



**UNR** Universidad  
Nacional de Rosario

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**

**APROXIMACIÓN ÓMICA DE LAS BASES GENÉTICAS  
PARA LA CALIDAD DIFERENCIAL DEL FRUTO EN  
LÍNEAS CASI ISOGÉNICAS DE TOMATE**

Lic. en Biotecnología Melisa Di Giacomo

**TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS  
AGRARIAS**

Director: Lic. (Dr.) Javier Pereira da Costa

Codirector: Ing. Agr. (MSc., Dr.) Gustavo R. Rodríguez

**2023**

# **APROXIMACIÓN ÓMICA DE LAS BASES GENÉTICAS PARA LA CALIDAD DIFERENCIAL DEL FRUTO EN LÍNEAS CASI ISOGÉNICAS DE TOMATE**

**Melisa Di Giacomo**

**Licenciada en Biotecnología – Universidad Nacional de Rosario**

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 2017 y 2022, bajo la dirección del Dr. Javier H. Pereira da Costa y del Dr. Gustavo R. Rodríguez.



Lic. Biotec. Melisa Di Giacomo



Lic. Biotec. (Dr.) Javier H. Pereira da Costa



Ing. Agr. (Dr.) Gustavo R. Rodríguez

Defendida el 08 de septiembre de 2023

## **AGRADECIMIENTOS**

A lo largo del desarrollo de esta tesis he contado con muchas personas que han hecho que esta etapa sea enriquecedora y gratificante. En primer lugar quiero agradecer a mis directores, el Dr. Javier Pereira da Costa y el Dr. Gustavo Rodríguez, por sus enseñanzas, su motivación y por transmitirme todo lo lindo de esta profesión. Desde el primer día abrieron las puertas de este hermoso grupo y me hicieron sentir parte de inmediato. Me brindaron la compañía y el apoyo que necesité, así como también la independencia y libertad para crecer y desarrollarme en el ámbito científico. Quiero que sepan que son grandes profesionales pero por sobre todo, excelentes personas.

Al grupo de Mini Tomate, Agus, Dana, Fede, Fran, Heli, Maga, Pao, Roxi, Valen, Vicky y Vladi. También al resto de los chicos a quienes crucé en la Sala de Becarios, en particular a Anapauli, Luci, Mara, Rochi y Shir. Les agradezco el día a día con charlas y risas, las frustraciones compartidas y el empuje. ¡Llegar hasta acá no hubiera sido lo mismo sin ustedes!

A todos los integrantes de la Cátedra de Genética y a los ayudantes quienes de diferentes formas colaboraron en mi trabajo de tesis. A todas las personas que crucé en la Sección de Horticultura, en especial a David y Rolo, les agradezco la colaboración para llevar adelante los ensayos. Quiero agradecer también a Tatiana, por compartirme sus conocimientos en el laboratorio y por estar siempre disponible para responder mis dudas.

A mi familia y amigos, quienes me apoyan en cada decisión y me alientan a conseguir todas mis metas. Siempre estuvieron presentes y son un gran pilar en mi vida.

Por último, agradezco también a la Universidad Pública, a la Facultad de Ciencias Agrarias UNR y a CONICET por haberme dado la oportunidad de formarme y llegar a ser la persona que hoy escribe estas líneas pensando en todo el camino recorrido para alcanzar este ansiado título.

## PUBLICACIONES Y CONGRESOS

Los resultados que se describen en la presente Tesis han formado parte de las siguientes publicaciones en revistas y reuniones científicas:

### Revistas científicas

- **Di Giacomo M**, Vega TA, Cambiaso V, Picardi LA, Rodríguez GR, Pereira da Costa JH (2023) An integrative omics approach to identify putative genes underlying fruit ripening of tomato near isogenic lines with long shelf life. *Plants* 12(15), 2812. <https://doi.org/10.3390/plants12152812>
- **Di Giacomo M**, Luciani MD, Cambiaso V, Zorzoli R, Rodríguez GR, Pereira da Costa JH (2020) Tomato near isogenic lines to unravel the genetic diversity of *S. pimpinellifolium* LA0722 for fruit quality and shelf life breeding. *Euphytica* 216:126. <https://doi.org/10.1007/s10681-020-02649-z>

### Revistas de divulgación científica

- **Di Giacomo M**, Luciani MD, Cambiaso V, Rodríguez GR, Pereira da Costa JH (2020) Programas de mejoramiento locales: desarrollo de líneas de tomate con genes silvestres que mejoran la calidad y la vida poscosecha de los frutos. *Agromensajes* 58:18-21.

### Reuniones científicas

- **Di Giacomo M**, Cambiaso V, Rodríguez GR, Pereira da Costa JH (2021) Análisis de haplotipos para introgresiones de *Solanum pimpinellifolium* LA0722 que confieren larga vida poscosecha al tomate cultivado. XVIII Congreso Latinoamericano de Genética (ALAG), Chile. [DOI: 10.35407/bag.2021.32.01.suppl](https://doi.org/10.35407/bag.2021.32.01.suppl).
- **Di Giacomo M**, Cambiaso V, Rodríguez GR, Pereira da Costa JH (2020) Análisis fenotípico y molecular de líneas casi isogénicas de tomate que difieren en regiones cromosómicas aportadas por *Solanum pimpinellifolium*. XLVIII Congreso Argentino de Genética (SAG), modalidad virtual. [DOI: 10.35407/bag.2020.31.01.suppl](https://doi.org/10.35407/bag.2020.31.01.suppl).

- **Di Giacomo M**, Luciani MD, Rodríguez GR, Pereira da Costa JH (2019). Incremento de la variabilidad genética para la calidad de fruto de tomate en líneas casi isogénicas con introgresiones silvestres. XVII Congreso Latinoamericano de Genética (ALAG), Mendoza, Argentina. [DOI: 10.35407/baq.2019.XXX.01.supp](https://doi.org/10.35407/baq.2019.XXX.01.supp)
- **Di Giacomo M**, Rodríguez GR, Pereira da Costa JH (2018) Differential gene expression at different fruit ripening stages in two tomato near isogenic lines differing in fruit shelf life. XXII International Congress of Genetics (ICG), Foz de Iguazú, Brasil. [www.sbg.org.br](http://www.sbg.org.br) – ISBN 978-85-89109-06-2
- **Di Giacomo M**, Zorzoli R, Rodríguez GR, Pereira da Costa JH (2017) Efecto de introgresiones de *Solanum pimpinellifolium* L. en variedades esencialmente derivadas de tomate. XIX Congreso y XXXVII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario (SBR), Zavalla, Argentina. [www.sbr.org.ar](http://www.sbr.org.ar) - ISSN 2314-1484

# ÍNDICE

ABREVIATURAS .....	3
RESUMEN .....	4
ABSTRACT .....	6
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	7
HIPÓTESIS .....	17
OBJETIVOS GENERALES .....	17
Capítulo I. Efecto de introgresiones silvestres provenientes de LA0722 de <i>S. pimpinellifolium</i> sobre caracteres de calidad de fruto en líneas casi isogénicas de tomate .....	18
Antecedentes .....	19
Objetivos específicos .....	22
Materiales y métodos.....	23
Resultados.....	27
Discusión .....	40
Conclusiones parciales.....	46
Capítulo II. Detección de introgresiones silvestres adicionales y su efecto en la vida poscosecha de los frutos .....	47
Antecedentes .....	48
Objetivos específicos .....	51
Materiales y métodos.....	52
Resultados.....	55
Discusión .....	64
Conclusiones parciales.....	66
Capítulo III. Estudios ómicos en líneas casi isogénicas de tomate que discrepan para calidad de fruto con el fin de identificar genes involucrados en la maduración.....	67
Antecedentes .....	68
Objetivos específicos .....	70
Materiales y métodos.....	71
Resultados.....	78
Discusión .....	91

Conclusiones parciales.....	98
CONCLUSIONES FINALES .....	99
CONSIDERACIONES FINALES Y PERSPECTIVAS.....	100
BIBLIOGRAFÍA.....	102
ANEXO.....	112

## ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc - AFLP: *AFLP* basado en perfiles de transcripción

AFLP: *Amplified Fragment Length Polymorphism* o polimorfismo en la longitud de fragmentos

ANOVA: análisis de la variancia

ARN: ácido ribonucleico

Cr: cromosoma

DEP: *Differential Expressed Protein* o proteína diferencialmente expresada

dNTPs: desoxirribonucleótidos (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)

InDel: inserciones/deleciones

Mpb: mega pares de bases o un millón de pares de bases

NIL: *Near Isogenic Lines* o líneas casi isogénicas

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

QTL: *Quantitative Trait Loci* o *loci* de caracteres cuantitativos

RM: rojo maduro

TDF: *Transcript Derived Fragment* o fragmento derivado de transcritos

VM: verde maduro

## RESUMEN

La calidad de fruto mejorada y la reducción de las pérdidas poscosecha son dos desafíos importantes para el mejoramiento del tomate destinado al consumo en fresco. Frente a la reducida calidad y variabilidad genética en el germoplasma cultivado, las especies silvestres de tomate se vuelven importantes recursos para el mejoramiento. En este trabajo de tesis se planteó como hipótesis que la introgresión de genes de la especie silvestre *S. pimpinellifolium* tiene el potencial de mejorar la calidad de fruto en el tomate cultivado. Con este fin se estudió una colección de 22 líneas casi isogénicas desarrollada a partir de introgresiones de la accesión silvestre LA0722 de *S. pimpinellifolium* en el fondo genético cultivado proveniente de Caimanta de *S. lycopersicum*. Las líneas casi isogénicas de la colección mostraron una larga vida poscosecha, con valores entre 11 y 26 días, donde la mitad de ellas fue significativamente mayor que Caimanta ( $9,7 \pm 0,9$  días) y, a su vez, un menor ablandamiento del fruto. Por otro lado, se observó la recuperación del tamaño del fruto cultivado (con pesos entre 57 y 87 g) y la carnosidad (con espesores de pericarpio entre 0,36 y 0,65 cm), cualidades que contribuyen positivamente a las preferencias del consumidor y serían el resultado del proceso de retrocruza hacia Caimanta. A pesar de alto porcentaje del genoma cultivado recuperado en la colección de líneas casi isogénicas (86,5 - 97,1 %), se demostró que las líneas casi isogénicas conservan introgresiones silvestres adicionales a las detectadas durante su obtención, con un promedio de 3 a 13 introgresiones según la línea. El análisis reveló que introgresiones adicionales localizadas en los cromosomas 4, 5 y 11 prolongaron la vida poscosecha en comparación con el progenitor cultivado. Particularmente, se detectó una región de 7,17 Mpb en la parte superior del cromosoma 4 que incrementó la vida poscosecha en un 70 %. Estas características mejoradas hacen que las 22 líneas casi isogénicas constituyan potenciales cultivares comerciales con una mayor vida poscosecha y calidad de fruto mejorada. Otra manera de reducir las pérdidas

poscosecha y mejorar la calidad es a partir de un retardo de la maduración del fruto. En esta tesis se abordó un estudio integrador sobre la maduración del tomate en dos líneas casi isogénicas. Se realizó un análisis exhaustivo que incluyó enfoques genómicos, transcriptómicos y proteómicos. Los resultados mostraron un total de 10 genes involucrados en la maduración que intervienen en el metabolismo, en el estrés biótico y abiótico, en las vías del etileno y en la remodelación de la pared celular. Del análisis se destacaron dos genes novedosos que retrasan la maduración en tomate: un factor de respuesta a etileno del cromosoma 5 (AP2/ERF) que está involucrado en la remodelación de la pared celular y que podría ser activado por una quinasa (MAPK), y otro factor de respuesta a etileno del cromosoma 3 (E4) heredado del progenitor silvestre *S. pimpinellifolium*. Como conclusión, el desarrollo de esta tesis permitió demostrar que las introgresiones provenientes de la especie silvestres *S. pimpinellifolium* portan genes que otorgan una calidad de fruto mejorada y una maduración diferencial en las líneas casi isogénicas de tomate.

**Palabras claves:** *S. pimpinellifolium*, *S. lycopersicum*, maduración de fruto, transcriptómica, proteómica, expresión diferencial

## ABSTRACT

### **Omics approach of the genetic bases for the differential fruit quality in tomato near isogenic lines**

Improved fruit quality and reduction of postharvest losses are two important challenges for tomato breeding. As cultivated germplasm presents reduced genetic variability, tomato wild species become important resources to solve them. Therefore, a collection of 22 near isogenic lines that have introgressions from the wild accession LA0722 of *S. pimpinellifolium* in the cultivated background of Caimanta of *S. lycopersicum* was studied. Half of the lines showed a longer shelf life, as well as a reduced fruit softening, compared to their cultivated parent. On the other hand, we observed the recovery of the size of the cultivated fruit and a greater fleshiness. It was shown that these lines contain additional wild introgressions to those detected during their development, and some of them located on chromosomes 4, 5 and 11, increased shelf life. These characteristics mean that the 22 near isogenic lines constitute commercial cultivars with longer shelf life and improved fruit quality. Another way to reduce postharvest losses and improve quality is delaying fruit ripening. In this thesis, a comprehensive analysis including genomic, transcriptomic and proteomic approaches on tomato ripening in two near isogenic lines was addressed. The results showed a total of 10 ripening genes involved in processes such as metabolism, biotic and abiotic stress, ethylene pathways, and cell wall remodeling. Two novel genes that delay tomato ripening stood out from the analysis: an ethylene response factor on chromosome 5 (AP2/ERF), which is involved in cell wall remodeling and could be activated by a kinase (MAPK), and another ethylene response factor on chromosome 3 (E4) inherited from the wild parent *S. pimpinellifolium*. In conclusion, this thesis demonstrated that the introgressions from the wild species *S. pimpinellifolium* carry genes that provide improved fruit quality and differential fruit ripening in the tomato near isogenic lines.

# INTRODUCCIÓN GENERAL

## ***Cultivo de tomate***

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, la berenjena, la petunia, el tabaco, el pimiento, entre otras (Rick 1978). Por su parte, el tomate es una de las hortalizas más importantes en el mundo y en la Argentina, por su nivel de consumo, el valor económico de la producción y la superficie dedicada a su cultivo. Se encuentra ampliamente distribuido en el mundo, y si bien es una planta tropical, se cultiva desde regiones tropicales hasta zonas frías gracias al uso de invernaderos.

El tomate es una especie dicotiledónea, herbácea y perenne cultivada como anual (Nuez 1999). En cuanto a su descripción botánica (López Marín 2017), sus plantas presentan un porte erecto o rastrero con un crecimiento determinado o indeterminado. Presenta un sistema radicular con una raíz principal y abundantes raíces secundarias y adventicias. Tiene un hábito de crecimiento simpodial, con un tallo principal a partir del cual se desarrollan las hojas, los tallos secundarios en la axila de las hojas y las inflorescencias. Las hojas son pinnadas compuestas y están formadas por siete a nueve folíolos primarios lobulados. Tanto en las hojas como en los tallos jóvenes hay abundante pubescencia. Estos pequeños pelos glandulares que aparecen en tallos, hojas y pedúnculos producen su olor característico. Las inflorescencias son de tipo racimo y pueden ser simples o ramificadas, con un número variable de entre cinco y 15 flores, aunque algunos cultivares de frutos pequeños pueden producir 30 o más flores. Las inflorescencias brotan opuestas y entre las hojas. Las flores son hermafroditas y cuentan con cuatro verticilos. El cáliz de la flor es verde y persistente compuesto por sépalos pubescentes. La corola es amarilla con sus pétalos distribuidos en forma de estrella. Los estambres poseen anteras amarillas que están unidas para formar un tubo que rodea al pistilo. El estilo y estigma

normalmente quedan dentro del cono estaminal, favoreciendo de esta manera la autofecundación que generalmente coincide con el momento de anthesis. Tras la fecundación se produce el desarrollo del ovario que se convertirá en un fruto tipo baya carnosa bi o plurilocular. El fruto está constituido principalmente por el pericarpio, el tejido placentario y las semillas.

### ***Origen y domesticación***

El tomate es un cultivo originario de la región Andina de América del Sur, que abarca desde el sur de Ecuador hasta el norte de Chile, incluidas las islas Galápagos hasta la parte oriental de los Andes. En base a estudios morfológicos y moleculares, la hipótesis más aceptada propone que el proceso de domesticación se produjo por las culturas precolombinas en dos etapas y con dos centros independientes (Lin et al. 2014; Blanca et al. 2015). La primera etapa de domesticación habría ocurrido en manos de los primeros agricultores en Ecuador o el norte de Perú, con la selección de frutos de tamaño moderado (tipo *cherry*), la fijación de la autogamia o la producción de semillas por autofecundación. En la segunda etapa, probablemente ocurrida en Mesoamérica, en la región de la península de Yucatán en México, se produjo una selección adicional de frutos de mayor tamaño completando el proceso de domesticación del tomate (Razifard et al. 2020; Blanca et al. 2022). Después de la llegada de los conquistadores españoles a América, el tomate fue llevado a Europa desde donde se dispersó al resto del mundo.

### ***Especies silvestres de tomate***

Las etapas en la domesticación y migración del cultivo constituyeron dos cuellos de botella genético o deriva genética, causando grandes pérdidas de variabilidad genética como consecuencia de una selección principalmente orientada a la mejora del fruto. Frente a la reducida variabilidad genética en el germoplasma cultivado, las especies silvestres de tomate se vuelven importantes recursos para enriquecer las bases del cultivo con alternativas génicas que

mejoren la calidad, la adaptación y la productividad. El análisis genómico de los 725 genotipos de tomate cultivados y silvestres ha revelado una pérdida sustancial de genes en las variedades modernas durante la domesticación, lo que contribuyó a estrechar su base genética en comparación con las especies silvestres emparentadas (Gao et al. 2019; Zhou et al. 2022). Dado que los genotipos silvestres son recursos genéticos valiosos, cruzarlos con especies cultivadas de tomate permite ampliar la diversidad genética. Los cruzamientos interespecíficos entre una especie cultivada y una silvestre pueden revelar alelos de interés que otorguen características buscadas en los programas de mejoramiento.

Se conocen 13 especies de tomate pertenecientes al género *Solanum* sección *Lycopersicon*, 12 de las cuales son silvestres: *S. arcanum*, *S. cheesmaniae*, *S. chilense*, *S. chmielewskii*, *S. corneliomulleri*, *S. galapagense*, *S. habrochaites*, *S. huaylasense*, *S. neorickii*, *S. pennellii*, *S. peruvianum* y *S. pimpinellifolium* (Peralta et al. 2008). Estas crecen en una gran variedad de hábitats y están adaptadas a microclimas particulares y diversos tipos de suelos. Es probable que los diferentes hábitats ecológicos y climas contribuyeran a la gran diversidad encontrada en las especies silvestres. Esta diversidad se expresa tanto en características morfológicas, como fisiológicas y sexuales, y las convierte en recursos genéticos muy valiosos (Peralta et al. 2005). 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.

### ***Importancia del cultivo***

En 2020, la producción de tomate alcanzó más de 250 millones de toneladas a nivel mundial (FAOSTAT 2020). En la actualidad, el tomate representa la segunda hortaliza de mayor importancia económica en nuestro país después de la papa. Su producción se desarrolla en aproximadamente 17.000 hectáreas (alrededor de un 60 % se destina a mercado para consumo

en fresco y un 40 % para industria) de las cuales se obtienen cerca de un millón de toneladas (**Figura 1**, fuente SENASA). Su cultivo se desarrolla principalmente en las provincias de Mendoza y San Juan (Cuyo), Salta y Jujuy (NOA), Corrientes y Formosa (NEA), Río Negro y Buenos Aires. En Santa Fe, un censo de 595 productores hortícolas en 2021 determinó que la superficie dedicada a horticultura es de 7.221,28 hectáreas (Argentina.gov.ar 2022). Además de los Cinturones Hortícolas de Santa Fe y Reconquista, al sur de la provincia se ubica el Cinturón Hortícola de Rosario que tiene una larga tradición productiva, con buenas condiciones agroecológicas y cercanía a un mercado de dos millones de consumidores. Se extiende desde Granadero Baigorria al límite sur de la provincia, y desde el río Paraná hasta Soldini. Se destaca no sólo por el volumen de comercialización, sino también por el área sembrada, que ocupa 2.900 hectáreas.

# TOMATE

## PRODUCCIÓN ARGENTINA

2° hortaliza más cultivada

17 mil ha cultivadas

1 millón tn anuales



### Provincias productoras



Principalmente en provincias Mendoza y San Juan (Cuyo), Salta y Jujuy (NOA), Corrientes y Formosa (NEA), Río Negro y Buenos Aires.

**Santa Fé**  
Cinturones Hortícolas de Rosario, Reconquista y Santa Fé



**Figura 1.** Importancia del cultivo de tomate en Argentina.

### **Calidad de fruto y vida poscosecha**

En nuestro país, el principal destino de la producción de tomate es para consumo en fresco donde la calidad de los frutos juega un rol trascendental. Los programas de mejoramiento modernos de tomate se han focalizado principalmente en el rendimiento y las resistencias a estrés biótico y abiótico mientras que la calidad de fruto ha quedado desatendida. Como consecuencia, el sabor en los tomates que encontramos en el mercado se ha visto afectado y esto constituye la principal demanda por parte de los consumidores (Klee y Tieman 2018).

Otra característica de calidad de fundamental importancia para la comercialización del fruto en fresco es la prolongación de la vida poscosecha (VP). El fruto de tomate es altamente perecedero y cualquier intento de prolongar su VP favorece la comercialización y disminuye las pérdidas. Las pérdidas poscosecha de frutas y hortalizas en los países en desarrollo representan casi el 50 % de la producción (Meli et al. 2010). A esta problemática se suman el transporte, la logística y la comercialización de los frutos. Es por ello que los tomates larga vida son altamente apreciados en la producción y comercialización de tomate para consumo en fresco, y así la VP se considera una característica de gran importancia en los programas de mejoramiento genético de esta especie. Hasta el momento, el mejoramiento genético para prolongar la VP se ha hecho a través de la incorporación de genes presentes en el germoplasma del tomate cultivado tales como *ripening-inhibitor (rin)*, *non-ripening (nor)* y *Colorless non-ripening (Cnr)* (Vrebalov et al. 2002; Manning et al. 2006; Wang et al. 2019). 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, estos genes producen acciones negativas sobre la calidad de fruto debido a los efectos pleiotrópicos que tienen sobre otras vías metabólicas involucradas en brindar al fruto un adecuado sabor, aroma y/o textura.

Otra forma de incrementar la VP y 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. El tomate de maduración tardía denominado tomate Flavr-savr®, con una expresión reducida de una poligalacturonasa, una proteína de la pared celular, fue obtenido por una construcción antisentido y representó la primera planta transgénica liberada al mercado en el mundo, aunque sólo comercializada en USA e Israel (Kramer y Redenbaugh 1994). Esta transformación mejoró significativamente la VP de los frutos y el almacenamiento. Sin embargo, fue un fracaso comercial debido a la resistencia por parte de los consumidores frente a los organismos transgénicos. Hubo otros intentos de aumentar la VP centrados en retrasar la maduración de fruto a partir de la modificación de proteínas involucradas en la remodelación de la pared celular en tomates transgénicos (Brummell y Harpster 2001; Meli et al. 2010; Uluisik et al. 2016; Yang et al. 2017); incluso se desarrollaron líneas de tomate con larga VP reemplazando el gen *alcobaca* (*alc*) a partir de edición génica con CRISPR/Cas9 (Yu et al. 2017). Aunque estas estrategias han obtenido buenos resultados, carecen de aceptación por parte del consumidor y tienen que lidiar con las legislaciones de diferentes países (Ishii y Araki 2016; Schmidt et al. 2020).

### ***Especies silvestres en programas de mejoramiento en tomate***

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. En un segundo lugar, se han considerado características como la resistencia a enfermedades, amplia adaptabilidad, precocidad en la maduración o tolerancia a estrés abiótico, postergándose aspectos importantes que le dan calidad al fruto. Se 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).

En todo programa de mejoramiento la diversidad genética es esencial. Por lo tanto, desarrollar nuevas estrategias capaces de aumentar la base genética para la calidad y VP del tomate cultivado es uno de los principales fines. Gur y Zamir (2004) sostienen que la biodiversidad presente en el tomate silvestre representa una fuente sub-explotada que puede enriquecer las bases genéticas del cultivo con alternativas génicas que mejoren la calidad de fruto. En este sentido, los primeros trabajos de Rick (1960) han hecho uso de la diversidad presente en el tomate silvestre a partir de los cruzamientos entre especies silvestres y cultivadas. Rick demostró que los cruzamientos entre ellas generaban nueva diversidad fenotípica y que la variación transgresiva positiva podía encontrarse dentro de la progenie interespecífica.

Las especies silvestres de tomate muestran un fenotipo agronómicamente inferior a la especie cultivada. Sin embargo, en los últimos años se ha fomentado su uso como fuente de nuevos polimorfismos y genes. El germoplasma silvestre se utilizó principalmente en tomate como fuente de genes de resistencia para enfermedades y plagas. Desde entonces, los mejoradores han descubierto nuevos alelos en diferentes especies silvestres para mejorar la tolerancia al frío, la sequía y la salinidad, el rendimiento y el contenido de carotenoides (Hobson y Grierson 1993; Eshed y Zamir 1995; Fridman et al. 2004; Semel et al. 2006; Ikeda et al. 2013; Soyk et al. 2017). No obstante, las especies silvestres de tomate no han sido suficientemente estudiadas en su aporte para mejorar características de la calidad del fruto.

Una especie silvestre de interés es *S. pimpinellifolium* que se caracteriza por su pequeño tamaño y frutos rojos de alta calidad (Peralta et al. 2008). Esta especie tiene un gran potencial para mejorar la calidad y la VP de los frutos. Estudios previos del grupo de Genética y Mejoramiento de Tomate (GMT) de la Cátedra de Genética de la Facultad de Ciencias Agrarias (FCA – UNR) han demostrado que la accesión LA0722 de *S. pimpinellifolium* porta genes para larga VP ya que líneas derivadas del cruzamiento con el tomate cultivado presentaron frutos con

mayor VP y mejor calidad en comparación con los testigos (Zorzoli et al. 1998; Pratta et al. 2003; Rodríguez et al. 2006; Cambiaso et al. 2019a). En este contexto, en el Programa se han desarrollado diferentes poblaciones a partir del cruzamiento interespecífico entre el cultivar argentino Caimanta de *S. lycopersicum* (CAI) y la accesión LA0722 de *S. pimpinellifolium* (LA0722), entre ellas, poblaciones F<sub>2</sub>, líneas endocriadas recombinantes (RIL), híbridos de segundo ciclo (HSC) y NILs (Pereira da Costa et al. 2021).

### **Líneas casi isogénicas**

Las 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. Las especies silvestres utilizadas como progenitores donantes en el desarrollo de NILs tienen el potencial no solo de aumentar la variación genética en un germoplasma élite, sino también de estudiar la contribución de genes silvestres o QTLs en un fondo genético apropiado (Barrantes et al. 2014). En tomate, la primera colección de NILs se desarrolló entre *S. pennelli* LA0716 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. habrochaites* LA1777 (Monforte y Tanksley 2000) y LYC4 (Finkers et al. 2007); *S. hirsutum* LA407 (Francis et al. 2001) y *S. lycopersicoides* (Chetelat y Meglic 2000; Canady et al. 2005). Dentro de los recursos genéticos generados por el GMT se encuentra una colección de 22 líneas casi isogénicas (NILs) que contienen introgresiones silvestres de LA0722 de *S. pimpinellifolium* en el contexto genético de CAI. Otras colecciones de NILs en tomate ya se han obtenido mediante la introgresión de segmentos cromosómicos provenientes de *S. pimpinellifolium* para caracteres de fruto y la estructura de la

planta (Tanksley et al. 1996; Bernacchi et al. 1998; Doganlar et al. 2002; Kinkade y Foolad 2013; Barrantes et al. 2016; Nakano et al. 2016; Celik et al. 2017). Sin embargo, colecciones desarrolladas teniendo como objetivo VP con introgresiones silvestres de la accesión LA0722 aún no han sido estudiadas.

### ***Maduración de fruto***

Los procesos de maduración de fruto tienen un notable impacto en la VP, en su calidad y en la aceptación del consumidor. La maduración de fruto es un proceso complejo que involucra una serie de cambios fisiológicos y bioquímicos. En frutos carnosos, la maduración siempre implica cambios drásticos en el color a medida que se acumulan los pigmentos y se degradan las clorofilas, en el ablandamiento del fruto a medida que se remodela la pared celular y en el desarrollo del sabor a medida que se acumulan ácidos, azúcares y compuestos volátiles. Los frutos carnosos se pueden dividir en dos grupos: climatéricos y no climatéricos. Los frutos climatéricos, como el tomate, muestran una explosión de respiración y un rápido aumento en la acumulación de etileno al inicio de la maduración a diferencia de los no climatéricos (Giovannoni 2004). Además, otras hormonas controlan características específicas del proceso de maduración. Por ejemplo, la auxina facilita el cambio del crecimiento a la maduración, y el ácido abscísico sirve como un importante regulador de la maduración y senescencia del fruto (Fenn y Giovannoni 2021). El proceso de maduración es coordinado por un efecto combinado de hormonas vegetales, factores de transcripción y modificaciones epigenéticas, los cuales pueden influir en la calidad de fruto (Giovannoni et al. 2017; Brumos 2021; Li et al. 2022).

La base molecular y genética de la maduración ha sido objeto de un estudio intensivo durante mucho tiempo debido en parte a su relevancia en la seguridad alimentaria y nutricional (Giovannoni et al. 2017). Como modelo de estudio, el tomate es una de las especies más utilizadas. Esto se debe a que posee una constitución genética diploide con un número básico

de 12 cromosomas, un genoma de tamaño pequeño (~950 Mb) y un corto ciclo de cultivo que, sumados a la disponibilidad de herramientas ómicas, lo convierten en uno de los modelos genéticos más efectivos (Giovannoni 2004). Además, desde 2012 se dispone la secuencia genómica completa del cultivar de tomate Heinz 1706, junto a un borrador de secuencia de su pariente silvestre, *S. pimpinellifolium* accesión LA1589 (The Tomato Genome Consortium 2012). Recientemente, a partir de la información genómica de 725 accesiones silvestres y cultivadas se ha construido el primer pan-genoma en tomate (Gao et al. 2019).

En las últimas dos décadas, ha habido un interés creciente en explorar los mecanismos subyacentes a la maduración de fruto utilizando enfoques ómicos y genéticos. De esta manera, las NILs desarrolladas con una calidad mejorada y VP prolongada representan un material genético promisorio para investigar el efecto de germoplasma silvestre en la maduración de fruto. En este sentido, avances recientes en el campo de las ómicas han acelerado los estudios en profundidad de los mecanismos moleculares y la integración de diferentes enfoques ómicos permite dilucidar mecanismos involucrados en procesos de interés para el mejoramiento genético. Por lo tanto, elucidar genes relacionados con la maduración del fruto de tomate proporciona nuevas herramientas para el mejoramiento del tomate que podrían ayudar a aumentar la VP y mejorar la calidad del fruto. Además, el desarrollo de variedades de tomate con mayor VP permitirá reducir el desperdicio de alimentos con un impacto positivo para la percepción de los consumidores.

## HIPÓTESIS

Las regiones introgresadas desde la especie silvestre *S. pimpinellifolium* portan genes que determinan caracteres de calidad de fruto cuya expresión es diferencial en las líneas casi isogénicas.

El análisis ómico integral en genotipos que difieren por la introgresión de segmentos genómicos desde la especie silvestre permite dilucidar las bases genéticas de la maduración de fruto.

## OBJETIVOS GENERALES

Caracterizar a nivel fenotípico, genómico, transcriptómico y proteómico líneas casi isogénicas de tomate para caracteres de calidad de fruto.

Investigar las bases genéticas de la maduración de fruto mediante la integración de las aproximaciones ómicas en una población original de líneas casi isogénicas de tomate.

El presente trabajo se estructura en tres capítulos:

**Capítulo I:** efecto de introgresiones silvestres provenientes de LA0722 de *S. pimpinellifolium* sobre caracteres de calidad de fruto en líneas casi isogénicas de tomate.

**Capítulo II:** detección de introgresiones silvestres adicionales y su efecto en la vida poscosecha de los frutos.

**Capítulo III:** estudios ómicos en líneas casi isogénicas de tomate que discrepan para calidad de fruto con el fin de identificar genes involucrados en la maduración.

# Capítulo I

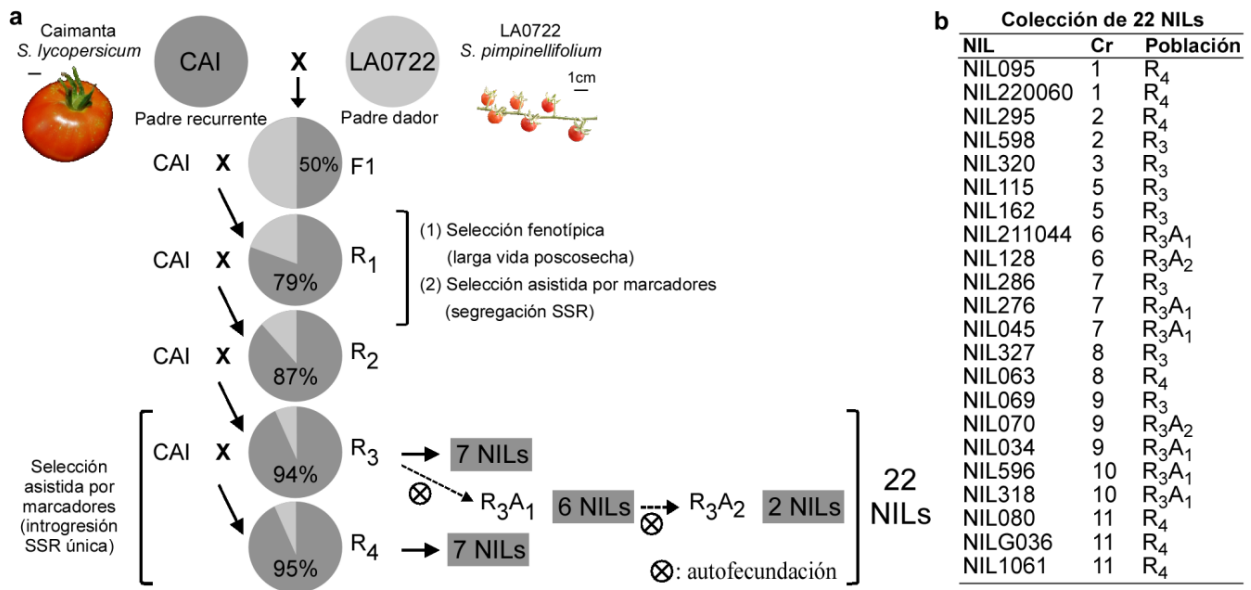
**Efecto de introgresiones silvestres provenientes de LA0722 de *S. pimpinellifolium* sobre caracteres de calidad de fruto en líneas casi isogénicas de tomate**

## Antecedentes

Dentro de los recursos genéticos generados por el grupo GMT de la Cátedra de Genética FCA – UNR se encuentra una colección de 22 líneas casi isogénicas (NILs) obtenida a partir de retrocruzadas (**Figura I-1a**). El cultivar argentino Caimanta de *S. lycopersicum* (CAI) fue utilizado como progenitor recurrente mientras que la accesión LA0722 de la especie silvestre *S. pimpinellifolium*, como progenitor donante de los segmentos cromosómicos silvestres. El cultivar CAI tiene un hábito de crecimiento determinado, plantas compactas, frutos de tipo platense (mayor diámetro que altura) de buen tamaño y corta VP (un peso promedio de  $98,5 \pm 9,9$  g y una VP de  $9,7 \pm 0,9$  días). La accesión LA0722 tiene un hábito de crecimiento indeterminado y un gran número de flores por inflorescencia, con frutos pequeños y esféricos de un peso menor a 1 g y alta VP ( $18,7 \pm 0,4$  días) (Rodríguez et al. 2006; Pereira da Costa et al. 2013).

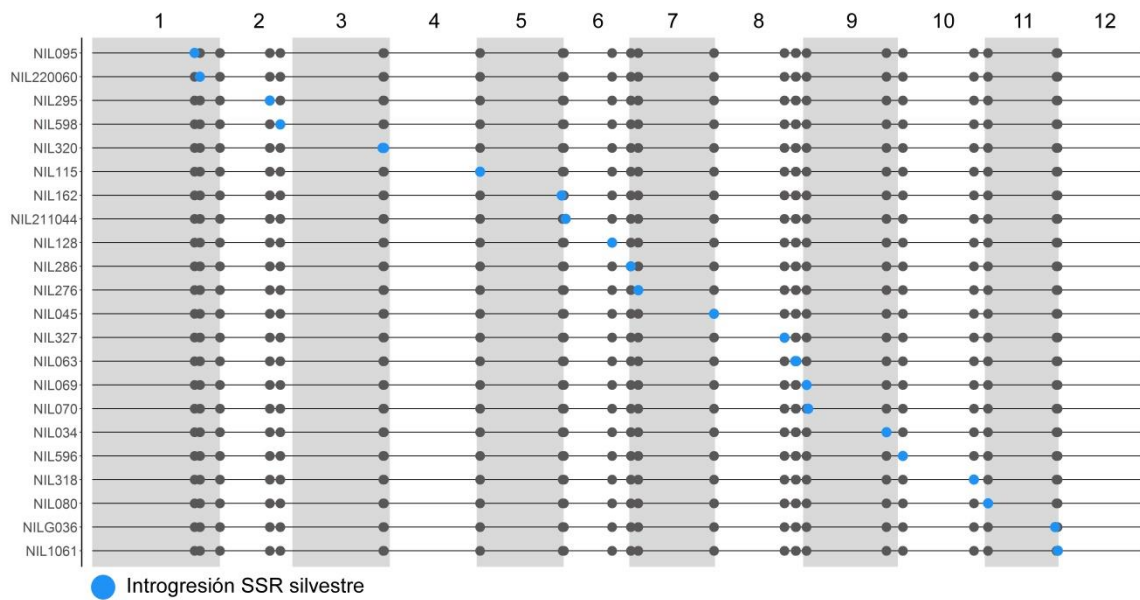
Un esquema del programa de mejoramiento para la obtención de la colección de NILs se encuentra en la **Figura I-1a**. Brevemente, se realizaron retrocruzadas contra CAI hasta llegar a una tercera y cuarta retrocruza ( $R_3$  y  $R_4$ ) seguida de una o dos autofecundaciones. Durante el proceso de obtención se seleccionó por los fenotipos y genotipos de las plantas. La selección fenotípica se basó en larga VP y los genotipos, a través de selección asistida por marcadores (SAM) con un conjunto de 28 marcadores moleculares *Simple Sequence Repeat* (SSR, por sus siglas en inglés) distribuidos en el genoma de tomate (Luciani 2017). Estos SSR fueron elegidos por su naturaleza codominante y su ubicación cromosómica, considerando al menos dos por cromosoma, uno por cada brazo (Pereira da Costa et al. 2013).

Se obtuvieron un total de 22 NILs conteniendo introgresiones de LA0722 en condición heterocigota (NIL-CP) (**Figura I-1b**) (Luciani 2017).



**Figura I-1.** (a) Esquema de cruces realizados para la obtención de las 22 líneas casi isogénicas (NILs). Las diferentes tonalidades de grises representan la fracción del genoma de cada progenitor en las distintas generaciones. Los valores corresponden al porcentaje del genoma del progenitor recurrente recuperado. (b) Colección de 22 NILs, cromosoma donde se encuentra la introgresión silvestre y población o generación de la que fue derivada. A: autofecundación; R: retrocruza; SSR: marcador *Simple Sequence Repeat*; Cr: cromosoma.

Cada una de las NILs-CP en estudio lleva un fragmento único de LA0722 determinado por un marcador SSR por el cual es nombrada la línea. Estas fueron autofecundadas para obtener líneas cuyo fragmento introgresado se encontrara en condición homocigota para los alelos silvestres (PP). En la **Figura I-2** se esquematiza en círculos azules la posición física de introgresiones PP en las 22 NILs.



**Figura I-2.** Genotipado de la colección de NILs con el conjunto de marcadores SSR utilizados durante su desarrollo. Esquema representativo de la posición física de las introgresiones silvestres que posee cada NIL. A la izquierda se representan las 22 líneas y arriba los 12 cromosomas. Los círculos azules representan las introgresiones homocigotas para los alelos silvestres (PP) y en círculos grises los marcadores que fijaron alelos cultivados (CC).

## Objetivos específicos

- Verificar las introgresiones silvestres provenientes de LA0722 de *S. pimpinellifolium* en las 22 NILs de tomate.
- Caracterizar fenotípicamente las 22 NILs a partir de 13 caracteres de calidad de fruto en distintos años de evaluación.
- Analizar el efecto que tienen sobre caracteres de calidad de fruto las introgresiones silvestres de LA0722 de *S. pimpinellifolium* en el contexto genético del cultivar Caimanta.

## **Materiales y métodos**

### ***Material vegetal***

Las 22 NILs que portan el fragmento único introgresado marcado por el SSR correspondiente en condición homocigota para los alelos silvestres fueron evaluadas en tres campañas: la primera durante la tesis de la Dra. Marianela Luciani (2017) y las restantes dos durante el transcurso de la presente tesis.

Se sembraron 10 plantas de cada NIL y de sus progenitores (CAI y LA0722). CAI fue provista por EEA INTA Cerrillos (Salta, Argentina) y la accesión silvestre LA0722 por el Tomato Genetic Resources Center, Department of Vegetable Crops, University of California (Davis, USA).

### ***Genotipado***

El ADN genómico se extrajo de hojas jóvenes utilizando un kit comercial (Kit de purificación de ADN genómico Wizard® de Promega®). El ADN extraído se disolvió en buffer TE (Tris-Cl 10 mM pH 8,00, EDTA 1 mM) y la concentración final se ajustó a 40 ng/μL. La cantidad y calidad de ADN extraído se evaluó en geles de agarosa al 1 % por comparación con un estándar de ADN del fago lambda.

Para el desarrollo de la colección de 22 NILs inicialmente se utilizaron un total de 28 marcadores SSR para la SAM. Cuatro de ellos resultaron monomórficos en distintas generaciones durante la obtención de las NILs (SSR009, SSR288, SSRH301 y SSR344), fijando alelos cultivados en todas las plantas evaluadas. Se corrieron los 24 marcadores SSR restantes para cada NIL de manera de corroborar las introgresiones silvestres en condición homocigota para los alelos de LA0722 de cada planta. Se usaron protocolos de PCR estándar para obtener productos de amplificación del ADN usando los cebadores para los marcadores

SSR (**Tabla Suplementaria S1**). La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida al 6 % p/v. La visualización se realizó mediante un kit de tinción de nitrato de plata comercial (Silver Sequence Staining Reagents, Promega®).

### ***Diseño experimental y fenotipado***

Los ensayos se realizaron en la Estación Experimental José F. Villarino, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario, Argentina (33° 02' S y 60° 53' O), durante las estaciones primavera-verano. El material vegetal se sembró en bandejas de plántulas y se cultivó durante 45 días antes de ser trasplantado a suelo en un invernadero bajo luz natural. Se utilizó un diseño completamente al azar. La distancia entre plantas fue de 0,45 m y la distancia entre hileras de 1 m. Las plantas se condujeron a un tallo, se cultivaron bajo riego por goteo y regímenes de fertilización estándar.

Para la evaluación fenotípica se cosecharon 10 frutos por planta en el estado pintón (P, 10 % de la superficie del fruto con el color de madurez) definido por Giovannoni (2004). Se evaluaron las siguientes características del fruto: diámetro (D, cm), altura (A, cm), forma del fruto (Forma, relación A/D), peso del fruto (P, g), número de lóculos (NL), espesor de pericarpio (EP, cm) y VP (días). La VP se evaluó considerando los días desde la cosecha hasta el primer signo visual de deterioro y ablandamiento (Rodríguez et al. 2010). Frutos al estado P se almacenaron en estantería a  $25 \pm 3$  °C y se descartaron a intervalos de 48 hs cuando se consideraron comercialmente inaceptables debido a la presencia de arrugas o al ablandamiento excesivo. Otros frutos cosechados en estado rojo maduro (RM, más del 90 % de su superficie con el color de madurez Giovannoni (2004)) se utilizaron para medir los índices de color (a/b, cociente entre las absorbancias medidas a 540 nm y 675 nm y L, porcentaje de reflectancia) con un CR-400 Chroma Meter de Minolta y la firmeza del fruto (F, medida en dos áreas opuestas del plano ecuatorial del fruto) con un durómetro Durofel DFT100. Posteriormente, se obtuvo jugo

homogeneizado de frutos RM para evaluar el contenido de sólidos solubles (CSS, °Brix) con refractómetro manual, pH y acidez titulable (AT, g de ácido cítrico y málico/100 g de jugo homogeneizado). La AT se determinó valorando 10 g de jugo disueltos en 100 mL de agua destilada frente a hidróxido de sodio (NaOH) 0,1 N, utilizando como punto final un pH de 8,1.

### ***Detección de QTLs de calidad de fruto***

Con la caracterización fenotípica a partir de los 13 caracteres de calidad de fruto y la caracterización molecular con los SSR se prosiguió a evaluar el efecto de las introgresiones silvestres en la colección de 22 NILs. Para ello se realizó una detección de QTLs por análisis de punto único a partir de la comparación entre las NILs y el progenitor recurrente CAI dentro de cada año de evaluación. Los valores medios se compararon mediante una prueba de Dunnett con un nivel de significancia de 0,05. La estabilidad de los QTLs se evaluó en base a la presencia de los mismos en dos o los tres años de evaluación de las NILs. Se analizó el efecto de las introgresiones silvestres sobre la calidad de fruto a partir del aumento o disminución de la media del carácter respecto de CAI.

### ***Análisis estadísticos***

Se investigaron los efectos genotipo, ambiente y genotipo x ambiente sobre la variación fenotípica. Los componentes de la varianza fenotípica se estimaron a partir del ANOVA utilizando la función de efectos mixtos lineales (*lmer*) del paquete *lme4* (Bates et al. 2015). Para todos los caracteres, se aplicó el siguiente modelo:

$$Y_{ij} = \mu + g_i + y_j + gy_{ij} + \epsilon_{ij}$$

donde  $Y_{ij}$  es el carácter fenotípico,  $\mu$  es la media general,  $g_i$  es el efecto resultante del  $i$ -ésimo genotipo,  $y_j$  es el efecto resultante del  $j$ -ésimo año,  $gy_{ij}$  es el efecto resultante de la interacción genotipo por año y  $\varepsilon_{ij}$  es el error residual.

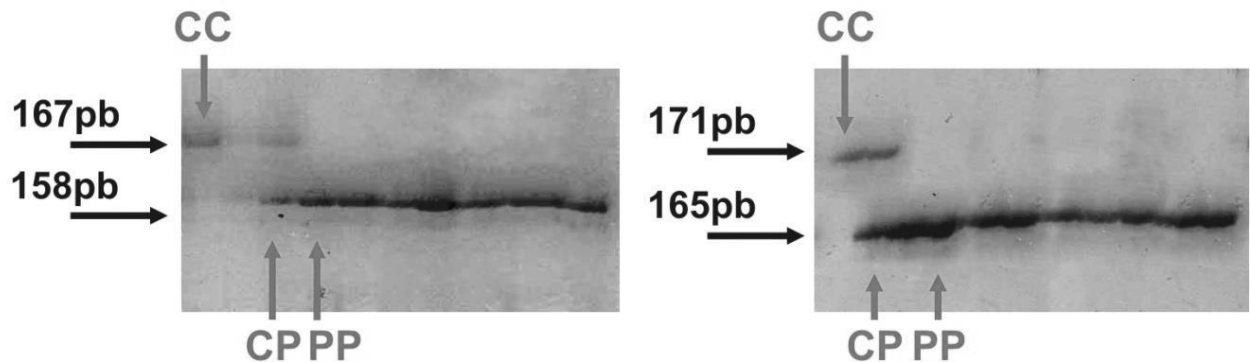
Todos los efectos fueron tratados como aleatorios. Para cada carácter se estimaron los mejores predictores lineales insesgados (BLUP por sus siglas en inglés, *Best Linear Unbiased Predictor*) basados en modelos aleatorios. La función de efectos aleatorios (*raneñ*) del paquete *lme4* se utilizó para estimar los BLUP en el modelo (Bates et al. 2015). Se extrajeron los valores de BLUP para cada NIL y se usaron para un análisis de componentes principales (ACP).

## Resultados

### Genotipado de las NILs

Con los marcadores SSR se verificó la presencia de las introgresiones silvestres en condición homocigota para los alelos de LA0722 para todas las plantas evaluadas en cada NIL. En la **Figura I-3** se muestran los geles para dos marcadores SSR con los perfiles de bandas obtenidos para cada genotipo del marcador y el resultado para las plantas genotipadas.

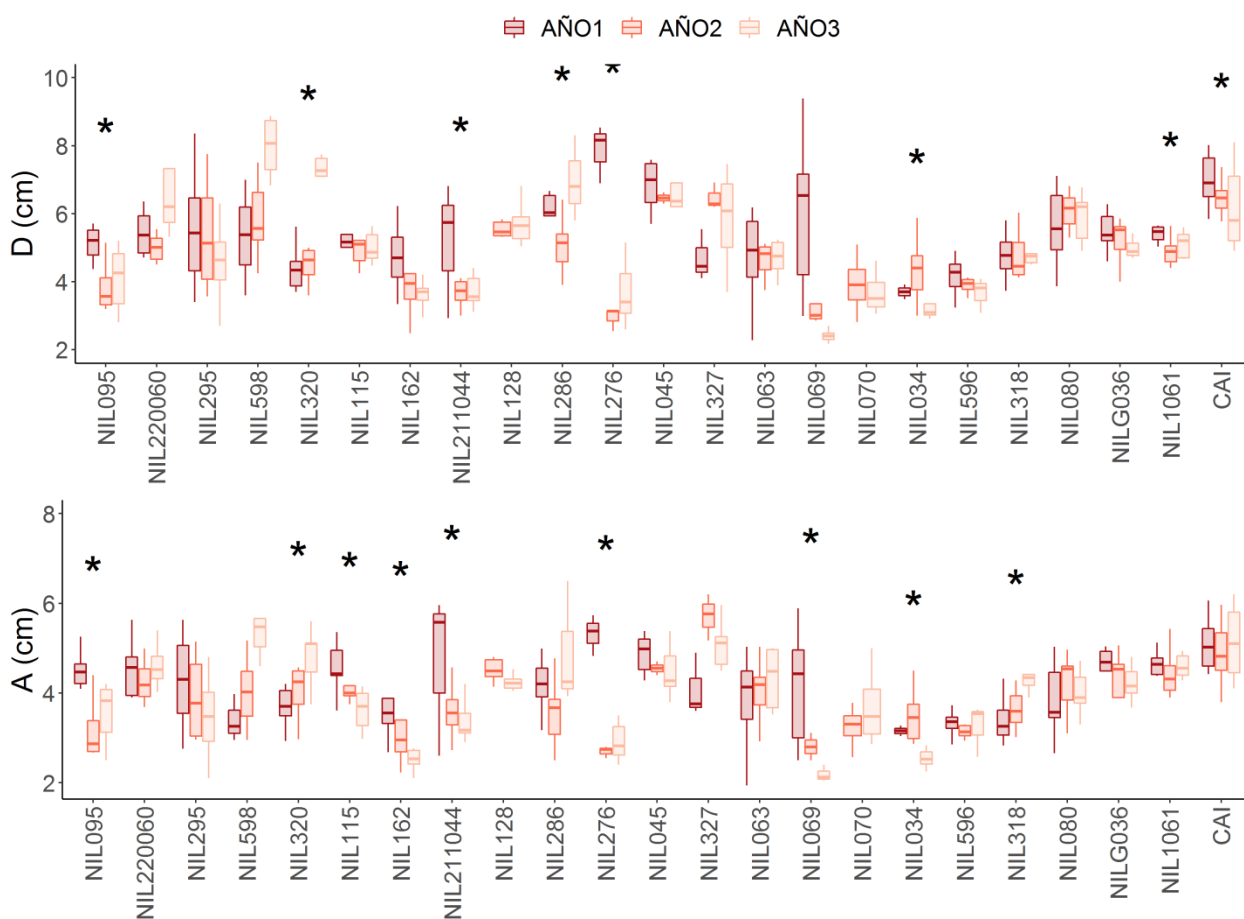
De las 22 NILs, 20 poseen una introgresión silvestre en un solo *locus* SSR y dos (NIL320 y NIL063) tienen una introgresión que comprende dos *loci* SSR estrechamente cercanos (SSR320-SSR014 y SSR063-SSR038, respectivamente) que no pudieron recombinar.

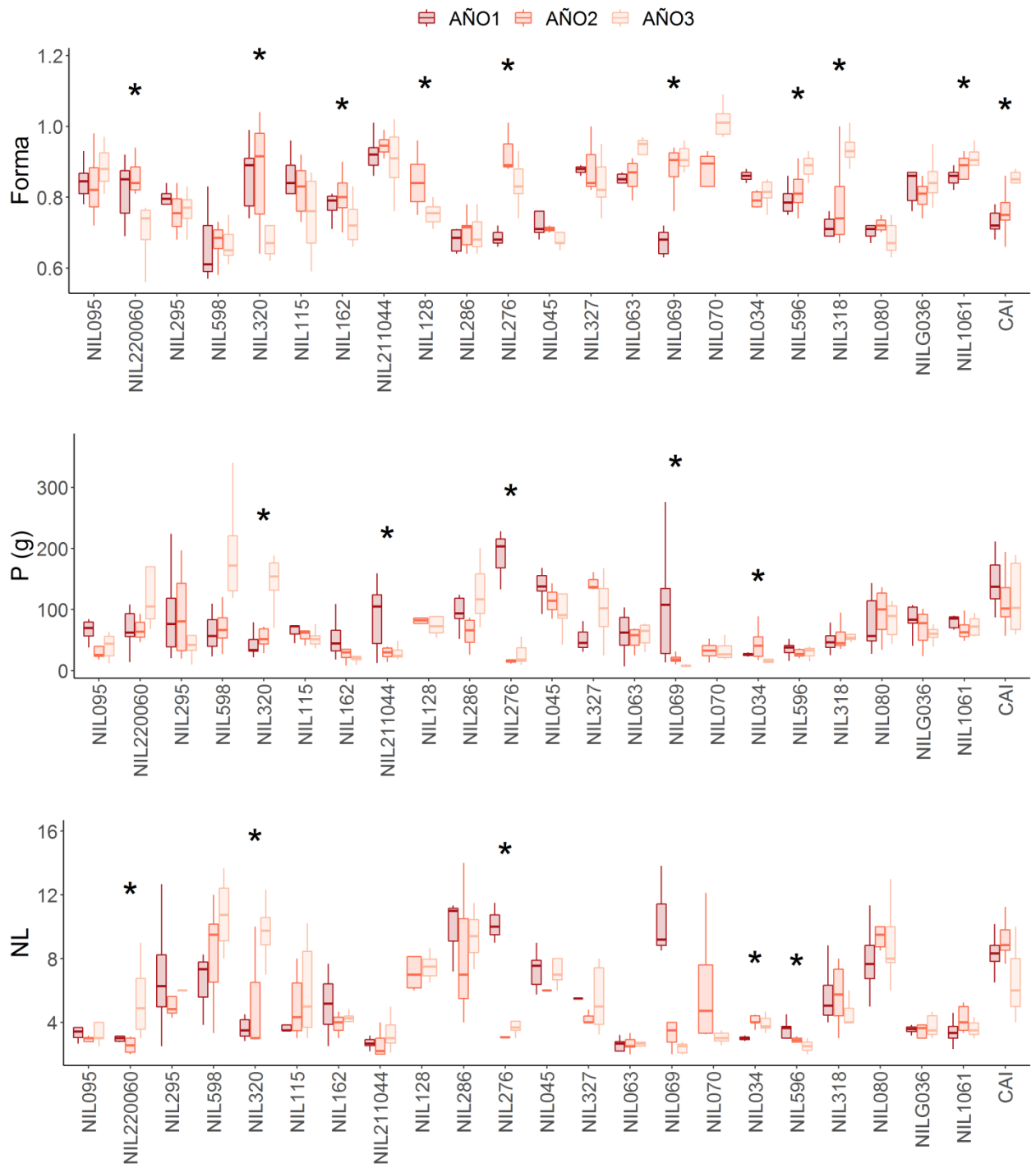


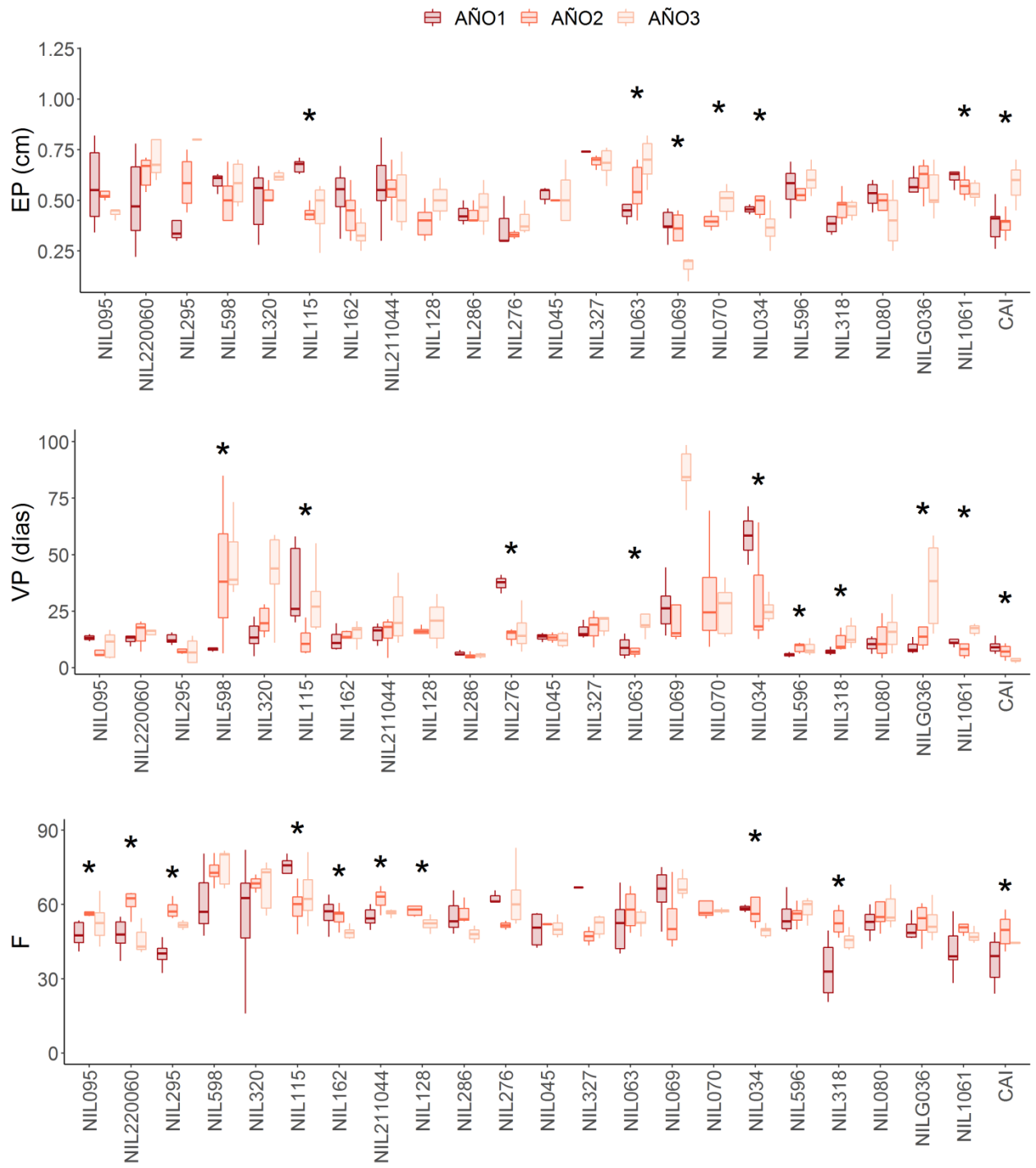
**Figura I-3.** Geles representativos de dos marcadores moleculares utilizados en el desarrollo y genotipado de las NILs (izquierda SSR045, derecha SSR320). Las flechas verticales indican cómo se visualizan los diferentes genotipos para el marcador (CC, homocigota para el alelo cultivado; PP, homocigota para el alelo silvestre y CP, heterocigota). Las flechas horizontales indican el peso molecular de las diferentes bandas observadas.

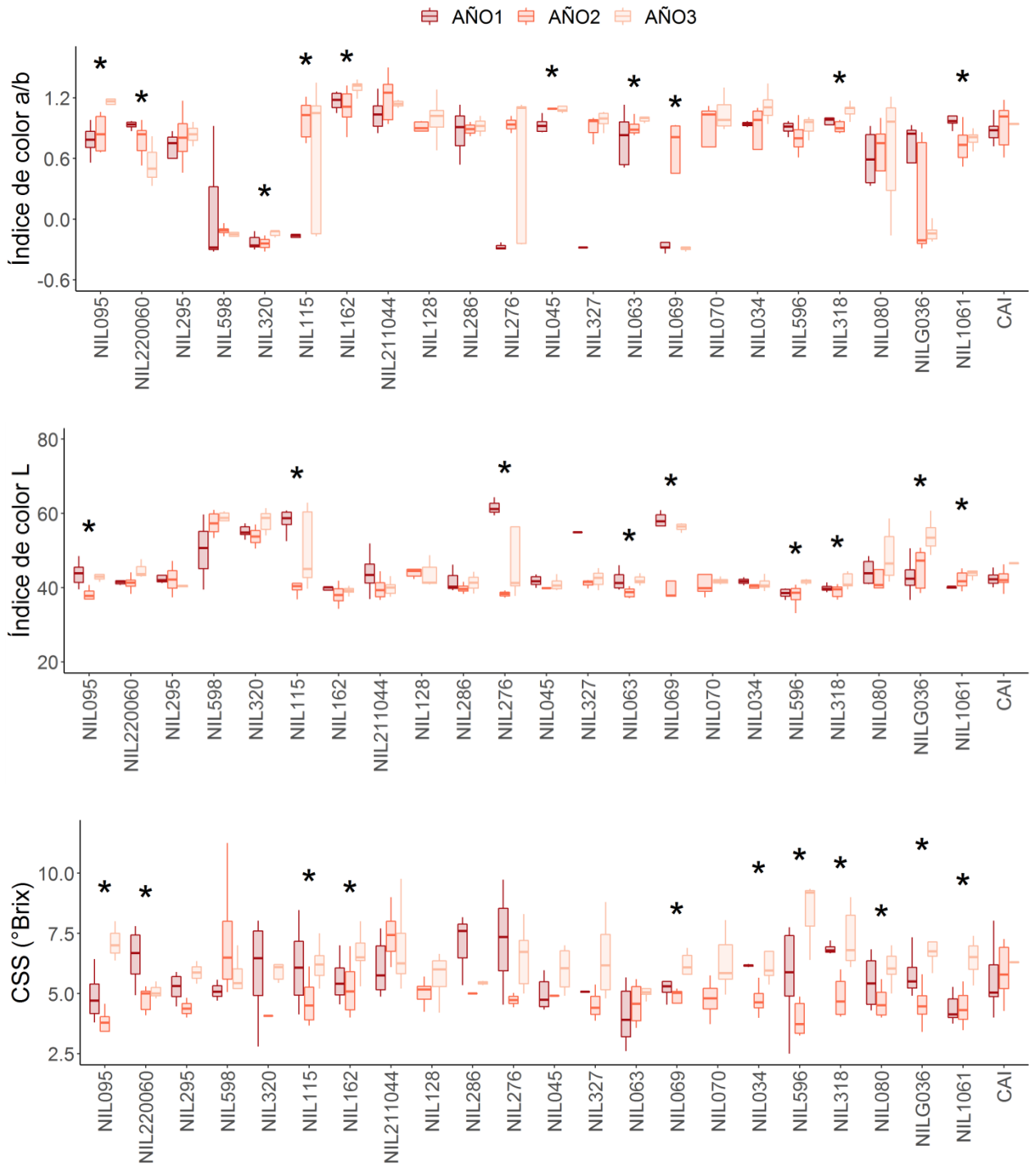
### Caracterización fenotípica de las NILs

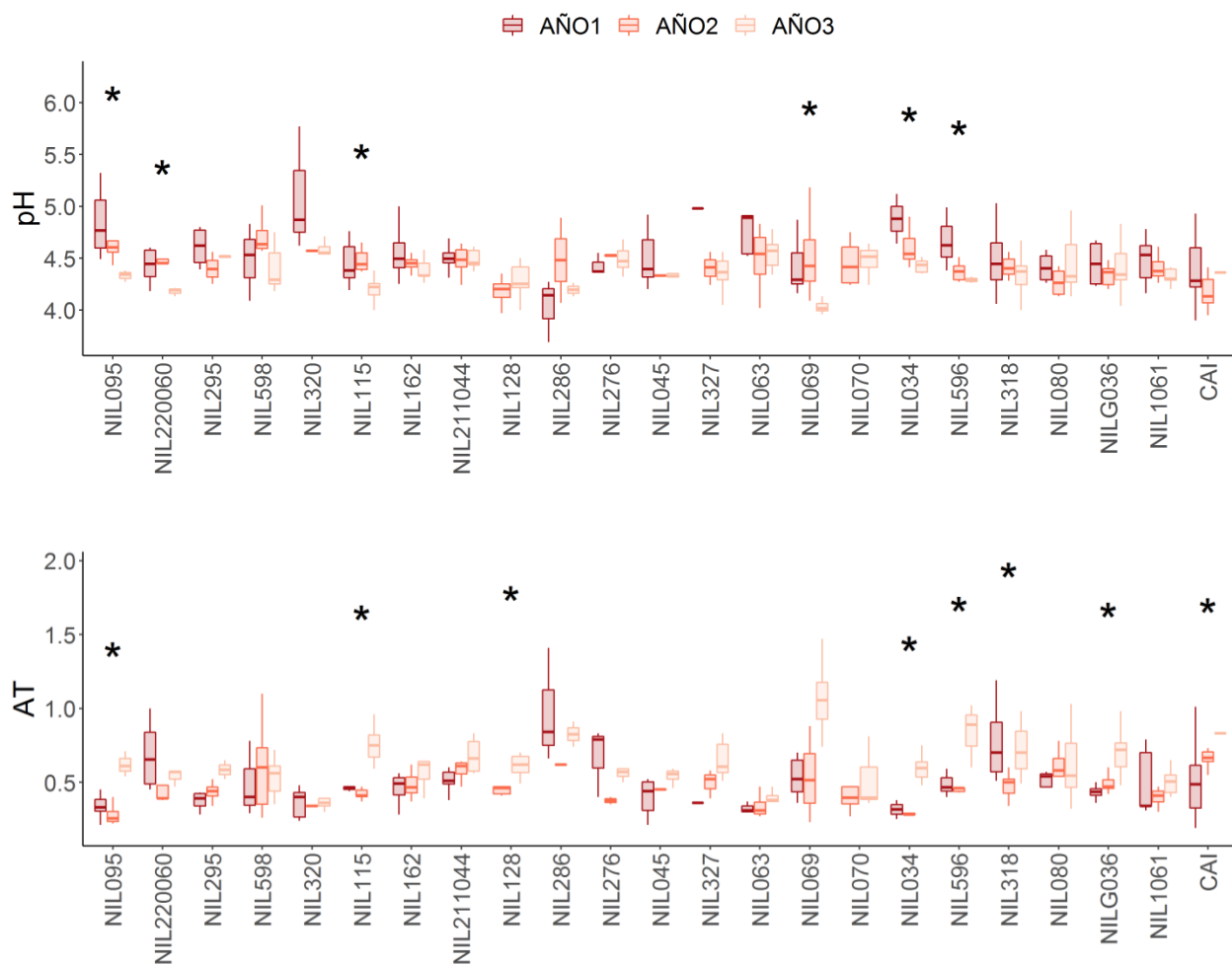
Los 13 caracteres fenotípicos se evaluaron en cada NIL y el progenitor cultivado CAI en cada uno de los tres años de evaluación. En la **Figura I-4** se observan las variaciones dentro de los años de evaluación y con asteriscos se presentan las diferencias significativas entre años ( $p < 0,05$ ). Caracteres de tamaño de fruto como P, NL, EP junto a pH fueron los que presentaron una mayor estabilidad en los distintos años, presentando el mayor número de genotipos sin diferencias significativas entre años de evaluación. Para VP se observó el mayor valor en el tercer año de evaluación para seis de las 22 NILs. Por otro lado, 2 NILs presentaron mayor VP el primer año de evaluación al igual que CAI y 14 de ellas no mostraron diferencias significativas entre años, demostrando su estabilidad.











**Figura I-4.** Caracterización fenotípica de las NILs y su progenitor cultivado Caimanta (CAI) en tres años de evaluación. D, diámetro; A, altura; P, peso; NL, número de lóculos; EP: espesor del pericarpio; VP, vida poscosecha; F, firmeza; a/b, índice de color a/b; L, índice de color L; CSS, contenido de sólidos solubles; AT, acidez titulable (g ácido cítrico y málico/100 g jugo homogenizado). Los asteriscos indican diferencias significativas entre años ( $p < 0,05$ ).

Para comprender las fuentes potenciales de variación fenotípica en la colección de NILs, se evaluaron los efectos del genotipo (G), del ambiente o año de evaluación (A) y de la interacción genotipo × ambiente (GxA) (**Tabla I-1**). El análisis de los componentes de la varianza mostró un efecto G significativo para todos los caracteres ( $p < 0,05$ ). El efecto GxA también fue significativo para la totalidad de ellos. Se evidenció además un efecto significativo de A en 11 de los 13 caracteres, exceptuando EP y F, indicando su alta influencia.

**Tabla I-1.** Cuadrados medios para los efectos genotipo (G), ambiente o año de evaluación (A) y su interacción (GxA) para cada carácter de calidad de fruto.

	gl	D	A	Forma	P	NL	EP
G	21	9,52*	3,84*	0,07*	8849*	46,78*	0,11*
A	2	10,19*	2,45*	0,04*	8337,85*	12,53*	0,01
GxA	42	4,83*	1,96*	0,02*	6297,59*	11,67*	0,03*
Error		0,94	0,46	4,50E-03	1520,09	3,05	0,01

	gl	VP	F	a/b	L	CSS	pH	AT
G	21	1570,76*	510,14*	1,84*	292,5*	3,92*	0,19*	0,14*
A	2	1816,58*	199,67	0,94*	343,66*	48,23*	0,91*	0,76*
GxA	42	681,34*	150,39*	0,32*	66,82*	2,58*	0,09*	0,06*
Error		123	66,57	0,11	20,15	1,25	0,05	0,02

gl: grados de libertad

\* diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

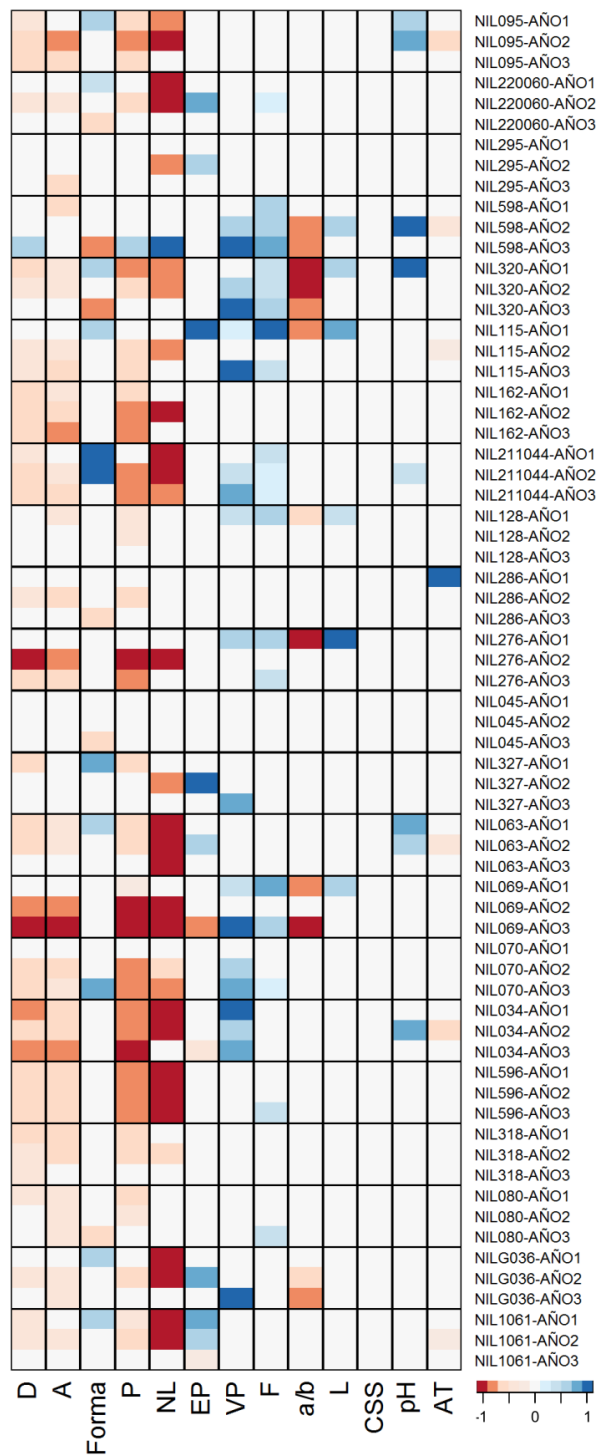
### **Análisis de QTLs de calidad de fruto**

Se detectaron QTLs para todos los caracteres evaluados en los tres años de evaluación con excepción de CSS. En la **Figura I-5** se grafican en colores los QTLs que resultaron significativos al 5 % para los 13 caracteres de calidad de fruto en las 22 NILs y en cada uno de los tres años de evaluación. En total, se hallaron 251 QTLs de calidad de fruto. Se comprobó que muchos de ellos fueron estables en dos o los tres años de evaluación. Del total, 72 fueron detectados en los tres años y 104, en dos años.

Se analizó el efecto de las introgresiones silvestres sobre caracteres de calidad de fruto, es decir, se estudió si la presencia de las introgresiones silvestres aumentaba o disminuía la media de cada carácter respecto de la media de CAI. Se observó que el efecto fue estable en casi la totalidad de los casos. Los 72 QTLs detectados en los tres años de evaluación presentaron el mismo efecto con la única excepción de un QTL de EP en el tercer año de evaluación de la NIL1061. En la **Figura I-5** se muestran en tonalidades rojas aquellos QTLs en los que la presencia de los alelos silvestres tuvo un efecto de disminución de la media del carácter. Esto fue observado principalmente para caracteres de tamaño de fruto (D, A, P y NL). También se observó una disminución para índice de color a/b que se evidenció por la presencia de NILs con frutos amarillos. Las introgresiones silvestres asociadas a AT disminuyeron la media en comparación al progenitor cultivado CAI con excepción de la NIL286 en el primer año de evaluación. Por otro lado, se detectaron QTLs en los que la presencia de los alelos silvestres aumentó la media del carácter como puede observarse en la **Figura I-5** en tonalidades azules. Estos aumentos respecto a los valores del progenitor cultivado CAI se observaron para caracteres de interés para el mejoramiento de tomate como VP y F. Once de las 22 NILs presentaron QTLs de VP con valores entre dos y siete veces mayores. Entre ellas, la NIL034 presentó un QTL estable en los tres años de evaluación. Además, se evidenciaron NILs que presentaron QTLs para VP y F en dos años de evaluación (NIL598, NIL320, NIL115, NIL211044 y NIL069). Particularmente, la NIL115 mejoró la VP y F, con valores tres veces mayores a CAI, y presentó frutos de color rojo. Para pH se encontraron seis QTLs, dos de ellos localizados en los cromosomas 1 (NIL095) y 8 (NIL063) fueron consistentes en dos años donde los alelos LA0722 aumentaron los valores. Respecto a Forma, las introgresiones tendieron a aumentar la media de este carácter hacia frutos redondos con algunas excepciones de QTLs para frutos más achatados en el tercer año de evaluación. En su mayoría, las introgresiones silvestres

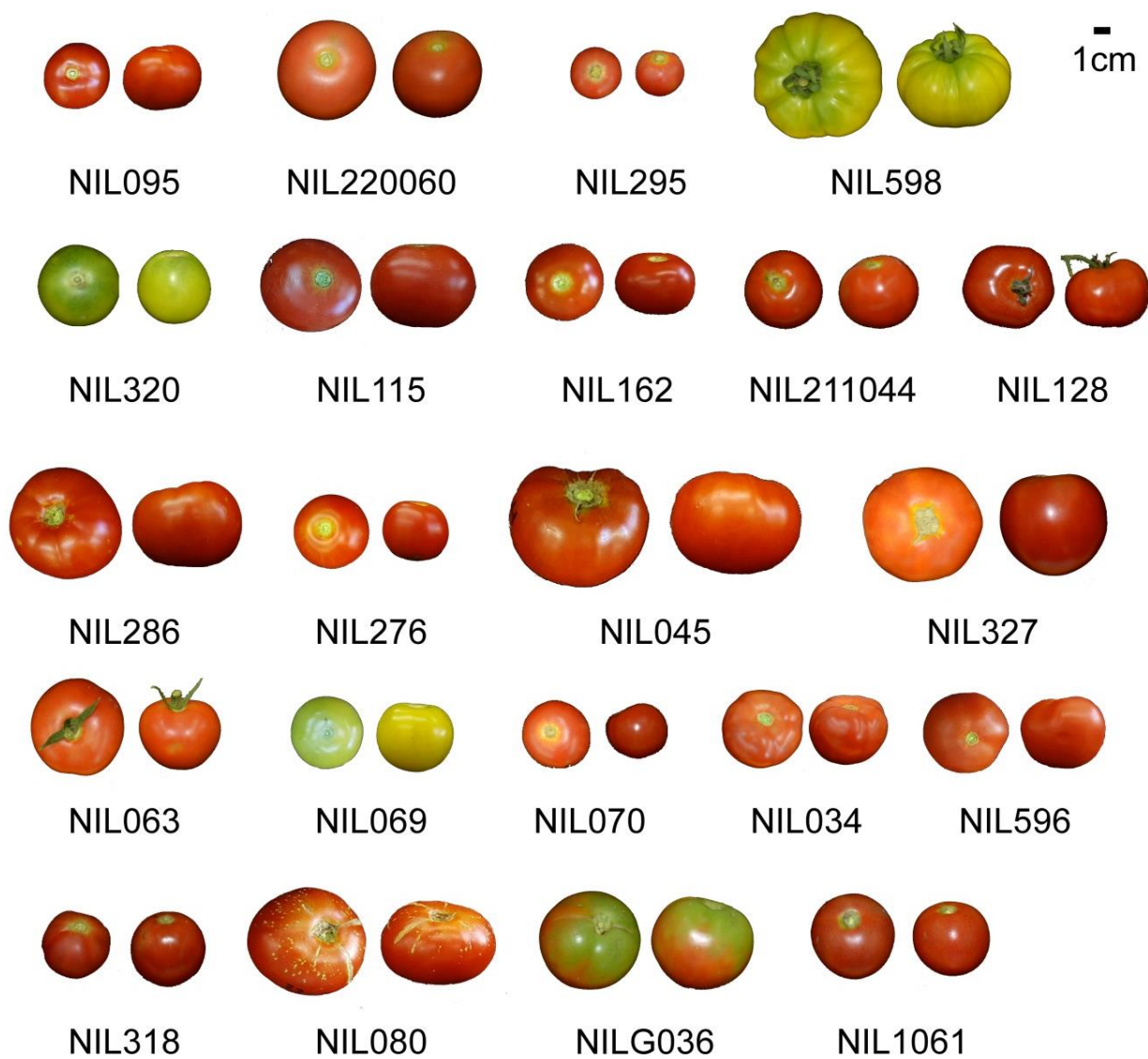
asociadas a EP tuvieron un efecto positivo, aumentado la media para este carácter dando frutos más carnosos.

**Figura I-5.** Detección de QTLs en las 22 NILs en un ensayo de tres años. Representación en mapa de calor de las diferencias entre el padre recurrente *S. lycopersicum* cv. Caimanta (CAI) y las 22 NILs. Los datos se normalizaron al valor mínimo o máximo en cada carácter. Nivel de significancia de 0,05 (prueba de Dunnett). Los bloques blancos simbolizan asociaciones no significativas. Los bloques en escala roja indican un efecto de disminución de la media del carácter por parte del alelo silvestre, mientras que los bloques en escala azul indican un efecto de aumento. NIL: línea casi isogénica; D: diámetro; A: altura; P: peso; NL: número de lóculos; EP: espesor de pericarpio; VP: vida poscosecha; F: firmeza; a/b y L: índices de color; CSS: contenido de sólidos solubles; AT: acidez titulable



### Colección de 22 NILs

Frutos representativos de las 22 NILs se muestran en la figura **Figura I-6**. Se puede observar el tamaño, forma y color de cada una de las NILs.



**Figura I-6.** Frutos representativos de las 22 NILs.

La integración de la información obtenida a partir de la caracterización molecular junto a la fenotípica en los tres años de evaluación fue utilizada para el análisis de la colección de 22 NILs. Los valores de BLUP estimados a partir de la evaluación en los tres años y la interacción permiten tener un valor fenotípico descriptivo para cada NIL (**Tabla I-2**).

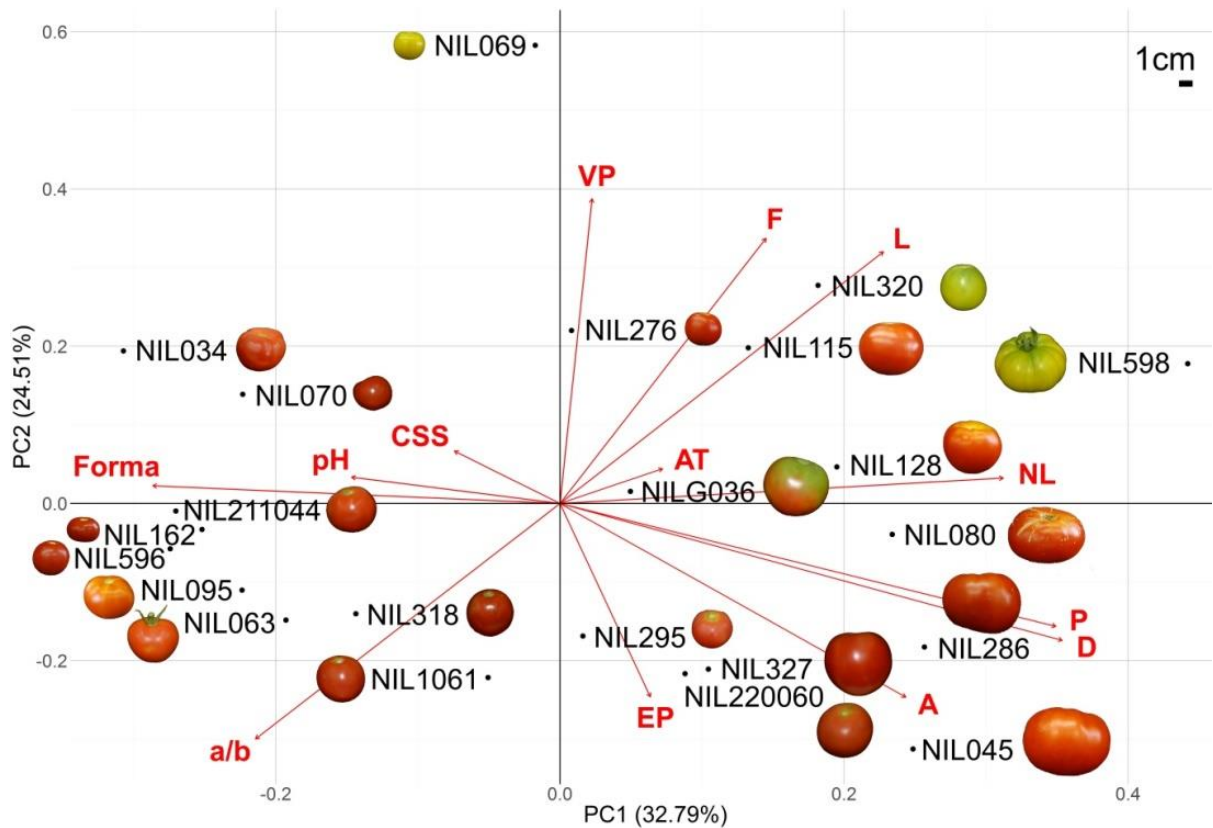
El ACP a partir de los valores de BLUP resume la información obtenida a partir de los 13 caracteres de calidad evaluados en las 22 NILs en tres años (**Figura I-7**). Las primeras dos componentes principales explicaron un 57,30 % de la variación total. La componente 1 representó el 32,79 % y se ponderó hacia caracteres de tamaño y forma de fruto (D, P, NL, Forma y A); mientras que la componente 2 representó el 24,51 % y fue ponderada hacia VP, F e índices de color a/b y L.

La NIL069, NIL320, NIL115 y NIL276 agruparon junto a mayor VP, F y L. La NIL286, NIL045 y NIL080 fueron las que agruparon con valores altos para caracteres de tamaño de fruto. La NIL220060, NIL327 y NIL295 agruparon con EP, hacia frutos carnosos. Por otro lado, un gran número de NILs agruparon con Forma y a/b, indicando que sus frutos poseen una forma redonda y color rojo intenso.

**Tabla I-2.** Valores BLUP para cada carácter y cada NIL.

<b>NIL</b>	<b>D</b>	<b>A</b>	<b>Forma</b>	<b>P</b>	<b>NL</b>	<b>EP</b>	<b>VP</b>	<b>F</b>	<b>ab</b>	<b>L</b>	<b>CSS</b>	<b>pH</b>	<b>AT</b>
NIL095	4,70	3,85	0,84	63,40	3,74	0,52	14,21	53,04	0,91	42,26	5,49	4,56	0,45
NIL220060	5,41	4,18	0,80	80,15	3,94	0,60	16,94	53,59	0,76	43,03	5,64	4,40	0,56
NIL295	5,11	3,92	0,78	73,24	5,88	0,53	13,48	51,63	0,75	42,64	5,53	4,48	0,49
NIL598	5,76	4,11	0,71	83,28	7,27	0,58	23,98	65,47	0,11	51,39	5,57	4,48	0,49
NIL320	5,22	4,06	0,80	74,56	6,16	0,54	25,18	60,91	-0,04	53,20	5,67	4,65	0,41
NIL115	5,12	4,01	0,80	70,36	5,37	0,51	23,01	63,23	0,46	49,38	5,66	4,40	0,55
NIL162	4,55	3,54	0,78	59,45	4,57	0,45	15,79	53,30	1,11	40,10	5,72	4,47	0,52
NIL128	5,38	4,15	0,78	74,73	6,82	0,46	21,48	57,38	0,66	46,77	5,83	4,33	0,58
NIL211044	4,62	3,95	0,89	63,28	3,37	0,54	19,11	57,38	1,05	41,87	6,13	4,50	0,56
NIL045	5,86	4,31	0,74	86,79	6,54	0,52	15,77	52,44	0,95	41,63	5,53	4,43	0,48
NIL276	4,89	3,79	0,82	71,17	5,65	0,41	20,71	58,62	0,44	48,04	5,80	4,48	0,54
NIL286	5,57	4,06	0,73	80,26	8,16	0,46	11,32	54,50	0,85	41,91	5,73	4,33	0,70
NIL063	4,85	4,02	0,86	65,74	3,19	0,56	15,64	54,93	0,86	41,77	5,32	4,58	0,40
NIL327	5,37	4,41	0,85	79,59	5,10	0,65	19,51	53,60	0,70	44,55	5,62	4,48	0,53
NIL034	4,36	3,50	0,82	56,56	4,08	0,46	28,77	55,21	0,89	42,39	5,70	4,54	0,45
NIL069	4,46	3,48	0,82	62,33	5,14	0,36	36,25	61,19	0,13	50,30	5,57	4,36	0,67
NIL070	4,54	3,77	0,87	60,02	4,85	0,46	22,69	57,74	0,77	43,11	5,70	4,52	0,48
NIL318	4,88	3,88	0,81	64,64	5,30	0,46	14,38	47,35	0,92	41,18	5,89	4,44	0,62
NIL596	4,45	3,59	0,82	57,06	3,47	0,56	12,50	54,99	0,85	40,41	5,72	4,45	0,57
NIL080	5,45	3,99	0,73	75,27	7,97	0,48	15,44	56,43	0,63	45,54	5,59	4,42	0,56
NIL1061	5,11	4,27	0,86	72,41	4,03	0,56	17,28	49,20	0,75	42,99	5,53	4,44	0,49
NILG036	5,13	4,13	0,82	70,98	3,94	0,57	20,94	53,19	0,24	47,19	5,73	4,43	0,54

*NIL: línea casi isogénica; D: diámetro (cm); A: altura (cm); P: peso; NL: número de lóculos; EP: espesor de pericarpio (cm); VP: vida poscosecha (días); F: firmeza; a/b y L: índices de color; CSS: contenido de sólidos solubles (°Brix); AT: acidez titulable (g de ácido cítrico y málico/100 g de jugo homogeneizado)*



**Figura I-7.** Análisis de componentes principales de las 22 NILs a partir de los valores de BLUP. PC, componente principal; D, diámetro; A, altura; P, peso; NL, número de lóculos; EP: espesor del pericarpio; VP, vida poscosecha; F, firmeza; a/b, índice de color a/b; L, índice de color L; CSS, contenido de sólidos solubles; AT, acidez titulable.

## Discusión

En el Programa de Mejoramiento del grupo GMT, nuestra colección de NILs fue desarrollada utilizando selección fenotípica para larga VP y también SAM utilizando un conjunto de marcadores SSR. En tomate, se ha demostrado una mayor eficiencia en términos de tiempo y cantidad de material vegetal que se evalúa por ciclos mediante la aplicación de SAM (Foolad y Sharma 2005). Gracias a la aplicación de SAM se logró obtener líneas esencialmente derivadas en un número de generaciones relativamente bajo (tres o cuatro rondas de retrocruza y una 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 dobles recombinaciones, y por tanto, conlleva a una buena calidad del fondo genético en relación a la similitud con el progenitor cultivado.

La calidad de fruto mejorada y la reducción de las pérdidas poscosecha son dos desafíos importantes para el mejoramiento del tomate destinado al consumo en fresco. Varias NILs de nuestra colección mostraron una VP más larga y un menor ablandamiento de fruto proporcionado por las introgresiones de la accesión silvestre LA0722 de *S. pimpinellifolium* en el fondo cultivado. La mayor VP era esperada ya que se ejerció presión de selección para este carácter durante el desarrollo de la colección de NILs (Luciani 2017). La firmeza de los frutos es otro atributo importante en los tomates de mercado fresco. La reducción del ablandamiento en las NILs tiene un impacto positivo en la disminución de las pérdidas poscosecha. Además, la recuperación del tamaño y carnosidad de los frutos cultivados contribuye positivamente a las preferencias del consumidor y serían el resultado del proceso de retrocruza hacia el progenitor cultivado. A su vez, el avance en las rondas de autofecundación contribuye a la estabilización de las

líneas hacia una mayor homocigosis, haciendo que nuestras NILs se conviertan en materiales de alto valor agronómico y calidad mejorada promisorios para ser inscritos en el Registro Nacional de Cultivares del INASE en nuestro país.

Las NILs constituyen una herramienta muy valiosa para la identificación y localización de QTLs (Zamir 2001). En las NILs, la identificación de QTLs se ve simplificada ya que solo difieren del progenitor recurrente en uno o unos pocos segmentos cromosómicos provenientes del progenitor donante, y por lo tanto, las diferencias fenotípicas pueden atribuirse directamente a esas regiones (Eshed y Zamir 1995). En comparación con otras poblaciones segregantes, al presentar solo una pequeña proporción del genoma del donante, 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 donante. Esto las convierte en un sistema eficiente para la identificación de QTLs (Lippman et al. 2007). Uno de los principales objetivos de nuestra colección de NILs fue evidenciar cómo las introgresiones silvestres de LA0722 afectan los caracteres de calidad del fruto en el contexto genético de CAI. La comparación de las NILs con su progenitor cultivado CAI mostró diferencias para todos los caracteres evaluados excepto para el CSS (**Figura I-5**). Se observó que la mayoría de los QTLs fueron estables en dos o los tres años de evaluación.

Se detectaron mayoritariamente QTLs para caracteres de tamaño y morfología como era esperado debido al gran contraste en las líneas parentales para estas características. La presencia de alelos de LA0722 presentó un efecto de disminución de la media de estos caracteres. Para tamaño de fruto, se observaron asociaciones conjuntas entre D, A y P, esperables dada la estrecha correlación que existe entre ellos. De este modo, resulta probable que se trate de efectos pleiotrópicos y no de la existencia de distintos QTLs en la misma región cromosómica. Estudios de genotipado y secuenciación de alta resolución en esta región cromosómica de interés permitirían identificar y afinar la

región con mayor detalle y determinar si se trata de un solo gen con efectos pleiotrópicos que afectan varias características de tamaño, como D, A y P, o si se trata de varios genes ligados que influyen de manera independiente en cada una de ellas. La saturación con marcadores moleculares y la recombinación de estas regiones cromosómicas y su estudio en diferentes poblaciones o ambientes permitiría también confirmar la presencia de estos efectos y su impacto.

Para D, de las 22 introgresiones, 20 mostraron asociación y 13 de ellas fueron consistentes en dos o incluso los tres años de evaluación. En todos los QTLs, los alelos silvestres tuvieron un efecto de disminución de la media para este carácter; sin embargo, un único QTL en la NIL598 en el tercer año de evaluación tuvo un efecto de aumento del D. QTLs para A se encontraron en casi todas las NILs (20/22) y cuatro mostraron estabilidad a lo largo de los tres años. Para Forma se observaron nueve QTLs, donde los alelos silvestres aportaron a frutos más redondos en el primer año de evaluación. En el segundo año, estas NILs mostraron la misma tendencia, aunque los valores no fueron significativamente diferentes del padre recurrente con excepción de la NIL211044. Se debe mencionar que en el tercer año de evaluación se detectaron ciertos QTLs donde el alelo silvestre disminuyó la media del carácter hacia frutos más achatados. Esto podría deberse a que el aumento en generaciones pudo haber fijado alelos cultivados en otras regiones segregantes, aumentando aún más el recupero del fondo genético cultivado. Estas asociaciones podrían ser el resultado de nuevos efectos pleiotrópicos descubiertos e interacciones epistáticas dentro de un fondo genético diferente o con introgresiones silvestres adicionales (Chaïb et al. 2006).

De los QTLs hallados para P y NL, las asociaciones de SSRG036 y SSR1061 (cromosoma 11) fueron previamente detectadas en varias generaciones durante el desarrollo de las NILs, y con el mismo efecto del alelo proveniente de LA0722 (Luciani 2017). Por otro lado, muchas nuevas asociaciones para P y NL no detectadas

previamente durante el desarrollo de las NILs fueron descubiertas en la colección conforme se avanzó en el número de autofecundaciones.

Para el resto de los caracteres de calidad, se encontró un menor número de QTLs probablemente como consecuencia de una herencia más compleja. Sin embargo, todos los caracteres mostraron diferencias significativas con el progenitor recurrente ( $p < 0,05$ ) excepto en el CSS que presentó variaciones bajas y no se encontró ningún QTL. Esta ausencia de QTLs para CSS podría estar relacionada con la pérdida de alelos para alto contenido en azúcares que se dio al seleccionar frutos más grandes en las NILs. Muchos estudios en tomate han revelado que QTLs que influyen positivamente en el CSS se localizan en las mismas regiones cromosómicas que QTLs que impactan negativamente en el P (Chen et al. 1999; Doganlar et al. 2002; Tieman et al. 2017).

Sin tener en cuenta algunas asociaciones con AT, todos los QTLs de calidad de fruto detectados mostraron valores mayores en comparación con el progenitor cultivado CAI (**Figura I-5**). En cuanto a VP, la mitad de las NILs presentaron QTLs con un aumento del valor entre dos y siete veces. Entre ellas, la NIL034 presentó un QTL estable en los tres años de evaluación. Cercano a la región del SSR110 introgresada en la NIL034 se localiza *LeBR1 (Solyc09g092520)*, un miembro de la familia de xiloglucano endotransglucosilasa/hidrolasa (XTH) (Koka et al. 2000). Las XTH son enzimas modificadoras de la pared celular y muchas de ellas están asociadas a la maduración del fruto ya que su actividad ocurre durante el ablandamiento (Saladié et al. 2006). Otras NILs evidenciaron QTLs tanto para VP y F en dos años de evaluación (NIL598, NIL320, NIL115, NIL211044 y NIL069). A diferencia de estas NILs, la NIL034 no mostró asociación a F; sin embargo, presentó una tendencia a mayores valores de F respecto a CAI en los tres años de evaluación.

Siguiendo con F, tres NILs mostraron QTLs estables para este carácter en los tres años de evaluación (NIL598, NIL320 y NIL211044). La NIL598 y la NIL320 también

presentaron asociación para color de fruto, mostrando frutos amarillos. En particular, cerca de la región de SSR320 en el cromosoma 3 en la NIL320, se encontró un gen involucrado en la biosíntesis de carotenoides que codifica una fitoeno desaturasa 1 (PDS1, *Solyc03g123760*). Este gen mostró signos de selección durante la domesticación del tomate a partir de *S. pimpinellifolium* (Razifard et al. 2020). Es posible que alguna alteración del gen esté involucrada en la causa de este fenotipo de frutos amarillos. Además, pueden estar implicados otros genes del ablandamiento de fruto dentro de la región de SSR320. Un gen que codifica para una pectato liasa (PL) bien caracterizada se encuentra dentro de esta región del cromosoma (Yang et al. 2017).

Se observaron además otros QTLs para los índices de color a/b y L en las NILs. Se pudo notar que las asociaciones dan lugar a NILs de frutos amarillos, aunque ambos progenitores tengan frutos rojos. Esto también podría observarse en los QTLs de EP que mostraron valores de espesor más altos causados por los alelos de LA0722. Esto podría ser el resultado del aislamiento de distintas regiones del donante silvestre y su introgresión en el fondo genético de interés que estarían revelando 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 fondo genético del receptor puede generar una variabilidad inesperada (Lippman et al. 2007).

Para pH, se encontraron QTLs en los cromosomas 1 (SL4.0ch01:70.499.385) y 8 (SL4.0ch08:59.221.251). Similares resultados en estas regiones fueron reportados en otras líneas de retrocruzas endogámicas de *S. pimpinellifolium* (Celik et al. 2017).

Las medidas fenotípicas en ensayos replicados en varios lugares y años son posibles debido a la inmortalidad de las NILs (Schauer et al. 2006). Esto es una ventaja de estas poblaciones ya que aumenta el poder estadístico en la evaluación de caracteres

cuantitativos y hace posible estimar interacciones ambientales para caracteres de herencia compleja (Kearsey y Pooni 1996). Así, fue posible analizar la colección de NILs a partir de la integración de la información disponible para las 22 líneas en tres años de evaluación. El cálculo de los estimadores BLUP nos permitió obtener un valor fenotípico descriptivo para cada carácter y cada NIL. Debido a que la varianza fenotípica (VF) es la suma de la variación entre individuos debido a causas genéticas (varianza genética, VG) y a causas ambientales (varianza ambiental, VA), la evaluación de un genotipo en infinitos ambientes genera que la VF tienda a la VG (Mariotti y Collavino 2014). Por lo tanto, la evaluación de las NILs en tres años hace que los valores de BLUP calculados se aproximen a los valores genotípicos de las NILs, constituyendo buenos descriptores para la colección. Dichos valores permitieron la caracterización y organización de la colección de NILs a partir de la integración de la información recolectada.

## **Conclusiones parciales**

- La evaluación molecular y fenotípica en tres años permitió caracterizar y organizar la colección de 22 NILs.
- En la colección de NILs se detectaron QTLs para todos los caracteres de calidad de fruto evaluados excepto para CSS.
- La presencia de los alelos silvestres disminuyó la media en caracteres de tamaño y morfología de fruto y aumentaron la media de VP, F, EP y pH.

## **Capítulo II**

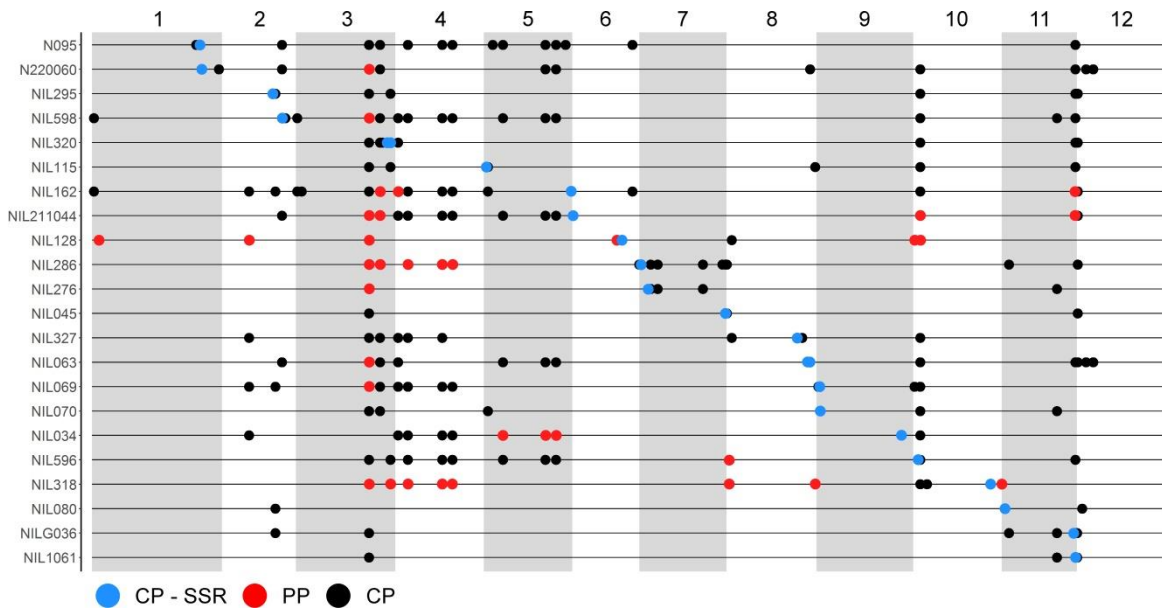
**Detección de introgresiones silvestres adicionales  
y su efecto en la vida poscosecha de los frutos**

## Antecedentes

La secuenciación de los genomas de los parentales CAI y LA0722 permitió el desarrollo de nuevos marcadores moleculares (Cambiaso et al. 2019b). Se detectaron un total de 1.397.518 polimorfismos en la comparación entre CAI y LA0722. De esta comparación se consiguió una lista de inserciones y deleciones utilizada para el desarrollo de marcadores moleculares de tipo InDel. En estos marcadores, el polimorfismo derivado de las inserciones y de las deleciones que diferencian a los genomas es revelado mediante una amplificación por PCR con cebadores que flanquean la región y posterior resolución de los fragmentos de diferentes tamaños por electroforesis. Estos marcadores presentan múltiples ventajas respecto a los ya utilizados SSR. Entre ellas se pueden mencionar la simplicidad del proceso y la visualización mediante geles de agarosa, sumado a la posibilidad de realizar PCR múltiples y correr varios InDel en un mismo gel y disminuir así el uso de reactivos y el tiempo de procesamiento.

Los marcadores funcionales están asociados a genes o QTLs ya identificados y pueden proporcionar información muy útil en la caracterización de nuevos materiales. En el grupo de trabajo se dispone de marcadores funcionales relacionados al tamaño y la forma del fruto. Estos marcadores funcionales fueron empleados, junto a los InDel, para complementar el estudio de las NILs obtenidas.

Luciani 2017 utilizó un total de 89 marcadores moleculares entre ellos los ya mencionados SSR, sumados a marcadores InDel y funcionales que permitieron identificar regiones silvestres adicionales en las NILs-CP como se muestra en la **Figura II-1**.



**Figura II-1.** Genotipado de las NILs-CP con un conjunto de 89 marcadores moleculares del tipo SSR, InDel y funcionales. Esquema representativo de la posición física de las introgresiones silvestres que posee cada NIL. A la izquierda se representan las 22 líneas y arriba los 12 cromosomas. Los círculos azules representan las introgresiones heterocigotas (CP) determinadas por los SSR para las cuales fue desarrollada la NIL; los círculos rojos representan las introgresiones adicionales en condición homocigota para los alelos silvestres provenientes de *S. pimpinellifolium* LA0722 (PP), determinadas por los marcadores InDel y funcionales; los círculos negros representan las introgresiones CP adicionales.

El programa de mejoramiento del grupo GMT tiene como objetivo principal la obtención de genotipos con larga VP y calidad de fruto, que son altamente apreciados en el mercado del tomate fresco. Para el tomate se ha demostrado que los métodos empleados después de la cosecha pueden disminuir las pérdidas (Raffo et al. 2012). Sin embargo, los frutos tratados químicamente no son bien aceptados por los consumidores. Por otro lado, las estrategias de mejoramiento para prolongar la VP en tomate se han

focalizado principalmente en mutaciones espontáneas que afectan la maduración, a través de la incorporación de genes larga vida a cultivares comerciales, o a partir de ingeniería genética, pero estas estrategias presentan la disminución de calidad de fruto o la baja aceptación en el mercado. Otra alternativa para extender la VP, como se mencionó en la introducción, es recurrir a las especies silvestres. El desarrollo de NILs tiene el potencial no solo de introducir variabilidad y mejorar el germoplasma élite, sino también de estudiar la contribución de genes silvestres o QTLs en un fondo genético apropiado. Las NILs desarrolladas a partir de un cruzamiento interespecífico constituyen una herramienta muy valiosa para la identificación y localización de QTLs y para ampliar la diversidad genética en el germoplasma cultivado. La exploración de introgresiones silvestres adicionales en las NILs desarrolladas hace posible el estudio de nuevas regiones genómicas o QTLs involucrados en la determinación de caracteres de interés como la VP con la posibilidad de derivar nuevas variedades comerciales.

## **Objetivos específicos**

- Caracterizar molecularmente los individuos de las 22 NILs de tomate con un conjunto de 89 marcadores moleculares.
- Establecer haplotipos en la colección de NILs.
- Analizar el efecto de las introgresiones silvestres adicionales sobre la VP de los frutos.

## Materiales y métodos

### ***Caracterización molecular de las 22 NILs***

Se realizó una caracterización molecular de las 22 NILs con el fin de genotipar las introgresiones silvestres adicionales. Para ello, se extrajo ADN genómico de hojas jóvenes de un promedio de 10 individuos de cada una de las 22 NILs en la segunda campaña de evaluación (2018-2019) utilizando un kit comercial (kit de purificación de ADN genómico Wizard® de Promega®). El ADN extraído se disolvió en buffer TE (Tris-Cl 10 mM pH 8,00, EDTA 1 mM) y la concentración final se ajustó a 40 ng/μL. La cantidad y calidad de ADN extraído se evaluó en geles de agarosa al 1 % por comparación con un estándar de ADN del fago lambda.

Se utilizaron múltiples tipos de marcadores moleculares. Además de los SSR utilizados durante el desarrollo de las NILs, se utilizaron 62 InDel desarrollados a partir de la secuencia del genoma de CAI y LA0722 (Cambiaso et al. 2019b) y cuatro marcadores funcionales para genes de tamaño de fruto: FW2.2 (Blanca et al. 2015), LC (Muños et al. 2011), FW3.2 (Chakrabarti et al. 2013) y FAS (Rodríguez et al. 2011). Los marcadores fueron seleccionados para cubrir todo el genoma del tomate. Los detalles de los marcadores usados se resumen en la **Tabla Suplementaria S1**.

Se utilizaron protocolos de PCR estándar para obtener productos de amplificación de los diferentes tipos de marcadores moleculares. En la reacción de PCR para los InDel, 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 hibridación y 1 min a 72 °C durante 32

ciclos, finalizando con un paso de elongación de 5 min a 72 °C. La temperatura de hibridación varió en un rango de 52 a 56 °C de acuerdo al InDel amplificado.

Las electroforesis de los marcadores InDel y funcionales se realizaron en geles de agarosa al 3 % p/v teñidos con SYBR® Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific®), mientras que los marcadores SSR se corrieron en geles de poliacrilamida al 6 % p/v teñidos mediante un kit de tinción con nitrato de plata comercial (Silver Sequence Staining Reagents, Promega®).

Se determinó el número promedio de introgresiones silvestres en cada NIL contabilizando aquellas introgresiones en condición homocigota para los alelos de LA0722 (PP) y en condición heterocigota (CP). Además, se calculó el porcentaje de germoplasma de CAI recuperado como:

$$\% \text{ GR} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \frac{n_{CC} \times 2 + n_{CP}}{n_{MM} \times 2} \times 100$$

donde % GR es el porcentaje de genoma cultivado recuperado en cada NIL, nCC el número de marcadores que fueron homocigotas para el alelo cultivado proveniente de CAI en el individuo i, nCP el número de marcadores que fueron heterocigotas para el individuo i, nMM el número total de marcadores evaluados en el individuo i y N es el número de individuos evaluados por cada NIL.

### ***Detección de QTLs de VP en haplotipos de las 22 NILs***

Con la evaluación fenotípica para VP y la caracterización molecular con 89 marcadores se prosiguió a evaluar el efecto de las introgresiones silvestres adicionales sobre este carácter. A partir de los datos obtenidos de la caracterización molecular se realizó análisis de coordenadas principales (ACoP). Por otro lado, los individuos de las 22 NILs se catalogaron en grupos de alta, media y baja VP. El ranking para VP se realizó a

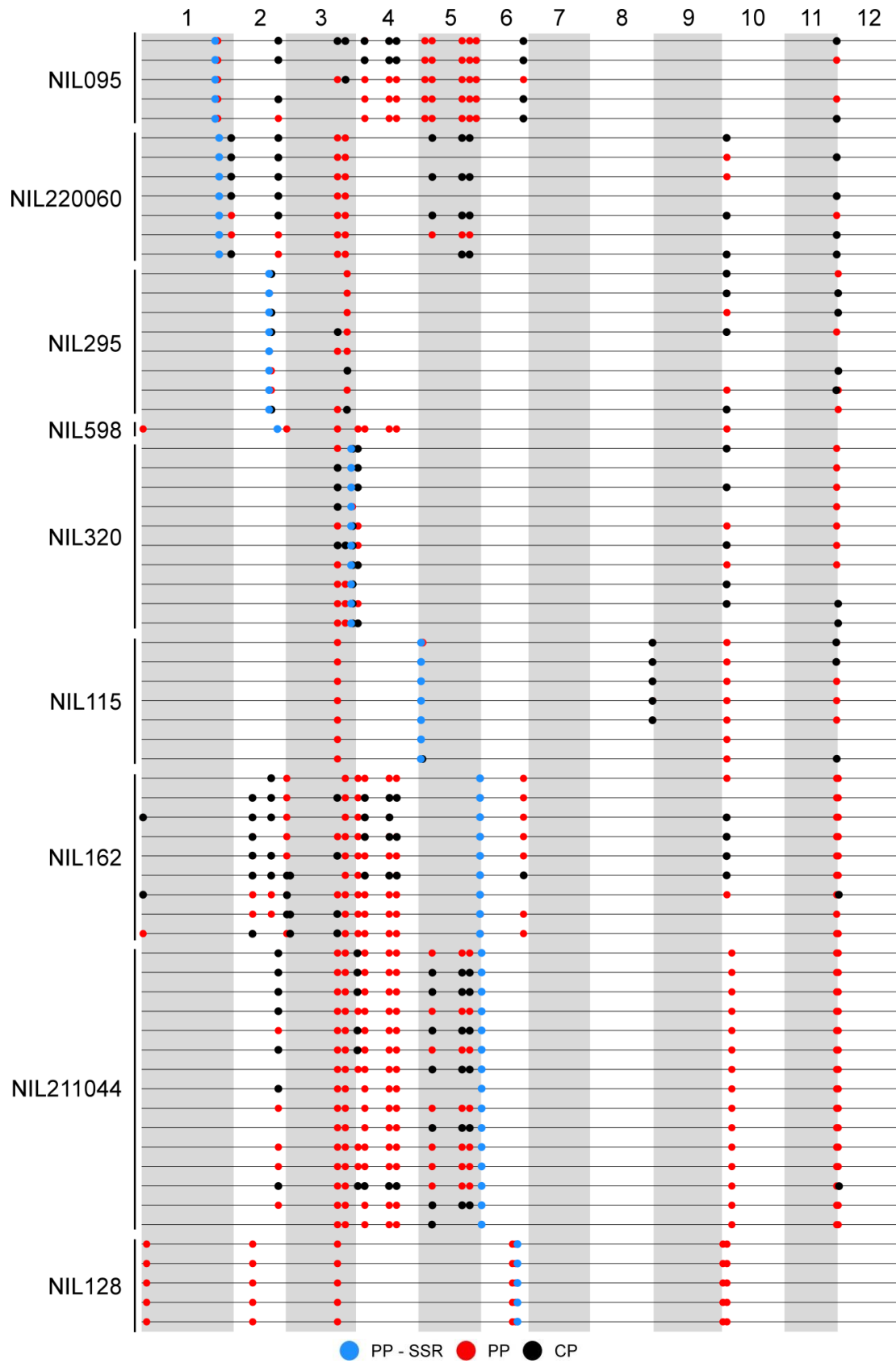
partir de los datos de cuartiles 1 y 3 (Q1 y Q3). Aquellos individuos con valores de VP por debajo del valor de Q1 fueron considerados de baja VP, entre Q1 y Q3 de media VP y por encima de Q3, de alta VP. La distribución de estos individuos se observó en el biplot del ACoP. Se analizaron los cromosomas cuyos marcadores agruparon con las NILs de alta VP y se evaluó el efecto de las introgresiones sobre la VP en esos cromosomas. En la colección de 22 NILs se identificaron los haplotipos, es decir, las agrupaciones físicas de variantes genómicas que se heredan juntas, que estaban presentes en esos cromosomas y se compararon entre sí mediante análisis no paramétrico Kruskal Wallis con un nivel de significancia del 5 %.

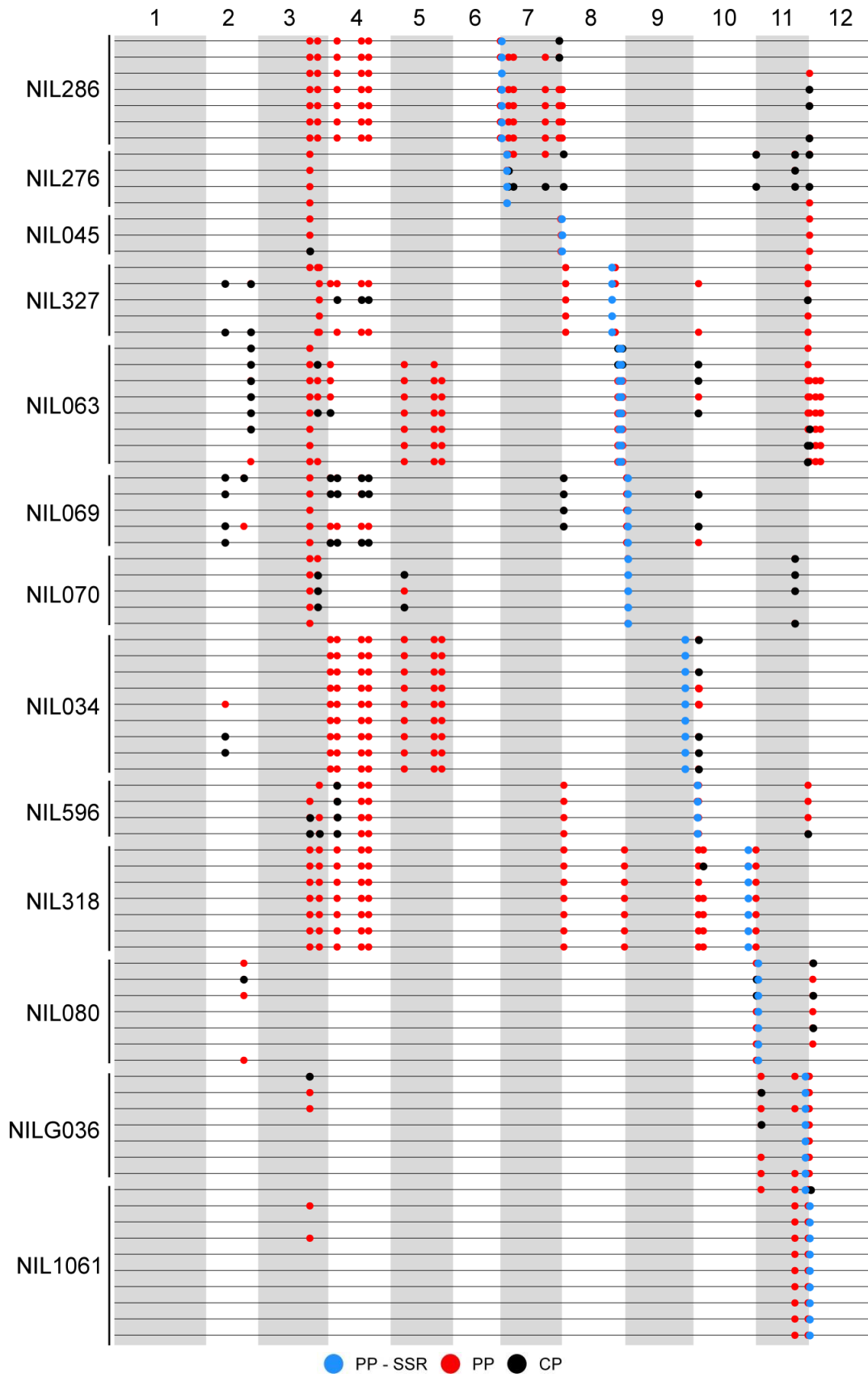
## Resultados

### **Caracterización molecular de las 22 NILs**

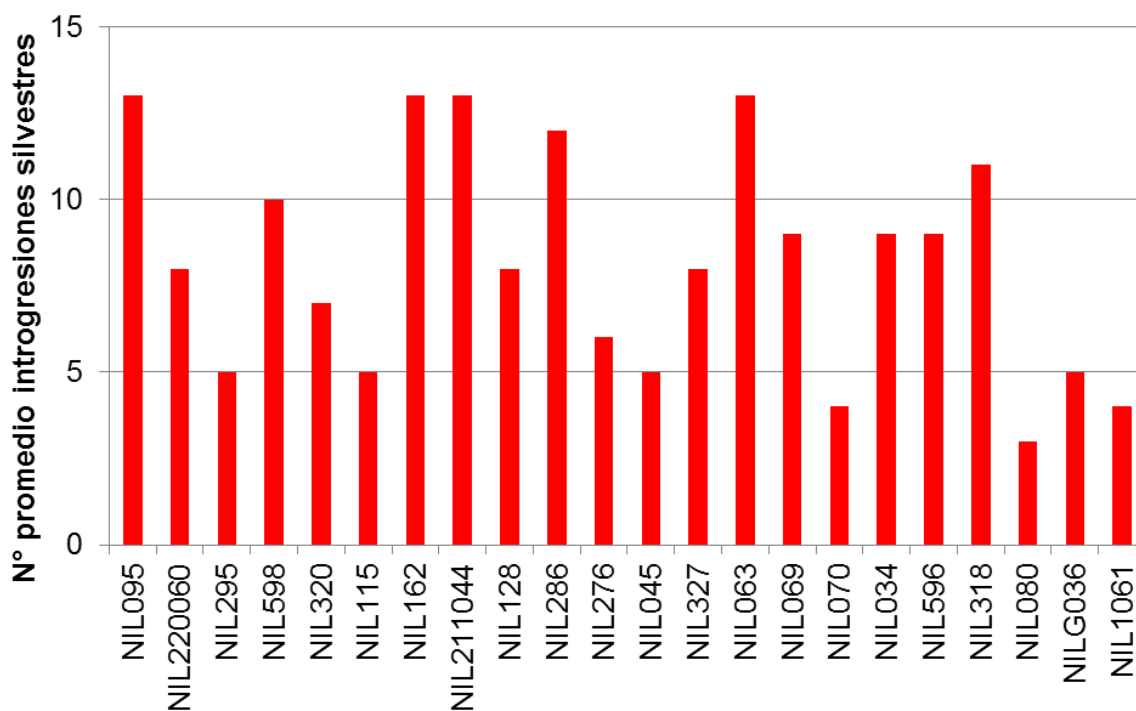
La caracterización molecular con el conjunto de 89 marcadores moleculares permitió determinar el genotipo de las introgresiones silvestres en los individuos de las 22 NILs. La **Figura II-2** muestra esa caracterización molecular donde se observa de manera esquemática la posición física de las introgresiones silvestres. Como se puede observar, las NILs presentan introgresiones silvestres adicionales a aquellas determinadas por los SSR para las cuales habían sido desarrolladas. Los círculos azules representan las introgresiones homocigotas para los alelos silvestres provenientes de *S. pimpinellifolium* LA0722 (PP) determinada por los SSR para las cuales fue desarrollada la NIL; los círculos rojos representan las introgresiones silvestres PP adicionales y los negros, las introgresiones silvestres adicionales en condición heterocigota (CP).

Considerando el total de introgresiones silvestres PP y CP, el número promedio de introgresiones silvestres por NIL varió entre 3 y 13 (**Figura II-3**). Por otro lado, el porcentaje del fondo genético cultivado recuperado varió entre 86,5 y 97,1 % (**Figura II-4**). La NIL con el menor número de introgresiones silvestres fue la NIL080, con un promedio de 3. Las otras NILs desarrolladas para el cromosoma 11 (NILG036 y NIL1061) también estuvieron dentro de las de menor número de introgresiones promedio. Por otro lado, la NIL095, NIL162, NIL211044 y NIL063 fueron las que presentaron el mayor número, con un promedio de 13.

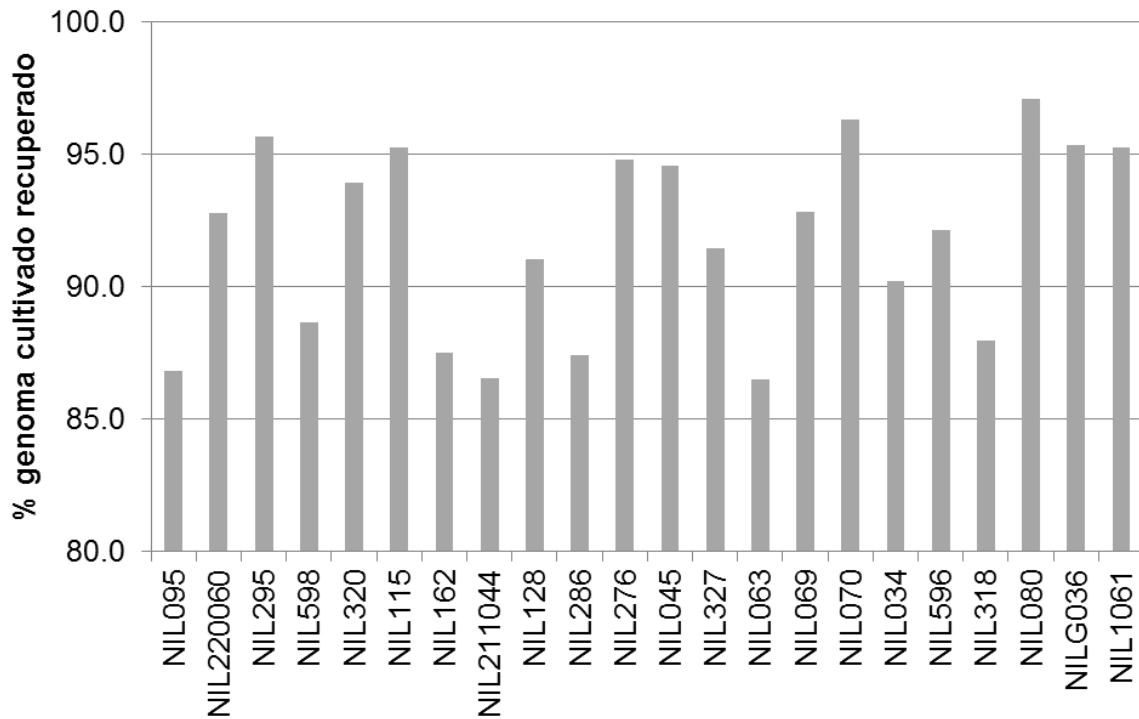




**Figura II-2.** Caracterización molecular de individuos de las 22 NILs basada en un conjunto de 89 marcadores moleculares de tipo SSR, InDel y funcionales. Esquema representativo de la posición física de las introgresiones silvestres. A la izquierda se representan las 22 líneas y arriba los 12 cromosomas. Los círculos azules representan las introgresiones homocigotas para los alelos silvestres provenientes de *S. pimpinellifolium* LA0722 (PP) determinada por los SSR para las cuales fue desarrollada la NIL; los círculos rojos representan las introgresiones silvestres PP adicionales y los negros, las introgresiones silvestres adicionales en condición heterocigota (CP).



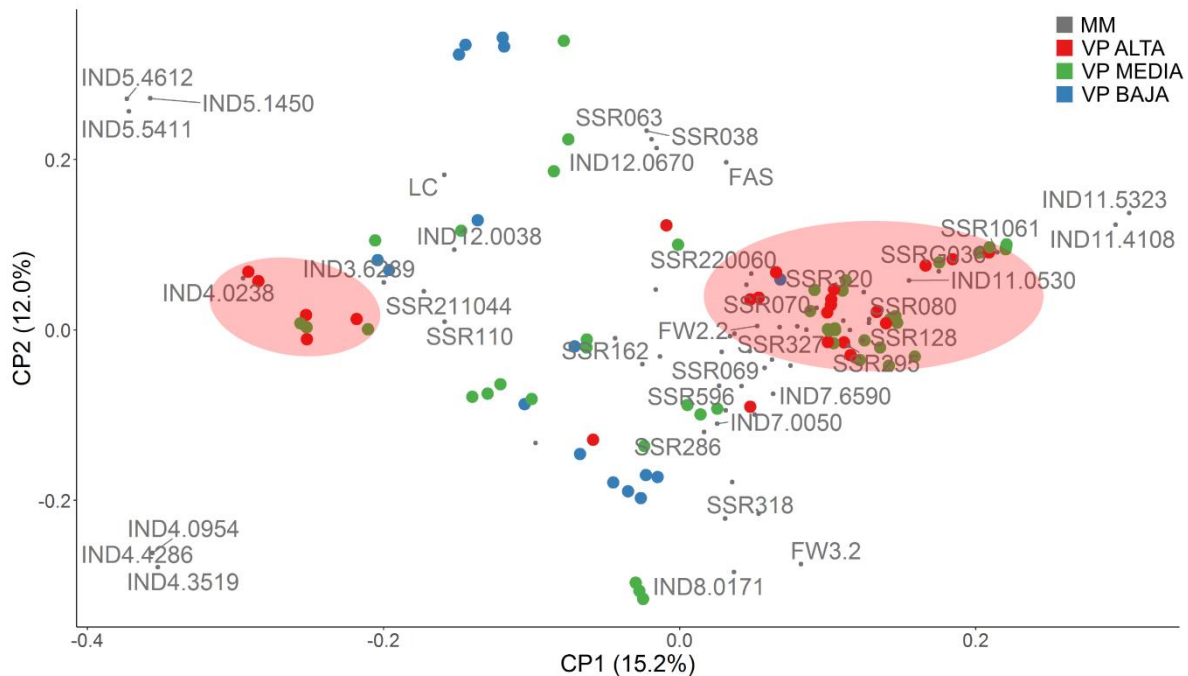
**Figura II-3.** Número promedio de introgresiones silvestres (en condición homocigota o heterocigota) en cada NIL.



**Figura II-4.** Porcentaje del genoma cultivado recuperado en cada NIL.

***Análisis de QTLs de VP para haplotipos en las 22 NILs***

El ACoP mostró que las dos primeras coordenadas principales explicaron un 27,2 % de la variación total (**Figura II-5**). La coordenada principal 1 fue la que mostró un agrupamiento de las NILs de alta VP en dos grupos como se marcan en elipses rosas en la **Figura II-5**. Esta coordenada principal 1 presentó una contribución mayoritaria por parte de marcadores localizados en los cromosomas 4, 5 y 11.



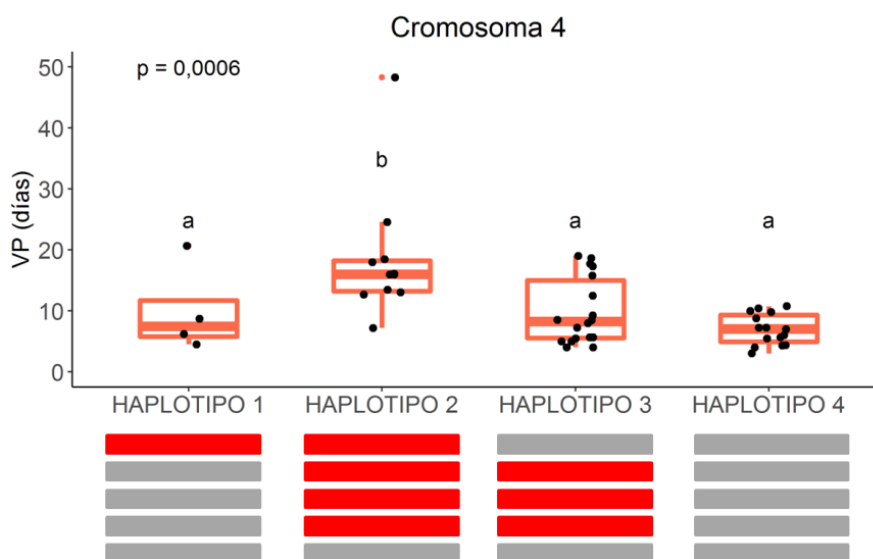
**Figura II-5.** Análisis de coordenadas principales a partir de la caracterización molecular con el conjunto de 89 marcadores moleculares. En color se muestra la disposición de los individuos de las NILs según alta, media y baja vida poscosecha (VP). Puntos grises indican los marcadores moleculares. Elipses rosas marcan el agrupamiento para NILs de alta VP. CP, coordenada principal.

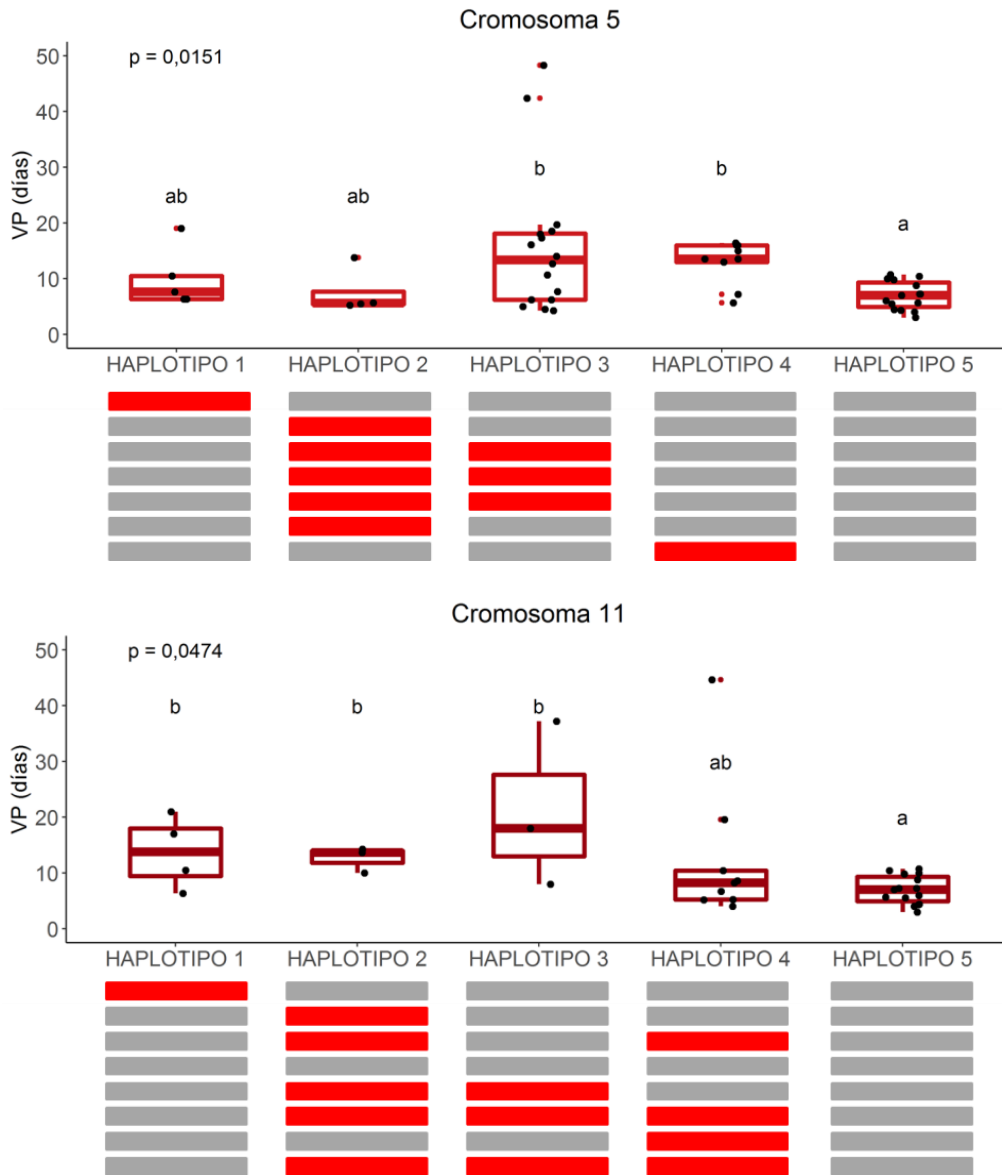
Se observó una asociación a VP para introgresiones silvestres en los cromosomas 4, 5 y 11 con un efecto positivo sobre este carácter. En la **Figura II-6** se observan con letras diferentes las diferencias significativas entre los diferentes haplotipos ( $p < 0,05$ ). Los haplotipos se esquematizan a partir de sus introgresiones silvestres en cada cromosoma: en rojo se muestran las regiones homocigotas para los alelos de LA0722 de *S. pimpinellifolium* y en gris, las homocigotas para los alelos de *S. lycopersicum*.

Para el cromosoma 4, el haplotipo 2 se diferenció significativamente del haplotipo 4 cultivado, mientras que los haplotipos 1 y 3 no lo hicieron. Analizando las introgresiones silvestres en cada haplotipo fue posible delimitar una región en el cromosoma 4 como la

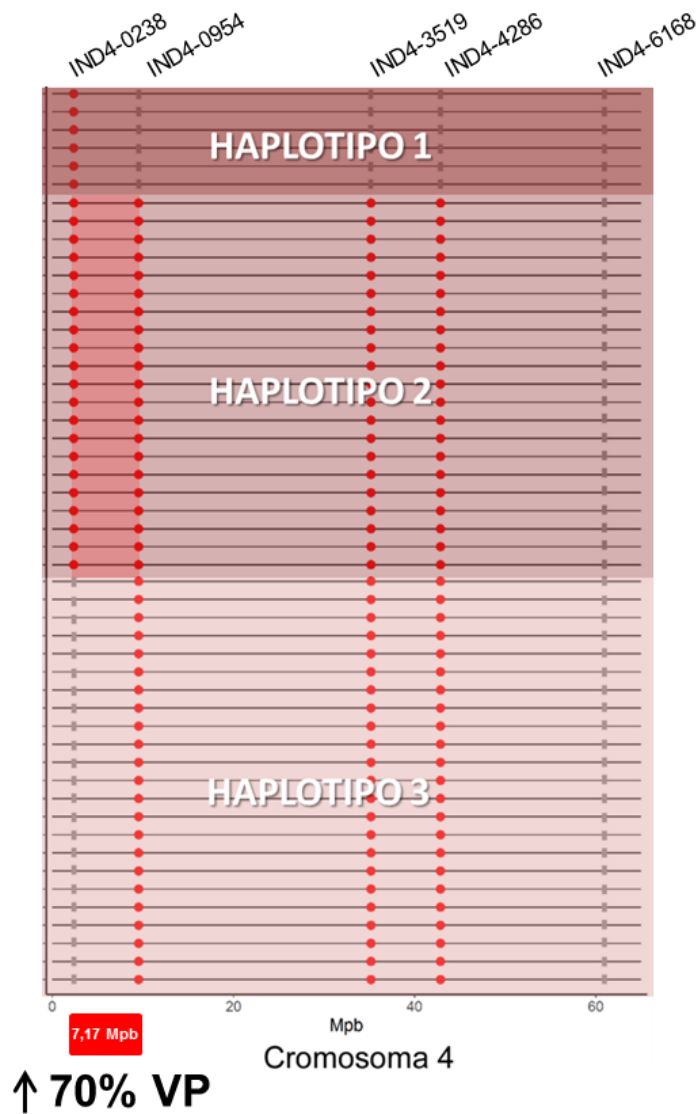
responsable del incremento significativo en la VP. En la **Figura II-7** se detalla la caracterización molecular en los individuos correspondientes a los tres haplotipos del cromosoma 4 que presentan introgresiones silvestres. Como se puede observar, el haplotipo 2 presenta una introgresión silvestre exclusiva de 7,17 Mpb comprendida entre los marcadores IND4-0238 (SL4.0ch04:2.413.372) e IND4-0954 (SL4.0ch04:9.580.217), que está ausente en los haplotipos 1 y 3. Esta región destacada en color rojo en la parte superior del cromosoma 4 incrementó la VP en un 70 %.

Por otro lado, la VP de los haplotipos 3 y 4 del cromosoma 5 y los haplotipos 1, 2 y 3 del cromosoma 11 fue significativamente mayor respecto al haplotipo cultivado (**Figura II-6**). Sin embargo, no fue posible delimitar una única región asociada a esta suba.





**Figura II-6.** Asociaciones a vida poscosecha (VP) en los cromosomas 4, 5 y 11. Boxplots para VP de los diferentes haplotipos. Letras diferentes muestran diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Debajo se esquematizan los cromosomas con las introgresiones silvestres que caracterizan a cada haplotipo. En rojo se muestran las regiones homocigotas para los alelos de LA0722 de *S. pimpinellifolium* (PP) y en gris, las homocigotas para los alelos de *S. lycopersicum* (CC).



**Figura II-7.** Esquema de la caracterización molecular en los individuos correspondientes a los tres haplotipos del cromosoma 4 que presentan introgresiones silvestres. Los tres haplotipos se diferencian en tonos rosas. Los círculos rojos representan las introgresiones homocigotas para los alelos silvestres provenientes de *S. pimpinellifolium* LA0722 (PP) y las líneas grises, las regiones genómicas en condición homocigota para los alelos cultivados provenientes de *S. lycopersicum* cv. Caimanta (CC). Los marcadores InDels utilizados se indican en la parte superior. En rojo se destaca una región de 7,17 Mpb que incrementó la VP en un 70 %.

## Discusión

La caracterización molecular con el conjunto de 89 marcadores moleculares permitió genotipar y determinar la localización de las introgresiones silvestres en los individuos de las 22 NILs (**Figura II-2**). La mayor cobertura del genoma con nuevos marcadores moleculares permitió encontrar introgresiones silvestres adicionales. Algunas de las nuevas introgresiones resultaron extensas abarcando varios marcadores contiguos, e incluso se reveló que en varias NILs los segmentos determinados por los SSR comprendían marcadores adyacentes.

La presencia de introgresiones silvestres adicionales en el desarrollo de NILs ha sido reportada por varios autores (Eichten et al. 2011; Pea et al. 2013) quienes afirmaron la importancia de controlar el fondo genético durante el procedimiento de introgresión para garantizar la homogeneidad del genoma recurrente en el fondo genético de las NILs. No obstante, como se determinó a partir de estos análisis moleculares, estas NILs tienen una alta proporción del genoma cultivado (mayor al 86 %) y, a su vez, una baja frecuencia de alelos silvestres con efectos indeseables sobre caracteres agronómicos observados en el fenotipo.

Estas líneas resultan útiles en los estudios de QTLs involucrados en la determinación de caracteres de interés. A diferencia de la presencia de una única introgresión por línea en una población de líneas de introgresión (ILs), la presencia de múltiples introgresiones en una NIL permite el estudio de las interacciones genéticas que regulan caracteres complejos. La población de NILs proporciona un complemento sinérgico a la población ILs (Eshed y Zamir 1994), un recurso adicional para vincular QTLs identificados en las ILs con genes, ya que varias NILs poseen introgresiones superpuestas más pequeñas dentro de las regiones de introgresión más grandes que pueden tener las ILs. Enfocados en el mejoramiento para larga VP, se determinó que

marcadores en los cromosomas 4, 5 y 11 agruparon con NILs de alta VP y se identificaron diferentes haplotipos en la colección de NILs para dichos cromosomas, donde se pudo comprobar la asociación con efecto positivo de las introgresiones silvestres. Ciertamente, la selección fenotípica para larga VP ha seleccionado, a su vez, regiones en dichos cromosomas que están asociadas a este carácter. En la colección de NILs esto se evidenció claramente en el cromosoma 4, que a pesar de no contar con ningún SSR durante el proceso de selección por SAM, resultó con una alta proporción de introgresiones silvestres adicionales. En la parte superior de este cromosoma fue posible delimitar una región de interés de 7,17 Mpb que incrementó la VP en un 70 % en comparación con el haplotipo cultivado. En dicha región del cromosoma han sido identificados 4 genes candidatos involucrados en la maduración en tomate. Un factor de transcripción de respuesta a etileno (*Solyc04g009450*) con influencias en la acumulación de pigmentos se encontró diferencialmente expresado en el estado maduro de la mutante *Never-ripe* respecto de Ailsa Craig (Guo et al. 2022). Otro estudio reciente ha observado la expresión diferencial de este gen entre los estados verde maduro y rojo maduro mientras investigaban el efecto de la acumulación de antocianinas durante la maduración (Xu et al. 2022). Por otro lado, estudios de genes relacionados con la maduración regulados tanto por RIN como por RIN-MC han encontrado una poligalacturonasa (PG, *Solyc04g015530*) involucrada en la remodelación de la pared celular en esta región del cromosoma 4 (Li et al. 2018).

## Conclusiones parciales

- Una caracterización molecular más completa reveló que las líneas obtenidas conservaban aún diversas introgresiones adicionales provenientes de *S. pimpinellifolium* LA0722.
- La caracterización molecular permitió definir haplotipos en todos los cromosomas y constatar que varias NILs poseen introgresiones superpuestas.
- Las asociaciones a VP de las introgresiones silvestres localizadas en los cromosomas 4, 5 y 11 prolongaron la VP en comparación con el haplotipo cultivado.

## **Capítulo III**

**Estudios ómicos en líneas casi isogénicas de tomate que discrepan para calidad de fruto con el fin de identificar genes involucrados en la maduración**

## Antecedentes

La maduración del fruto requiere la sincronización precisa de varios procesos independientes que provocan el cambio de color desencadenado por la degradación de la clorofila y la acumulación de pigmentos, la mejora del sabor como resultado de la producción de azúcares, ácidos y compuestos volátiles, y el ablandamiento del fruto promovido por la remodelación de la pared celular. Muchos estudios se han focalizado en mutaciones espontáneas en factores de transcripción como *rin*, *nor* y *Cnr* que retardan la maduración de los frutos (Wang et al. 2020). Sin embargo, estas mutaciones tienen efectos indeseables en la calidad del fruto. Otros enfoques que retrasan la maduración de los frutos se han dirigido a proteínas de modificación de la pared celular en tomates transgénicos que carecen de aceptación por parte de los consumidores y tienen que lidiar con las legislaciones de diferentes países. Por lo tanto, las NILs con introgresiones silvestres de *S. pimpinellifolium* LA0722 representan una oportunidad para estudiar la maduración de fruto y desarrollar, a su vez, variedades larga vida que eviten la ingeniería genética o los efectos pleiotrópicos indeseables causados por introgresiones de genes mutantes. En nuestra colección se destacaron ocho NILs por su larga VP y mayor firmeza, mostrando un aumento significativo en comparación con el progenitor cultivado. Entre ellas, NIL115 lleva una introgresión homocigota silvestre (SL4.0ch05:2.779.337) que se asoció con frutos más firmes y una mayor VP (**Figura I-5**). Por otro lado, NIL080 presentó un QTL para F (**Figura I-5**) y un QTL para VP en el que la introgresión en condición heterocigota (SL4.0ch11:2.309.947) retrasa la maduración de los frutos (Luciani 2017). Además, la NIL080 fue de las NILs con mayor tamaño de fruto (**Figura I-7**) y con el menor número de introgresiones silvestres, con un promedio de 3 (**Figura II-3**). Con base en estas características fenotípicas, se seleccionaron las NIL115 y NIL080 para una

investigación más exhaustiva del papel de las introgresiones provenientes de LA0722 en la maduración del fruto a través de estudios transcriptómicos y proteómicos.

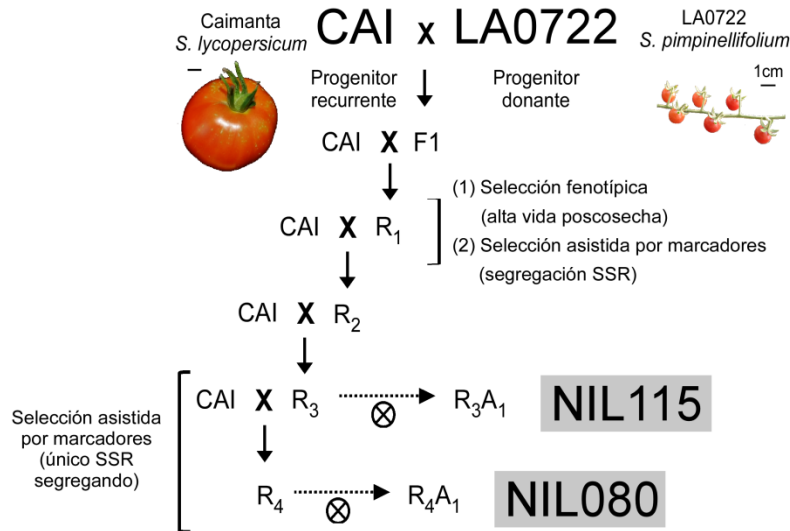
## **Objetivos específicos**

- Caracterizar y comparar el transcriptoma y el proteoma de NILs que discrepan para caracteres de calidad de fruto.
- Integrar la información de las aproximaciones ómicas con el fin de identificar genes candidatos involucrados en la maduración de fruto.
- Proponer un modelo de genes con potencial efecto en la maduración de tomate.

## Materiales y métodos

### *Material vegetal*

En este estudio se utilizaron las NILs resaltadas en gris en la **Figura III-1**. La NIL115 cuenta con la introgresión SSR silvestre homocigota (PP) en SSR115 (SL4.0ch05:2.779.337) mientras que la NIL080 posee una introgresión PP en SSR080 (SL4.0ch11:2.309.947). En una nueva campaña de evaluación, individuos de esta NILs fueron evaluados a partir de distintos enfoques que incluyeron evaluación fenotípica, genómica, transcriptómica y proteómica, que se utilizaron para un análisis integral sobre la maduración de fruto. Para ello, se recolectó tejido de pericarpio de un solo fruto de tres plantas diferentes por genotipo (tres réplicas biológicas) en dos estados de madurez: verde maduro (VM) y rojo maduro (RM). El número total de frutos por genotipo fue de seis. El estado VM corresponde al final de la expansión celular, cuando el crecimiento del fruto se detiene y los frutos comienzan a madurar, mientras que el RM corresponde al fruto que ha alcanzado el color de la madurez (Giovannoni 2004). Las comparaciones se realizaron entre estos dos estados de madurez por genotipo.



**Figura III-1.** Esquema del material vegetal seleccionado. Las NILs resaltadas en gris fueron seleccionadas para un análisis integral sobre la maduración de fruto.

### ***Enfoques fenotípico y genómico***

Seis individuos de la NIL115 y 10 individuos de la NIL080 fueron caracterizados fenotípicamente a partir de los 13 caracteres de calidad de fruto siguiendo la metodología especificada en el capítulo I. En esta misma campaña se evaluaron los progenitores (CAI y LA0722) como testigos. Para el análisis genómico, se caracterizaron molecularmente los individuos de las dos NILs con los 89 marcadores moleculares como se especificó en el capítulo II.

### ***Enfoque transcriptómico: perfiles de expresión por ADNc-AFLP***

Las muestras utilizadas correspondieron al pericarpio congelado de tres réplicas biológicas por NIL en los estados de madurez VM y RM. El ARN total se extrajo con *TriPure Isolation Reagent* según las instrucciones del fabricante (Roche, Basilea, Suiza). Brevemente, se mezclaron 500 mg de pericarpio molido con 1 mL de reactivo de

aislamiento *TriPure*. Se añadió un volumen de cloroformo y se separó la fase acuosa que contenía el ARN. El ARN finalmente se precipitó con 0,5 mL de isopropanol.

La síntesis de ADNc para obtener perfiles de ADNc-AFLP se realizó de acuerdo con Pereira da Costa et al. (2018). La primera y la segunda hebra de ADNc se obtuvieron a partir de 1 µg de ARN total. La digestión se realizó utilizando las enzimas de restricción *ApoI* y *MseI* (Vos et al. 1995). Las secuencias de los adaptadores, las condiciones de ligación y amplificación se llevaron a cabo siguiendo el protocolo propuesto por Vuylsteke et al. (2007). Se realizó una preamplificación utilizando secuencias de cebadores sin base selectiva al final (+0). Para la amplificación selectiva, se usaron secuencias de cebadores que terminaron con una base selectiva (+1) en cuatro combinaciones (**Tabla Suplementaria S2**). Los productos de amplificación selectiva se separaron en geles de poliacrilamida al 6 % p/v funcionando a 50 W durante 3 h y se visualizaron mediante tinción con plata (Silver Sequence Staining Reagents, Promega®).

La identificación de los fragmentos derivados de la transcripción (TDF) se realizó sobre la base de su patrón de expresión diferencial. Se consideró la presencia o ausencia de un TDF cuando dos o más réplicas biológicas presentaron banda o no, respectivamente. Las comparaciones se realizaron entre los estados VM y RM en cada NIL. Se calculó el número total de TDF y TDF polimórficos por estado de madurez.

Los TDF se cortaron, eluyeron y volvieron a amplificar para secuenciarlos en función de la expresión diferencial observada entre los estados de madurez. La secuenciación se llevó a cabo utilizando los servicios de MacroGen Inc. (Corea). El análisis secuenciado se realizó a través de la herramienta BLASTn (SOLGENOMICS 2022) usando las bases de datos Tomato Genome CDS (ITAG versión 4.0) y *S. pimpinellifolium* CDS LA1589.

### ***Enfoque proteómico: cuantificación proteica libre de etiquetas***

Se llevó a cabo una cuantificación libre de etiquetas (LFQ, por sus siglas en inglés *label-free quantification*). Para este experimento se utilizó el mismo tejido que en el enfoque transcriptómico descrito en el material vegetal. Aquí también incluimos los genotipos parentales (CAI y LA0722) que fueron utilizados como testigos y en los que se realizaron las comparaciones entre los estados VM y RM.

Las proteínas se extrajeron de 1 g de pericarpio por combinación de genotipo-estado de madurez según Wu et al. (2014). En este experimento se utilizaron tres réplicas biológicas. Los precipitados proteicos se disolvieron en 60  $\mu$ L de urea 6 M y CHAPS al 1 % p/v. La concentración de proteínas totales se cuantificó mediante absorbancia a 280 nm y densitometría en gel después del procedimiento de extracción. Un total de 24 muestras (**Tabla III-1**) fueron enviadas al Centro de Proteómica de CEQUIBIEM (Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina) para digestión de proteínas y análisis de espectrometría de masas (MS). Cada muestra se redujo con DTT 20 mM durante 45 min a 56 °C, se alquiló con yodoacetamida 50 mM durante 45 min en la oscuridad y se digirió con tripsina durante 8 hs. La extracción de péptidos se realizó con acetonitrilo y la limpieza de sal se realizó a través de Zip-Tip C18 (Merck). Los péptidos desalados se analizaron mediante nanocromatografía líquida de alta resolución (EASY-nLC 1000, Thermo Scientific®) acoplada a un espectrómetro de masas de tecnología Orbitrap (Q-Exactive, celda de disociación de alta colisión y analizador Orbitrap, Thermo Scientific®). La ionización de péptidos se realizó mediante electropulverización (Easy Spray, Thermo Scientific®) a 2,5 kV.

Los espectros obtenidos se analizaron utilizando el programa Proteome Discoverer 2.2 (Thermo Scientific®). La búsqueda se realizó utilizando una tolerancia de masa para precursores de 10 ppm y una tolerancia de masa para fragmentos de 0,05 Da con una tasa de descubrimiento falso del 1 %. A continuación, se seleccionó la enzima tripsina y

se permitieron hasta dos escisiones erróneas. Como modificación dinámica se usó la oxidación sobre metionina y la carbamidometilación sobre cisteína se usó como modificación estática. Para la identificación de proteínas, se realizaron búsquedas contra la base de datos de *Solanum lycopersicum* cv. Heinz 1706 (UniProt, referencia del proteoma: [UP000004994](#)). Los datos de proteómica de MS se depositaron en el Consorcio ProteomeXchange a través del repositorio PRIDE (Perez-Riverol et al. 2022) bajo el identificador [PXD036132](#).

Las intensidades de proteína se transformaron con la función logaritmo. La imputación de los valores de intensidad  $\text{Log}_2$  se llevó a cabo utilizando una distribución normal desplazada hacia abajo con un ancho de 0,3 y un desplazamiento hacia abajo de 1,8 para cada muestra. La abundancia relativa de péptidos en las etapas de maduración se comparó con el software R (versión 3.6.3). Brevemente, se utilizó el análisis empírico de Bayes del paquete *Bioconductor limma* para obtener las proteínas expresadas diferenciales (DEPs) entre los dos estados de madurez (VM versus RM) en cada genotipo (Gentleman et al. 2004). Se estableció un valor de  $p < 0,05$  y valores de  $\text{Log}_2$  del cambio ( $\text{Log}_2$  FC, por sus siglas en inglés *fold change*) por encima de 1 o por debajo de -1 para determinar un aumento significativo de proteínas abundantes en las etapas VM o RM. Se realizó un análisis de enriquecimiento de ontología génica (GO) para todas las DEPs por genotipo utilizando el programa agriGO v2.0 (Tian et al. 2017) utilizando las siguientes condiciones: la especie *Solanum lycopersicum*, tipo *Plant GO Slim* y referencia *Transcript ID* (versión ITAG4.0).

**Tabla III-1.** Muestras de tejido vegetal recolectadas de pericarpio de fruto de 4 genotipos (CAI, LA0722, NIL115, NIL080) en dos estados de madurez (VM, verde maduro y RM, rojo maduro) y tres réplicas biológicas (R1, R2 y R3).

<b>Genotipo</b>	<b>Estado de madurez</b>	<b>Réplica biológica</b>
CAI	VM	R1
		R2
		R3
	RM	R1
		R2
		R3
LA0722	VM	R1
		R2
		R3
	RM	R1
		R2
		R3
NIL115	VM	R1
		R2
		R3
	RM	R1
		R2
		R3
NIL080	VM	R1
		R2
		R3
	RM	R1
		R2
		R3

### ***Integración de las aproximaciones ómicas***

Se utilizó la información recolectada de las diferentes aproximaciones ómicas para plantear un modelo de genes involucrados en la maduración de tomate. El análisis de GO se utilizó para filtrar e identificar las DEPs involucradas en la maduración a partir de los términos GO relacionados a dicho proceso. De las DEPs identificadas se analizó si su regulación se encontraba incrementada en el estado VM, en el RM o era invariante en

cada genotipo. Este análisis también se realizó en los progenitores para comparar si el patrón de expresión observado en las NILs coincidía con alguno de ellos o era diferencial. A partir del patrón de regulación observado y de la funcionalidad de los genes determinados se analizó el efecto positivo o negativo de cada uno de ellos sobre la maduración. Por otro lado, se evaluó la localización de los genes y proteínas diferencialmente expresadas y se comparó con la localización de las introgresiones silvestres identificadas a partir del análisis genómico.

## Resultados

### **Análisis fenotípico**

Los valores medios y sus errores estándar se muestran en la **Tabla III-2** para los 13 caracteres de calidad de fruto en las dos NILs seleccionadas (NIL115 y NIL080) y sus progenitores (CAI y LA0722). En la **Figura III-2** se resume el fenotipado basado en estos 13 caracteres para los cuatro genotipos. Los valores graficados corresponden a valores estandarizados según el mínimo y máximo valor por carácter en una escala de 0 - 1. En líneas rojas se muestran los valores de cada genotipo y en fondo color gris, los valores de CAI, progenitor contra el cual se hicieron las comparaciones.

Los genotipos parentales, CAI y LA0722, presentaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para todos los caracteres, excepto para índice de color a/b y pH. CAI se caracterizó por presentar los valores más altos en caracteres de tamaño (D, A y P). LA0722 presentó frutos redondos (Forma =  $0,93 \pm 0,01$ ), más pequeños ( $0,74 \pm 0,04$  g de P) mientras que CAI mostró frutos aplanados (Forma =  $0,72 \pm 0,01$ ) más pesados ( $76,89 \pm 7,47$  g de P). LA0722 mostró valores más altos para características de calidad como VP ( $15,19 \pm 3,07$  días), F ( $57,33 \pm 1,53$ ), CSS ( $9,10 \pm 0,65$  °Brix) y AT ( $0,96 \pm 0,14$  g de ácido cítrico y málico/100 g de jugo homogeneizado).

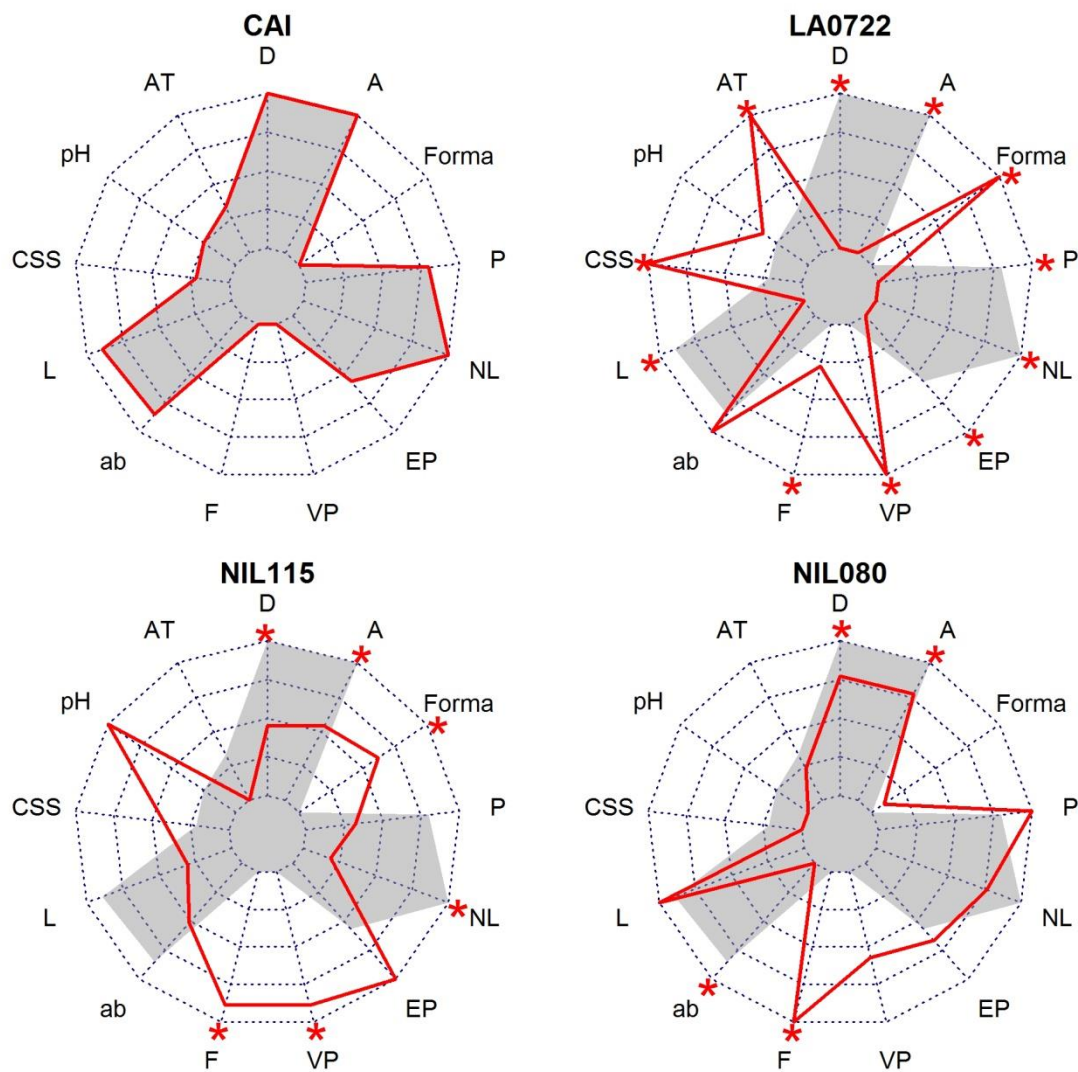
Con respecto a las NILs, ninguna mostró diferencias para P en comparación con CAI. Además, la NIL080 presentó tamaño y morfología similar a CAI (Forma y NL). Ambas NILs exhibieron frutos carnosos ( $0,67 \pm 0,09$  cm y  $0,47 \pm 0,02$  cm de EP para NIL115 y NIL080, respectivamente), también sin diferencias con respecto a CAI. En cuanto a VP, la NIL115 mostró diferencias con CAI ( $4,50 \pm 1,61$  días para CAI vs  $14,00 \pm 1,38$  días para NIL115). Por otro lado, ambas NILs presentaron frutos significativamente más firmes que CAI. Para el índice de color a/b, NIL080 exhibió un valor medio negativo y fue diferente a CAI.

**Tabla III-2.** Valores medios y errores estándar para los 13 caracteres de calidad de NIL115, NIL080 y sus progenitores (CAI y LA0722).

Caracteres	Progenitores		NILs	
	CAI	LA0722	NIL115	NIL080
<b>D</b>	7,27 ± 0,18	1,24 ± 0,03*	3,96 ± 0,37*	5,89 ± 0,27*
<b>A</b>	5,18 ± 0,20	1,14 ± 0,03*	3,32 ± 0,27*	4,26 ± 0,14*
<b>Forma</b>	0,72 ± 0,01	0,93 ± 0,01*	0,85 ± 0,03*	0,74 ± 0,01
<b>P</b>	76,89 ± 7,47	0,74 ± 0,04*	31,64 ± 8,76	96,21 ± 10,54
<b>NL</b>	8,87 ± 0,44	2,06 ± 0,03*	3,34 ± 0,67*	7,25 ± 0,58
<b>EP</b>	0,41 ± 0,04	0,075 ± 0,01*	0,67 ± 0,09	0,47 ± 0,02
<b>VP</b>	4,50 ± 1,61	15,19 ± 3,07*	14,00 ± 1,38*	10,60 ± 1,97
<b>F</b>	42,12 ± 2,85	57,33 ± 1,53*	90,97 ± 6,14*	97,90 ± 2,24*
<b>a/b</b>	0,88 ± 0,02	1,08 ± 0,11	0,42 ± 0,62	-0,27 ± 0,02*
<b>L</b>	55,98 ± 8,83	39,49 ± 0,98*	45,07 ± 14,11	58,02 ± 0,90
<b>CSS</b>	5,78 ± 0,44	9,10 ± 0,65*	6,67 ± 0,37	4,87 ± 0,13
<b>pH</b>	4,41 ± 0,12	4,46 ± 0,07	4,77 ± 0,20	4,29 ± 0,11
<b>AT</b>	0,52 ± 0,08	0,96 ± 0,14*	0,30 ± 0,00	0,45 ± 0,04

D: diámetro (cm); A: altura (cm); Forma (A/D); P: peso (g); NL: número de lóculos; EP: espesor de pericarpio (cm); VP: vida poscosecha (días); F: firmeza; a/b y L: índice de color CIELAB; CSS: contenido de sólidos solubles (°Brix); AT: acidez titulable (g ácido cítrico y málico/100 g de jugo homogenizado).

Asteriscos muestran diferencias significativas con CAI (Prueba de Dunnett,  $p < 0,05$ ).

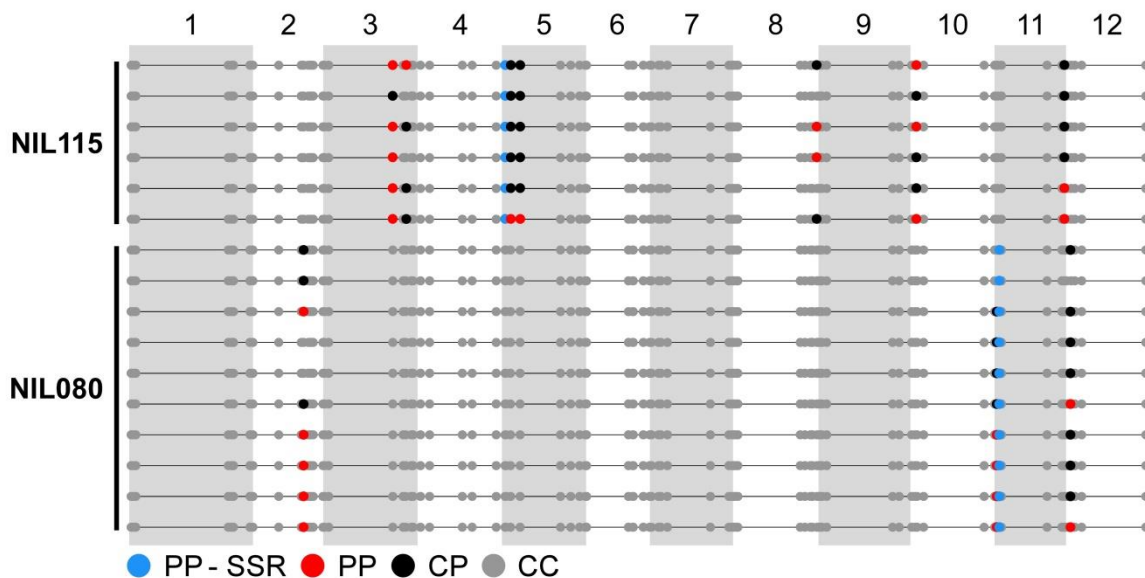


**Figura III-2.** Fenotipado basado en los 13 caracteres de calidad de fruto en la NIL115, la NIL080 y sus progenitores (CAI y LA0722). Los círculos corresponden a una escala de 0 - 1 de valores estandarizados según el mínimo y máximo valor por carácter fenotípico. El color gris de fondo indica los valores de CAI y las líneas rojas, los valores de cada genotipo. Los asteriscos muestran diferencias significativas con CAI (Prueba de Dunnett,  $p < 0,05$ ). D, diámetro; A, altura; P, peso; NL, número de lóculos; EP: espesor del pericarpio; VP, vida poscosecha; F, firmeza; a/b, índice de color a/b; L, índice de color L; CSS, contenido de sólidos solubles; AT, acidez titulable.

### **Análisis genómico de las NILs**

En ambas NILs se revelaron introgresiones silvestres adicionales a las que habían sido determinadas por el conjunto de SSR durante el desarrollo (**Figura III-3**). En promedio, la NIL115 tuvo siete introgresiones adicionales mientras que NIL080, solo tres. Un 3,93 % del genoma de la NIL115 presentaba introgresiones silvestres homocigotas (PP) mientras que un 4,31 % eran heterocigotas (CP). En la NIL080, un 2,36 % del genoma era PP y un 1,57 % era CP.

Los segmentos determinados por los marcadores SSR comprendieron InDels adyacentes. Junto al SSR115 (SL4.0ch05:2.779.337) se encontraron introgresiones silvestres en el IND5-0325 (SL4.0ch05:3.300.671) y el IND5-0697 (SL4.0ch05:7.037.638) para la NIL115. Cerca del SSR080 (SL4.0ch11:2.309.947), el IND11-0017 (SL4.0ch11:186.598) segregó en individuos de la NIL080. Ambas NILs también tenían introgresiones adicionales localizadas en otros cromosomas. La NIL115 presentó dos introgresiones silvestres en la base del cromosoma 3 (IND3-5470, SL4.0ch03:49.258.124 y FW3.2, SL4.0ch03:59.219.937), y una en cada uno de los siguientes cromosomas: 8 (IND8-6582, SL4.0ch08:63.974.144), 10 (IND10-0429, SL4.0ch10:4.087.865) y 11 (FAS, SL4.0ch11:52.946.405). Por otro lado, la NIL080 mostró una introgresión adicional en la base del cromosoma 2 (IND2-3976, SL4.0ch02:37.775.679) y una en la parte superior del cromosoma 12 (IND12-0379, SL4.0ch12:3.831.421).

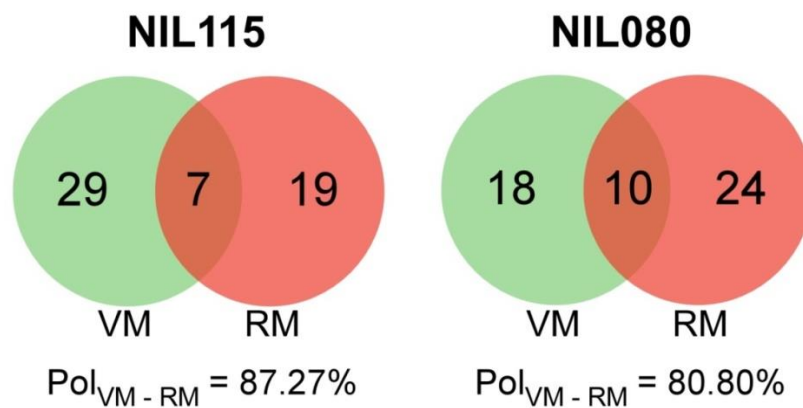


**Figura III-3.** Representación esquemática del análisis genómico basado en 89 marcadores moleculares en individuos de la NIL115 y la NIL080. Los números de cromosomas se muestran en la parte superior. Los círculos grises corresponden a las regiones genómicas en condición homocigota para los alelos del padre cultivado *S. lycopersicum* cv. Caimanta (CC); los círculos azules representan las introgresiones homocigotas para los alelos silvestres provenientes de *S. pimpinellifolium* LA0722 (PP) determinada por los SSR para las cuales fue desarrollada la NIL; los círculos rojos representan las introgresiones silvestres PP adicionales y los negros, las introgresiones silvestres adicionales en condición heterocigota (CP).

### ***Polimorfismos de transcripción relacionados con la maduración***

Los resultados del análisis de cDNA-AFLP se presentan en la **Figura III-4** para la NIL115 y la NIL080. Los círculos corresponden a cada estado de madurez (VM o RM). Los números dentro de cada círculo muestran los TDF polimórficos exclusivos de cada estado, mientras que el número en la intersección, los TDF monomórficos. Debajo se indica el porcentaje de polimorfismo entre los dos estados de madurez. El análisis mostró

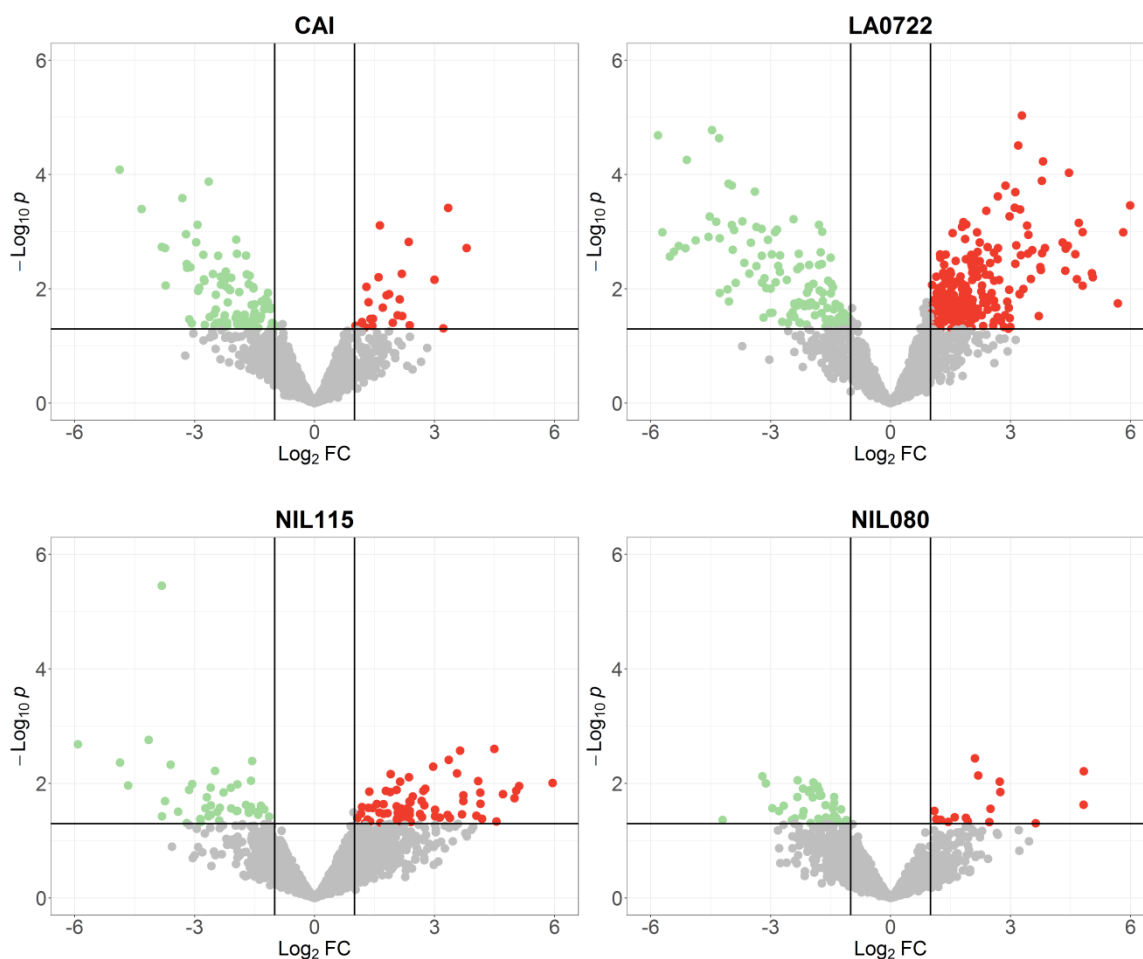
un total de 55 TDF totales para la NIL115, de los cuales 7 fueron monomórficos entre los dos estados de madurez, 29 exclusivos del VM y 19 exclusivos del RM (**Figura III-4**). Para la NIL080, el total de TDF detectados fue 52, con 10 monomórficos, 18 exclusivos del VM y 24 exclusivos del RM. Estos resultados revelaron un alto porcentaje de polimorfismo entre los estados de madurez VM y RM, siendo 87,27 % y 80,80 % para la NIL115 y la NIL080, respectivamente. Para la NIL115, el mayor número de TDF exclusivos se encontró en el estado VM mientras que para la NIL080, en el estado RM. En la NIL115, se secuenciaron 5 TDF de los cuales uno fue polimórfico entre los estados VM y RM. Este TDF alineó con un gen que codifica un factor de transcripción de respuesta al etileno APETALA2 (AP2/ERF) que se encuentra en la base del cromosoma 5 (*Solyc05g051380*). En la NIL080, los TDF polimórficos durante la maduración no pudieron ser reamplificados.



**Figura III-4.** Diagramas de Venn de fragmentos derivados de transcritos (TDF) totales y exclusivos para cada estado de madurez de la NIL115 y la NIL080. Los TDF se obtuvieron mediante perfiles de transcripción basados en AFLP (cDNA-AFLP) con cuatro combinaciones de cebadores específicos.  $Pol_{VM-RM}$ , porcentajes de polimorfismo entre los estadios maduro verde (VM) y rojo maduro (RM).

### Proteínas de maduración expresadas diferencialmente

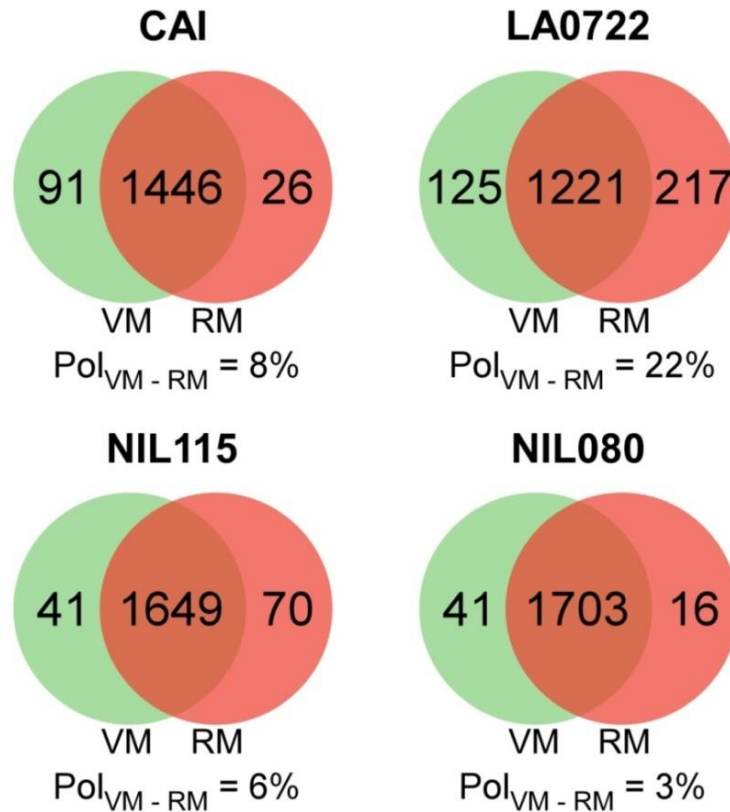
A partir del análisis proteómico cuantitativo de las proteínas del pericarpio se identificaron un total de 1760 y 1563 proteínas en las NILs y los progenitores, respectivamente. Se realizaron comparaciones de a pares entre los estados VM y RM dentro de cada genotipo. En la **Figura III-5** se observan el total de proteínas diferencialmente expresadas (DEPs) incrementadas en el estado VM y en el RM por color.



**Figura III-5.** Proteínas expresadas diferencialmente entre el estado verde maduro (VM) y rojo maduro (RM) para los genotipos parentales Caimanta (CAI) de *S. lycopersicum* y LA0722 de *S. pimpinellifolium* y las dos NIL derivadas de su cruzamiento (NIL115 y NIL080). Los puntos verdes muestran proteínas con mayor abundancia en el estado VM,

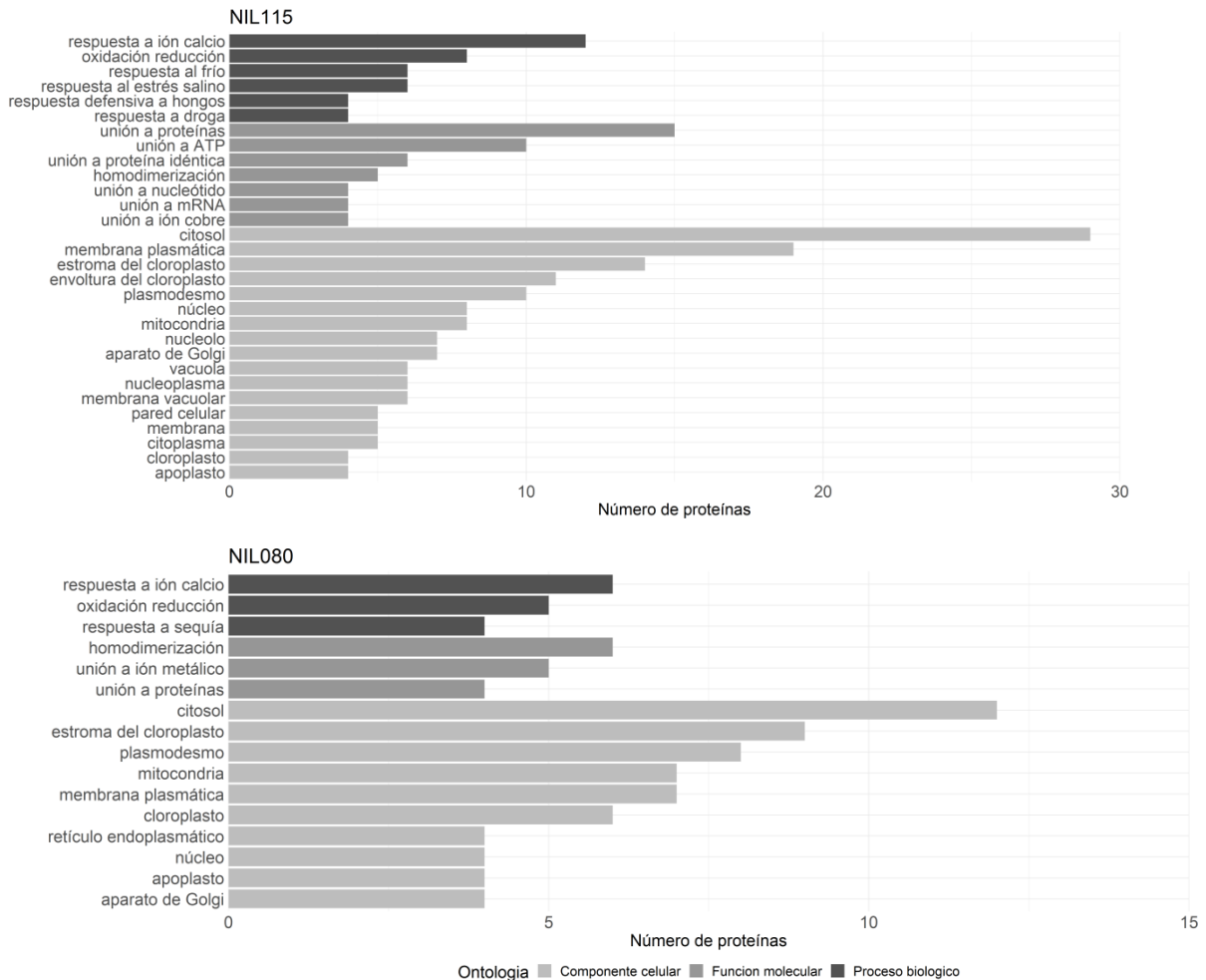
los puntos rojos muestran proteínas con mayor abundancia en el estado RM y los puntos grises muestran proteínas invariantes entre los dos estados de madurez.

Los resultados de este análisis se resumen en la **Figura III-6** para las NILs y sus progenitores. Los círculos corresponden a cada estado de madurez (VM o RM). Los números dentro de cada círculo muestran las DEPs polimórficas exclusivas de cada estado, la suma de ellos corresponde a las DEPs totales en la comparación de VM y RM, mientras que el número en la intersección corresponde a las proteínas invariantes. Debajo se indica el porcentaje de polimorfismo entre los dos estados de madurez. La comparación entre estos dos estados para CAI mostró 117 DEPs (8 %) y 342 DEPs (22 %) para LA0722. Los resultados para la NIL115 mostraron 111 DEPs (6 %), mientras que para la NIL080 se identificaron 57 DEPs (3 %) (**Figura III-6**). Las DEPs se obtuvieron principalmente en la etapa RM en la NIL115 (70 DEPs), pero fueron más frecuentes en el estado VM en la NIL080 (41 DEPs). Esta diferencia también se observó en los genotipos parentales. LA0722 presentó un mayor número de DEPs en el estado RM como la NIL115, mientras que CAI mostró el mismo comportamiento que la NIL080.



**Figura III-6.** Diagramas de Venn que muestran proteínas expresadas diferenciales (DEPs) para cada estado de madurez de la NIL115, la NIL080 y sus progenitores (CAI y LA0722). Las DEPs se obtuvieron mediante análisis proteómico.  $Pol_{VM-RM}$ , porcentaje de polimorfismo entre los estados verde maduro (VM) y rojo maduro (RM).

En la **Figura III-7** se muestran los resultados del análisis de ontología génica (GO) para las DEPs entre el estado RM y VM en la NIL115 y la NIL080. Se destacó la sobrerrepresentación de los términos GO de citosol y membrana plasmática. Las proteínas cloroplásticas también fueron abundantes. Las funciones moleculares de las DEPs se concentraron en la unión y la actividad de homodimerización de proteínas en ambas NILs. La mayoría de las DEPs se centraron en los procesos biológicos de respuesta a estrés biótico y abiótico.



**Figura III-7.** Resultados cuantitativos de proteínas del *Plant GO Slim* de agriGO v2.0 anotados en las proteínas diferencialmente expresadas (DEPs) entre el estado rojo maduro (RM) y el estado verde maduro (VM) en la NIL115 y la NIL080.

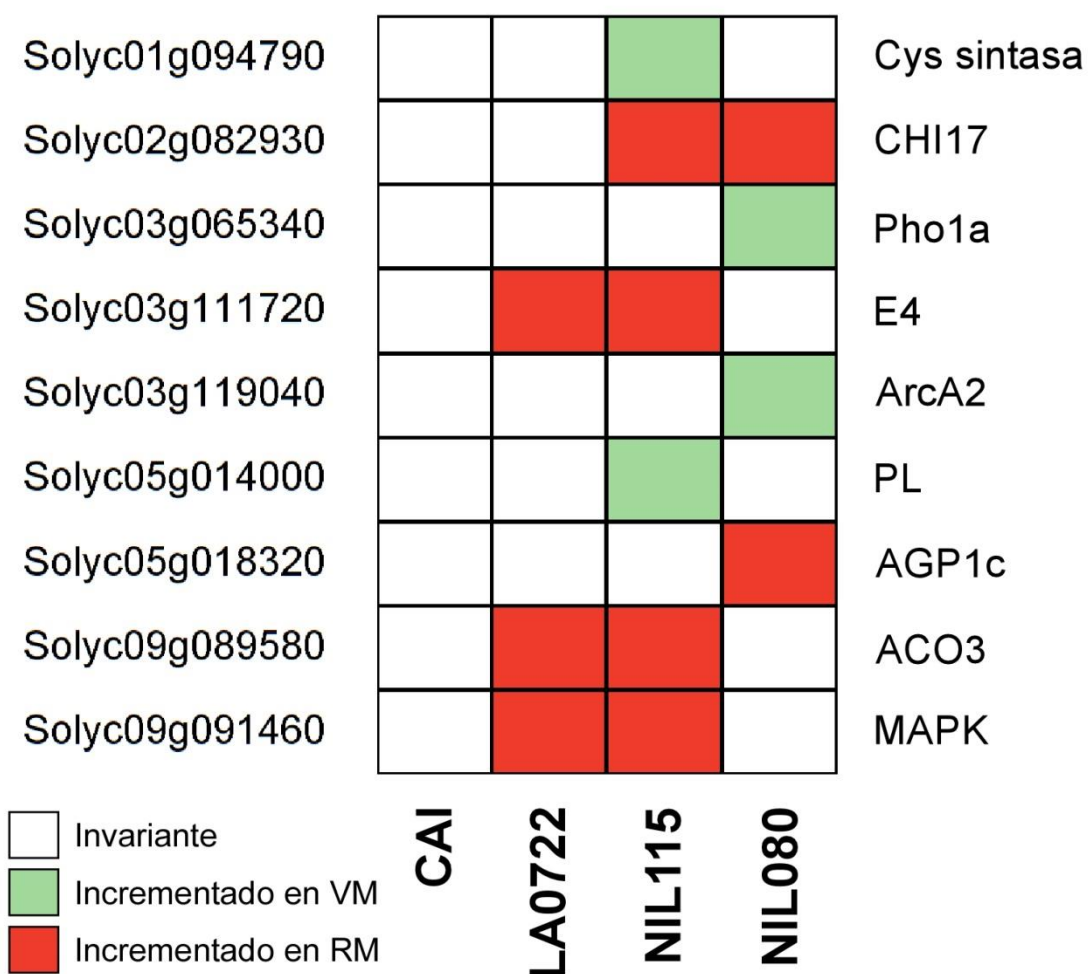
El análisis GO también permitió identificar proteínas involucradas en procesos de maduración (**Tabla III-3**). Como se grafica en la **Figura III-8**, de estas proteínas identificadas se analizó si su regulación se encontraba incrementada en el estado VM, en el RM o era invariante en cada NIL y se comparó con el patrón de regulación observado en los progenitores.

**Tabla III-3.** Proteínas expresadas diferencialmente (DEPs) entre el estado verde maduro (VM) y rojo maduro (RM) en la NIL115 y la NIL080 con un rol en la maduración de fruto. Se detallan los *Solyc* y UniProt ID, el nombre de las proteínas, el Log<sub>2</sub> del cambio (Log<sub>2</sub> FC), el valor de *p*, el porcentaje de cobertura (Cob %) y los péptidos únicos (Pep. únicos).

NIL	<i>Solyc</i> ID	UniProt ID	Proteína	Log <sub>2</sub> FC	<i>p</i>	Cob (%)	Pep. únicos
NIL115	<i>Solyc01g094790</i>	A0A3Q7F5F8	Cys sintasa	-1,14	0,0380	13	5
	<i>Solyc02g082930</i>	Q05540	CHI17	4,14	0,0145	56	7
	<i>Solyc03g111720</i>	P54153	E4	3,69	0,0345	48	7
	<i>Solyc05g014000</i>	A0A3Q7GFD0	PL	-2,28	0,0143	7	2
	<i>Solyc09g089580</i>	P10967	ACO3	5,00	0,0180	62	25
	<i>Solyc09g091460</i>	A0A3Q7I9A3	MAPK	1,89	0,0141	12	14
NIL080	<i>Solyc02g082930</i>	Q05540	CHI17	4.83	0,0061	56	7
	<i>Solyc03g119040</i>	A0A3Q7GJ89	ArcA2	-1,49	0,0415	26	1
	<i>Solyc03g065340</i>	A0A3Q7G8G0	Pho1a	-1,73	0,0162	2	2
	<i>Solyc05g018320</i>	A0A3Q7GJJ9	AGP1c	2,50	0,0276	6	2

En la NIL115 se identificaron seis DEPs con efecto sobre la maduración del tomate. Las proteínas de biosíntesis y de respuesta a etileno mostraron una expresión diferencial en esta NIL. Los resultados revelaron un aumento en la expresión de la proteína ACO3 (*Solyc09g089580*, sinónimo de E8) durante la transición de VM a RM. Un factor de respuesta a etileno (ERF), la péptido metionina sulfóxido reductasa (E4, *Solyc03g111720*), también mostró una expresión incrementada durante la maduración, así como una endoquitinasa ácida (CHI17, *Solyc02g082930*). Otra proteína que se incrementó en el estado RM está codificada en el cromosoma 9 (*Solyc09g091460*) y tiene un dominio de proteína quinasa de la subfamilia similar a Raf (MAPK). Una cisteína sintasa (*Solyc01g094790*) fue otra DEP con un papel en la maduración climatérica. Por otro lado, una pectato liasa (PL, *Solyc05g014000*) se presentó como proteína diferencial durante la maduración con efecto en la remodelación de la pared celular.

En la NIL080, se identificaron cuatro DEPs durante la maduración de fruto. Se observó una mayor abundancia en el estado VM de una proteína de unión a nucleótidos de guanina sensible a redox (ArcA2, *Solyc03g119040*). Otra DEP de menor expresión fue una alfa-1,4 glucano fosforilasa (Pho1a, *Solyc03g065340*). Por otro lado, un arabinogalactano (AGP1c, *Solyc05g018320*) mostró una expresión aumentada durante la maduración de la NIL080. CHI17 fue una DEP común con la NIL115 y mostró el mismo patrón de regulación en ambas NILs.



**Figura III-8.** Regulación de las proteínas diferencialmente expresadas (DEPs) entre el estado verde maduro (VM) y rojo maduro (RM) relacionadas con la maduración de fruto

en la NIL115, la NIL080 y sus progenitores (CAI y LA0722). Las DEPs se indican mediante bloques de color (valor de  $p < 0,05$ ); en verde, las DEPs aumentadas en VM ( $\log_2FC < -1$ ) y en rojo, las DEPs aumentadas en RM ( $\log_2FC > 1$ ). Los bloques en blanco representan proteínas con expresión invariable entre los estados de maduración.

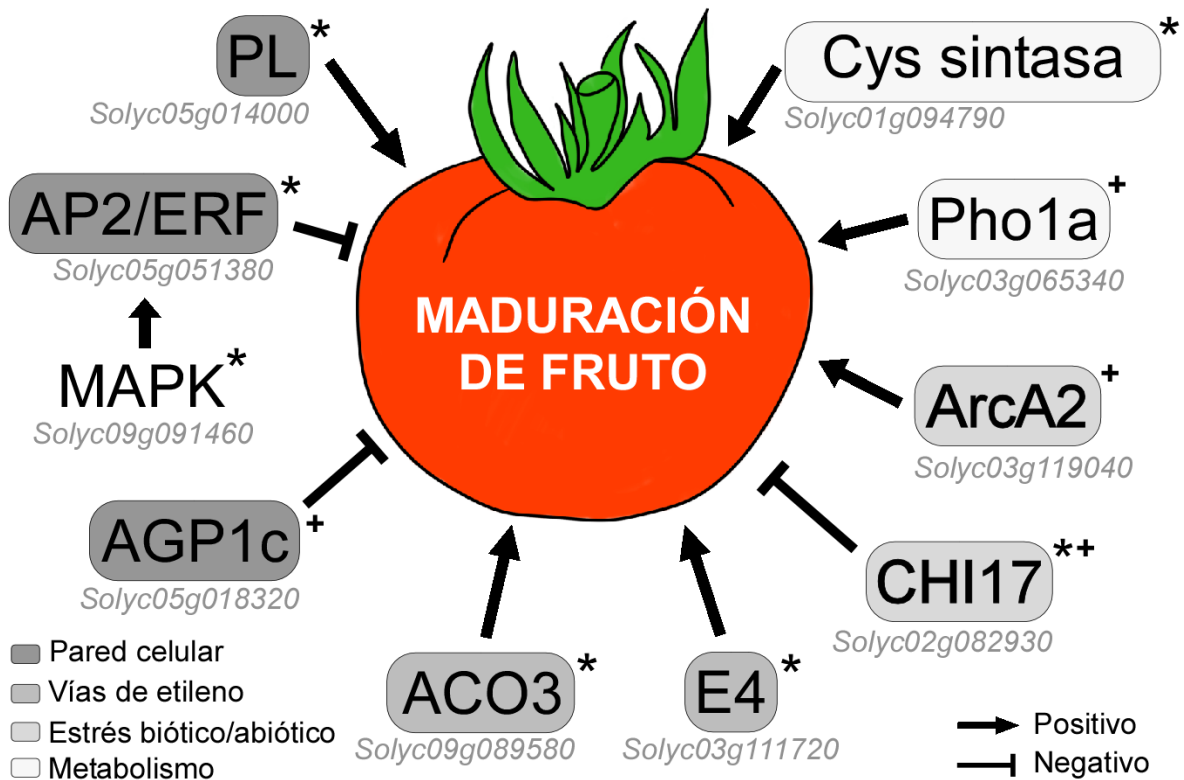
## Discusión

El tomate es un cultivo modelo para el estudio de la maduración de fruto. Enfocamos el estudio en dos NILs para recopilar información adicional de las bases genéticas que subyacen a la transición del estado VM al RM. La caracterización fenotípica mostró que la NIL115 y la NIL080 mejoraron la F del fruto en comparación con el progenitor cultivado sin diferencias en el P. Por otro lado, el análisis genómico demostró que los segmentos determinados por los marcadores SSR comprendieron InDels adyacentes que no recombinaron debido a su proximidad, lo que indica la presencia de segmentos silvestres más grandes. En promedio, la NIL115 tuvo siete introgresiones adicionales mientras que la NIL080, solo tres. Este menor número de introgresiones silvestres en la NIL080 era esperado debido a que esta NIL tiene una ronda adicional de retrocruzamiento, derivando de una  $R_4$ . El perfil transcriptómico reveló que la transición del estado VM al RM involucra muchos genes con expresión diferencial (**Figura III-4**). La NIL115 mostró un mayor número de TDF exclusivos en el estado VM mientras que la NIL080, en el estado RM. La NIL115 también mostró una alta VP, mayor que el progenitor cultivado. Como la maduración comienza en estado VM, muchos genes de maduración pueden verse afectados. En este estado se están dando cambios radicales, como la respiración, la biosíntesis de etileno y el ablandamiento de los frutos (Giovannoni 2004). A nivel proteómico, la NIL115 presentó un mayor porcentaje de polimorfismo entre VM y RM que la NIL080 (**Figura III-6**), pero ese porcentaje fue significativamente menor en comparación con el polimorfismo observado a nivel transcriptómico. En muchos estudios se observaron bajas correlaciones entre los niveles de expresión de ARNm y proteínas (de Sousa Abreu et al. 2009; Maier et al. 2009; Vogel y Marcotte 2012). Pontiggia et al. (2019) y Osorio et al. (2011) también encontraron una baja correlación entre los cambios transcriptómicos y proteómicos durante la maduración del tomate. Esto podría atribuirse a

una serie de razones que incluyen diferentes mecanismos o puntos de regulación en varios niveles del flujo de información genética. Diversos estudios propusieron que existe un efecto de fase retardada entre los perfiles de proteoma y transcriptoma entre las etapas de desarrollo, es decir, una complementación en lugar de una superposición de transcriptómica y proteómica (Gallie 2002; Kok et al. 2008).

Se examinaron las proteínas y su patrón de regulación en el proceso de maduración tanto en las NILs como en sus progenitores (**Figura III-8**). Se puede destacar que de estos genes se encontró que E4, ACO3 y MAPK se expresaban diferencialmente tanto en la NIL115 como en el progenitor silvestre LA0722, pero no en el progenitor cultivado CAI (**Figura III-8**). Estos tres DEPs pueden haber sido seleccionados del progenitor silvestre en el proceso de obtención de esta NIL. Por otro lado, varios genes mostraron una expresión diferencial única en las NILs que no se observó en ninguno de los genotipos parentales. Por lo tanto, las combinaciones e interacciones entre los alelos silvestres del donante y el fondo del receptor están ampliando la variabilidad fenotípica e influyendo en la maduración de fruto en las NILs.

La información obtenida de los diferentes enfoques ómicos en las dos NILs se resume en la **Figura III-9**. Se identificaron un total de 10 genes con un rol potencial en la maduración de fruto y se analizó su patrón de regulación. Estos genes se encuentran involucrados en el metabolismo, en el estrés biótico y abiótico, en las vías del etileno y en la remodelación de la pared celular.



**Figura III-9.** Esquema resumen de los genes con un rol potencial en la maduración de fruto determinados por el análisis ómico integral en la NIL115 (\*) y la NIL080 (+). Las flechas indican la regulación positiva o negativa. La escala de grises muestra los procesos en los que intervienen dichos genes.

La NIL115 se caracterizó por un aumento de VP y F de frutos (**Figura III-2**). La detección de QTLs presentada en el Capítulo I mostró asociaciones en el cromosoma 5 con caracteres relacionados con la maduración en esta línea (**Figura I-5**). En la parte superior de este cromosoma y adyacente a una introgresión silvestre se encuentra una PL (*Solyc05g014000*) que mostró una expresión diferencial entre los estados VM y RM en esta NIL. Las PL son proteínas muy estudiadas involucradas en la remodelación y degradación de la pared celular que dan como resultado el ablandamiento del fruto (Uluışik et al. 2016; Yang et al. 2017; Shi et al. 2022). El gen *Solyc05g014000* presentó

una mayor expresión en el estado VM en un estudio realizado por Seymour et al. (2013) en coincidencia con estos resultados (**Figura III-8**).

Una DEP con un papel en la maduración climatérica fue una cisteína sintasa (*Solyc01g094790*). Esta proteína se expresó diferencialmente entre los estados VM y RM en la NIL115 pero no en los genotipos parentales. Un estudio reciente demostró que los niveles de expresión de ciertos genes de cisteína sintasa coincidieron con la maduración de fruto, lo que sugiere su papel potencial en este proceso (Liu et al. 2019).

El tomate es un fruto climatérico y por ello la producción de etileno está acoplada a la maduración y asociada con la coloración y el ablandamiento del fruto (Barry y Giovannoni 2007). Se sabe que la familia de genes ERF y ACO tiene un efecto en la maduración del fruto. Los resultados mostraron una mayor expresión de proteínas en ACO3 (*Solyc09g089580*) y E4 (*Solyc03g111720*) en el estado RM en comparación con el VM. El mismo patrón de expresión diferencial también se observó en LA0722, pero no en CAI (**Figura III-8**). Además, en la NIL115, cerca de la región genómica del gen E4, se encuentra una introgresión silvestre homocigota (**Figura III-3**), lo que indica que se ha heredado del progenitor silvestre LA0722. Se conoce desde hace tiempo que los genes ACO3 y E4 se inducen rápidamente después de la inducción con etileno y durante la maduración normal del fruto (Lincoln et al. 1987; Barry y Giovannoni 2007; Martel et al. 2011).

Los factores de transcripción AP2/ERF pertenecen a una superfamilia de proteínas conservada en el reino vegetal que ha sido ampliamente estudiada. Los AP2/ERFs presentan diversas funciones reguladoras involucradas en procesos como el control del metabolismo primario y secundario, el crecimiento y desarrollo, así como respuestas a estímulos ambientales (Licausi et al. 2013). El análisis transcriptómico mostró que un AP2/ERF (*Solyc05g051380*) se expresó diferencialmente durante la maduración de fruto en la NIL115. Se encontró que el gen *Solyc05g051380* es un homólogo

AINTEGUMENTA-LIKE6 (AIL6, *At5g10510*) de *Arabidopsis thaliana*. AIL6 participa en la remodelación de la pared celular junto con AINTEGUMENTA. Estos factores de transcripción regulan las modificaciones del polisacárido pectina de la pared celular. AIL6 se asoció con la remodelación de la pared celular y los términos GO del inhibidor de pectina metilesterasa (PME) (Krizek et al. 2016). Dentro de la pared celular, las PME actúan en la desmetilesterificación del homogalacturonano (HG), el polisacárido péctico más abundante. Estos HG desmetilesterificados son sustratos para las enzimas que degradan la pectina, como la poligalacturonasa y la PL, lo que provoca el ablandamiento de la pared celular. Sin embargo, el gen *Solyc05g051380* no ha sido ampliamente estudiado en tomate. La NIL115 mostró un aumento significativo de VP y F en comparación con CAI (**Figura III-2**). Dentro de la superfamilia AP2/ERF, AP2a se identificó como un importante regulador de la maduración del fruto del tomate (Karlova et al. 2011). Además, se ha demostrado que otros AP2/ERF están involucrados en este proceso (Liu et al. 2016). Por lo tanto, la expresión diferencial del factor de transcripción codificado por el gen *Solyc05g051380* puede tener un papel potencial en la maduración de fruto en tomate.

La fosforilación juega un papel importante en la activación de los AP2/ERF (Phukan et al. 2017). Se identificó una MAPK que mostró una expresión incrementada durante la maduración codificada en el cromosoma 9 (*Solyc09g091460*) que tiene un dominio de proteína quinasa de la subfamilia similar a Raf (Iftikhar et al. 2017). Como las enzimas MAPK están involucradas en las cascadas de fosforilación, se sugiere que esta enzima podría estar involucrada en la regulación de AP2/ERF. En *Arabidopsis thaliana*, se ha demostrado que los ERF actúan como sustratos de MAPK (Popescu et al. 2009). La fosforilación parece activar la actividad transcripcional de los ERF en tomate, arroz y tabaco (Gu et al. 2000; Cheong et al. 2003; De Boer et al. 2011; Xu et al. 2011; Licausi et al. 2013).

En la NIL080, AGP1c (*Solyc05g018320*), un arabinogalactano, se identificó como otra DEP entre VM y RM. Las proteínas arabinogalactanos (AGP) son glicoproteínas ricas en hidroxiprolina fuertemente glicosiladas y su naturaleza dinámica tiene un efecto sobre la estructura del fruto. Estudios realizados por Leszczuk et al. (2018) revelaron que la disminución del contenido de AGP y polisacáridos de pectina está asociada con la remodelación de la pared celular y conduce a la maduración y el ablandamiento de los frutos. Los resultados mostraron una mayor abundancia de AGP1c en la etapa RM (**Figura III-8**), lo que indica un posible efecto de esta proteína en el desarrollo de frutos más firmes. Además, un análisis *in silico* permitió identificar elementos que actúan en *cis* de la región promotora de ciertos AGP unidos por factores de transcripción específicos involucrados en la regulación de la maduración del fruto del tomate (Leszczuk et al. 2020).

Durante la maduración de los frutos también existe un sistema antioxidante eficiente que protege de las especies reactivas de oxígeno. ArcA2, una proteína de unión a nucleótidos de guanina (*Solyc03g119040*) se expresó diferencialmente durante la maduración de la NIL080. Wang et al. (2021) realizaron un análisis proteómico redox en el que se identificó ArcA2 como una proteína redox sensible durante la maduración del tomate. Como no se identificó ninguna introgresión silvestre en el cromosoma 3, se podría sugerir que la expresión diferencial de la proteína ArcA2 está regulada por factores de transcripción.

Otra DEP identificada en la NIL080 fue Pho1a (*Solyc03g065340*), una alfa-1,4 glucano fosforilasa. Un estudio anterior mostró un alto nivel de expresión génica en el estado VM (Slugina et al. 2019), en concordancia con los resultados presentados. Se ha demostrado el efecto de este gen sobre la degradación del almidón y la acumulación de azúcares durante la maduración del fruto (Slugina et al. 2019; Li et al. 2021).

Hubo una DEP de interés compartida en ambas NILs (**Figura III-8**), correspondiente a CHI17 (*Solyc02g082930*), una endoquitinasa ácida con un papel en la

defensa contra patógenos fúngicos que contienen quitina. Eriksson et al. (2004) encontraron que las quitinasas prevalecían en los frutos de mutantes *Cnr* y podrían contribuir a la separación celular, así como a proteger los tejidos de la invasión de patógenos. Además, se identificaron varias endoquitinasas con perfiles de expresión alterados al comparar los estados de madurez del tomate (Kok et al. 2008). Solo la NIL080 mostró una introgresión silvestre cerca de la región de CHI17; sin embargo, CHI17 no se expresó diferencialmente en LA0722 o CAI (**Figura III-8**). Esto sugiere que las interacciones entre las introgresiones silvestres y el fondo genético cultivado pueden dar como resultado esta nueva DEP en ambas NILs.

## Conclusiones parciales

- Se encontraron genes diferencialmente expresados entre los estados VM y RM con un rol potencial en la maduración de fruto en tomate.
- Los genes diferencialmente expresados pudieron explicar los fenotipos discrepantes con CAI observados en la NIL115 y la NIL080.
- Se definió un modelo de genes involucrados en la maduración de tomate a partir de la integración de los resultados de las diferentes aproximaciones ómicas.
- Se destacaron dos genes que retrasan la maduración que no fueron informados previamente en tomate: un AP2/ERF involucrado en la remodelación de la pared celular que podría ser activado por un MAPK, y E4, un factor de respuesta a etileno heredado del progenitor silvestre *S. pimpinellifolium*.

## CONCLUSIONES FINALES

La colección de 22 NILs permitió comprobar la existencia de variabilidad genética valiosa y aprovechable en la accesión LA0722 de *S. pimpinellifolium* y fue posible identificar nuevas regiones genómicas que controlan caracteres de calidad de fruto y aumentan la vida poscosecha. Además, se identificaron genes relacionados con la maduración del fruto proporcionando así nuevas herramientas para el mejoramiento de tomate. Las NILs evaluadas constituyen nuevos recursos vegetales con alto potencial para programas de mejoramiento, estudios genéticos en tomate y como variedades de calidad comercial para el mercado de tomate en fresco.

## CONSIDERACIONES FINALES Y PERSPECTIVAS

En los programas de mejoramiento genético una estrategia para potenciar la variabilidad e introducir cambios fenotípicos en la descendencia es utilizar cruzamientos de variedades cultivadas elite con progenitores silvestres. Las NILs de esta colección representan líneas casi isogénicas con el tomate cultivado y con atributos de calidad mejorados proporcionados por introgresiones provenientes de la accesión silvestre LA0722 de *S. pimpinellifolium*. Los diversos análisis presentados mostraron la existencia de variabilidad genética beneficiosa y aprovechable en la especie silvestre *S. pimpinellifolium*. Las NILs con introgresiones silvestres presentaron tamaño mediano a grande, algunas incluso alcanzaron el peso del progenitor cultivado, y buena carnosidad de fruto. También se obtuvieron NILs que se destacaron por su mayor vida poscosecha y firmeza, caracteres esenciales para la reducción de las pérdidas. Estos resultados resultan prometedores para piramidar QTLs y evaluar el efecto sobre el fenotipo y su interacción.

La selección asistida por marcadores, la localización de las introgresiones silvestres y la detección de QTLs fue posible gracias al genotipado de las NILs a partir de un conjunto de 89 marcadores moleculares. La implementación de nuevos marcadores desarrollados a partir de la secuenciación de los progenitores donante y recurrente demostró que alelos beneficiosos dentro del genoma silvestre podían ser identificados. En la actualidad, las tecnologías de genotipado masivo de alta densidad y de re-secuenciación de genomas permiten determinar la constitución genómica con una gran resolución. En los últimos años estas tecnologías han disminuido sus costos por lo que realizar un genotipado masivo en la colección de NILs permitirá delimitar de manera más precisa las introgresiones silvestres y, a su vez, detectar nuevas.

Por otra parte, dos NILs de la colección fueron utilizadas para abordar un estudio sobre la maduración de fruto. Se integró la información de diferentes enfoques ómicos y se lograron detectar 10 genes involucrados en la maduración y su patrón de regulación, información que podría resultar útil para el mejoramiento asistido. Futuros estudios sobre estos genes de interés y su validación funcional permitirán complementar los resultados hallados.

Por último, se destaca que las NILs resultan potenciales nuevos cultivares para ser comercializados en el mercado en fresco debido a la gran proporción del genoma cultivado junto al aporte positivo de regiones silvestres sobre la calidad de fruto. Además, aquellas NILs con características superiores al progenitor cultivado pueden usarse para programas de mejoramiento en forma directa o mediante la recombinación con otros materiales para el desarrollo de nuevas variedades. Como ventaja adicional, con pocos pasos complementarios, podrían generarse nuevas NILs para las introgresiones adicionales detectadas mediante los marcadores InDels y funcionales, ampliando esta población de líneas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Argentina.gob.ar (2022) Santa Fe: la horticultura abastece a más de 4 millones de consumidores. Disponible en: <<https://www.argentina.gob.ar/noticias/santa-fe-la-horticultura-abastece-mas-de-4-millones-de-consumidores>> [Acceso: 28 de octubre de 2022]
- Barrantes W, Fernández-del-Carmen A, López-Casado G, et al (2014) Highly efficient genomics-assisted development of a library of introgression lines of *Solanum pimpinellifolium*. *Mol Breed* 34:1817–1831. <https://doi.org/10.1007/s11032-014-0141-0>
- Barrantes W, López-Casado G, García-Martínez S, et al (2016) Exploring new alleles involved in tomato fruit quality in an introgression line library of *Solanum pimpinellifolium*. *Front Plant Sci* 7:1172. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01172>
- Barry CS, Giovannoni JJ (2007) Ethylene and fruit ripening. *J Plant Growth Regul* 26:143–159. <https://doi.org/10.1007/s00344-007-9002-y>
- Bates D, Mächler M, Bolker B, Wlaker S (2015) Fitting linear mixed-effects models using lme4. *J Stat Softw* 67:1–48. <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>
- Bernacchi D, Beck-Bunn T, Emmatty D, et al (1998) 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*. *Theor Appl Genet* 97:170–180. <https://doi.org/10.1007/s001220050882>
- Blanca J, Montero-Pau J, Sauvage C, et al (2015) Genomic variation in tomato, from wild ancestors to contemporary breeding accessions. *BMC Genomics* 16:257. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1444-1>
- Blanca J, Pons C, Montero-Pau J, et al (2022) European traditional tomatoes galore: A result of farmers' selection of a few diversity-rich loci. *J Exp Bot* 73:3431–3445. <https://doi.org/10.1093/jxb/erac072>
- Brummell DA, Harpster MH (2001) Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Mol Biol* 47:311–340. <https://doi.org/10.1023/A:1010656104304>
- Brumos J (2021) Gene regulation in climacteric fruit ripening. *Curr Opin Plant Biol* 63:102042. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2021.102042>
- Cambiaso V, Gimenez M, Pereira da Costa J, et al (2019a) Selected genome regions for fruit weight and shelf life in tomato RILs discernible by markers based on genomic sequence information. *Breed Sci* 69:447–454. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.19015>
- Cambiaso V, Pratta GR, Pereira da Costa JH, et al (2019b) Whole genome re-sequencing analysis of two tomato genotypes for polymorphism insight in cloned genes and a genetic map construction. *Sci Hort* 247:58–66. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.12.001>
- Canady MA, Meglic V, Chetelat RT (2005) A library of *Solanum lycopersicoides*

- introgression lines in cultivated tomato. *Genome* 48:685–697.  
<https://doi.org/10.1139/g05-032>
- Celik I, Gurbuz N, Uncu AT, et al (2017) Genome-wide SNP discovery and QTL mapping for fruit quality traits in inbred backcross lines (IBLs) of *Solanum pimpinellifolium* using genotyping by sequencing. *BMC Genomics* 18:1.  
<https://doi.org/10.1186/s12864-016-3406-7>
- Chaïb J, Lecomte L, Buret M, Causse M (2006) Stability over genetic backgrounds, generations and years of quantitative trait locus (QTLs) for organoleptic quality in tomato. *Theor Appl Genet* 112:934–944. <https://doi.org/10.1007/s00122-005-0197-7>
- Chakrabarti M, Zhang N, Sauvage C, et al (2013) A cytochrome P450 regulates a domestication trait in cultivated tomato. *Proc Natl Acad Sci* 110:17125–17130.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1307313110>
- Chen F, Foolad M, Hyman J, et al (1999) Mapping of QTLs for lycopene and other fruit traits in a *Lycopersicon esculentum* × *L. pimpinellifolium* cross and comparison of QTLs across tomato species. *Mol Breed* 5:283–299.  
<https://doi.org/10.1023/A:1009656910457>
- Cheong YH, Moon BC, Kim JK, et al (2003) BWMK1, a rice mitogen-activated protein kinase, locates in the nucleus and mediates pathogenesis-related gene expression by activation of a transcription factor. *Plant Physiol* 132:1961–1972.  
<https://doi.org/10.1104/pp.103.023176>
- Chetelat RT, Meglic V (2000) Molecular mapping of chromosome segments introgressed from *Solanum lycopersicoides* into cultivated tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Theor Appl Genet* 100:232–241. <https://doi.org/10.1007/s001220050031>
- De Boer K, Tilleman S, Pauwels L, et al (2011) APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR and basic helix-loop-helix tobacco transcription factors cooperatively mediate jasmonate-elicited nicotine biosynthesis. *Plant J* 66:1053–1065.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04566.x>
- de Sousa Abreu R, Penalva L, Marcotte E, Vogel C (2009) Global signatures of protein and mRNA expression levels. *Mol Biosyst* 5:1512–1526.  
<https://doi.org/10.1039/b908315d>
- Doganlar S, Frary A, Ku H, Tanksley S (2002) Mapping quantitative trait loci in inbred backcross lines of *Lycopersicon pimpinellifolium* (LA1589). *Genome* 45:1189–1202.  
<https://doi.org/10.1139/g02-091>
- Eichten SR, Foerster JM, Leon N De, et al (2011) B73-Mo17 Near-Isogenic Lines Demonstrate Dispersed Structural Variation in Maize. *Plant Physiol* 156:1679–1690.  
<https://doi.org/10.1104/pp.111.174748>
- Eriksson EM, Bovy A, Manning K, et al (2004) Effect of the Colorless non-ripening mutation on cell wall biochemistry and gene expression during tomato fruit development and ripening. *Plant Physiol* 136:4184–4197.  
<https://doi.org/10.1104/pp.104.045765>
- Eshed Y, Zamir D (1994) Introgressions from *Lycopersicon pennellii* can improve the

- soluble solids yield of tomato hybrids. *Theor Appl Genet* 88:891–897.  
<https://doi.org/10.1007/BF01254002>
- Eshed Y, Zamir D (1995) An Introgression Line Population. *Genetics* 141:1147–1162.  
<https://doi.org/10.1093/genetics/141.3.1147>
- FAOSTAT (2020) Crops and livestock products. Disponible en:  
<<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>> [Acceso: 28 de octubre de 2022]
- Fenn MA, Giovannoni JJ (2021) Phytohormones in fruit development and maturation. *Plant J* 105:446–458. <https://doi.org/10.1111/tbj.15112>
- Finkers R, van Heusden AW, Meijer-Dekens F, et al (2007) The construction of a *Solanum habrochaites* LYC4 introgression line population and the identification of QTLs for resistance to *Botrytis cinerea*. *Theor Appl Genet* 114:1071–1080.  
<https://doi.org/10.1007/s00122-006-0500-2>
- Foolad MR, Sharma A (2005) Molecular markers as selection tools in tomato breeding. *Acta Hortic* 695:225–240. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.695.25>
- Francis DM, Kabelka E, Bell J, et al (2001) Resistance to Bacterial Canker in Tomato (*Lycopersicon hirsutum* LA407) and its Progeny Derived from Crosses to *L. esculentum*. *Plant Dis* 85:1171–1176. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.11.1171>
- Fridman E, Carrari F, Liu Y, et al (2004) Zooming In on a Quantitative Interspecific Introgressions. *Science* 305:1786–1789. <https://doi.org/10.1126/science.1101666>
- Gallie DR (2002) Protein-protein interactions required during translation. *Plant Mol Biol* 50:949–970. <https://doi.org/10.1023/a:1021220910664>
- Gao L, Gonda I, Sun H, et al (2019) The tomato pan-genome uncovers new genes and a rare allele regulating fruit flavor. *Nat Genet* 51:1044–1051.  
<https://doi.org/10.1038/s41588-019-0410-2>
- Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, et al (2004) Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 5:R80.  
<https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-10-r80>
- Giovannoni J (2004) Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell* 16:S170–S180. <https://doi.org/10.1105/tpc.019158>
- Giovannoni J, Nguyen C, Ampofo B, et al (2017) The epigenome and transcriptional dynamics of fruit ripening. *Annu Rev Plant Biol* 68:61–84.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042916-040906>
- Giovannoni JJ (2007) Fruit ripening mutants yield insights into ripening control. *Curr Opin Plant Biol* 10:283–289. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.04.008>
- Gu YQ, Yang C, Thara VK, et al (2000) Pti4 is induced by ethylene and salicylic acid, and its product is phosphorylated by the Pto kinase. *Plant Cell* 12:771–785.  
<https://doi.org/10.1105/tpc.12.5.771>
- Guo S, Zheng Y, Meng D, et al (2022) DNA and coding/non-coding RNA methylation analysis provide insights into tomato fruit ripening. *Plant J* 399–413.

<https://doi.org/10.1111/tpj.15951>

- Gur A, Zamir D (2004) Unused natural variation can lift yield barriers in plant breeding. *PLOS Biol* 2:e245. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020245>
- Hobson G, Grierson D (1993) Tomato. In: Seymour G, Taylor J, Tucker G (eds) *Biochemistry of Fruit Ripening*. Chapman and Hall, London, pp 405–442
- Iftikhar H, Naveed N, Virk N, et al (2017) *In silico* analysis reveals widespread presence of three gene families, MAPK, MAPKK and MAPKKK, of the MAPK cascade from crop plants of *Solanaceae* in comparison to the distantly-related syntenic species from *Rubiaceae*, coffee. *PeerJ* 5:e3255. <https://doi.org/10.7717/peerj.3255>
- Ikeda H, Hiraga M, Shirasawa K, et al (2013) Analysis of a tomato introgression line, IL8-3, with increased Brix content. *Sci Hort* 153:103–108. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.02.006>
- Ishii T, Araki M (2016) Consumer acceptance of food crops developed by genome editing. *Plant Cell Rep* 35:1507–1518. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-1974-2>
- Karlova R, Rosin FM, Busscher-Lange J, et al (2011) Transcriptome and metabolite profiling show that APETALA2a is a major regulator of tomato fruit ripening. *Plant Cell* 23:923–941. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.081273>
- Kearsey M, Pooni H (1996) *The Genetical Analysis of Quantitative Traits*. Londres: Chapman and Hall, pp 396. <https://doi.org/10.1201/9781003062806>
- Kinkade MP, Foolad MR (2013) Validation and fine mapping of lyc12.1, a QTL for increased tomato fruit lycopene content. *Theor Appl Genet* 126:2163–2175. <https://doi.org/10.1007/s00122-013-2126-5>
- Klee H, Tieman D (2018) The genetics of fruit flavour preferences. *Nat Rev Genet* 19:347–356. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0002-5>
- Kok EJ, Lehesranta SJ, Van Dijk JP, et al (2008) Changes in gene and protein expression during tomato ripening - Consequences for the safety assessment of new crop plant varieties. *Food Sci Technol Int* 14:503–518. <https://doi.org/10.1177/1082013208100771>
- Koka C, Cerny R, Gardner R, et al (2000) A putative role for the tomato genes DUMPY and CURL-3 in brassinosteroid biosynthesis and response. *Plant Physiol* 122:85–98. <https://doi.org/10.1104/pp.122.1.85>
- Kramer MG, Redenbaugh K (1994) Commercialization of a tomato with an antisense polygalacturonase gene: The FLAVR SAVR™ tomato story. *Euphytica* 79:293–297. <https://doi.org/10.1007/BF00022530>
- Krizek BA, Bequette CJ, Xu K, et al (2016) RNA-seq links the transcription factors AINTEGUMENTA and AINTEGUMENTA-LIKE6 to cell wall remodeling and plant defense pathways. *Plant Physiol* 171:2069–2084. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01625>
- Leszczuk A, Chylińska M, Zięba E, et al (2018) Structural network of arabinogalactan proteins (AGPs) and pectins in apple fruit during ripening and senescence processes. *Plant Sci* 275:36–48. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.07.019>

- Leszczuk A, Kalaitzis P, Blazakis KN, Zdunek A (2020) The role of arabinogalactan proteins (AGPs) in fruit ripening—a review. *Hortic Res* 7:176. <https://doi.org/10.1038/s41438-020-00397-8>
- Li N, Wang J, Wang B, et al (2021) Identification of the Carbohydrate and Organic Acid Metabolism Genes Responsible for Brix in Tomato Fruit by Transcriptome and Metabolome Analysis. *Front Genet* 12:1–16. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.714942>
- Li S, Xu H, Ju Z, et al (2018) The RIN-MC fusion of MADs-box transcription factors has transcriptional activity and modulates expression of many ripening genes. *Plant Physiol* 176:891–909. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01449>
- Li X, Wang X, Zhang Y, et al (2022) Regulation of fleshy fruit ripening: From transcription factors to epigenetic modifications. *Hortic Res*. <https://doi.org/10.1093/hr/uhac013>
- Licausi F, Ohme-Takagi M, Perata P (2013) APETALA2/Ethylene Responsive Factor (AP2/ERF) transcription factors: mediators of stress responses and developmental programs. *New Phytol* 199:639–649. <https://doi.org/10.1111/nph.12291>
- Lin T, Zhu G, Zhang J, et al (2014) Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding. *Nat Genet* 46:1220–1226. <https://doi.org/10.1038/ng.3117>
- Lincoln JE, Cordes S, Read E, Fischer RL (1987) Regulation of gene expression by ethylene during *Lycopersicon esculentum* (tomato) fruit development. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:2793–2797. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.9.2793>
- Lippman Z, Semel Y, Zamir D (2007) An integrated view of quantitative trait variation using tomato interspecific introgression lines. *Curr Opin Genet Dev* 17:545–52. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2007.07.007>
- Liu D, Lu J, Li H, et al (2019) Characterization of the O-acetylserine(thiol)lyase gene family in *Solanum lycopersicum* L. *Plant Mol Biol* 99:123–134. <https://doi.org/10.1007/s11103-018-0807-9>
- Liu M, Gomes BL, Mila I, et al (2016) Comprehensive profiling of ethylene response factor expression identifies ripening-associated ERF genes and their link to key regulators of fruit ripening in tomato. *Plant Physiol* 170:1732–1744. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01859>
- López Marín L (2017) Manual técnico del cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*). Costa Rica, Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (inta), pp 126
- Luciani M (2017) Efecto de regiones cromosómicas de *Solanum pimpinellifolium* sobre caracteres que afectan la calidad de fruto en el contexto genético del tomate cultivado. Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Agrarias de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario, pp 176
- Maier T, Güell M, Serrano L (2009) Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Lett* 583:3966–3973. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.10.036>
- Manning K, Tör M, Poole M, et al (2006) A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. *Nat*

- Genet 38:948–952. <https://doi.org/10.1038/ng1841>
- Mariotti J, Collavino N (2014) Los caracteres cuantitativos en la mejora genética de los cultivos (1a ed.). Buenos Aires: Orientación Gráfica Editora, pp 325
- Martel C, Vrebalov J, Tafelmeyer P, Giovannoni JJ (2011) The tomato MADS-box transcription factor RIPENING INHIBITOR interacts with promoters involved in numerous ripening processes in a COLORLESS NONRIPENING-dependent manner. *Plant Physiol* 157:1568–1579. <https://doi.org/10.1104/pp.111.181107>
- Meli VS, Ghosh S, Prabha TN, et al (2010) Enhancement of fruit shelf life by suppressing N-glycan processing enzymes. *PNAS* 107:2413–2418. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909329107>
- Monforte A, Tanksley S (2000) Fine mapping of a quantitative trait locus (QTL) from *Lycopersicon hirsutum* chromosome 1 affecting fruit characteristics and agronomic traits: breaking linkage among QTLs affecting different traits and dissection of heterosis for yield. *Theor Appl Genet* 100:471–479. <https://doi.org/10.1007/s001220050061>
- Muños S, Ranc N, Botton E, et al (2011) Increase in tomato locule number is controlled by two single-nucleotide polymorphisms located near WUSCHEL. *Plant Physiol* 156:2244–2254. <https://doi.org/10.1104/pp.111.173997>
- Nakano H, Kobayashi N, Takahata K, et al (2016) Quantitative trait loci analysis of the time of floral initiation in tomato. *Sci Hortic* 201:199–210. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.02.009>
- Nuez F (1999) El cultivo del tomate. Mundi-Prensa, pp 767
- Osorio S, Alba R, Damasceno CMB, et al (2011) Systems biology of tomato fruit development: combined transcript, protein, and metabolite analysis of tomato transcription factor (nor, rin) and ethylene receptor (Nr) mutants reveals novel regulatory interactions. *Plant Physiol* 157:405–425. <https://doi.org/10.1104/pp.111.175463>
- Pea G, Aung HH, Frascaroli E, et al (2013) Extensive genomic characterization of a set of near-isogenic lines for heterotic QTL in maize (*Zea mays* L.). *BMC Genomics* 14:1–15. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-61>
- Peralta I, Spooner D, Knapp S (2008) Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (*Solanum* sect. *Lycopersicoides*, sect. *Juglandifolia*, sect. *Lycopersicon*; Solanaceae). *Syst Bot Monogr* 84:1–186
- Peralta IE, Knapp S, Spooner DM (2005) New Species of Wild Tomatoes (*Solanum* Section *Lycopersicon*: Solanaceae) from Northern Peru. *Syst Bot* 30:424–434. <https://doi.org/10.1600/0363644054223657>
- Pereira da Costa J, Cambiaso V, Picardi L, et al (2021) Fruit quality improvement through the incorporation of wild species genes in the tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *J Basic Appl Genet* 32:40–47. <https://doi.org/10.35407/bag.2021.32.02.05>
- Pereira da Costa J, Rodríguez G, Pratta G, et al (2013) QTL detection for fruit shelf life and quality traits across segregating populations of tomato. *Sci Hort* 156:47–53.

<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.03.015>

- Pereira da Costa JH, Rodríguez GR, Picardi LA, et al (2018) Genome-wide expression analysis at three fruit ripening stages for tomato genotypes differing in fruit shelf life. *Sci Hort* 229:125–131. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.11.004>
- Perez-Riverol Y, Bai J, Bandla C, et al (2022) The PRIDE database resources in 2022: a hub for mass spectrometry-based proteomics evidences. *Nucleic Acids Res* 50:D543–D552. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1038>
- Phukan UJ, Jeena GS, Tripathi V, Shukla RK (2017) Regulation of Apetala2/Ethylene response factors in plants. *Front Plant Sci* 8:1–18. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00150>
- Pontiggia D, Spinelli F, Fabbri C, et al (2019) Changes in the microsomal proteome of tomato fruit during ripening. *Sci Rep* 9:1–18. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50575-5>
- Popescu SC, Popescu G V., Bachan S, et al (2009) MAPK target networks in *Arabidopsis thaliana* revealed using functional protein microarrays. *Genes Dev* 23:80–92. <https://doi.org/10.1101/gad.1740009>
- Pratta G, Zorzoli R, Picardi LA (2003) Diallel analysis of production traits among domestic, exotic and mutant germplasms of *Lycopersicon*. *Genet Mol Res* 2:206–213
- Raffo A, Nicoli S, Nardo N, et al (2012) Impact of Different Distribution Scenarios and Recommended Storage Conditions on Flavor Related Quality Attributes in Ripening Fresh Tomatoes. *J Agric Food Chem* 60:10445–10455. <https://doi.org/10.1021/jf3028528>
- Razifard H, Ramos A, Della Valle AL, et al (2020) Genomic evidence for complex domestication history of the cultivated tomato in Latin America. *Mol Biol Evol* 37:1118–1132. <https://doi.org/10.1093/molbev/msz297>
- Rick C (1978) The tomato. *Sci Am* 239:76–87
- Rick C (1960) Hybridization between *Lycopersicon esculentum* and *Solanum pennillii*: phylogenetic and cytogenetic significance. *Proc Natl Acad Sci USA* 46:78–82. <https://doi.org/10.1073/pnas.46.1.78>
- Rodríguez G, Liberatti D, Pratta G, et al (2010) Inheritance of shelf life and other quality traits of tomato fruit estimated from F1's, F2's and backcross generations derived from standard cultivar, nor homozygote and wild cherry tomato. *Euphytica* 176:137–147. <https://doi.org/10.1007/s10681-010-0241-9>
- Rodríguez G, Pratta G, Zorzoli R, Picardi L (2006) Recombinant lines obtained from an interspecific cross between *Lycopersicon* species selected by fruit weight and fruit shelf life. *J Am Soc Hortic Sci* 131:651–656. <https://doi.org/10.21273/JASHS.131.5.651>
- Rodríguez GR, Muños S, Anderson C, et al (2011) Distribution of SUN, OVATE, LC, and FAS in the Tomato Germplasm and the Relationship to Fruit Shape Diversity. *Plant Physiol* 156:275–285. <https://doi.org/10.1104/pp.110.167577>

- Saladié M, Rose JKC, Cosgrove DJ, Catalá C (2006) Characterization of a new xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH) from ripening tomato fruit and implications for the diverse modes of enzymic action. *Plant J* 47:282–295. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02784.x>
- Schauer N, Semel Y, Roessner U, et al (2006) Comprehensive metabolic profiling and phenotyping of interspecific introgression lines for tomato improvement. *Nat Biotechnol* 24:447–454. <https://doi.org/10.1038/nbt1192>
- Schmidt SM, Belisle M, Frommer WB (2020) The evolving landscape around genome editing in agriculture: Many countries have exempted or move to exempt forms of genome editing from GMO regulation of crop plants. *EMBO Rep* 21:e50680. <https://doi.org/10.15252/embr.202050680>
- Semel Y, Nissenbaum J, Menda N, et al (2006) Overdominant quantitative trait loci for yield and fitness in tomato. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:12981–12986
- Seymour GB, Chapman NH, Chew BL, Rose JKC (2013) Regulation of ripening and opportunities for control in tomato and other fruits. *Plant Biotechnol J* 11:269–278. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2012.00738.x>
- Shi L, Liu Q, Qiao Q, et al (2022) Exploring the effects of pectate and pectate lyase on the fruit softening and transcription profiling of *Solanum lycopersicum*. *Food Control* 133:108636. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108636>
- Slugina MA, Shchennikova AV, Kochieva EZ (2019) The expression pattern of the Pho1a genes encoding plastidic starch phosphorylase correlates with the degradation of starch during fruit ripening in green-fruited and red-fruited tomato species. *Funct Plant Biol* 46:1146–1157. <https://doi.org/10.1071/FP18317>
- SOLGENOMICS (2022) BLAST. Disponible en: <<https://solgenomics.net/tools/blast/>> [Acceso: 31 de mayo de 2022]
- Soyk S, H. Lemmon Z, Oved M, et al (2017) Bypassing negative epistasis on yield in tomato imposed by a domestication gene. *Cell* 169:1142–1155. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.032>
- Tanksley S, Nelson J (1996) Advanced backcross QTL analysis: a method for the simultaneous discovery and transfer of valuable QTLs from unadapted germplasm into elite breeding lines. *Theor Appl Genet* 92:191–203. <https://doi.org/10.1007/BF00223376>
- Tanksley SD, Grandillo S, Fulton TM, et al (1996) Advanced backcross QTL analysis in a cross between an elite processing line of tomato and its wild relative *L. pimpinellifolium*. *Theor Appl Genet* 92:213–224. <https://doi.org/10.1007/BF00223378>
- The Tomato Genome Consortium (2012) The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* 485:635–641. <https://doi.org/10.1038/nature11119>
- Tian T, Liu Y, Yan H, et al (2017) AgriGO v2.0: A GO analysis toolkit for the agricultural community, 2017 update. *Nucleic Acids Res* 45:W122–W129. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx382>
- Tieman D, Zhu G, Resende MFR, et al (2017) A chemical genetic roadmap to improved

- tomato flavor. *Science* 355:391–394. <https://doi.org/10.1126/science.aal1556>
- Ulusik S, Chapman NH, Smith R, et al (2016) Genetic improvement of tomato by targeted control of fruit softening. *Nat Biotechnol* 34:950–952. <https://doi.org/10.1038/nbt.3602>
- Vogel C, Marcotte EM (2012) Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet* 13:227–232. <https://doi.org/10.1038/nrg3185>
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23:4407–4414. <https://doi.org/10.1093/nar/23.21.4407>
- Vrebalov J, Ruezinsky D, Padmanabhan V, et al (2002) A MADS-Box Gene Necessary for Fruit Ripening at the Tomato Ripening-Inhibitor (*Rin*) Locus. *Science* 296:343–346. <https://doi.org/10.1126/science.1068181>
- Vuylsteke M, Peleman J, van Eijk M (2007) AFLP-based transcript profiling (cDNA-AFLP) for genome-wide expression analysis. *Nat Protoc* 2:1399–1413. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.174>
- Wang P, Li X, Wang Y, et al (2021) Redox proteomic analysis reveals the involvement of oxidative post-translational modification in tomato fruit ripening. *Postharvest Biol Technol* 178:111556. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2021.111556>
- Wang R, Lammers M, Tikunov Y, et al (2020) The *rin*, *nor* and *Cnr* spontaneous mutations inhibit tomato fruit ripening in additive and epistatic manners. *Plant Sci* 294:110436. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110436>
- Wang R, Tavano EC da R, Lammers M, et al (2019) Re-evaluation of transcription factor function in tomato fruit development and ripening with CRISPR/Cas9-mutagenesis. *Sci Rep* 9:1696. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38170-6>
- Wu X, Xiong E, Wang W, et al (2014) Universal sample preparation method integrating trichloroacetic acid/acetone precipitation with phenol extraction for crop proteomic analysis. *Nat Protoc* 9:362–374. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.022>
- Xu Y, Liu X, Huang Y, et al (2022) Ethylene Inhibits Anthocyanin Biosynthesis by Repressing the R2R3-MYB Regulator *S/AN2*-like in Tomato. *Int J Mol Sci* 23:7648. <https://doi.org/10.3390/ijms23147648>
- Xu ZS, Chen M, Li LC, Ma YZ (2011) Functions and Application of the AP2/ERF Transcription Factor Family in Crop Improvement. *J Integr Plant Biol* 53:570–585. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2011.01062.x>
- Yang L, Huang W, Xiong F, et al (2017) Silencing of *S/PL*, which encodes a pectate lyase in tomato, confers enhanced fruit firmness, prolonged shelf-life and reduced susceptibility to grey mould. *Plant Biotechnol J* 15:1544–1555. <https://doi.org/10.1111/pbi.12737>
- Yu QH, Wang B, Li N, et al (2017) CRISPR/Cas9-induced targeted mutagenesis and gene replacement to generate long-shelf life tomato lines. *Sci Rep* 7:11874. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12262-1>
- Zamir D (2001) Improving plant breeding with exotic genetic libraries. *Nat Rev Genet*

2:983–989. <https://doi.org/10.1038/35103590>

Zhou Y, Zhang Z, Bao Z, et al (2022) Graph pangenome captures missing heritability and empowers tomato breeding. *Nature* 606:527–534. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04808-9>

Zorzoli R, Pratta G, Picardi L (1998) Efecto de los mutantes nor y rin y de genes silvestres sobre características del fruto en *Lycopersicon*. *Mendeliana* 13:12–19

## ANEXO

**Tabla suplementaria S1.** Marcadores moleculares utilizados para la caracterización molecular de las NILs.

Cr	Marcador	Posición Física (SL4.0)	Secuencia de cebadores (5'-3')
1	IND1-0149	SL4.0ch01:1.504.228	F: TTGTTTCTAAGTTTTGATTCATCACC R: GGTCTACTCCTTTTTCAAACCTCG
	IND1-0317	SL4.0ch01:3.117.684	F: TGTAACTTTTCCCCTCTCACG R: AACACAGCACAGAACCAACG
	IND1-0512	SL4.0ch01:5.152.650	F: GAAAATCTACTTGTAAGCACACTCG R: AAACCTCGCGTTTAAAATGGTG
	SSR095	SL4.0ch01:70.499.385	F: CAATCCAACAAGCAATCCCT R: CCACATAACTAAGCCCACAACCTT
	IND1-8018	SL4.0ch01:72.757.986	F: AAACAAGGGGTGGAACCTGTG R: TATTCAGCATCTGGGCATGT
	SSR220060	SL4.0ch01:73.954.467	F: CCAGTTGCTTTCCAGATGT R: CTTTCTGACAGAGATTGCGT
	IND1-9461	SL4.0ch01:86.926.002	F: CATGACCTCGTAACTGCCTTC R: ACAGATTTGGGACCAGTGATCT
SSR288	SL4.0ch01:89.276.091	F: TCGTGGGAATTTGTTAACCC R: TCTTCATCGTCCTCCTCCTG	
2	IND2-2019	SL4.0ch02:18.591.294	F: CAGGGAGGCTTCTCAACATAA R: GCATGGATGTCTCCCATCTT
	SSR295	SL4.0ch02:35.928.914	F: CTCCAGAAGGAACCTCGATGC R: CAATTCCTTTCACCTGCCAC
	IND2-3976	SL4.0ch02:37.775.679	F: GGCCTGAATTCTTTCCATTTT R: TCATCAACTTTTAGTGCGTTC
	IND2-4384	SL4.0ch02:41.822.790	F: TGTTACAATTCACCCCACTGC R: TGATTTTCATAACAAGTAATGCTGCT
	SSR598	SL4.0ch02:43.849.175	F: TGGAAAGAAGCAGTAGCATTG R: CAACGAACATCCTCCGTTCT
	IND2-4465	SL4.0ch02:48.109.769	F: TGGTGAATTGTAATAACTTGTCTTG R: CAGCTTGGCTAAGCATACTTTTT
	LC	SL4.0ch02:45.189.395	F: GCCGAACACATCAACATTTTC R: CCTTTTCCTAAAAGATTTGGCATGAAG
FW2.2	SL4.0ch02:50.292.139	F: CATATAAAGTGTACTGACCGTCA R: CTGTCCTATTCAAGAGGTAATGAG	

	IND3-0117	SL4.0ch03:1.215.918	F: GGGGAAGCAAAGTGTCTTCA R: GCCATAAGCCAAGTCACTTCA
	IND3-0448	SL4.0ch03:4.382.632	F: AGAAGATTCGCGCCCATTAT R: GCCACATGTAGGGTCTTTGG
	IND3-5470	SL4.0ch03:49.258.124	F: TGTTGGTTTTGCAAATCAGG R: TGCAGCCAGAGTTCAGACAT
3	IND3-6289	SL4.0ch03:57.325.662	F: TGCTCCAAGAACTCCGGTAA R: ATGGTTCGATTCTTCGTTGC
	FW3.2	SL4.0ch03:59.219.937	F: AAAGTCGAATAAATTAGATGAACTTGA R: ATTGGGTCTCTCCTCGCTCT
	SSR320	SL4.0ch03:63.604.127	F: ATGAGGCAATCTTCACCTGG R: TTCAGCTGATAGTTCCTGCG
	SSR014	SL4.0ch03:64.198.992	F: TCTGCATCTGGTGAAGCAAG R: CTGGATTGCCTGGTTGATTT
	IND3-7057	SL4.0ch03:65.035.215	F: TCCAGACCATATACAGCACCTAAA R: CTCCAATGGGACCACTGTCT
	IND4-0238	SL4.0ch04:2.413.372	F: TCACAATGGTAGGGGTAAGGTC R: CAAAGCATGTCAAGGTCTTCAA
	IND4-0954	SL4.0ch04:9.580.217	F: CAGCAATCCCTTGAAAGTGC R: AATCTTTCCCAAGACATGC
4	IND4-3519	SL4.0ch04:34.376.500	F: AGGCATGTGCTTCCATTTTT R: ACAACTGGCTACGATCCTGAA
	IND4-4286	SL4.0ch04:42.093.601	F: AAGACTGGTGTGCGGTGATT R: CCAATTTGAGAGCGATAGGC
	IND4-6168	SL4.0ch04:59.676.440	F: GGGAGATAACCTGCCATCAG R: TGCACCAGAGGTAAGTTAGGC
	SSR115	SL4.0ch05:2.779.337	F: CACCCTTTATTCAGATTCCTCT R: ATTGAGGGTATGCAACAGCC
	IND5-0325	SL4.0ch05:3.300.671	F: CGGAAACGGCTTCTTTACC R: CGTGTGTAAGTTTTGTGCATTG
	IND5-0697	SL4.0ch05:7.037.638	F: CACTTCTCCGCTCCATCATT R: CATGTTTTTGCCATGGATGA
5	IND5-1450	SL4.0ch05:14.557.724	F: TTGGAGGCATGTCACTCCTT R: GCAATTTGCGCCCTTTCTAC
	IND5-4612	SL4.0ch05:45.365.642	F: AGGTGATGGCTTTGAGTGTTG R: CACATCAATCTGCTCCATGC
	IND5-5411	SL4.0ch05:53.404.855	F: CATCAGACACCTCAAACACGA R: GAGAATTTGACACTCGAAACGA
	IND5-6112	SL4.0ch05:60.515.167	F: CGGTGGGAGGTGAAAGGTA R: CCACTTGTTTTCCAAATCAATACA
	SSR162	SL4.0ch05:64.854.176	F: GCTCTCTACAAGTGGAACTTTCTC R: CAACAGCCAGGAACAAGGAT

6	SSR211044	SL4.0ch06:1.015.396	F: AGCAGGGTAAGTCTCCAGCA R: CAAGACCATTGGTGTCTGTG
	IND6-3385	SL4.0ch06:31.581.118	F: AATCGCAACTGCAAAAGAAGA R: TATGGGCAAAAATGGATTGG
	IND6-3717	SL4.0ch06:34.971.254	F: TGGTTCATCTATGCCGGATT R: TCTCCAAATGCCAAGACAAA
	SSR128	SL4.0ch06:35.315.633	F: GGTCCAGTTCAATCAACCGA R: TGAAGTCGTCTCATGGTTCG
	IND6-4186	SL4.0ch06:43.137.732	F: GGTTGGAATAAATTCTAAACAACATT R: ACAATGCTTCTCTATTAGGCAAA
	IND6-4561	SL4.0ch06:46.899.029	F: TGGTTTCAATGGGAGATTCA R: CGTGCTTAGCAATGATGGTG
7	IND7-0050	SL4.0ch07:487.557	F: CTTGACCTATTTAGCCAAGTTTTATAC R: TCTTTTCCAATGATCTAGCTGAGTA
	SSR286	SL4.0ch07:1.847.615	F: AGCTATGGAGTTTCAGGACCA R: ATTCAGGTAGCATGGAACGC
	SSR276	SL4.0ch07:7.500.501	F: CTCCGGCAAGAGTGAACATT R: CGACGGAGTACTTCGCATTT
	IND7-0918	SL4.0ch07:9.277.980	F: GTCCCAAACCAGAATCGAGA R: CATTTTGCACCACATCCAGA
	IND7-1436	SL4.0ch07:14.442.330	F: GAGAACTTGTTGCGTGTTCTTG R: CAGACGACAACGTGACAGGA
	IND7-4808	SL4.0ch07:47.874.530	F: GCTGACTGGTCTGGATGGAT R: CACGTATGAATTGGGCAACA
	IND7-6266	SL4.0ch07:62.585.355	F: CCAGCAGTTGTGTCATTAGAGC R: AAATAAGTTGGCGGTCATGAGT
	IND7-6489	SL4.0ch07:64.743.652	F: GGAATGGAATGATGGTTTG R: CATCCAGGCCAGGTTGAA
	SSR045	SL4.0ch07:64.854.889	F: TGTATCCTGGTGGACCAATG R: TCCAAGTATCAGGCACACCA
	IND7-6590	SL4.0ch07:65.738.355	F: GTTGTTGAACTTAACCGTTCAAAG R: CCCATGTCTTGGAATATTGTGA

	IND8-0171	SL4.0ch08:1.721.370	F: AAGATAGCAAGGAAGTTGAAGATCA R: AGTTGAACTTGCCGTGTGAA
	IND8-0367	SL4.0ch08:3.597.390	F: CTCTGCTGCTGCTGTCGT R: CTCACTACTCTCTCACCCCTGACC
	SSR327	SL4.0ch08:50.681.183	F: TCAGGATCAGGAGCAGGAGT R: TGGACTTGTTCCATGAACCC
	IND8-5616	SL4.0ch08:54.272.619	F: CACTCTCAAGTCTTGTGTCATATTCA R: CCTCTAATTTCTGGCAAGTGTA
8	IND8-6049	SL4.0ch08:58.604.346	F: ATGAATAAAATATAGGAAGTCGCACA R: GAAAGAGCGAGCCTGCTG
	SSR063	SL4.0ch08:59.221.251	F: CCACAAACAATTCCATCTCA R: GCTTCCGCCATACTGATACG
	SSR038	SL4.0ch08:59.542.280	F: GTTTCTATAGCTGAACTCAACCTG R: GGGTTCATCAAATCTACCATCA
	IND8-6206	SL4.0ch08:60.178.936	F: CCTCTGCTTGTGTCATCCCTTC R: ACGCTTTAGCTTACAACCTACATCTTG
	IND8-6582	SL4.0ch08:63.974.144	F: AGCGAAAAGTGTACCCATTGA R: GGGTTGCATGAAATCTGGAC
	IND9-0093	SL4.0ch09:954.425	F: AACACGATGGGGTGAAATGT R: GGAAGAATATTTTCATGATGATTTTGAG
	IND9-0232	SL4.0ch09:2.363.020	F: ATGACTTAATTCGTTAACATATGACTG R: GACTCACATAATTGAAGTTCATTCG
	SSR069	SL4.0ch09:3.578.234	F: TTGGCTGGATTATTCCTGTTG R: GCATTTGATAGAAGGCCAGC
9	SSR070	SL4.0ch09:3.663.546	F: TTTAGGGTGTCTGTGGGTCC R: GGAGTGCGCAGAGGATAGAG
	IND9-0744	SL4.0ch09:7.465.463	F: CTCTATGACCAGGCCAACG R: TTGGAGTTGTCATTTTCTGTGG
	IND9-5909	SL4.0ch09:55.162.504	F: AAAATGGGAAATGGCCAAAC R: AGACAGACCCTGCTCTAATACCA
	SSR110	SL4.0ch09:60.364.136	F: TGTAACGTCAAACCTCAGGTG R: CTCCGCAATGTGTTGTATGG

10	IND10-0015	SL4.0ch10:37.516	F: TTGAGAATGAGGGGGTGTTC R: TAACCACCCACGACTTAGCC
	SSR596	SL4.0ch10:2.707.998	F: TTCGGATAAAGCAATCCACC R: TCGATTGTGTACCAACGTCC
	IND10-0429	SL4.0ch10:4.087.865	F: ATATTCGGCGTCATTTAGGC R: GGTCGATCGTTTACTTTTCGAT
	IND10-0939	SL4.0ch10:9.069.669	F: CACAACTTGCGACAACCTCAA R: TGACCTTTATTGAGGCTGGTG
	SSR318	SL4.0ch10:55.882.817	F: GCAGAGGATATTGCATTCGC R: CAAACCGAACTCATCAAGGG
	IND10-6196	SL4.0ch10:61.747.181	F: GGGGTCAGTGGAACAGAAGA R: TCCTTCCCCACCCTCTTTTA
11	IND11-0017	SL4.0ch11:186.598	F: CATTCTGTGAAGGCAATATGA R: GATGTGCTATCAAATAGATGGATGA
	SSR080	SL4.0ch11:2.309.947	F: GGCAAATGTCAAAGGATTGG R: AGGGTCATGTTCTTGATTGTCA
	IND11-0530	SL4.0ch11:5.088.749	F: TTTATCTTGCATTTGGTGTGG R: ACCCAGCTAAAAGAATGAAGTCG
	IND11-4108	SL4.0ch11:39.814.279	F: GTTCATTAATTTTTGTGGGGAGT R: TGTTTAGTCGAACTTCACTATCTCC
	IND11-5266	SL4.0ch11:50.697.741	F: CAATTGACACAGTGGAGATAAGTTG R: TGCATTATCTTGGGCAGAAA
	SSRG036	SL4.0ch11:52.470.928	F: TGTTTTAACTGAAGATGTGTAAAATG R: TGAATGAGCAAGTTAAACAGTAAGG
	FAS	SL4.0ch11:52.946.405	*F1: CCAATGATAATTAAGATATTGTGACG *F2: ATGGTGGGGTTTTCTGTTCA R: CAGAAATCAGAGTCCAATTCCA
	SSR1061	SL4.0ch11:53.236.788	F: TCAGGTTAGTGTTCCATGCAG R: GTTCTACGTAAGATTCATG
IND11-5323	SL4.0ch11:54.214.603	F: AAGACAAACATGCCAGCCTTA R: TTGGAATAAACAAAAACAACAATCA	
12	IND12-0038	SL4.0ch12:401.630	F: GACGAAGCATCTCAGATTCA R: TCTTTTGTGGTTTTGCTC
	IND12-0379	SL4.0ch12:3.831.421	F: AGGGTCTGGCTTAGGCAAAT R: TGCTATTTTTATGAGCAGATGGTT
	IND12-0670	SL4.0ch12:6.751.549	F: AGGCTTGTGGGTGTATCG R: TGTCTAACAAACAAGGCATTCAA
	IND12-1197	SL4.0ch12:12.097.075	F: GGCATTCTCTAGGCAACAGC R: GCCAGCTAGCTCGATTTGTC
	IND12-6230	SL4.0ch12:61.905.584	F: ACCTCATGTTCTCAACCCACTT R: AATCAAGGATAAGTTGTGGTGCT

Cr: cromosoma; F: cebador directo; R: cebador reverso.

\*F1: cebador directo en presencia de la inserción; \*F2: cebador directo en ausencia de la inserción.

**Tabla suplementaria S2.** Enzimas de restricción, secuencia de adaptadores, cebadores pre-amplificación y combinación de cebadores para la amplificación selectiva usados para ADNc-AFLP.

Enzimas de restricción		<i>ApoI</i>	<i>MseI</i>
<b>Adaptadores</b>	<b>Hebra sentido</b>	CTCGTAGACTGCGTACC	AATTGGTACGCAGTCTAC
	<b>Hebra antisentido</b>	GACGATGAGTCCTGAG	TACTCAGGACTCAT
<b>Cebador de pre-amplificación (+0)*</b>		CTCGTAGACTGCGTACCAATT	GACGATGAGTCCTGAGTAA
<b>Cebadores de amplificación selectiva (+1)**</b>		GACTGCGTACCAATTA (Apo12)	GATGAGTCCTGAGTAAG (Mse37)
		GACTGCGTACCAATTC (Apo13)	GATGAGTCCTGAGTAAT (Mse38)
		GACTGCGTACCAATTT (Apo14)	
<b>Combinación de cebadores</b>			<b>A:</b> Mse37 - Apo12 <b>B:</b> Mse37 - Apo13 <b>C:</b> Mse37 - Apo14 <b>D:</b> Mse38 - Apo12

\* Secuencia de cebadores sin base selectiva (+0) al final

\*\* Secuencia de cebadores con una base selectiva (+1) al final