alelos silvestres en condición homocigota, pudiendo ejercer algún efecto importante. En particular, el *locus fw3.2* fijó los alelos de LA722 en esta *pre-NIL*, lo cual podría explicar las diferencias que se observaron con el cultivar en relación al diámetro, la altura y el peso, sin afectar el número de lóculos o la forma de los frutos.

Para la **pre-NIL080** se determinó que esta región *SSR080* del cromosoma 11 estuvo asociada a la vida poscosecha de los frutos, siendo la condición heterocigota la cual presentó ventajas significativas, aumentando la vida poscosecha, en relación a los homocigotas. Este *QTL* había sido reportado en algunas de las generaciones anteriores de estas retrocruzas ( $BC_1S_1$  y  $BC_2S_1$ ), manifestando el mismo efecto. Esto parece indicar que la presencia de alelos de ambos padres, que se combinan en el genotipo heterocigota, es necesaria, revelando algún tipo de interacción *intra locus* (heterosis o sobredominancia). Si bien las aplicaciones de este *QTL* en un programa de mejora se reducen al desarrollo de híbridos, estas observaciones permiten conocer más acerca de las determinaciones que afectan este complejo carácter. Como resultaba esperable, la *pre-NIL* homocigota para la introgresión silvestre (*pre-NIL-PP*) no difirió de Caimanta para la vida poscosecha de los frutos, aunque sí exhibió algunas diferencias en relación al diámetro, la altura, el peso y la firmeza. En este sentido, el menor tamaño del fruto y la mayor firmeza mostrados por esta *pre-NIL-PP* en relación al cultivar podrían ser resultados de otras introgresiones silvestres o de diversas interacciones entre los genomas. Cabe destacar que, en base a nuestro análisis molecular, la *pre-NIL080* fue una de las que menos introgresiones silvestres no-diana presentó, solamente en los cromosomas 2 y 12.

En relación a la **pre-NILG036**, se observó un efecto importante a través de las generaciones (BC<sub>1</sub>, BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> y BC<sub>3</sub>) asociado a esta región del cromosoma 11, indicada por el *SSRG036*, sobre el diámetro, la forma, el peso y el número de lóculos de los frutos. En esta familia pre-*NIL*, el *QTL* explicó cerca del 40 % y 60 % de la variación, en el número de lóculos y en la forma del fruto respectivamente (resultados Tabla III.5). La presencia de alelos silvestres en esta región determinó una disminución del número de lóculos, del diámetro y del peso, y un aumento del índice de forma, como se esperaba en base a los fenotipos parentales. Dada la alta relación que mantienen estos rasgos entre sí, resulta más probable atribuirlos a efectos pleiotrópicos que a diferentes *QTLs* en una misma región. La pre-*NIL* homocigota para la introgresión silvestre (pre-*NIL-PP*) se diferenció significativamente de Caimanta para estos caracteres. Si bien no puede descartarse la participación de otras regiones genómicas o de diversas interacciones epistáticas, el análisis molecular mostró pocas introgresiones silvestres adicionales en esta línea (cromosomas 2, 3 y 11), avalando la importancia de esta región en la determinación de estos rasgos. En este sentido, debe considerarse que el *locus fas* se localiza cercano en el cromosoma 11 y, dado los conocidos efectos de este *locus* sobre los caracteres del tamaño del fruto, es factible que las características de esta pre-*NIL* se deban a alelos de este gen. Además, el efecto principal de *fas* sobre el número de lóculos de los frutos (Barrero y Tanksley, 2004) explicaría los altos porcentajes de variación fenotípica atribuible a variación genética (% VG/VF), encontrados para el número de lóculos en esta familia pre-*NIL* (resultados Tabla III.3). No obstante, otro *QTL* cercano en el cromosoma 11, *fw11.3*, que influye también sobre el peso de los frutos ha sido reportado en tomate. El clonado reciente de *fw11.3* reveló que se trata de un gen, denominado *CSR* (*Cell Size Regulator*), que controla el peso del fruto regulando el tamaño celular (Mu *et al.*, 2017). Más estudios son necesarios para dilucidar si nuestras observaciones corresponden a efectos del *locus fas*, al *fw11.3* o a algún *QTL* ligado en la región cromosómica.

Para la **pre-NIL1061**, se encontró que la región del cromosoma 11, marcada por el *SSR1061*, se asoció al diámetro, la forma, el peso y el número de lóculos de los frutos, lo cual había sido reportado previamente en otras generaciones de estas retrocruzas (BC<sub>1</sub>S<sub>1</sub> y BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub>). En esta familia pre-*NIL*, el *QTL* explicó cerca del 60 % de la variación en el número de lóculos y en la forma del fruto (resultados Tabla III.5), y la presencia de los alelos silvestres mostró el efecto esperado según el fenotipo progenitor. Confirmando estos efectos, la pre-*NIL* homocigota para la introgresión silvestre (pre-*NIL-PP*) difirió de Caimanta manifestando un

menor número de lóculos, un menor tamaño y una forma del fruto más esférica. Como se ha señalado, debido la estrecha vinculación entre estos rasgos, es probable que estas características se deban a efectos pleiotrópicos, aunque no puede descartarse que existan diversos *QTLs* en la región. En base a la caracterización molecular, pocas introgresiones silvestres adicionales fueron detectadas en esta pre-*NIL* (cromosoma 3 y 11). Sin embargo, se advirtió que el segmento *SSR1061*, introgresado en el cromosoma 11, era extenso, abarcando diversos marcadores contiguos e incluso el *locus fas*. Estas observaciones hacen suponer que el *locus fas* es el responsable, por lo menos en parte, de los efectos encontrados sobre el diámetro, la forma, el peso y el número de lóculos de los frutos. Por otro lado, la región *SSR1061* se asoció también al color de los frutos, pero más estudios se requieren para determinar si se trata de algún *QTL* cercano en el cromosoma. Además, esta pre-*NIL-PP* presentó una buena vida poscosecha de los frutos (18 días aproximadamente, resultados Tabla III.7) que, junto a los beneficiosos atributos de color (elevado índice a/b y bajo L), la convierten en un material de valor agronómico y de interés para continuar estudios genéticos.

En forma general, las pre-*NILs* exhibieron buenos atributos de calidad de fruto, e incluso varias superaron al progenitor cultivado para diversos rasgos. Las diferencias más notables respecto a Caimanta se hallaron en relación al tamaño y la forma del fruto, que representan aquellos caracteres para los cuales los progenitores discrepan marcadamente. Es factible que para otros caracteres, como los sólidos solubles y la acidez, las menores diferencias y también el menor número de *QTLs* encontrados se relacionen con la menor divergencia entre los progenitores. Sin embargo, aun así las pre-*NILs* manifestaron buenos valores agronómicos para estos rasgos. Otros caracteres, como la vida poscosecha y el color mostraron importantes variaciones, al presentar notables fenotipos transgresivos, como fueron algunos frutos de muy elevada vida poscosecha y también los frutos de color amarillo. Considerando algunos *QTLs* interesantes, podemos destacar la asociación a los sólidos solubles y la acidez titulable del cromosoma 1 (*SSR220060*), donde los alelos silvestres determinaron un aumento en ambos caracteres, volviéndose de gran valor para la mejora del sabor de los frutos de tomate. En relación a la vida poscosecha de los frutos, más estudios son necesarios para dilucidar si los efectos localizados en el cromosoma 5 corresponden al *locus rin* o si se trata de otro gen que afecta algún proceso de la madurez del fruto. Alternativamente, el *QTL* detectado para a la vida poscosecha en el cromosoma 8 (*SSR327*) resulta bastante promisorio, ya que la presencia de

alelos silvestres en esta región promueve una extensión de la vida poscosecha de los frutos, en principio sin aparente vinculación directa con caracteres de calidad negativos. Además, recientemente, Green *et al.* (2016) hallaron también la asociación de esta región del cromosoma 8 a la vida poscosecha de los frutos, en una población segregante F<sub>3</sub>-BC<sub>1</sub>S<sub>1</sub>, derivada del cruzamiento entre un cultivar comercial de *S. lycopersicum*, denominado Rio Grande, y la accesión LA1589 de *S. pimpinellifolium*. En este trabajo, al igual que en nuestro estudio, la presencia de alelos silvestres en la región mejoró la vida poscosecha de los frutos y representa una importante validación de esta asociación en diferentes materiales genéticos. Por otra parte, considerando los atributos generales de las líneas, resultan atractivas la pre-NIL211044, la pre-NIL045 y la pre-NIL1061, las cuales presentaron una vida poscosecha intermedia (15, 14 y 18 días respectivamente), pero a su vez buenas propiedades en cuanto al tamaño y el color de los frutos (resultados Tabla III.7). Entre estas, la pre-NIL211044 exhibió además una elevada firmeza y alto contenido en sólidos solubles. En una primera instancia, estas y otras pre-NILs que lleven *QTLs* de valor pueden ser seleccionadas para realizar más estudios, reducir aún más la proporción del genoma dador y avanzar en las caracterizaciones, de cara a desarrollar nuevas líneas de mejora con beneficios en los caracteres de calidad de fruto.

## CONCLUSIONES PARCIALES

---

- La colección de pre-*NILs*, derivada a partir del cultivar Caimanta y la especie silvestre *S. pimpinellifolium*, mostró diversidad en relación a los caracteres de calidad de fruto. Estas pre-*NILs* manifestaron valores discrepantes para atributos del fruto, como el tamaño, la forma, la vida poscosecha, el color, la firmeza, el contenido en sólidos solubles y la acidez, destacándose que, en forma general, las diferentes pre-*NILs* exhibieron buenos atributos de calidad, e incluso se encontraron valores superiores al progenitor cultivado para diversos rasgos.
- Diversas regiones *SSR* de *S. pimpinellifolium*, introgresadas en el contexto de Caimanta en las pre-*NILs*, tuvieron efectos sobre algunos caracteres de calidad de fruto, y el comportamiento integral de las pre-*NILs* fue muy promisorio. El estudio de estas líneas posibilitó la exploración del aporte de la diversidad genética de la especie silvestre, mostrando que la introgresión de regiones genómicas de *S. pimpinellifolium* en el genoma cultivado permite mejorar diversas características de calidad de los frutos.
- Diversas regiones genómicas, asociadas a caracteres de calidad de fruto, en las diferentes pre-*NILs*, se validaron a través de las comparaciones con las generaciones precedentes de retrocruzas, derivadas del cruzamiento entre Caimanta y LA722. Estos estudios permitieron avanzar en las bases genéticas de caracteres de la calidad del fruto, posibilitándonos conocer algunas de las regiones genómicas que controlan estos rasgos en tomate.

## CONCLUSIONES FINALES

---

- Los diversos análisis mostraron la existencia de variabilidad genética beneficiosa y aprovechable en la especie silvestre *S. pimpinellifolium*. Los resultados revelaron que la introgresión de regiones genómicas de *S. pimpinellifolium* en el genoma cultivado permitió mejorar diferentes características de calidad de los frutos y obtener nuevos recursos vegetales con alto potencial para programas de mejoramiento y estudios genéticos en tomate.
  
- Se obtuvieron 22 pre-*NILs* derivadas, a partir del cruzamiento entre la especie silvestre *S. pimpinellifolium* y un cultivar argentino tipo platense y destinado al consumo en fresco, Caimanta. El proceso de desarrollo de estas líneas permitió avanzar en el conocimiento de la constitución genómica de estos materiales, de gran relevancia a nivel regional, y aplicar estos conocimientos en el programa de mejora de materiales locales.

## CONSIDERACIONES FINALES

---

La reducida diversidad genética del germoplasma cultivado es una de las principales consecuencias de los sucesivos “cuellos de botella” y la selección durante la domesticación y el mejoramiento del tomate (Miller y Tanksley, 1990; Blanca *et al.*, 2012). Esto ha llevado a los genetistas y mejoradores a buscar en la rica variación genética almacenada en el germoplasma no adaptado (Bai y Lindhout, 2007). El empleo de cruzamientos interespecíficos es sumamente apropiado para caracteres que han sido descuidados durante el proceso de domesticación de la especie y desean ser recuperados en programas de mejoramiento. Ya los primeros trabajos en pre-mejora (Rick, 1986) establecieron que las especies silvestres de tomate pueden ser una fuente de genes de interés agronómico, conteniendo alelos con efectos favorables, incluso ocultos bajo fenotipos que se presentan como inferiores. Los nuevos desarrollos en marcadores moleculares sentaron la idea de que estos alelos beneficiosos podían ser identificados dentro del genoma silvestre, y una vez localizados por medio del mapeo de *QTLs*, ser introducidos en los cultivares modernos, mediante *Selección Asistida por Marcadores* (Collard *et al.*, 2005). Sin embargo, el potencial de las especies silvestres, como fuente de alelos valiosos para la mejora genética del tomate, todavía está muy lejos de ser totalmente explotado (Grandillo *et al.*, 2011). Una falla ha sido la completa disociación entre los procesos de estudio de *QTLs* y el desarrollo de nuevas variedades y, hoy en día, la falta de poblaciones adecuadas para la explotación de estos recursos genéticos sigue siendo una limitación clave (Barrantes *et al.*, 2014). Para aumentar la eficiencia con la cual la biodiversidad natural pueda ser utilizada para mejorar el rendimiento, la adaptación y/o la calidad del germoplasma elite, es necesario disminuir la brecha entre el mapeo de *QTLs* y el mejoramiento basado en *QTLs*. El fin último de este trabajo ha sido acercar al mejorador la variabilidad genética presente en la entrada LA722, de la especie silvestre *S. pimpinellifolium*, para que pueda ser aprovechada en programas de mejora y en diversas investigaciones genéticas. La metodología de trabajo se basó en el “*Análisis de QTLs en retrocruzas avanzadas*” (Tanksley y Nelson, 1996) y el desarrollo de “*poblaciones de NILs*” (Eshed y Zamir, 1994, 1995; Zamir, 2001), para explotar más eficazmente el potencial genético almacenado en el germoplasma silvestre y ampliar así la diversidad existente en la especie de cultivada (Tanksley y McCouch, 1997; Zamir, 2001; Grandillo *et al.*, 2013). Este enfoque favoreció la detección de alelos de interés, para numerosos rasgos en la especie silvestre, junto con la obtención de nuevos

materiales de gran valor agronómico. Combinar el análisis de *QTLs* con el desarrollo de poblaciones avanzadas, permitió abordar la variabilidad genética presente en la especie silvestre, para incluirla en planes de mejora y también para el estudio básico de caracteres de interés, relacionados con la calidad del fruto en un principio, pero que pueden extenderse a más en el futuro. Como fruto de este trabajo se consiguieron 22 pre-*NILs* de tomate, derivadas del cultivar argentino tipo platense Caimanta, con aportes de la especie silvestre *S. pimpinellifolium*.

En forma generalizada, en el proceso de desarrollo de las pre-*NILs*, se encontraron diferencias en la detección de los *QTLs* a través de las generaciones, las cuales pueden atribuirse a causas experimentales y/o a factores biológicos. En gran parte, estas discrepancias se relacionan con la mayor varianza, los arrastres por ligamiento o las diversas interacciones epistáticas presentes en las generaciones más tempranas que van cambiando al progresar hacia las pre-*NILs*. A medida que avanzamos en los ciclos de retrocruzas, hacia el progenitor recurrente, se reduce la proporción del genoma dador y la variación existente. Esto lleva a modificaciones en el fondo genético y a la posibilidad de que los alelos silvestres de un *QTL* experimenten nuevas interacciones epistáticas, viendo alterados sus efectos o incluso perdiéndose. La recombinación entre los genomas y las variaciones en las interacciones epistáticas pueden jugar un rol trascendental. Respuestas impredecibles se originan por nuevas interacciones entre las introgresiones y el genoma recurrente (Bernacchi *et al.*, 1998b). Al mismo tiempo, nuevos *QTLs* no detectados previamente pueden aparecer en las generaciones más avanzadas, debido a la fijación de *QTLs* mayores o de múltiples regiones silvestres que enmascaraban sus efectos. Al disminuir la variabilidad genética se aumenta el poder de detección de *QTLs* con efectos menores (Chaïb *et al.*, 2006). Por otro lado, reducir la variación de fondo también favorece a la eliminación de asociaciones falsas, ya que la detección de un *QTL* en una generación podría ser espuria (error de tipo I) (Bernacchi *et al.*, 1998b). Sumado a esto, un factor importante puede ser la pérdida de la asociación entre un marcador y el *QTL*, debido a la recombinación, al progresar en los cruzamientos, obstaculizándose su detección. Podría ocurrir también la formación de nuevas asociaciones. Alternativamente, un *QTL* puede perderse si la región genómica deja de segregar, fijando alelos de algún progenitor. En este trabajo, notables diferencias fueron halladas entre las generaciones, algunos *QTLs* se fueron perdiendo y otros nuevos fueron emergiendo al avanzar en las retrocruzas hacia al progenitor

cultivado. Además, observamos que el efecto final de la introgresión silvestre en la pre-*NIL* resultó bastante menor que lo previsto por los estudios de *QTLs*. Podemos decir, que el análisis de *QTLs* en las generaciones tempranas fue un bajo predictor del comportamiento final de la región genómica en la pre-*NIL*. Estas observaciones muestran una baja conservación y una fuerte dependencia del *background* genético en los análisis de *QTLs*, resaltando nuevamente la importancia de estudiar los *QTLs* en el contexto genético de interés.

En relación a aquellos *QTLs* que habían sido detectados previamente y se conservaron en las pre-*NILs*, en general, mostraron efectos estables a través de las generaciones, con algunas excepciones particulares. Como se mencionó anteriormente, las discrepancias en los efectos de un *QTL*, a través de las generaciones, pueden atribuirse tanto a causas biológicas como experimentales. Principalmente, las modificaciones en el contexto genético, al avanzar en los cruzamientos, sumado a los efectos ambientales, pueden afectar notablemente la expresión de un *QTL*. El hecho de que diversos rasgos manifiesten distintos niveles de estabilidad indica diferencias en importancia de las interacciones genéticas de fondo en la expresión de esos rasgos. Es decir, mientras que para algunos caracteres prevalecen las acciones génicas aditivas, para otros lo hacen las interacciones epistáticas, volviéndolos más influenciados por el contexto (Barrantes *et al.*, 2016). Por otro lado, en gran medida la dirección de los efectos en los *QTLs* estuvo en concordancia con lo esperado, en base al fenotipo de los progenitores del cruzamiento. Sin embargo, y al igual que en muchos trabajos publicados de mapeo de *QTLs* (Tanksley *et al.*, 1996; Causse *et al.*, 2004; Gur y Zamir, 2004), se encontraron alelos, tanto de la especie silvestre como cultivada, que presentaron efectos opuestos a los esperados, aumentando así considerablemente la variabilidad disponible.

Finalmente, los nuevos materiales y conocimientos obtenidos serán utilizados en futuras investigaciones genéticas para continuar con la mejora de la calidad del fruto en tomate.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Asíns, M.J.; Mestre, P.; Gracia, J.E.; Dicenta, F. y Carbonell, E.A. (1994). Genetic x environment interaction in QTL analysis of an intervarietal almond cross by means of genetic markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 89, 358-364.
- 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.
- Barrantes, W. (2014). Desarrollo de una genoteca de líneas de introgresión entre *Solanum lycopersicum* y *Solanum pimpinellifolium* utilizando herramientas genómicas de alto rendimiento y detección de *QTLs* implicados en calidad de fruto. Tesis para optar al grado académico de Doctor en Biotecnología, Universidad Politécnica de Valencia.
- Barrantes, W.; Fernández-del-Carmen, A.; López-Casado, G.; González-Sánchez, M.A.; 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.
- Barrantes, W.; Lopez-Casado, G.; García-Martínez, S.; Alonso, A.; Rubio, F.; Ruiz, J.J.; Fernández-Muñoz, R.; Granell, A. y Monforte, A.J. (2016). Exploring new alleles involved in tomato fruit quality in an introgression line library of *Solanum pimpinellifolium*. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1172. doi:10.3389/fpls.2016.01172
- Barrero, L.S. y Tanksley, S.D. (2004). Evaluating the genetic basis of multiple-locule fruit in a broad cross section of tomato cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 109, 669-679.
- Bauchet, G. y Causse, M. (2012). Genetic diversity in tomato (*Solanum lycopersicum*) and its wild relatives. En: M. Caliskan (ed.), *Environmental Sciences*. Rijeka, Croacia: InTechOpen, (pp. 133-62).

- Bedinger, P.A.; Chetelat, R.T.; McClure, B.; Moyle, L.C.; Rose, J.K.C.; Stack, S.M.; van der Knaap, E.; Baek, Y.S.; Lopez-Casado, G.; Covet, P.A.; Kumar, A.; Li, W.; Nunez, R.; Cruz-Garcia, F. y Royer, S. (2011). Interspecific reproductive barriers in the tomato clade: opportunities to decipher mechanisms of reproductive isolation. *Sexual Plant Reproduction*, 24, 171-187.
- Bergougnoux, V. (2014). The history of tomato: From domestication to biopharming. *Biotechnology Advances*, 32, 170-189.
- Bernacchi, D.; Beck-Bunn, T.; Eshed, Y.; Lopez, J.; Petiard, V.; Uhlig, J.; Zamir, D.; Tanksley, S. (1998a). 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.
- Bernacchi, D.; Beck-Bunn, T.; Emmatty, D.; Eshed, Y.; Inai, S.; Lopez, J.; Petiard, V.; Sayama, H.; Uhlig, J.; Zamir, D. y Tanksley, S.D. (1998b). Advanced backcross QTL analysis of tomato. II. Evaluation of near-isogenic lines carrying single-donor introgressions for desirable wild QTL-alleles derived from *Lycopersicon hirsutum* and *L. pimpinellifolium*. *Theoretical and Applied Genetics*, 97, 170-180.
- Bintou, F.; Diouf, H. y Mergeai, G. (2012). Distorsions de ségrégation et amélioration génétique des plantes (synthèse bibliographique). *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 16, 499-509.
- Blanca, J.; Cañizares, J.; Cordero, L.; Pascual, L.; Díez, M. J. y Nuez, F. (2012). Variation revealed by SNP genotyping and morphology provides insight into the origin of the Tomato. *PLoS ONE*, 7, e48198.
- Blanca, J.; Montero-Pau, J.; Sauvage, C.; Bauchet, G.; Illa, E.; Díez, M. J.; Francis, D.; Causse, M.; van der Knaap, E. y Cañizares, J. (2015). Genomic variation in tomato, from wild ancestors to contemporary breeding accessions. *BioMedCentral Genomics*, 16, 257.

- Brummell, D.A. y Harpster, M.H. (2001). Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Molecular Biology*, 47, 311-340.
- Buescher, R.W.; Sistrunk, W.A.; Tigchelaar, E.C. y Ng, T.J. (1976). Softening, pectolytic activity and storage life of *rin* and *nor* tomato hybrids. *HortScience*, 11, 603-605.
- Cambiaso, V. (2017). Construcción de un mapa y detección de *QTLs* asociados a la vida poscosecha y calidad de los frutos en un cruzamiento interespecífico de tomate. Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Agrarias de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario. Pp. 103.
- Cambiaso, V.; Pereira da Costa, J.H.; Rodríguez, G.R.; Pratta, G.R.; Picardi, L.A.; Francis, D.M. y Zorzoli R. (2015). Polimorfismo en la secuencia genómica completa entre un cultivar argentino y una especie silvestre de tomate (*Solanum* spp.). Publicado en Actas del XLIV Congreso Argentino de Genética en *Journal of Basic & Applied Genetics*. Suppl. Vol. XXVI(1) 2015 - pp. 178.
- Canady, M.A.; Meglic, V. y Chetelat, R.T. (2005). A library of *Solanum lycopersicoides* introgression lines in cultivates tomato. *Genome*, 48, 685-697.
- Causse, M.; Duffe, P.; Gomez, M.C.; Buret, M.; Damidaux, R.; Zamir, D.; Gur, A.; Chevalier, C.; Lemaire-Chamley, M. y Rothan, C. (2004). A genetic map of candidate genes and *QTLs* involved in tomato fruit size and composition. *Journal of Experimental Botany*, 55, 1671-1685.
- Censo del Cinturón Hortícola de Rosario (2012). Censo 2012 del Cinturón Hortícola de Rosario, Ajuste del diagnóstico agronómico de necesidades y estrategias de intervención del proyecto hortícola de Rosario, 2013/2018. *Publicación Miscelánea N° 50*. Estación experimental agropecuaria INTA Oliveros, Centro regional Santa Fe. ISSN 0326-256.

- Chaïb, J.; Lecomte, L.; Buret, M. y Causse, M. (2006). Stability over genetic backgrounds, generations and years of quantitative trait locus (*QTLs*) for organoleptic quality in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 112, 934-944.
- Chaïb, J.; Devaux, M.F.; Grotte, M.G.; Robini, K.; Causse, M.; Lahaye, M. y Marty, I. (2007). Physiological relationships among physical, sensory, and morphological attributes of texture in tomato fruits. *Journal of Experimental Botany*, 58, 1915-1925.
- Chakrabarti, M.; Zhang, N.; Sauvage, C.; Muños, S.; Blanca, J.; Cañizares, J.; Diez, M.J.; Schneider, R.; Mazourek, M.; McClead, J.; Causse, M. y van der Knaap, E. (2013). A cytochrome P450 regulates a domestication trait in cultivated tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 10, 17125-17130.
- Chen, F.Q. y Foolad, M.R. (1999). A molecular linkage map of tomato based on an interspecific cross between *Lycopersicon esculentum* and *L. pimpinellifolium* and its comparison with other molecular maps of tomato. *Genome*, 42, 94-103.
- Chen, F.Q.; Foolad, M.R.; Hyman, J.; St. Clair, D.A. y Beelaman, R.B. (1999). Mapping of *QTLs* for lycopene and other fruit traits in a *Lycopersicon esculentum* × *L. pimpinellifolium* cross and comparison of *QTLs* across tomato species. *Molecular Breeding*, 5, 283-299.
- Chetelat, R.T. y Meglic, V. (2000). Molecular mapping of chromosome segments introgressed from *Solanum lycopersicoides* into cultivated tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Theoretical and Applied Genetics*, 100, 232-241.
- Collard, B.C.Y.; Jahufer, M.Z.Z.; Brouwer, J.B. y Pang, E.C.K. (2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (*QTL*) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica*, 142, 169-196.
- Cong, B.; Liu, J. y Tanksley, S.D. (2002). Natural alleles at a tomato fruit size quantitative trait locus differ by heterochronic regulatory mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 99, 13606-13611.

- Cong, B.; Barrero, L.S. y Tanksley, S.D. (2008) Regulatory change in YABBY-like transcription factor led to evolution of extreme fruit size during tomato domestication. *Nature Genetics*, 40, 800-804.
- De Candolle, A. (1886). *Origin of cultivated plants*. Nueva York: Hafner Publishing Company (reprint 1959), (pp. 468).
- De Vicente, M.C. y Tanksley, S.D. (1993). QTL analysis of transgressive segregation in an interspecific tomato cross. *Genetics*, 134, 585-596.
- Di Renzo, J.A.; Casanoves, F.; Balzarini, M.G.; Gonzalez, L.; Tablada, M. y Robledo, C.W. (2001). *Infostat*, versión 2001, Grupo Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- 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.
- Eichten, S.R.; Foerster, J.M.; de Leon, N.; Kai, Y.; Yeh, C.T.; Liu, S.; Jeddloh, J.A.; Schnable, P.S.; Kaeppler, S.M. y Springer, N.M. (2011). B73-Mo17 near-isogenic lines demonstrate dispersal structural variation in maize. *Plant Physiology*, 156, 1679-1690.
- Eshed, Y. y Zamir, D. (1994). Introgressions from *Lycopersicon pennellii* can improve the soluble solids yield of tomato hybrids. *Theoretical and Applied Genetics*, 88, 891-897.
- 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. y Zamir, D. (1996). Less-than-additive epistatic interactions of quantitative trait loci in tomato. *Genetics*, 143, 1807-1817.

- Eshed, Y.; Gera, G. y Zamir, D. (1996). *Lycopersicon esculentum* lines containing small overlapping introgressions from *L. pennellii*. *Theoretical and Applied Genetics*, 83, 1027-1034.
- Falke, K.C.; Sušić, Z.; Hackauf, B.; Korzun, V.; Schondelmaier, J.; Wilde, P.; Wehling, P.; Wortmann, H.; Mank, J.R.; van der Voort, J.R.; Maurer, H.P.; Miedaner, T. y Geiger, H.H. (2008). Establishment of introgression libraries in hybrid rye (*Secale cereale* L.) from an Iranian primitive accession as a new tool for rye breeding and genomics. *Theoretical and Applied Genetics*, 117, 641-652.
- FAOSTAT. Base de datos Estadísticos (2013/2014). FAOSTAT Agriculture data. <http://www.fao.org/faostat/en/#data>.
- Ferratto, J.; Rotondo, R.; Firpo, T.; Mondino, M. y Grasso, R. (2008). Pérdidas y daños poscosecha de tomates en distintas etapas del proceso, producidos a campo e invernadero. *XXXI Congreso Argentino de Horticultura 2008*. Publicado en Actas del Congreso en *Horticultura Argentina*, 27(64) - pp. 136.
- Finkers, R.; Heusden, A.W.; Dekens-Meijer, F.; Kan, J.A.; Maris, P. y Lindhout, P. (2007). The construction of a *Solanum habrochaites* LYC4 introgression line population and the identification of QTLs for resistance to *Botrytis cinerea*. *Theoretical and Applied Genetics*, 112, 1360–1373.
- Foolad, M. R. (2007). Genome mapping and molecular breeding of tomato. *International Journal of Plant Genomics*, 2007. Article ID 64358 (doi:10.1155/2007/64358).
- 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.

- Frary, A.; Nesbitt, T.C.; Grandillo, S.; Knaap, E.; Cong, B.; Liu, J.; Meller, J.; Elber, R.; Alpert, K.B. y Tanksley, S.D. (2000). fw2.2: a quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science*, 289, 85-88.
- Frary, A.; Doganlar, S.; Frampton, A.; Fulton, T.; Uhlig, J.; Yates, H. y Tanksley, S. (2003). Fine mapping of quantitative trait loci for improved fruit characteristics from *Lycopersicon chmielewskii* chromosome 1. *Genome*, 46, 235-243.
- Fray, R.G. y Grierson, D. (1993) Identification and genetic analysis of normal and mutant phytoene synthase genes of tomato by sequencing, complementation and co-suppression. *Plant molecular biology*, 22, 589-602.
- Fridman, E.; Pleban, T. y Zamir, D. (2000). A recombination hotspot delimits a wild-species quantitative trait locus for tomato sugar content to 484pb within an invertase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 97, 4718-4723.
- Fulton, T.M.; Chunwongse, J. y Tanksley, S.D. (1995). Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 13, 207-209.
- Fulton, T.M.; Beck-Bunn, T.; Emmatty, D.; Eshed, Y.; Lopez, J.; Petiard, V.; Uhlig, J.; Zamir, D. y Tanksley, S.D. (1997). QTL analysis of an advanced backcross of *Lycopersicon peruvianum* to the cultivated tomato and comparisons with QTL found in other wild species. *Theoretical and Applied Genetics*, 95, 881-894.
- Fulton, T.M.; Grandillo, S.; Beck-Bunn, T., Fridman, E.; Frampton, A.; Lopez, J.; Petiard, V.; Uhlig, J.; Zamir, D. y Tanksley, S.D. (2000). Advanced backcross QTL analysis of a *Lycopersicon esculentum* x *Lycopersicon parviflorum* cross. *Theoretical and Applied Genetics*, 100, 1025-1042.
- Fulton, T.M.; Bucheli, P.; Voirol, E.; López, J.; Pétiard, V. y Tanksley, S.D. (2002). Quantitative Trait Loci (QTL) affecting sugar organic acids and other biochemical properties possibly

- contributing to flavour identified in four advanced backcross population of tomato. *Euphytica*, 127, 163-177.
- Giovannoni, J.J. (2004). Genetic regulation of fruit development and ripening. *The Plant Cell*, 16, 170-180 (Supplement).
- Giovannoni, J.J. (2007). Fruit ripening mutants yield insights into ripening control. *Current Opinion in Plant Biology*, 10, 283-9.
- Goldman, I.L.; Paran, I. y Zamir, D. (1995). Quantitative trait locus analysis of a recombinant inbred line population derived from *Lycopersicon esculentum* × *Lycopersicon cheesmanii* cross. *Theoretical and Applied Genetics*, 90, 925-932.
- Grandillo, S. y Tanksley, S.D. (1996a). QTL analysis of horticultural traits differentiating the cultivated tomato from the closely related species *Lycopersicon pimpinellifolium*. *Theoretical and Applied Genetics*, 92, 935-951.
- Grandillo, S. y Tanksley, S.D. (1996b). Genetic analysis of RFLPs, GATA microsatellites and RAPDs in a cross between *L. esculentum* and *L. pimpinellifolium*. *Theoretical and Applied Genetics*, 92, 957-965.
- Grandillo S. y Tanksley S.D. (2005). Advanced backcross QTL analysis: Results and perspectives. En: R. Tuberosa, R.L. Phillips y M. Gale (eds.), *Proceeding of the International Congress "The wake of the double helix: From the green revolution to the gene revolution*. Bologna, Italia: Edizioni Avenue Media, (pp. 115-132).
- Grandillo, S.; Ku, H.M. y Tanksley, S.D. (1996) Characterization of *fs8.1*, a major QTL influencing fruit shape in tomato. *Molecular Breeding*, 2, 251-260.
- Grandillo, S.; Zamir, D. y Tanksley, S.D. (1999a). Genetic improvement of processing tomatoes: A 20 years perspective. *Euphytica*, 110, 85-97.

- Grandillo, S.; Ku, H.M. y Tanksley, S.D. (1999b). Identifying the loci responsible for natural variation in fruit size and shape in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 99, 978-987.
- Grandillo, S.; Chetelat, R.; van der Knaap, E.; Spooner, D.; Peralta, I.; Cammareri, M.; Perez, O.; Termolino, P.; Tripodi, P.; Chiusano, M.L.; Ercolano, M.R., Frusciante, L.; Monti, L. y Pignone, D. (2011). *Solanum* sect. *Lycopersicon*. En: C. Kole (ed.), *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources*, 5 Vegetables. Países Bajos: Springer, (pp 129-215).
- Grandillo, S.; Termolino, P. y van der Knaap, E. (2013). Molecular mapping of Complex Traits in Tomato. En: B.E. Leidl, J.A. Labate, J.R. Stommel, A. Slade y C. Kole (eds.), *Genetics, Genomic and Breeding of Tomato*. Estados Unidos: CRC Press, (pp 150-228).
- Grant, V. (1975). *Genetics of Flowering Plants*. Nueva York, EE.UU: Columbia University Press.
- Green, G.Y.; Pereira da Costa, J.H.; Cambiaso, V.; Pratta, G.R.; Zorzoli, R. y Rodríguez, G.R. (2016). Single and joint effect of the basal region of chromosome 2 and centromeric region of chromosome 8 on morphological and fruit quality traits in tomato. *Euphytica*, 210, 327-339.
- Grierson, D. y Kader, A.A. (1986). Fruit ripening and quality. En: J.G. Atherton y J. Rudich (eds.). *The tomato crop: A scientific basis for improvement*. Londres: Chapman and Hall, (pp 241-280).
- Gur, A. y Zamir, D. (2004). Unused natural variation can lift yield barriers in plant breeding. *PLOS Biology*, 2, 1610-1615.
- Hewitt, J.D. y Garvey, T.C. (1987). Wild sources of high soluble solids in tomato. En: D.J. Nevins y R.A. Jones (eds.). *Plant Biology. Vol. 4: Tomato Biotechnology*. Nueva York, EE.UU: AR Liss, (pp 45-54).

- Hobson, G.E. y Grierson, D. (1993). Tomato. En: G. Seymour, J. Taylor y G. Tucker (eds.). *Biochemistry of fruit ripening*. London, UK: Chapman and Hall, (pp 405-442).
- Huang, Z. y van der Knaap, E. (2011). Tomato fruit weight 11.3 maps close to *fasciated* on the bottom of chromosome 11. *Theoretical and Applied Genetics*, 123, 465-474.
- Hyman, J.H.; Gaus, J. y Foolad, M.R. (2004). A rapid and accurate method for estimating tomato lycopene content by measuring chromaticity values of fruit puree. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 129, 717-723.
- Ikeda, H.; Hiraga, M.; Shirasawa, K.; Nishiyama, M.; Kanahama, K. y Kanayama, Y. (2013). Analysis of a tomato introgression line, IL8-3, with increased Brix content. *Scientia Horticulturae*, 153, 103-108.
- INASE. Sitio oficial del Instituto Nacional de Semillas - República Argentina. <https://www.inase.gov.ar/>.
- INDEC. Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. Censo Nacional Agropecuario 2008. <http://www.indec.gob.ar/>.
- Isaacson, T.; Ronen, G.; Zamir, D. y Hirschberg, J. (2002) Cloning of tangerine from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of beta-carotene and xanthophylls in plants. *The Plant cell*, 14, 333-42.
- Jarret, R.L.; Sayama, H. y Tigchelaar, E.C. (1984). Pleiotropic effects associated with the chlorophyll intensifier mutations *high pigment* and *dark green* in tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 109, 873-787.
- Jenkins, J.A. (1948). The origin of the cultivated tomato. *Economic Botany*, 2, 379-392.
- Jones, R.A. y Scott, S.J. (1983). Improvement of tomato flavor by genetically increasing sugar and acid contents. *Euphytica*, 32, 845.

- Jones, R.A. y Scott, S.J. (1984). Genetic potential to improve tomato flavor in commercial F<sub>1</sub> hybrids. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 109, 318-321.
- Kader, A.A.; Chastagner, G.A.; Morris, L.L. y Ogawa, J.M. (1978). Effects of carbon monoxide on decay, physiological responses, ripening and composition of tomato fruits. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 103, 665-670.
- Kearsey, M.J. y Pooni, H.S. (1996). The genetical analysis of quantitative traits. Londres: Chapman and Hall.
- Kindale, P.M. y Foolad, M.R. (2013). Validation and fine mapping of *lyc12.1*, a QTL for increased tomato fruit lycopene content. *Theoretical and Applied Genetics*, 126, 2163-2175.
- Ku, H.M.; Doganlar, S.; Chen, K.Y. y Tanksley, S.D. (1999). The genetic basis of pear-shaped tomato fruit. *Theoretical and Applied Genetics*, 99, 844-850.
- Lewinsohn, E.; Sitrit, Y.; Bar, E.; Azulay, Y.; Meir, A.; Zamir, D. y Tadmor, Y. (2005). Carotenoid pigmentation affects the volatile composition of tomato and watermelon fruits, as revealed by comparative genetic analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3142-3143.
- Lin, T.; Zhu, G.; Zhang, J.; Xu, X.; Yu, Q.; Zheng, Z.; Zhang, Z.; Lun, Y.; Li, S.; Wang, X.; Huang, Z.; Li, J.; Zhang, C.; Wang, T.; Zhang, Y.; Wang, A.; Zhang, Y.; Lin, K.; Li, C.; Xiong, G.; Xue, Y.; Mazzucato, A.; Causse, M.; Fei, Z.; Giovannoni, J.J.; Chetelat, R.T.; Zamir, D.; Städler, T.; Li, J.; Ye, Z.; Du, Y. y Huang, S. (2014). Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding. *Nature Genetics*, 46, 1220-1226.
- Lippman, Z. y Tanksley, S.D. (2001). Dissecting the genetic pathway to extreme fruit size in tomato using a cross between the small-fruited wild species *Lycopersicon pimpinellifolium* and *L. esculentum* var. Giant Heirloom. *Genetics*, 158, 413-422.

- 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, 545–52.
- Liu, B.H. (1998). Statistical genomics: linkage, mapping, and QTL analysis. CRC Press., Boca Ratón.
- Liu, S.; Zhou, R. y Dong, Y. (2006). Development, utilization of introgression lines using synthetic wheat as donor. *Theoretical and Applied Genetics*, 114, 1071-1080.
- Livingstone, K.D.; Lackney, V.K.; Blauth, J.R.; van Wijk; R. y Jahn, M.K. (1999). Genome mapping in *Capsicum* and the evolution of genome structure in the *Solanaceae*. *Genetics*, 152, 1183-1202.
- Lynch, M. y Walsh, B. (1998). Genetics and analysis of quantitative traits. Sunderland, Massachusetts, EE.UU: Sinauer Associates, Inc.
- Mahone, G.S.; Frisch, M.; Miedaner, T.; Wilde, P.; Wortmann, H. y Falke, C.K. (2013). Identification of quantitative trait loci in rye introgression lines carrying multiple donor chromosome segments. *Theoretical and Applied Genetics*, 126, 49-58.
- Mariotti, J.A. y Collavino, N.G. (2014). *Los caracteres cuantitativos en la mejora genética de los cultivos* (1a ed.). Buenos Aires: Orientación Gráfica Editora.
- Meli, V.S.; Ghosh, S.; Prabha, T.N.; Chakraborty, N.; Chakraborty, S. y Datta, A. (2010). Enhancement of fruit shelf life by suppressing N-glycan processing enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 107, 2413-2418.
- Miller, J.C. y Tanksley, S.D. (1990). RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. *Theoretical and Applied Genetics*, 80, 437-448.

- Monforte, A.J. y Tanksley, S.D. (2000a). 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.
- Monforte, A.J. y Tanksley, S.D. (2000b). Fine mapping of a quantitative trait locus (*QTL*) from *Lycopersicon hirsutum* chromosome I affecting fruit characteristics and agronomic traits: breaking linkage among *QTLs* affecting different traits and dissection of heterosis for yield. *Theoretical and Applied Genetics*, *100*, 471-479.
- Monforte, A.J.; Asins, M.J y Carbonell, E.A. (1997). Salt tolerance in *Lycopersicon* species. V. Does genetic variability at quantitative trait loci affect their analysis? *Theoretical and Applied Genetics*, *95*, 284-293.
- Monforte, A.J.; Diaz, A.; Caño-Delgado, A. y van der Knaap, E. (2014). The genetic basis of fruit morphology in horticultural crops: lessons from tomato and melon. *Journal of Experimental Botany*, *65*, 4625-4637. doi:10.1093/jxb/eru017
- Mu, Q.; Huang, Z.; Chakrabarti, M.; Illa-Berenguer, E.; Liu, X.; Wang, Y.; Ramos, A. y van der Knaap, E. (2017). Fruit weight is controlled by *Cell Size Regulator* encoding a novel protein that is expressed in maturing tomato fruits. *PLOS Genetics*, *13*, e1006930. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006930>.
- Müller, C.H. (1940). A revision of the genus *Lycopersicon*. *United States Department of Agriculture Miscellaneous Publication*, *382*, 1-28.
- Muños, S.; Ranc, N.; Botton, E.; Bérard, A.; Rolland, S.; Duffé, P.; Carretero, Y.; Le Paslier, M.C.; Delalande, C.; Bouzayen, M.; Brunel, D. y Causse, M. (2011). Increase in tomato locule number is controlled by two single-nucleotide polymorphisms located near *WUSCHEL*. *Plant Physiology*, *156*, 2244-2254.

- Mutschler, M.A.; Wolfe, D.W.; Cobb, E.D. y Yourstone, K.S. (1992). Tomato Fruit quality and shelf life in hybrids heterozygous for the *alc* ripening mutants. *HortScience*, 27, 352-355.
- Nesbitt, T.C. y Tanksley S.D. (2002). Comparative sequencing in the genus *Lycopersicon*: implication for the evolution of fruit size in the domestication of the cultivated tomatoes. *Genetics*, 162, 365-79.
- Ofner, I.; Lashbrooke, J.; Pleban, T.; Aharoni, A. y Zamir, D. (2016). *Solanum pennellii* backcross inbred lines (BILs) link small genomic bins with tomato traits. *The Plant Journal*, 87, 151-160. doi: 10.1111/tpj.13194.
- Paterson, A.H.; Damon, S.; Hewitt, J.D.; Zamir, D.; Rabinowitch, H.D.; Lincoln, S.E.; Lander, E.S. y Tanksley, S.D. (1991). Mendelian Factors Underlying Quantitative Traits in Tomato: Comparison Across Species, Generations, and Environments. *Genetics*, 127, 181-197.
- Pea, G.; Aung, H.H.; Frascaroli, E.; Landi, P. y Pé, M.E. (2013). Extensive genomic characterization of set of near-isogenic lines for heterotic *QTL* in maize (*Zea mays* L.). *BMC Genomics*, 14, 61.
- Peralta, I.E. y Spooner, D.M. (2005). Morphological characterization and relationships of wild tomatoes (*Solanum* L. Section *Lycopersicon*). *Monographs in Systematic Botany*, 104, 227-257.
- 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, 424-34.
- Peralta, I.E. y Spooner D.M. (2007). History, origin and early cultivation of tomato (Solanaceae). En M.K. Razdan y A.K. Mattoo (eds.), *Genetic improvement of Solanaceous crops*, vol. 2 Tomato. Enfield, NH: Science Publishers, (pp. 1-27).

- Peralta, I.E.; Spooner, D.M. y Knaap, S. (2008). Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (*Solanum* sect. *Lycopersicoides*, sect. *Juglandifolia*, sect. *Lycopersicon*, Solanaceae). *Systematic Botany Monographs*, 84, 1-186.
- Pereira da Costa, J.H.; Martínez, V.A.; Rodríguez, G.R.; Pratta, G.R. y Zorzoli, R. (2009). Influencia de genes exóticos sobre la vida en estantería y el peso del fruto de tomate. *Agriscientia*, 26, 7-13.
- Pereira da Costa, J.H. (2012). Introgresión de regiones genómicas de la línea LA722 de *Solanum pimpinellifolium* en un genotipo “elite” de tomate para incrementar la calidad del fruto. Tesis para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Agrarias de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario. Pp 277.
- Pereira da Costa, J.H.; Rodríguez, G.R.; Pratta, G.R.; Picardi, L.A. y Zorzoli, R. (2013). QTL detection for fruit shelf life and quality traits across segregating populations of tomato. *Scientia Horticulturae*, 156, 47-53.
- Powell, W.; Machray, G.C. y Provan, J. (1996). Polymorphism revealed by simple sequence repeat. *Trends in Plant Science*, 1, 215-227.
- Pratta, G.R.; Zorzoli, R. y Picardi, L.A. (1996). Evaluación de caracteres de interés agronómico en especies del género *Lycopersicon*. *Horticultura Argentina* 15, 25-32.
- Pratta, G.R.; Zorzoli, R. y Picardi, L.A. (2000). Interacciones genéticas entre germoplasma silvestre y cultivado de *Lycopersicon* spp. con efectos sobre la calidad del fruto de tomate. *Plant Genetic Resources Newsletter*, 124, 7-12.
- Pratta G.R.; Zorzoli, R. y Picardi, L.A. (2003). Diallel analysis of production traits among domestic, exotic and mutant germplasms of *Lycopersicon*. *Genetics and Molecular Research*, 2, 206-213.

- Pratta, G.R.; Rodríguez, G.R.; Zorzoli, R.; Valle, E.M. y Picardi, L.A. (2011a). Molecular markers detect stable genomic regions underlying tomato fruit shelf life and weight. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 11, 157-164.
- Pratta, G.R.; Rodríguez, G.R.; Zorzoli, R.; Valle, E.M. y Picardi, L.A. (2011b). Phenotypic and molecular characterization of selected recombinant inbred lines derived from the cross *Solanum lycopersicum* x *S. pimpinellifolium*. *Journal of Genetics*, 90, 229-237.
- Raffo, A.; Nicoli, S.; Nardo, N.; Baiamonte, I.; D'Aloise, A. y Paoletti, F. (2012). Impact of different distribution scenarios and recommended storage conditions on flavor related quality attributes in ripening fresh tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 10445-55.
- Rieseberg, L.H.; Archer, M.A. y Wayne, R.K. (1999). Transgressive segregation, adaptation and speciation. *Heredity*, 83, 363-372.
- Rick, C.M. (1960). Hybridization between *Lycopersicon esculentum* and *Solanum pennillii*: phylogenetic and cytogenetic significance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 46, 78-82.
- Rick, C.M. (1973). Potential genetic resources in tomato species: clones from observations in native habitats. En “*Genes, Enzymes and Populations*”. Nueva York: A.M. Snb. Plenum, (pp 255-269).
- Rick, C.M. (1979). Biosystematic studies in *Lycopersicon* and closely related species of *Solanum*. En J.G. Hawkes, R.N. Lester y A.D. Skelding (eds.), *The biology and taxonomy of Solanaceae*. Nueva York, EE.UU: Academic Press, (pp. 667-678).
- Rick, C.M. (1982). Genetic relationships between self-incompatibility and floral traits in the tomato species. *Biologisches Zentralblatt*, 101, 185-98.

- Rick, C.M. (1986). Genetic resources in *Lycopersicon*. En D.J. Nevins y R.A. Jones (eds.), *Plant Biology*. Vol. 4: *Tomato Biotechnology*. Nueva York, EE.UU: AR Liss, (pp.17-26).
- Rodríguez, G.R.; Pratta, G.R.; Zorzoli, R. y Picardi, L.A. (2006). Recombinant lines obtained from an interspecific cross between *Lycopersicon* species selected by fruit weight and fruit shelf life. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 131, 651-656.
- Rodríguez, G.R.; Liberatti, D.R.; Pratta, G.R.; Zorzoli, R. y Picardi, L.A. (2010). Inheritance of shelf life and other quality traits of tomato fruit estimated from F<sub>1</sub>'s, F<sub>2</sub>'s and backcross generations derived from the standard cultivar, *nor* homozygote and wild cherry tomato. *Euphytica*, 176, 137-147.
- Rodríguez, G.R.; Muños, S.; Anderson, C.; Sim, S.C.; Michel, A.; Causse, M.; McSpadden Gardener, B.B.; Francis, D. y van der Knaap, E. (2011). Distribution of *SUN*, *OVATE*, *LC*, and *FAS* in the tomato germplasm and the relationship to fruit shape diversity. *Plant Physiology*, 156, 275-285.
- Sacks, E.J. y Francis, D.M. (2001). Genetic and environmental variation for tomato flesh color in a population of modern breeding lines. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 162, 221-226.
- Saladié, M.; Matas, A.J.; Isaacson, T.; Jenks, M.A.; Goodwin, S.M.; Niklas, K.J.; Xiaolin, R.; Labavitch, J.M.; Shackel, K.A.; Fernie, A.R.; Lytovchenko, A.; O'Neill, M.A.; Watkins, C.B. y Rose, J.K.C. (2007). A reevaluation of the key factors that influence tomato fruit softening and integrity. *Plant Physiology*, 144, 1012-1028.
- Saliba-Colombani, V.; Causse, M.; Langlois, D.; Philouze, J. y Buret, M. (2001). Genetic analysis of organoleptic quality in fresh market tomato. I. Mapping *QTLs* for physical and chemical traits. *Theoretical and Applied Genetics*, 102, 259-272.
- Sanders, R.A. y Hiatt W. (2005). Tomato transgene structure and silencing. *Nature Biotechnology*, 23, 287-289.

- Schauer, N.; Semel, Y.; Roessner, U.; Gur, A.; Balbo, I.; Carrari, F.; Pleban, T.; Perez-Melis, A.; Bruedigam, C.; Kopka, J.; Willmitzer, L.; Zamir, D. y Fernie, A.R. (2006). Comprehensive metabolic profiling and phenotyping of interspecific introgression lines for tomato improvement. *Nature Biotechnology*, 24, 447-454.
- Schmalenbach, I.; March, T.J.; Bringezu, T.; Waugh, R. y Pillen, K. (2011). High-resolution genotyping of wild barley introgression lines and fine-mapping of the threshability locus *thresh-1* using the Illumina GoldenGate assay. *G3*, 1, 187-196.
- Schuelter, A.R.; Finger, F.L.; Casali, V.W.D.; Brommonschenkel, S.H. y Otoni, W.C. (2002). Inheritance and genetic linkage analysis of a firm-ripening tomato mutant. *Plant Breeding*, 121, 338-342.
- Shapiro, S.S. y Wilk, M.B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, 52, 591-611.
- Sim, S.C.; Robbins, M.D.; Chilcott, C.; Zhu, T. y Francis, D.M. (2009). Oligonucleotide array discovery of polymorphisms in cultivated tomato (*Solanum lycopersicum* L.) reveals patterns of SNP variation associated with breeding. *BioMedCentral Genomics*, 10, 466-476.
- Simmonds, N.W. (1990). The social context of plant breeding. *Plant Breeding Abstract*, 60, 337-341.
- 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 of USA*, 103, 12981-12986.
- Snedecor, G. (1964). *Métodos Estadísticos - 5ta Edición*. México, D.F.: Compañía Editorial, (pp. 631).

- Spooner, D.M; Peralta, I.E. y Knapp, S. (2005). Comparison of AFLPs with other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes [*Solanum L.* section *Lycopersicon* (Mill.) Wettst.]. *Taxon* 54, 43-61.
- Stevens, M.A. (1976). Inheritance of viscosity potential in tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 101, 152-155.
- Stevens, M.A. (1986). Inheritance of tomato fruit quality components. *Plant Breeding Reviews*, 4, 273-311.
- Stevens, M.A. y Rick, C.M. (1986). Genetics and Breeding. En: J.G. Atherton y J. Rudich (eds.), *The Tomato Crop*. Londres: Chapman and Hall, (pp. 35-100).
- Stevens, M.A.; Kader, A.A. y Albright-Holton, M. (1977). Genotypic variation for flavor and composition in fresh market tomatoes. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 102, 680-689.
- Stevens, R.; Buret, M.; Duffé, P.; Garchery, C.; Baldet, P.; Rothan, C. y Causse, M. (2007). Candidate genes and quantitative trait loci affecting fruit ascorbic acid content in three tomato populations. *Plant Physiology*, 143, 1943-1953.
- Tanksley, S.D. (1993). Mapping polygenes. *Annual Review of Genetics*, 27, 205-233.
- Tanksley, S. D. (2004). The genetic, developmental, and molecular bases of fruit size and shape variation in tomato. *Plant Cell* (Suppl), 16, S181-S189.
- Tanksley, S.D. y McCouch, S.R. (1997). Seed banks molecular maps: unlocking genetic from the wild. *Science*, 277, 1063-1066.
- Tanksley, S.D. y Nelson, J.C. (1996). Advanced backcross QTL analysis a method for the simultaneous discovery and transfer of valuable QTLs from unadapted germoplasm into elite breeding lines. *Theoretical and Applied Genetics*, 92, 191-203.

- Tanksley, S.D.; Young, N.D.; Paterson, A.H. y Bonierbale, M.W. (1989). RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. *Biotechnology*, 7, 257-264.
- Tanksley, S.D.; Grandillo, S.; Fulton, T.M.; Zamir, D.; Eshed, Y.; Petiard, V.; Lopez, J.; 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, 213-224.
- The Tomato Genome Consortium (2012). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, 485, 635-41.
- Tieman, D.; Zhu, G.; Resende Jr., M.F.R.; Lin, T.; Nguyen, C.; Bies, D.; Rambla, J.L.; Beltran, K.S.O.; Taylor, M.; Zhang, B.; Ikeda, H.; Liu, Z.; Fisher, J.; Zemach, I.; Monforte, A.; Zamir, D.; Granell, A.; Kirst, M.; Huang, S. y Klee1, H. (2017). A chemical genetic roadmap to improved tomato flavor. *Science*, 355, 391-394.
- Uluşık, S.; Chapman, N.H.; Smith, R.; Poole, M.; Adams, G.; Gillis, R.B.; Besong, T.M.; Sheldon, J.; Stieglmeier, S.; Perez, L.; Samsulrizal, N.; Wang, D.; Fisk, I.D.; Yang, N.; Baxter, C.; Rickett, D.; Fray, R.; Blanco-Ulate, B.; Powell, A.L.; Harding, S.E.; Craigon, J.; Rose, J.K.; Fich, E.A.; Sun, L.; Domozych, D.S.; Fraser, P.D.; Tucker, G.A.; Grierson, D. y Seymour, G.B. (2016). Genetic improvement of tomato by targeted control of fruit softening. *Nature Biotechnology*, 34, 950-952.
- Van der Knaap, E. y Tanksley, S.D. (2001). Identification and characterization of a novel locus controlling early fruit development in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 103, 353-358.
- Van der Knaap, E.; Chakrabarti, M.; Chu, Y.H.; Clevenger, J.P.; Illa-Berenguer, E.; Huang, Z.; Keyhaninejad, N.; Mu, Q.; Sun, L.; Wang, Y. y Wu, S. (2014). What lies beyond the eye: the molecular mechanisms regulating tomato fruit weight and shape. *Frontiers in Plant Science*, 5, 1-13.

- Vancetovic, J. (2008). An impact of environment on segregation ratio of qualitative traits in maize. *Genetika*, 40, 145-156.
- Vega, U. y Frey, K. J. (1980). Transgressive segregation in inter and intraespecific crosses of barley. *Euphytica*, 29, 585-594.
- von Korff, M.; Wang, H.; León, J. y Pillen, K. (2004). Development of candidate introgression lines using an exotic barley accession (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*) as donor. *Theoretical and Applied Genetics*, 109, 1736-1745.
- Vrebalov, J.; Ruezinsky, D.; Padmanabhan, V.; White, R.; Medrano, D.; Drake, R.; Schuch, W. y Giovannoni, J. (2002). A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato ripening-inhibitor (*rin*) locus. *Science*, 296, 343-346.
- Wang, B. y Chee, P. W. (2010). Application of advanced backcross quantitative trait locus (QTL) analysis in crop improvement. *Journal of Plant Breeding and Crop Science*, 2, 221-232.
- Wang, Y.J.; Wu, X.; Yu, D.; Zhang, Y.; Chen, S. y Gai, J. (2004). Method of evaluation and adjustment of recombinant inbred line population and its application to the soybean *RIL* population NJRIKY. *Acta Agronomica Sinica*, 30, 413-418.
- Warnock, S.J. (1988). A review of taxonomy and phylogeny of the genus *Lycopersicon*. *HortScience*, 23, 669-673.
- Weller, J.I.; Soller, M. y Brady, T. (1988). Linkage analysis of quantitative traits in an interspecific cross of tomato (*Lycopersicon esculentum* x *Lycopersicon pimpinellifolium*) by means of genetic markers. *Genetics*, 118, 329-339.
- Wolters, C.J. y Van Gembert, L.J. (1990). Towards an integrated model of sensory attributes, instrumental data and consumer perception of tomatoes. Part I. Relation between consumer perception and sensory attributes. *Acta Horticulturae*, 259, 91-106.

- Xu, Y.; Zhu, L.; Xiao, J.; Huang, N. y McCouch, S.R. (1997). Chromosomal regions associated with segregation distortion of molecular markers in F<sub>2</sub>, backcross, doubled haploid, and recombinant inbred populations in rice (*Oryza sativa* L.). *Molecular Genetics and Genomics*, 253, 535-545.
- Xu, J.; Zhao, Q.; Du, P.; Xu, C.; Wang, B.; Feng, Q.; Liu, Q.; Tang, S.; Gu, M.; Han, B. y Liang, G. (2010). Developing high throughput genotyped chromosome segment substitution lines based on population whole-genome re-sequencing in rice (*Oryza sativa* L.). *Genomics*, 11, 2-14.
- Zamir, D. (2001). Improving plant breeding with exotic genetic libraries. *Nature Reviews Genetics*, 2, 983-989.
- Zorzoli, R.; Pratta, G.R. y Picardi, L.A. (1998). Efecto de los mutantes *nor* y *rin* y de genes silvestres sobre características del fruto en *Lycopersicon*. *Mendeliana*, 13, 12-19.
- Zorzoli, R.; Pratta, G.R. y Picardi, L.A. (2000). Variabilidad genética para la vida poscosecha y el peso de los frutos en tomate para familias F<sub>3</sub> de un híbrido interespecífico. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 35, 2423-2427.

## ANEXO

Fotos de plantas representativas de cada una de las 20 pre-NILs evaluadas.

### **pre-NIL095**



### **pre-NIL220060**



### **pre-NIL295**



**pre-NIL598**



**pre-NIL320**



**pre-NIL115**



**pre-NIL162**



**pre-NIL211044**



**pre-NIL286**



**pre-NIL276**



**pre-NIL045**



**pre-NIL327**



**pre-NIL063**



**pre-NIL069**



**pre-NIL034**



**pre-NIL596**



**pre-NIL318**



**pre-NIL080**



**pre-NILG036**



**pre-NIL1061**

