



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

Facultad de Ciencias Agrarias

**INTROGRESIÓN DE REGIONES GENÓMICAS DE LA
LÍNEA LA722 DE *Solanum pimpinellifolium* EN UN
GENOTIPO “ELITE” DE TOMATE PARA INCREMENTAR
LA CALIDAD DEL FRUTO**

Lic. en Biotecnología JAVIER HERNÁN PEREIRA da COSTA

Tesis presentada para optar al grado de

Doctor en Ciencias Agrarias

Director: Dra. Roxana Zorzoli

Co-Director: Dr. Gustavo R. Rodríguez

2011

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la Dra. Roxana Zorzoli por haberme dirigido, orientado y por haberme prestado su tiempo para la realización de esta tesis. Al Dr. Gustavo Rodríguez, por la paciencia, la ayuda, los consejos, el tiempo, la dedicación y el compañerismo.

También quiero agradecer al Dr. Guillermo Pratta, con quién tuve el primer contacto para comenzar primero mi tesina de grado y luego este trabajo, y a la Dra. Liliana Picardi por su ayuda incondicional y sus aportes durante la corrección de este manuscrito.

A todos y cada uno de los integrantes de las Cátedras de Genética y Mejoramiento Vegetal del Departamento de Biología y Recursos Naturales de la Facultad de Ciencias Agrarias (UNR) por su compañía y estímulo: Enrique, Fernando, Graciela, Vanina, Tatiana, Nacho, Eugenia, Andrea, Carolina, Paula, Gabriela, David, Sabina y Ezequiel.

A los tesinistas y ayudantes de la Cátedra de Genética que cooperaron con el desarrollo de este trabajo: Agostina, Gisela, Yanina, Juan y Cecilia.

A mis amigos de toda la vida por haberme apoyado en todo.

A mi novia que me acompañó durante todo el doctorado.

A mis abuelos, tíos, primos y en especial a mis padres y hermanos que me dieron la oportunidad de estudiar.

A CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas) y FONCyT (Fondo para la Investigación Científica y tecnológica) por su financiación a través de una Beca para poder llevar a cabo esta tesis Doctoral.

*Al Tomato Genetic Resources Center, Department of Vegetable Crops,
University of California (Davis, USA) por proveer la semilla de la entrada LA722 de
S. pimpinellifolium.*

INDICE

	Pág.
Agradecimientos	
Índice	1
Resumen	2
Abstract	4
Introducción	6
Hipótesis y Objetivo General	17
Capítulo I: Identificación de regiones genómicas asociadas a caracteres poscosecha en la primera retrocruza	18
Objetivos Específicos	19
Material y Métodos	20
Resultados	39
I.A. Análisis fenotípico	39
I.B. Análisis Molecular	58
I.C. Marcadores Moleculares en la generación BC ₁	75
Capítulo II: Caracterización fenotípica y molecular e identificación de regiones genómicas asociadas a caracteres de calidad de frutos en la generación BC ₂	103
Objetivos Específicos	104
Material y Métodos	105
Resultados	110
II.A. Análisis fenotípico de las familias BC ₂	113
II.B. Análisis Molecular	115
Capítulo III: Validación de <i>QTLs</i> para caracteres de calidad de fruto en familias BC ₁ S ₁	129
Objetivos Específicos	130
Materiales y Métodos	131
Resultados	141
III.A. Análisis fenotípico	141
III.B. Análisis Molecular	150
III.C. Validación de <i>QTLs</i>	190
Discusión	198
Conclusiones	246
Consideraciones Finales	249
Bibliografía	251

RESUMEN

La especie de tomate *Solanum pimpinellifolium* es un material genético sub-explotado para introgresar genes de origen silvestre que pueden mejorar la calidad de los frutos en la especie cultivada (*S. lycopersicum*). El objetivo de este trabajo fue identificar regiones genómicas de la entrada LA722 de *S. pimpinellifolium* asociadas a la larga vida poscosecha y caracteres que confieren calidad a los frutos para introgresarlas en un genotipo 'elite' de la especie cultivada. Se evaluaron 74 plantas BC₁ (primera retrocruza entre el cultivar Caimanta de *S. lycopersicum* como padre recurrente y la entrada LA722 de *S. pimpinellifolium*), los progenitores y la F₁ para once caracteres fenotípicos. Estos materiales se caracterizaron molecularmente por perfiles polipeptídicos de pericarpio de frutos al estado verde y rojo maduro y marcadores de ADN del tipo *SRAP* (*Sequence Related Amplified Polymorphism*) y *SSR* (*Single Sequence Repeat*). Se encontraron polipéptidos asociados a caracteres como firmeza, altura, forma, pH y vida poscosecha de los frutos. Dos bandas de *SRAP* estuvieron asociados a porcentaje de reflectancia, firmeza, acidez titulable y contenido en sólidos solubles. Los *SSR* estudiados permitieron identificar asociaciones o *QTL* (*Quantitative Trait Loci*) a todos los caracteres de calidad con excepción de la vida poscosecha en la BC₁. Para seguir el comportamiento de estos segmentos cromosómicos asociados a los caracteres de calidad se evaluaron los mismos *SSR* en 40 plantas BC₂. Dado que las poblaciones de retrocruzas no son adecuadas para la detección de *QTLs* aportados por el progenitor donante con efectos recesivos, también se evaluaron cinco familias BC₁S₁. Se encontraron asociaciones a todos los caracteres de calidad entre los que se destacan *QTLs* para la vida poscosecha de los frutos no detectados en las

generaciones de retrocruzas. Once *QTLs* fueron detectados en al menos una generación segregante con $p < 0,001$. Finalmente, la comparación entre las asociaciones encontradas en las tres generaciones permitió validar 12 *QTLs* ($p < 0,05$). Estos resultados demuestran que la introgresión de regiones genómicas asociadas a la vida poscosecha y a la calidad del fruto de *S. pimpinellifolium* puede mejorar a la especie cultivada.

ABSTRACT

Introgression of genomic regions from LA722 accession of *Solanum pimpinellifolium* into an “elite” genotype to increase the tomato fruit quality

The wild tomato, *Solanum pimpinellifolium*, is a useful genetic material for the introgression of genes to improve the fruit quality in the cultivated tomato (*S. lycopersicum*). The objectives of this work were to identify genomic regions of LA722 accession of *S. pimpinellifolium* associated with fruit long shelf life and fruit quality traits, and introgress them into an ‘elite’ germplasm. Seventy-four BC₁ plants (the first backcross between the Caimanta cultivar of *S. lycopersicum*, as the recurrent parent, and the LA722 accession of *S. pimpinellifolium* as the donor parent), the parental, and the F₁ hybrid were evaluated for eleven fruit quality traits. These materials were characterized by polypeptide profiles of fruit pericarp at two ripening stages (mature green and red ripe) and two types of DNA markers: SRAP (Sequence Related Amplified Polymorphism) and SSR (Simple Sequence Repeats). Some polypeptides were found associated with fruit traits such as firmness, height, shape, pH and fruit shelf life. Two SRAP fragments were also associated with a color parameter, firmness, titratable acidity and soluble solid content. Since the backcross generations are not the best for QTL (Quantitative Trait Loci) detection when the alleles of the donor parent have recessive effects; five families BC₁S₁ were evaluated as well. Associations with all fruit quality traits were found. QTLs for fruit shelf life were discovered, which were not detected in the backcross generations. Eleven QTLs were detected in one segregating generation ($p < 0.001$) at least. Finally, 12 QTLs were validated ($p < 0.05$) when all analyzed generations were compared. These results demonstrated that the

introgression of genomic regions associated with fruit shelf life and fruit quality traits from LA722 of *S. pimpinellifolium* would improve the cultivated species.

INTRODUCCION

El tomate cultivado (*Solanum lycopersicum* L.) es originario de América y su nombre deriva de la expresión *tómatl*, de la lengua *Nahuatl* utilizada por los indígenas aztecas y que los colonizadores castellanos tradujeron por tomate (Heiser, 1969; Corominas, 1990). Este vocablo es con el cual se lo reconoce en la mayor parte de los idiomas occidentales. Todas las especies silvestres son nativas del oeste de América del Sur, considerado el centro de origen. Ellas se distribuyen en la región andina desde Ecuador hasta el norte de Chile y también existen dos especies endémicas en las Islas Galápagos (Spooner *et al.*, 2005). A pesar de que la distribución del género está en Sudamérica, aún está en discusión cuál es el área más probable de su domesticación (Labate *et al.*, 2007; Peralta *et al.*, 2008). Hay dos hipótesis alternativas que han sido surgidas: una propone el sur de México como el lugar donde ocurrió la domesticación (Jenkins, 1948; Rick y Fobes, 1975), mientras que la otra hipótesis sostiene que sucedió en Perú (De Candolle, 1886). A la llegada de los españoles al Nuevo Mundo no existía tradición sobre su uso como alimento en Sudamérica, pero formaba parte de la dieta de los pueblos aztecas y en la de otros pueblos de la zona centroamericana. La llegada a la vieja Europa se hizo a través de España a mediados del siglo XVI, de ahí pasó a Italia y de ésta a Francia. El tomate, como la mayor parte de los alimentos llevados a Europa desde el Nuevo Mundo, no triunfó inmediatamente. En un principio fue más valorado como planta ornamental por sus flores amarillas y sus frutos rojos y amarillos que como alimento.

El tomate cultivado (*S. lycopersicum*) anteriormente denominado taxonómicamente como *Lycopersicon esculentum* Mill.) es una Solanácea de gran importancia económica en el mundo. La calidad de los frutos juega un rol muy

importante tanto en la elección de los cultivares por parte de los productores como en la demanda del producto obtenido por parte de los consumidores. En Argentina es una de las hortalizas más importantes por el nivel de consumo (18 kilogramos/habitante/año), por el valor económico de la producción y la superficie destinada al cultivo (17.500 has) que representa el 0,6% de la superficie dedicada a este cultivo a nivel mundial (FAO, 2009). Es un alimento poco energético, ya que aproximadamente el 95% de su peso es agua y cerca de un 4% son hidratos de carbono. Sin embargo por el alto nivel de consumo es una fuente importante de ciertas sales minerales (principalmente potasio y magnesio). De su contenido en vitaminas se destacan la B1, B2, B5, vitamina C y carotenoides como el licopeno (pigmento que da el color rojo característico al tomate). Las propiedades antioxidantes del licopeno convierten al tomate en un alimento nutracéutico capaz de prevenir enfermedades coronarias y cancerígenas (Blum *et al.*, 2005).

Tanto en las variedades como en los genotipos híbridos que se comercializan para consumo en fresco se ha prestado especial atención al aspecto externo más que al interno, considerando al primero como sinónimo de calidad. Esto ha llevado a calificar a los productos sólo por su aspecto externo (tamaño, forma, color, ausencia de manchas y defectos, uniformidad). Pero hoy en día los mercados están interesados en diferenciar los productos por otros atributos, como son los internos relacionados con sabor, aroma, acidez, contenido en azúcares y/o en vitaminas. Si bien el tacto y la vista hacen a la elección inicial de los frutos por parte del consumidor según estos atributos externos, la aceptación final del fruto es el resultado de un balance entre los componentes del sabor y aroma que son los atributos internos más buscados. También lo son la consistencia de la pulpa y el color (Kader *et al.*, 1978). Los principales

componentes responsables del sabor del fruto son los azúcares y ácidos, mientras que los compuestos volátiles hacen al aroma (Angosto Trillo *et al.*, 2001).

Actualmente un carácter de fundamental importancia, altamente apreciado para la comercialización del fruto fresco, es la prolongación de la vida poscosecha de los frutos (*long shelf life*). Una forma de controlar el proceso de madurez del tomate es a través de la incorporación de genes “larga vida” a cultivares comerciales. En el campo de la biotecnología se han hecho considerables progresos para modificar vías metabólicas involucradas en la madurez del fruto. Smith *et al.* (1988) han desarrollado la técnica de ARN *antisense* para reducir la expresión de la enzima poligalacturonasa alterando específicamente el metabolismo de la pectina y la textura del fruto. Las plantas así modificadas producen frutos que retardan su proceso de madurez permaneciendo intactos por extensos períodos. Meli *et al.* (2010) demostraron que la degradación de los aminoglucanos está involucrada en el ablandamiento del fruto durante la madurez, por lo tanto la manipulación genética de los procesos de degradación de los N-glucanos podría ser una estrategia apropiada para aumentar la vida poscosecha de los frutos sin provocar efecto alguno sobre otros caracteres de calidad. Sin embargo los materiales transgénicos aún presentan resistencia por parte de los consumidores debido a la manipulación que han soportado y que aún a nivel de la sociedad no es completamente entendida (Bartozewski *et al.*, 2003).

Por otro lado en *S. lycopersicum* se han detectado varios genes mutantes que afectan el proceso natural de la madurez en los frutos tales como *rin* (*ripening inhibitor*), *nor* (*non ripening*), *Nr* (*never ripe*) y *alc* (alcobaca) (Chalukova y Manuehyan, 1991; Thompson *et al.*, 1999; Andrade *et al.*, 2005; Barry y

Giovannoni, 2006) siendo estos genes que bloquean o alargan el proceso de la madurez los que confieren la larga vida poscosecha a los frutos. La mayoría de los híbridos actuales de larga vida comercial llevan en heterocigosis el gen *rin*, el *alc* o el *nor*, los que producen acciones negativas sobre la calidad debido a los efectos pleiotrópicos que tienen sobre otras vías metabólicas involucradas en brindar al fruto un adecuado sabor, aroma y/o textura.

El tomate cultivado es una especie autógama y de reducida base genética (Rick y Fobes, 1975; Warnock, 1988). Con respecto a la presencia de variabilidad genética en este género existen varios estudios que analizando la variabilidad genética han demostrado la presencia de marcados polimorfismos en las formas silvestres, las que se encuentran en la zona andina, frente al monomorfismo encontrado en las líneas centroamericanas (Rick y Holle, 1990). Esta situación sería consecuencia del efecto de la selección natural durante el proceso migratorio del antepasado silvestre hacia América Central tanto como de la selección artificial a favor de los tipos deseados durante la domesticación y su posterior fijación debido a la reproducción autógama de la especie (Rick, 1988). Los cambios evolutivos más importantes que ha logrado la domesticación de esta especie son la reducción de la base genética, la modificación del sistema reproductivo y el incremento del tamaño del fruto (Warnock, 1988). Los cuellos de botella que se han dado por efecto de la domesticación y/o adaptación a distintos nichos ecológicos, han sido en parte responsables del lento progreso genético observado hasta mediados del siglo pasado (Rick, 1991). Esto explicaría la lentitud de los primeros programas de mejora practicada por los agricultores. Se sabe que los primeros programas de mejoramiento del cultivo se iniciaron en EE.UU. hacia 1920 (Rick, 1976). En los últimos treinta años el principal

incremento en el progreso genético estimado en el tomate se debió al reemplazo de las variedades por genotipos híbridos. Sin embargo en la actualidad las poblaciones básicas de mejora presentan un *plateau* fisiológico tanto para incrementar el rendimiento como la calidad (Grandillo *et al.*, 1999a).

Diversos autores (Rick, 1979; Hermsen, 1984; Schauer *et al.*, 2006) sostienen que las especies silvestres de *S. lycopersicum* representan una importante fuente de variabilidad y constituyen recursos genéticos de gran valor para el desarrollo de variedades en un programa de mejoramiento. Menos del 5% de la variabilidad genética total está presente en el tomate cultivado mientras que el resto se encuentra disponible en las especies silvestres del género (Miller y Tanksley, 1990).

La especie silvestre *S. pimpinellifolium* L. (anteriormente denominada taxonómicamente como *Lycopersicon pimpinellifolium* (L.) Mill.) es también una especie autógama y puede cruzarse con el tomate cultivado en ambos sentidos dando lugar a híbridos fértiles. Rick (1973) señaló la importancia de la introgresión de genes de esta especie durante la evolución del tomate cultivado. Esta especie se caracteriza por presentar frutos de menor tamaño y peso, de alta calidad nutritiva con una mayor concentración de vitamina C, azúcares solubles y un elevado contenido en materia seca total (Stevens y Rick, 1986). Pratta *et al.* (1996) y Zorzoli *et al.* (1998) encontraron que genotipos de esta especie y sus híbridos con el tomate cultivado presentaban mayor vida poscosecha respecto a los cultivares comerciales y al mismo tiempo presentaban mejor calidad del fruto (en cuanto a color, textura y sabor).

Muchos caracteres de importancia agronómica en el tomate, tales como la resistencia a enfermedades, tolerancia a *stress* y atributos de calidad de los frutos fueron introducidos por retrocruza (*backcross*) en genotipos de la especie cultivada a partir de especies silvestres (Rick, 1974). En los programas genéticos tradicionales, el germoplasma exótico ha sido exclusivamente utilizado para incorporar genes mayores. Este uso limitado puede ser explicado por la dificultad que tenían los mejoradores en el pasado para distinguir los genes favorables de los desfavorables presentes en el germoplasma silvestre y que podría ser superado en la actualidad por el desarrollo de tecnologías moleculares (Grandillo *et al.*, 1999a).

Una de las biotecnologías que ofrece amplias posibilidades de ser incorporada eficientemente a un programa de mejoramiento genético es la aplicación de marcadores moleculares para la selección asistida (MAS, *Marker Assisted Selection*). La aplicación de marcadores moleculares de alta resolución permite la localización de genes de interés en el genoma vegetal acortando así los tiempos y el espacio necesario para la selección de individuos superiores que manifiesten el carácter en cuestión. La información suministrada por los marcadores moleculares permite, por otro lado, incrementar la eficiencia del proceso de selección ya que las plantas portadoras de características indeseables podrían detectarse precozmente (en estadio juvenil), disminuyendo el tiempo de evaluación y evitando el uso de espacio y tiempo con plantas de baja calidad, lo que llevaría a un aumento de la ganancia genética obtenida en cada ciclo del programa. El establecimiento de las relaciones de ligamiento genético para facilitar la identificación y localización de genes que controlan caracteres de importancia agroeconómica permite así establecer una adecuada estrategia de

mejoramiento asistida por marcadores moleculares. Según Tanksley (1993) mediante el uso de marcadores moleculares es posible estimar con suficiente precisión el número, tipo y magnitud de los efectos génicos involucrados en la determinación de un carácter cuantitativo, así como las interacciones entre los diferentes *QTLs* (*Quantitative Trait Loci*, o *loci* de caracteres cuantitativos) y su localización en el mapa cromosómico de la especie. Las poblaciones comúnmente usadas para análisis de *QTLs* son generaciones F_2/F_3 , retrocruzas (BC, *backcrosses*), o líneas endocriadas recombinantes (*RILs*, *Recombinant Inbred Lines*). Es de destacar que utilizar material vegetal obtenido de retrocruzas avanzadas permite obviar los problemas que surgen al analizar *QTLs* en poblaciones con marcado desequilibrio. En una población de retrocruzas avanzadas los genotipos son más similares al padre *elite* recurrente que en una población de primera retrocruza, lo que permite avanzar más rápidamente en el programa de selección fenotípica debido a la baja frecuencia de los posibles alelos deletéreos del progenitor donante (Tanksley y Nelson, 1996). Por otro lado este método de la retrocruzas, seguido de autofecundación, también permite la detección de genes recesivos provenientes del padre donante involucrados en la expresión del carácter de interés. De esta forma son necesarias pocas generaciones adicionales para obtener líneas casi isogénicas (*NILs*, *Near Isogenic Lines*).

El genoma del tomate ha sido caracterizado por una amplia gama de marcadores de ADN incluyendo *RFLP* (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), *RAPD* (*Random Amplified Polymorphic DNA*), *SSR* (*Simple Sequence Repeat*), *AFLP* (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), *SCAR* (*Sequence Characterized Amplified Region*) y *SNPs* (*Single Nucleotide*

Polymorphism) (Kardolus *et al.*, 1998; Frary *et al.*, 2005, Primieri Carelli *et al.*, 2006, Sim *et al.*, 2009). En general estos estudios señalan que la variación genética es menor entre las variedades cultivadas, pudiéndose ampliar este espectro con el uso de especies silvestres. Azanza *et al.* (1995) encontraron una elevada asociación entre la variabilidad para sólidos solubles y pH y determinados marcadores *RFLP* en un cruzamiento entre *S. lycopersicum* y *S. chmielewskii* (anteriormente denominada *L. chmielewskii*). Grandillo y Tanksley (1996) realizaron un análisis genético de marcadores *RFLP*, microsatélites y *RAPD* en un cruzamiento entre *S. lycopersicum* var. *esculentum* y *S. pimpinellifolium*, concluyendo que es frecuente la segregación distorsionada hacia uno u otro progenitor y que, por otro lado, los *RAPD* y microsatélites marcan preferentemente zonas cercanas a los centrómeros. Posteriormente, estos autores (Grandillo *et al.*, 1999b) detectaron asociaciones significativas entre los marcadores y caracteres cuantitativos de importancia agronómica en ese mismo cruzamiento, que permitía explicar hasta un 59 % de la variación fenotípica observada de algunos caracteres. Bernacchi *et al.* (1998) identificaron por el método de retrocruza avanzada varios *QTLs* de caracteres de importancia agronómica en cruzamientos interespecíficos del tomate cultivado con accesiones de *S. pimpinellifolium* y *S. habrochaites* (anteriormente denominada *L. hirsutum*). Varias características del fruto como peso, contenido en sólidos solubles y acidez fueron asociadas a marcadores moleculares (Pratta *et al.*, 2011a; Lecomte *et al.*, 2004) mientras que Rosseaux *et al.* (2005), detectaron *QTLs* para compuestos antioxidantes en un cruzamiento entre el tomate cultivado *S. lycopersicum* y la especie silvestre *S. pennelli*.

Los *SSR* (*Simple Sequence Repeat*) también llamados microsatélites, son repeticiones en tándem de secuencias de ADN que consisten en unidades de mono-, di-, tri-, tetra- o penta-nucleótidos que cubren todo el genoma, y se encuentran tanto en animales como vegetales. En plantas son más frecuentes repeticiones de A-T, mientras que en animales lo son A-C o T-G. El polimorfismo es revelado por amplificación por *PCR* (*Polymerase Chain Reaction*) a partir de ADN genómico total, usando dos cebadores de entre 17 y 25 pares de bases que flanquean el *locus* microsatélite. Las ventajas de los *SSR* radican en su naturaleza multialélica, comportamiento codominante, facilidad de amplificación por *PCR*, relativa abundancia y extensa cobertura del genoma, además de la exigencia de una pequeña cantidad de ADN de partida. Son ampliamente polimórficos tanto entre como dentro de especies (Powell *et al.*, 1996).

Los *SRAP* (*Sequence Related Amplified Polymorphism*) son marcadores basados en *PCR* que utilizan dos cebadores, un cebador sentido de 17 bases y un cebador anti-sentido de 18 bases. Los cebadores sentidos consisten de una secuencia principal de 14 bases. Las primeras diez bases del extremo 5' son las secuencias llamadas de "relleno" que no presentan una constitución específica, seguida de la secuencia CCGG y luego tres nucleótidos selectivos en el extremo 3'. La variación en estos tres nucleótidos selectivos genera un juego de cebadores que comparten la misma secuencia principal. El cebador anti-sentido consiste de los mismos componentes que el cebador sentido, pero con las siguientes variaciones: la secuencia de "relleno" es seguida de la secuencia AATT en lugar de CCGG y se añaden tres bases selectivas en el extremo 3'. La única regla para el diseño de los cebadores sentido y anti-sentido es que no se formen rulos u otra estructura secundaria, y que tienen que tener un contenido de alrededor de 40-50

% de GC. Por otro lado las secuencias de “relleno” de los cebadores sentido y anti-sentido deben ser diferentes unas de otras y pueden ser de 10 u 11 bases de largo. El propósito de usar secuencias CCGG en el núcleo del primer par de cebadores de *SRAP* es apuntar a los exones de regiones con marcos abiertos de lectura. Esto está basado en el hecho de que los exones normalmente tienen regiones ricas en GC. Si bien las regiones expresadas tienden a estar conservadas entre diferentes individuos, el cebador anti-sentido es diseñado de manera de evitar este problema. La secuencia AATT del cebador anti-sentido se une preferentemente a regiones ricas en AT que se encuentran frecuentemente en promotores e intrones. Dado que los intrones, promotores y el ADN espaciador son generalmente variables entre diferentes individuos, esto hace que los *SRAP* sean factibles de generar bandas polimórficas basadas en intrones y exones y que puedan ser evaluadas como marcadores dominantes: presencia/ ausencia (Li and Quiros, 2001).

Los perfiles polipeptídicos también constituyen marcadores moleculares que ayudan a caracterizar genotipos y ya han sido exitosamente utilizados en diversas especies como marcadores moleculares (Hamada, 1998; Del Luca *et al.* 2000; Garello *et al.* 2000). Aunque son menos polimórficos que los marcadores de ADN, pueden brindar rápidamente información sobre la presencia de variabilidad genética para procesos biológicos que estarían estrechamente asociados al carácter bajo estudio, ya que están referidas a regiones del genoma que están siendo efectivamente expresadas en ciertas partes del vegetal y bajo determinadas condiciones internas y/o externas (Smith y Smith, 1992). Además, la obtención de fracciones polipeptídicas por medio de SDS-PAGE es un método sencillo y poco costoso para implementar en una primera etapa de

caracterización, selección y manejo de material genético (Bretting y Widrechner, 1995). Pratta (2004) encontró diferencias genotípicas para la inducción de las enzimas glutamina sintetasa (GS) y glutamato deshidrogenasa (GDH) en el pericarpio de frutos en dos estados de madurez en materiales genéticamente uniformes de tomates cultivados y silvestres que discrepaban para la vida poscosecha de sus frutos. Por otra parte, Rodríguez *et al.* (2008) y Pereira da Costa *et al.* (2011) detectaron polimorfismo en los perfiles polipeptídicos de frutos al estado verde maduro y rojo en un genotipo mutante para la madurez, una entrada de *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* y sus generaciones F₁ y F₂. Además, la variancia genética encontrada para varios caracteres de calidad de frutos como peso, forma, contenido en sólidos soluble, acidez, color y vida poscosecha tuvieron correspondencia con el polimorfismo observado a nivel de los perfiles polipeptídicos, y varios polipéptidos mostraron asociación con los caracteres de calidad.

Hasta el momento no existen antecedentes del uso de poblaciones de retrocruzas de tomate en las cuales los perfiles polipeptídicos o *SRAP* hayan sido utilizados para la detección de *QTLs* para caracteres de calidad del fruto.

Estos antecedentes sugieren que es posible continuar explorando el aporte del germoplasma silvestre como fuente de variabilidad y que el tomate cultivado y la especie *S. pimpinellifolium* son un material genético adecuado para analizar el efecto de la introgresión de genes de origen silvestre sobre caracteres tales como la vida poscosecha y otros que contribuyen a la calidad del fruto.

HIPOTESIS DE TRABAJO

La identificación de regiones genómicas asociadas a la vida poscosecha y a atributos que confieren calidad al fruto en *S. pimpinellifolium* y su introgresión en la especie cultivada posibilitan obtener genotipos superiores en calidad.

OBJETIVO GENERAL

Identificar regiones genómicas asociadas a la larga vida poscosecha y caracteres que confieren calidad a los frutos en la entrada LA722 de *S. pimpinellifolium* para introgresarlas en un genotipo 'elite' de la especie cultivada.

CAPITULO I

IDENTIFICACION DE REGIONES GENOMICAS ASOCIADAS A CARACTERES POSCOSECHA EN LA PRIMERA RETROCRUZA

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Estimar las acciones génicas involucradas en caracteres de calidad de fruto utilizando los valores fenotípicos de los progenitores y F_1 y obtener una estimación de la variancia genética para estos caracteres a través de la generación BC_1 .
- Analizar el grado de polimorfismo a nivel de perfiles polipeptídicos en fruto y los marcadores de ADN (*SSR* y *SRAP*) que se presentan en la generación de estos progenitores y la F_1 .
- Verificar la segregación mendeliana de estos polimorfismos moleculares en la generación BC_1 y detectar *QTLs* para caracteres de calidad de fruto.

MATERIALES Y METODOS

La experiencia se realizó en el Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario (UNR) y en el laboratorio de Biología Molecular y Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales, ubicado en la localidad de Zavalla, Provincia de Santa Fe (33° 1”S). (Foto I-1)

Foto I-1. Vista aérea del Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias, UNR.



Material vegetal: El genotipo utilizado como progenitor recurrente fue el cultivar Caimanta de *S. lycopersicum* (CAI). Caimanta tiene un hábito de crecimiento determinado, plantas compactas, frutos de tipo platense (mayor diámetro que altura), con un promedio de peso de $98,5 \pm 9,9$ g y una vida poscosecha promedio de $9,7 \pm 0,9$ días (Rodríguez *et al.*, 2006). El progenitor donante fue la línea LA722 de *S. pimpinellifolium*, con hábito de crecimiento indeterminado y un gran número de flores por inflorescencia, con frutos esféricos y de tamaño pequeño, con $0,9 \pm 0,1$ g de peso y $18,7 \pm 0,4$ días de vida poscosecha (Rodríguez *et al.*, 2006). El cultivar Caimanta fue provisto por la EEA de INTA Cerrillos (Salta, Argentina) y la línea LA722 por el *Tomato Genetic Resources Center, Department of Vegetable Crops, University of California* (Davis, USA).

El cruzamiento para la obtención de la generación F_1 se realizó en forma manual siguiendo la técnica descrita por Rick (1973) usando el cv. Caimanta como progenitor

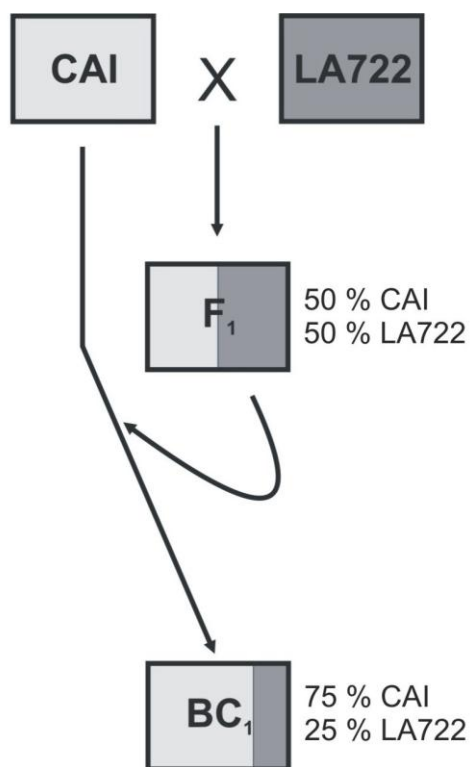


femenino en los meses de Septiembre a

Noviembre de 2006. Las flores utilizadas como progenitor femenino fueron emasculadas un día antes de la apertura de la flor (estimado por el cambio de color de la corola de amarillo pálido a amarillo crema) y se polinizaron al día siguiente con el progenitor masculino. Las plantas F_1 fueron retrocruzadas por el padre cultivado para producir las plantas de la primera retrocruza o *Backcross 1* (BC_1) durante los meses de Septiembre a Noviembre de 2007, utilizando el genotipo cultivado como progenitor femenino (Figura I-1). En el mes de Junio de 2008 se sembraron 15 semillas de cada progenitor y F_1 y 120 de la generación

BC₁ en cajas de Petri para su germinación, plantándose posteriormente en vasos de plásticos de 330 cc. Los plantines fueron trasplantados en invernadero en un diseño completamente aleatorizado cuando presentaron cuatro hojas verdaderas totalmente desplegadas. La distancia entre plantas fue de 35 cm y la distancia entre surcos de 1 m. Previo al trasplante se realizó una fertilización orgánica del suelo. Las plantas fueron regadas dos veces por semana lo suficiente para evitar el estrés durante el período de crecimiento.

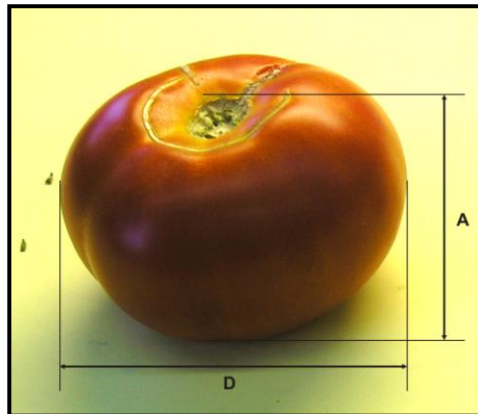
Figura I-1. Diagrama de cruzamientos para la obtención de la generación BC₁ a partir del cultivar Caimanta (CAI) de *S. lycopersicum* y LA722 de *S. pimpinellifolium*.



Distintos tonos de gris indican el porcentaje teórico del genoma de cada progenitor en cada generación.

Caracteres evaluados: En cada planta, en 10 frutos cosechados al estado pintón, estado en el cual se detectan visualmente los primeros síntomas de acumulación de carotenoides (Giovannoni, 2004), se evaluaron los siguientes caracteres:

- Peso (P, en g).
- Diámetro (D, en cm).
- Altura (A, en cm).



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



En frutos cosechados al estado rojo maduro, considerado cuando el fruto presentó más del 90% de su superficie con el color de madurez (Nuez, 1995) se evaluaron los siguientes caracteres:

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



- Acidez (Ac): medida a través del pH del jugo homogeneizado y de la acidez titulable (At, en gramos de ácido cítrico/ 100 gramos de jugo

homogeneizado) calculada a partir del volumen de NaOH 0,1 N necesario para llevar a 8,1 el pH de 10 g de jugo disueltos en 100 ml de agua destilada.

Para evaluar estos caracteres se tomaron tres muestras independientes de 3 a 8 frutos por planta dependiendo del tamaño del fruto.

- Firmeza (F): medida sobre el plano ecuatorial, en dos áreas opuestas del fruto con un durómetro tipo Shore A (Durofel DFT100) con una puntera de 0,10 cm².

- Color, a través del porcentaje de reflectancia (L) y el cociente a/b. Los parámetros L, a (absorbancia a longitudes de onda de 540 nm) y b (absorbancia a longitudes de onda de 675 nm) fueron determinados con un Chromameter CR 400. El rango de variación de estos parámetros es para a desde + 60 para tonos rojos a - 60 para tonos verdes, para b desde + 60 para amarillos a - 60 para azules y para L desde 0 para blancos a 100 para negro. El valor de los parámetros de color de las muestras se obtuvo promediando las medidas obtenidas de tres lecturas en la zona ecuatorial de cada fruto.



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



En la Tabla I-I se detalla el número de frutos evaluados en cada genotipo progenitor y en las generaciones F_1 y BC_1 .

Tabla I-I: Número de frutos evaluados por genotipo progenitor, la F₁ y en la generación BC₁ del cruzamiento entre *S. lycopersicum* (CAI) y LA722 de *S. pimpinellifolium*.

Genotipos	Nro. de frutos evaluados
CAI	52
LA722	132
F ₁	110
BC ₁	1240
Total	1534

Análisis estadístico: La distribución normal de los caracteres cuantitativos evaluados en todas las generaciones se verificó a través de la prueba de Shapiro-Wilk (1965). La comparación de los valores medios para cada carácter entre los progenitores y la F_1 se llevo a cabo por la prueba t de Student (Snedecor, 1964) Para aquellos caracteres en que se encontraron diferencias significativas entre los progenitores se calcularon los grados de dominancia (d/a) (Falconer y Mackay, 1996). Se analizaron los patrones de distribución de frecuencias de las variables en la generación BC_1 . Se utilizó un análisis de la variancia (ANOVA) para estimar el porcentaje de variación genética (% VG) en la generación BC_1 (adaptado de Mariotti, 1986). Se calcularon los coeficientes de correlación fenotípicos (r) entre los caracteres (Sokal y Rohlf, 1969). Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el *software* InfoStat Versión 1.0 (Di Renzo *et al.*, 2001).

Marcadores moleculares de polipéptidos en distintos estados de madurez del fruto: Para obtener los perfiles de polipéptidos totales se cosecharon frutos en los estados verde maduro (VM) y rojo maduro (RR) en los progenitores y en las generaciones F_1 y BC_1 . Para cada genotipo uniforme se recolectaron tres muestras independientes (un único fruto de plantas diferentes) en cada estado de madurez: VM y RR.

La extracción de las proteínas se realizó a partir del pericarpio del fruto siguiendo el protocolo de Hurkman y Tanaka (1986). Las proteínas fueron extraídas de 1 g de pericarpio, homogeneizado en N_2 líquido con mortero. El tejido fue mezclado en presencia de 1 ml de buffer de extracción (100 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 2 % de β - mercaptoetanol) y 4 ml de fenol saturado con Tris buffer 100 mM (pH 8,0). Luego fue centrifugado a 5000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. La fase fenólica fue removida, extraída nuevamente

con un volumen de buffer acuoso y mezclada con 4 volúmenes de acetato de amonio en metanol (0,1 M). Las muestras se incubaron a -20 °C durante la noche. Las proteínas fueron precipitadas por centrifugación a 5000 rpm durante 15 minutos a 4° C. El pellet se lavó dos veces con acetato de amonio en metanol (0,1 M) y una vez con acetona al 80 % y se resuspendió en buffer de siembra (25 mM Tris pH 6,8, 1 % SDS, 10 % glicerol, 5 % de β - mercaptoetanol y 0,002 % bromofenol blue). Los polipéptidos fueron separados usando un gel de poliacrilamida a una concentración de 10 % en condiciones desnaturizantes en el cual se sembró igual cantidad de polipéptidos en cada una de las calles (20 μ g, cuantificados por la técnica de Bradford). La electroforesis se realizó a intensidad de corriente constante (35 mA) durante 1 a 1,5 hs. La tinción se realizó por *Coomasie Brilliant Blue*. Los geles fueron analizados con el *software* GelPro Analyzer 3.0.

Determinación de los Marcadores moleculares de ADN: Se emplearon marcadores moleculares de ADN del tipo *SRAP* y *SSR*.

Se extrajeron hojas jóvenes de los progenitores, la F_1 y cada planta de la generación BC_1 , las que se mantuvieron en *freezer* -80° hasta el momento de la extracción de ADN. Se utilizó un *kit* comercial (*Wizard® Genomic DNA Purification Kit* de Promega®). El ADN fue extraído de 40 mg de hoja en un tubo Eppendorf de 1,5 ml homogeneizado con pilón en presencia de N_2 líquido hasta obtener un polvo fino, al cual se adicionaron 600 μ l de una solución de lisis nuclear y se agitó vigorosamente 3 seg. Luego se incubó la muestra en un baño termostatzado a 65 °C durante 15 min. Con el objetivo de eliminar el ARN se adicionó a cada muestra 3 μ l de RNAsa, se mezcló por inversión 2 a 5 veces y posteriormente se incubó durante 15 min a 37 °C. Para eliminar las proteínas éstas fueron precipitadas con

una solución provista por el *kit*. Se centrifugaron las muestras a 13000 rpm durante 3 min y el sobrenadante fue trasvasado a otro tubo Ependorf de 1,5 ml que contenía 600 µl de isopropanol a temperatura ambiente. Luego de agitar suavemente las muestras, fueron centrifugadas a 13000 rpm durante 1 min. El sobrenadante fue descartado y el precipitado lavado con una solución 70 % v/v de etanol. El pellet obtenido luego de una nueva centrifugación durante 1 min a 13000 rpm se lo dejó secar a temperatura ambiente por 15 min para luego resuspenderlo en 100 µl de buffer TE (10 mM Tris pH 7,4 y 1 mM EDTA pH 8,0).

Los ADN fueron cuantificados en un gel de agarosa al 1 % y teñido con bromuro de etidio utilizando un testigo estándar de ADN de fago lambda (100 ng/µl). Una vez conocida su concentración se realizaron las diluciones correspondientes de manera de obtener soluciones de trabajo de 20 ng/µl de ADN.

Tanto para marcadores *SRAP* como *SSR* se hicieron amplificaciones por duplicado para cada genotipo progenitor y la F₁

Metodología para los SRAP: La técnica de *SRAP* se basa en la utilización de dos tipos de *primers* (cebadores), el primero, “*forward*” (sentido) de 17 bases y ricos en GC y el segundo, “*reverse*” (anti-sentido) de 18 bases ricos en AT. Se utilizaron cuatro combinaciones de *primers* diferentes para posteriormente seleccionar, a partir del grado de polimorfismo presentado entre los progenitores, las combinaciones a ser utilizadas en la caracterización de la generación BC₁ (Tabla I-II).

Tabla I-II. Combinaciones de cebadores de *SRAP* (*Sequence Related Amplified Polymorphism*), secuencias de los *primers forward* y *reverse*.

Combinaciones	Primer Forward	Primer Reverse
1- Me1-EM2	Me1: 5'-TGAGTCCAAACCGGATA-3'	EM2: 5'-GACTGCGTACGAATTTGC-3'
2- Me2-EM1	Me2: 5'-TGAGTCCAAACCGGAGC-3'	EM1: 5'-GACTGCGTACGAATTAAT-3'
3- Me2-Ga34	Me2: 5'-TGAGTCCAAACCGGAGC-3'	Ga34: 5'-CCAAATGGAACAAAATGATG-3'
4- Me8-Sa14	Me8: 5'-TGAGTCCTTTCCGGTGC-3'	Sa14: 5'-TTACCTTGGTCATACAACATT-3'

Para la reacción de *PCR*, cada muestra (20 μ l volumen final) consistió en 20 ng de ADN genómico, 5 mM de cada dNTPs, 50 mM de $MgCl_2$, 10 μ M de cada primer, 5,2 μ l 10X Taq buffer y 2 unidades de Taq polimerasa. Se utilizó el siguiente protocolo de amplificación: 5 min a 94 °C, 5 ciclos de tres pasos: 1 min a 94 °C, 1 min a 35 °C y 1 min a 72 °C, para los siguientes 35 ciclos la temperatura de hibridación se elevó a 50 °C, finalizando con un paso de elongación de 10 min a 72 °C. La separación de los fragmentos amplificados se realizó en geles de poliacrilamida (5% p/v) a temperatura ambiente. La corrida electroforética se llevó a cabo a 50 W constante durante 3 hs. La visualización se realizó mediante la tinción con $AgNO_3$ que consiste de los siguientes pasos: fijación (30 min en agitación en 1,5 l de una solución de ácido acético al 10% v/v), lavado (dos lavados con agua destilada de 5 min cada uno), tinción (30 min en agitación en 2 l de una solución de nitrato de plata ($AgNO_3$) 0,1% p/v y formaldehído 0,07% v/v) y finalmente revelado (agitación hasta aparición de las bandas en 2 l de una solución de carbonato de calcio ($CaCO_3$) 3% p/v, formaldehído 0,07% v/v y tiosulfato de sodio 0,4 % p/v). El análisis de los geles fue llevado a cabo con el *software* GelPro Analyzer 3.0.

Metodología para los SSR: Se utilizaron aquellos que se encuentran disponibles en <http://www.solgenomics.net>, obteniendo además, la secuencia de *primers*, el tamaño de los alelos del genotipo cultivado y el silvestre y su localización cromosómica. Se eligieron marcadores polimórficos distribuidos en el genoma de tomate para identificar regiones asociadas a los caracteres bajo estudio (Tabla I-III). Se seleccionaron al menos dos *SSR* por cromosoma, ubicados preferentemente en brazos distintos. Para la reacción de *PCR*, cada muestra (30 μ l de volumen final) consistió de 40 ng de ADN genómico, 2,5 mM de

dNTPs, 40 mM de cloruro de magnesio ($MgCl_2$), 10 μM de cada primer, 3 μl 10X de Taq buffer y 1,5 unidades de Taq polimerasa. Se utilizó el siguiente protocolo de amplificación: 1 min a 94 °C, luego se repitieron los siguientes tres pasos: 30 seg a 94°C, 30 seg a 55 °C y 2 min a 72 °C durante 32 ciclos, finalizando con un paso de elongación de 5 min a 72 °C. La temperatura de *annealing* varió de acuerdo al *SSR* amplificado. Dichas temperaturas variaron en un rango de 52 a 56 °C. La amplificación de las muestras, tanto para *SSR* como *SRAP*, fueron probadas en geles de agarosa al 1%, sembrando 2 μl del amplificado junto con 1 μl del *loading* buffer 5X. La electroforesis se realizó a 60 V constante durante 20 minutos y la tinción se llevó a cabo con bromuro de etidio por un lapso de 15 min.

La separación de los fragmentos de amplificación se realizó en geles de poliacrilamida (6% p/v) a temperatura ambiente. Las condiciones de la corrida electroforética fueron las mismas que para *SRAP*, con la diferencia que fueron corridos dos *SSR* por gel. Los *SSR* corridos en un mismo gel, fueron seleccionados en base a su tamaño, habiendo sembrado primero el de menor tamaño para evitar la superposición con el siguiente *SSR*. El momento del sembrado en el gel del segundo *SSR* estuvo desfasado 1 h del primero. La visualización se llevó a cabo mediante tinción con nitrato de plata ($AgNO_3$), siguiendo el mismo procedimiento que para *SRAP*.

Tabla I-III. SSR (*Simple Sequence Repeat*) probados en los genotipos progenitores (*S. lycopersicum* (CAI) y LA722 de *S. pimpinellifolium*) y la F₁, secuencias de los *primers forward* y *reverse* y su ubicación cromosómica.

SSR	Cr	Secuencia <i>primer forward</i> (5'-3')	Secuencia <i>primer reverse</i> (5'-3')
SSR009	1	009F: CCCTTTGCAAGTCTTCTCA	009R: CCCTCTTGCCTAAACATCCA
SSR095	1	095F: CAATCCAACAAGCAATCCCT	095R: CCACATAACTAAGCCCACAACCT
SSR134	1	134F: CCCTCTTGCCTAAACATCCA	134R: CGTTGCGAATTTCAGATTAGTT
SSR266	1	266F: CAAGTTCACCTCATTGACCC	266R: TGTGTGAGCACTAAAGGACGA
SSR288	1	288F: TCGTGGGAATTTGTTAACCC	288R: TCTTCATCGTCTCCTCCTCG
SSR308	1	308F: TTTCCCTGTTTCAGCCTTTG	308R: GGCACGAGAATTTAGCCACT
SSR316	1	316F: CCACCGCAACAACCTTATT	316R: GGGTGGTGAAGAAGGATCTGA
SSR032	2	032F: TGGAAAGAAGCAGTAGCATTG	032R: CAACGAACATCCTCCGTCT
SSR295	2	295F: CTCCAGAAGGAAGTCCGATGC	295R: CAATTCCTTTACCTGCCCA
SSR349	2	349F: GAGTGATCATCCATCCTCTCA	349R: GGAAGAGACTTTGGACTAAGGGA
SSR598	2	598F: TGGAAAGAAGCAGTAGCATTG	598R: CAACGAACATCCTCCGTCT
SSR014	3	014F: TCTGCATCTGGTGAAGCAAG	014R: CTGGATTGCCTGGTTGATTT
SSR111	3	111F: TTCCTCCCTTCCATCAGTTCT	111R: TTTGCTGCTATACTGCTGACA
SSR320	3	320F: ATGAGGCAATCTTACCTGG	320R: TTCAGCTGATAGTTCTCGCG
SSR601	3	601F: TCTGCATCTGGTGAAGCAAG	601R: CTGGATTGCCTGGTTGATTT
SSR043	4	043F: CTCCAAATTGGGCAATAACA	043R: TTAGGAAGTTGCATTAGGCCA
SSR296	4	296F: CCGGAACAAGTCCCTTCTATA	296R: TCAGCCAAAGTTGAGTACATC
SSR306	4	306F: ACATGAGCCCAATGAACCTC	306R: AACCATTCCGCACGTACATA
SSR310	4	310F: GCGATGAGGATGACATTGAG	310R: TTTACAGGCTGTCGCTTCT
SSR450	4	450F: AATGAAGAACCATTCCGCAC	450R: ACATGAGCCCAATGAACCTC
SSR115	5	115F: CACCCTTTATTAGATTCTCT	115R: ATGAGGGTATGCAACAGCC
SSR152	5	152F: ATCAAGGAACCTTTAGCTCC	152R: TGCATTAAGGTTTATAAATGA
SSR162	5	162F: GCTCTCTACAAGTGGAACTTTCTC	162R: CAACAGCCAGGAACAAGGAT
SSR128	6	128F: GGTCCAGTTCAATCAACCGA	128R: TGAAGTCGTCTCATGGTTCC
SSR211044	6	211044F: AGCAGGGTAAGTCTCCAGCA	211044R: CAAGACCATTGGTGTCTGTG
SSR578	6	578F: CAGCACAACCAGACTTATCT	578R: AAGTCCATCTCATCTATCA
SSR045	7	045F: TGTATCCTGGTGGACCAATG	045R: TCCAAGTATCAGGCACACCA
SSR276	7	276F: CTCCGGCAAGAGTGAACATT	276R: CGACGGAGTACTTCGCATTT
SSR286	7	286F: AGCTATGGAGTTTCAGGACCA	286R: ATTCAGGTAGCATGGAACGC
SSR038	8	038F: GTTCTATAGCTGAACTCAACCTG	SSR038R: GGGTTCATCAAATCTACCATCA
SSR063	8	063F: CCACAAACAATTCCATCTCA	063R: GCTTCGCCATACTGATACG
SSR327	8	327F: TCAGGATCAGGAGCAGGAGT	327R: TGGACTTGTTCCATGAACCC
SSR344	8	344F: TGTGCTCGAACTCTCCAAA	344R: CATAGGAGAGGTAACCCGCA
SSR069	9	069F: TTGGCTGGATTATCCTGTTG	069R: GCATTTGATAGAAGGCCAGC
SSR070	9	070F: TTTAGGGTGTCTGTGGGTCC	070R: GGAGTGCAGAGGATAGAG
SSR110	9	110F: TGTAACGTCAAATTCAGGTG	110R: CTCCGCAATGTGTTGTATGG
SSR333	9	333F: GTTCCGCTTGAGAAACAAC	333R: CCAATGCTGGGACAGAGAT
SSR383	9	383F: ATTGTACAAAGACCCGTGGC	383R: GTTGCACACTGGATCAATGC
SSR034	10	034F: TGTAACGTCAAATTCAGGTG	034R: CTCCGCAATGTGTTGTATGG
SSR223	10	223F: TGGCTGCCTCTTCTCTGTTT	223R: TTTCTTGAAGGGTCTTTCCC
SSR318	10	318F: GCAGAGGATATTGCATTGCG	318R: CAAACCGAACTCATCAAGGG
SSR596	10	596F: TTCGGATAAAGCAATCCACC	596R: TCGATTGTGTACCAACGTCC
SSRG036	11	G036F: TGTTTTAACTGAAGATGTGTAATG	G036R: TGAATGAGCAAGTTAAACAGTAAGG
SSR080	11	080F: GGCAAATGTCAAAGGATTGG	080R: AGGGTCATGTTCTTGATTGCA
SSR1061	11	1061F: TCAGGTTAGTGTCCATGCGAG	1571R: GTTCTACGTAAGATTTCATG
SSR1526	11	1526F: CAATCAAGGTTAGTCTCTTG	1527R: TCCACTCAAACAATTCTCTG
SSR2220060	11	220060F: CCAGTTGCTTTCCAGATGT	220060R: CCTTCTGACAGAGATTGCGT
SSRG111	12	G111F: GGGTTCGATACACCTTAGC	G111R: CCTTCTATATAATCCACCAATGC
SSRH301	12	H301F: TGCTGTTTTGTTGGCTCAC	H301R: TGTTTCATATCTTTGATGGCATGT
SSR020	12	020F: GAGGACGACAACAACAACGA	020R: GACATGCCACTTAGATCCACAA
SSR176	12	176F: TCTCGTCTCCATCAAATACAAT	176R: CAACCATCAGCATAGAAAACAT

Cr: cromosoma, F: forward, R: reverse

Análisis estadístico y genético de los datos moleculares: Se analizaron los geles cuantificando el total de bandas obtenidas y calculando el porcentaje de bandas polimórficas en los progenitores y en el híbrido F₁. En el caso de los perfiles de polipéptidos, para cada estado de madurez, se verificó la segregación mendeliana 1:1 (presencia: ausencia) de las bandas en la generación BC₁ por la prueba de χ^2 (Snedecor, 1964). En el caso de los marcadores SRAP de naturaleza dominante se siguió la misma metodología.

Dada la naturaleza codominante de los marcadores microsatélites, se probó la segregación mendeliana esperada para una BC₁ (1:1, homocigotas: heterocigotas) a través de una prueba de χ^2 (Snedecor, 1964).

El porcentaje de germoplasma recuperado en la generación BC₁ calculado a partir de los datos de SSR evaluados, se obtuvo como:

$$\% GR = \left[\sum_{i=1}^N \left(\frac{nCC \times 2 + nCP}{nM \times 2} \times 100 \right) \right] \times \frac{1}{N}$$

Donde % GR es el porcentaje de germoplasma del padre recurrente (CAI) recuperado, *nCC* el número de marcadores SSR que fueron homocigotas para el alelo de CAI en el individuo *i*, *nCP* el número de marcadores SSR que fueron heterocigotas para el individuo *i*, *nM* número totales de marcadores SSR evaluados en el individuo *i* y *N* es el número de individuos evaluados. Se analizó la distribución de frecuencias para el porcentaje del genoma de CAI recuperado en cada planta BC₁.

La asociación entre marcadores moleculares (perfiles polipeptídicos, SSR y SRAP) y los caracteres de interés agronómico se determinó a través del método

de un solo punto (*single point analysis*, Tanksley, 1993) con el fin de detectar su asociación. Para ello, se realizó un ANOVA a un criterio de clasificación, en el cuál los diferentes marcadores fueron las fuentes de variación. Se estableció un valor de probabilidad de $p < 0,001$ como límite para definir las diferencias entre las medias de los caracteres según el marcador (variable clasificatoria), de manera de minimizar el Error de Tipo-1 en la identificación de *QTLs* no verdaderos que pudieran aparecer por el alto número de comparaciones a efectuar (este valor correspondería a un *LOD-score* de 2,4 Grandillo y Tanksley, 1996). Sin embargo, también se registraron con un fin exploratorio aquellos *QTLs* detectados con una probabilidad de $p < 0,05$, dado que podrían ser validados en las posteriores generaciones BC_1S_1 y BC_2 . Se utilizó el valor de R^2 para estimar el porcentaje de variancia fenotípica total explicada para el *QTL* estudiado por cada marcador (Liu, 1998). En aquellos casos en los que se detectó más de una banda asociada a un mismo carácter se llevó a cabo un ANOVA a dos criterios de clasificación para comprobar el efecto conjunto de las bandas y segregar el efecto de la interacción.

RESULTADOS

I.A. Análisis fenotípico

I.A.1. Análisis fenotípico en los progenitores y la F₁

Todas las variables mostraron distribución normal. El análisis de Shapiro-Wilk indicó distribución normal de todos los caracteres con valores de W cercanos a 1.

Los valores medios y el error estándar de los genotipos progenitores y la F₁ para cada uno de los caracteres se muestran en la Tabla I-IV. Esta tabla indica además los grados de dominancia para aquellas variables en las cuales fueron encontradas diferencias significativas entre los progenitores y la F₁.

Tabla. I-IV. Valores medios, error estándar y grados de dominancia para *S lycopersicum* (CAI), *S. pimpinellifolium* (LA722) y la F₁ para cada variable analizada.

Caracteres	Genotipos			d/a
	CAI	LA722	F ₁	
Diámetro (cm)	6,46 ± 0,28c	1,22 ± 0,03a	2,17 ± 0,03b	-0,62
Altura (cm)	3,99 ± 0,14c	1,13 ± 0,02a	2,02 ± 0,03b	-0,37
Forma	0,65 ± 0,03a	0,95 ± 0,03b	0,93 ± 0,01b	0,86
Peso (g)	97,84 ± 11,1c	1,17 ± 0,08a	6,21 ± 0,20b	-0,89
Lv (días)	7,96 ± 0,63a	15,26 ± 0,60b	16,39 ± 0,37b	1,28
Firmeza	35,88 ± 3,52a	65,61 ± 1,40c	49,30 ± 1,97b	-0,09
L	41,10 ± 1,92c	38,52 ± 0,21b	36,84 ± 0,32a	-2,30
a/b	0,94 ± 0,04a	1,42 ± 0,02b	1,34 ± 0,03b	0,66
SS (°Brix)	7,52 ± 0,03a	7,25 ± 0,35a	8,73 ± 0,08b	-
pH	4,79 ± 0,03a	4,83 ± 0,06a	4,76 ± 0,04a	-
At (g)	0,26 ± 0,01a	0,91 ± 0,03c	0,43 ± 0,01b	-0,46

d/a: grados de dominancia, Lv: vida poscosecha, L: porcentaje de reflectancia, a/b: índice de color, SS: contenido en sólidos solubles, At: acidez titulable. Letras distintas indican diferencias significativas (p < 0,05).

Los genotipos progenitores fueron diferentes en todos los caracteres analizados, excepto para el contenido en sólidos solubles y el pH. Se observaron diferencias altamente significativas ($p < 0,001$) entre CAI y LA722 para los siguientes caracteres: diámetro ($t = 18,45$), altura ($t = 20,83$), peso ($t = 8,71$), forma ($t = -17,45$), vida poscosecha ($t = -8,40$) y firmeza ($t = -9,32$). No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre LA722 y la F_1 para vida poscosecha ($t = 1,60$).

El genotipo cultivado (CAI) fue quien presentó los valores más altos para caracteres relacionados con el tamaño de los frutos como peso, diámetro y altura, pero presentó la menor firmeza ($F = 35,88 \pm 3,52$) y la vida poscosecha más corta ($Lv = 7,96 \pm 0,63$).

Para componentes del color fruto el genotipo silvestre mostró valores más altos para el índice de color a/b ($a/b = 1,42 \pm 0,02$), y acidez titulable ($At = 0,91 \pm 0,03$). En la mayoría de los casos, la generación F_1 tuvo valores que se ubican entre los observados para los genotipos progenitores, a excepción del contenido en sólidos solubles y el parámetro de color L. En la Foto I-2 y I-3 se muestran frutos de ambos genotipos progenitores y la F_1 .

Foto I-2. Frutos al estado rojo maduro de *S. lycopersicum* (CAI), LA722 de *S. pimpinellifolium* y la F₁

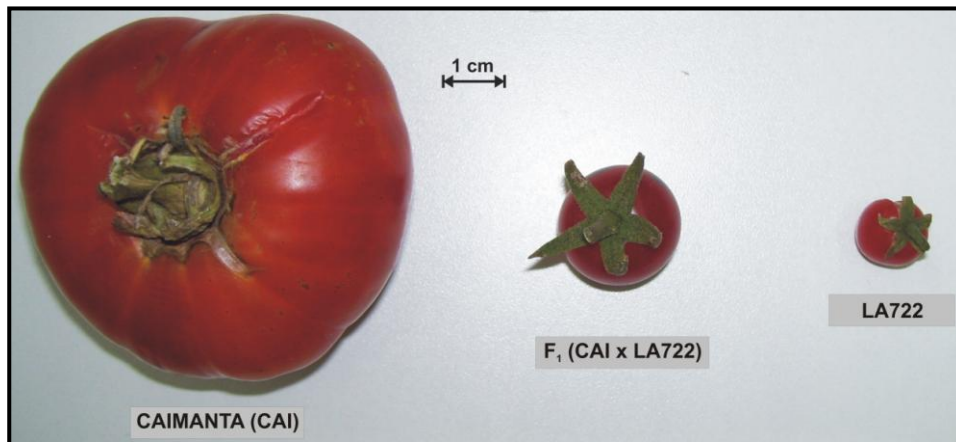
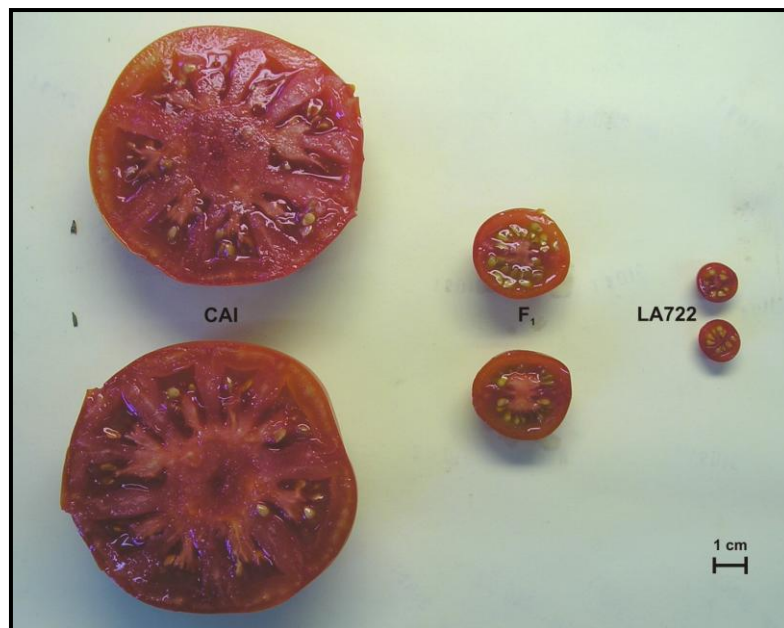


Foto I-3. Corte transversal de frutos de *S. lycopersicum* (CAI), LA722 de *S. pimpinellifolium* y F₁ en estado rojo maduro.

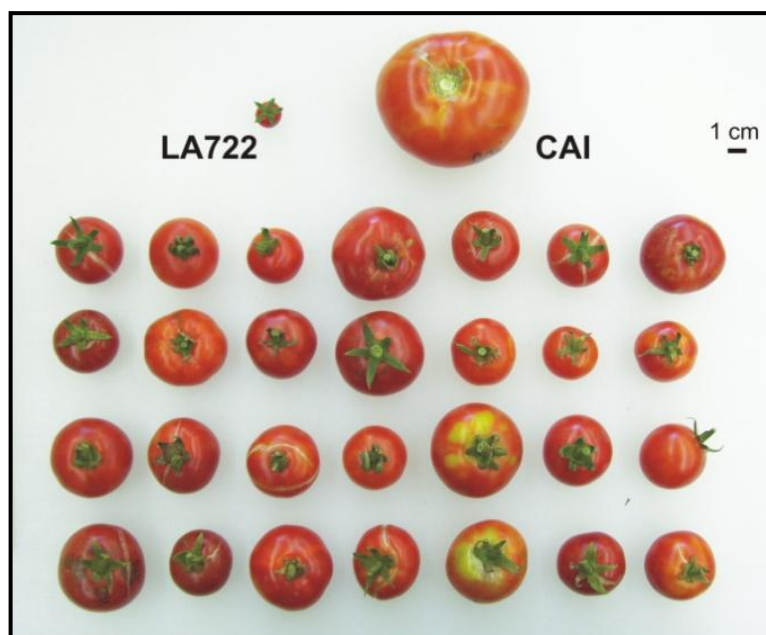


Cuando se calcularon los grados de dominancia, se encontró sobredominancia para L ($d/a = -2,30$), dominancia completa hacia el progenitor silvestre (LA722) para a/b ya que el valor de d/a no difirió significativamente de 1 ($d/a = 0,66$) y dominancia parcial hacia el genotipo cultivado (CAI) para At ($d/a = -0,46$). No hubo diferencias significativas para pH entre los progenitores y la F_1 por lo que no se calcularon los grados de dominancia para esta variable. Se encontró dominancia parcial hacia el progenitor silvestre, para diámetro ($d/a = -0,62$), altura ($d/a = -0,37$) y peso ($d/a = -0,89$). Los valores negativos indican un desplazamiento de la media de la F_1 hacia el progenitor silvestre, que presenta los valores medios más bajos para caracteres relacionados con el tamaño de los frutos. Dominancia completa de LA722 fue observado para la vida poscosecha y forma de los frutos ($d/a = 1,28$ y $d/a = 0,86$, respectivamente), es decir un valor de d/a que no difirió de 1. Se observó aditividad para Firmeza dado que el valor de d no difirió de cero ($d/a = 0,09$).

I.A.2 Análisis fenotípico en la generación BC₁

La prueba de Shapiro-Wilk permitió verificar que todos los caracteres cuantitativos se distribuyeron normalmente con valores de W cercanos a 1 y no significativos.

Foto II-4. Frutos de plantas BC₁ y de los progenitores *S. lycopersicum* (CAI) y LA722 de *S. pimpinellifolium*.



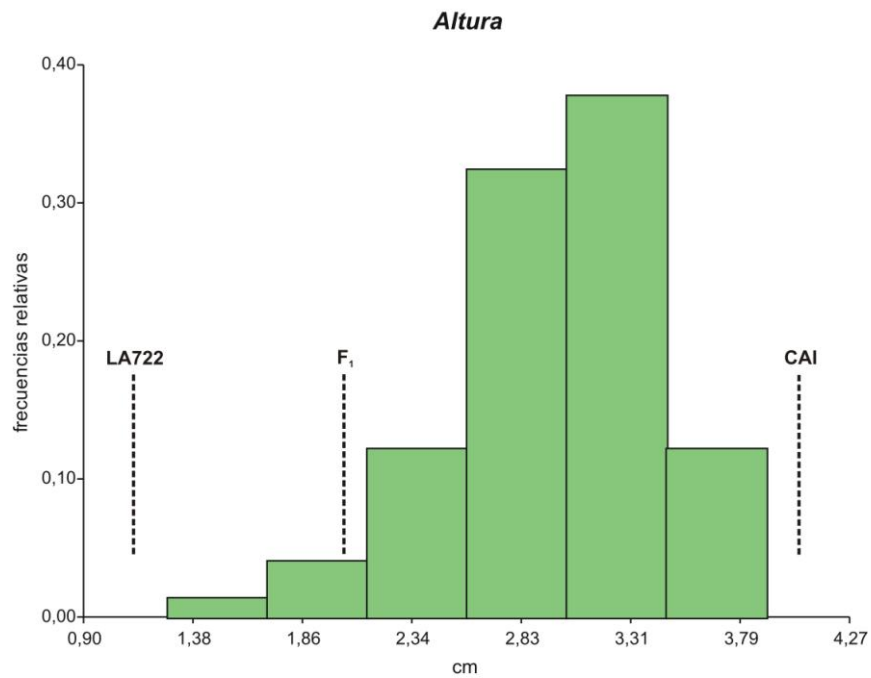
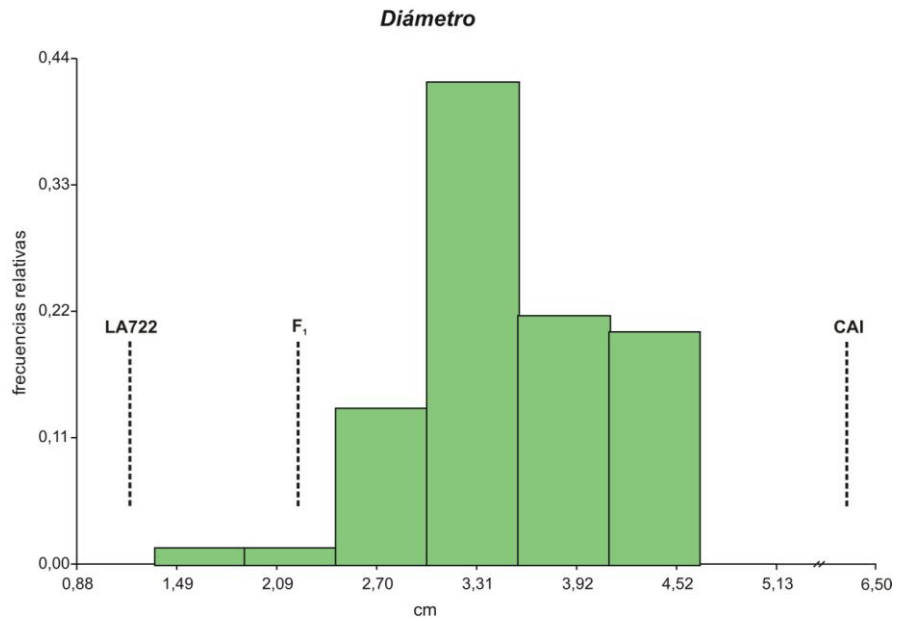
Para el diámetro de los frutos, los individuos se distribuyeron cercanos al valor de la F_1 y la altura de los frutos mostró un desplazamiento en la BC_1 hacia el progenitor cultivado. En cambio, el peso de los frutos mostró en su distribución asimetría hacia el progenitor silvestre.

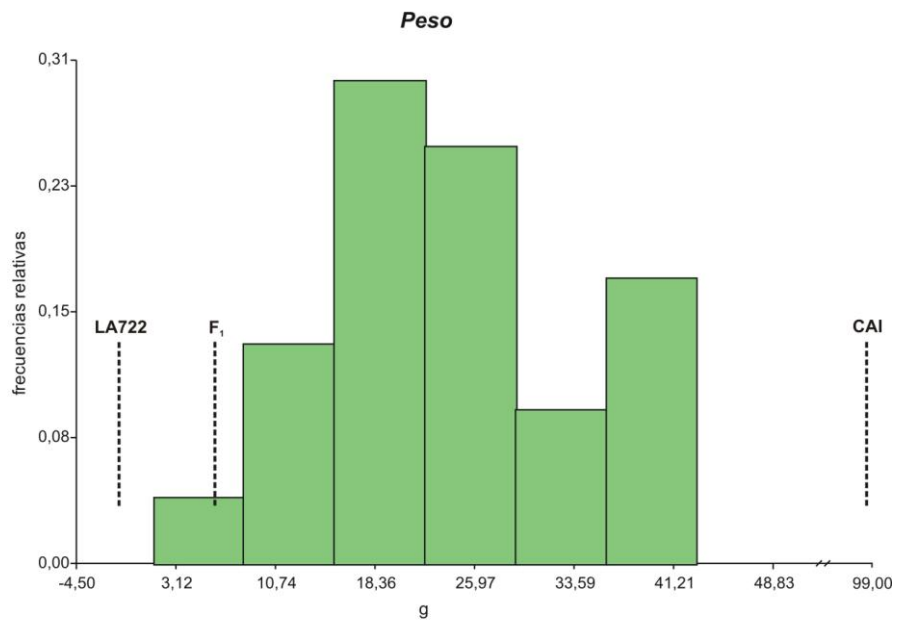
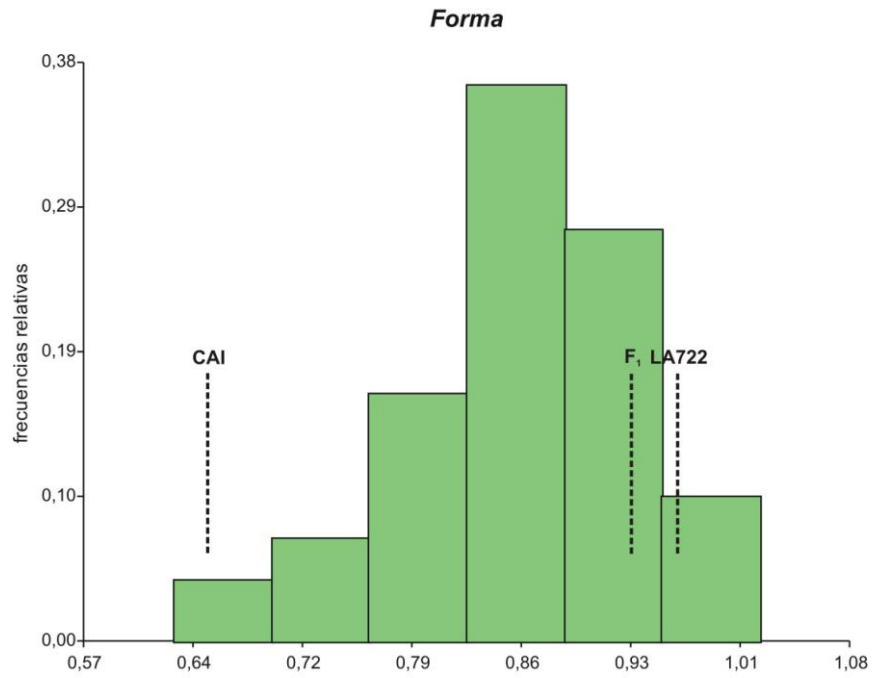
Por otro lado la dominancia completa exhibida por el progenitor silvestre para la forma y vida poscosecha de los frutos se evidenció por el sesgo de las distribuciones de estas variables en la BC_1 . Similar tendencia pudo observarse para la firmeza, aunque la media en la generación BC_1 estuvo más cercana al punto medio entre los progenitores. La distribución para parámetros de color como L y a/b presentaron un desplazamiento hacia el genotipo cultivado.

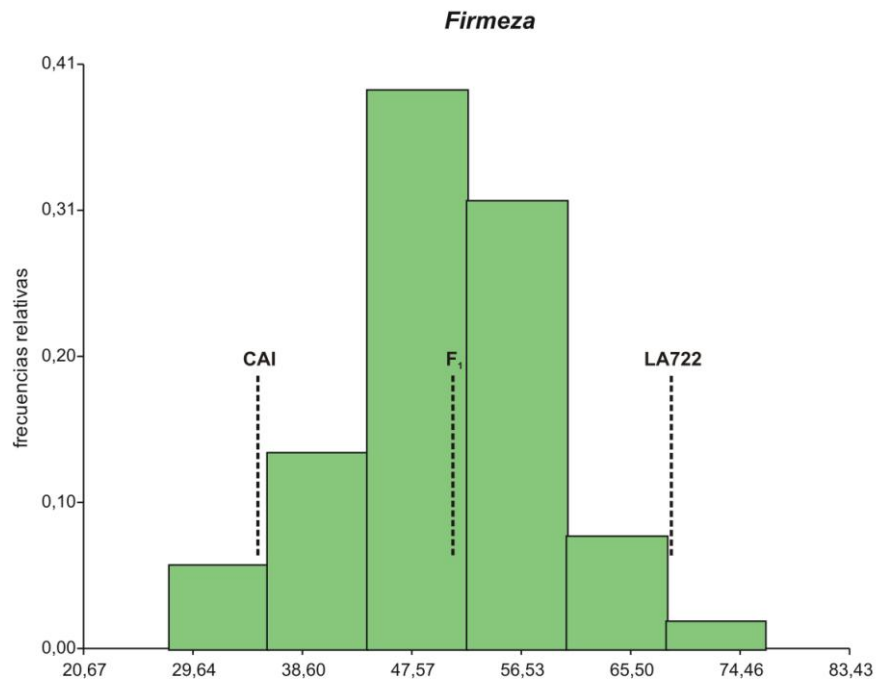
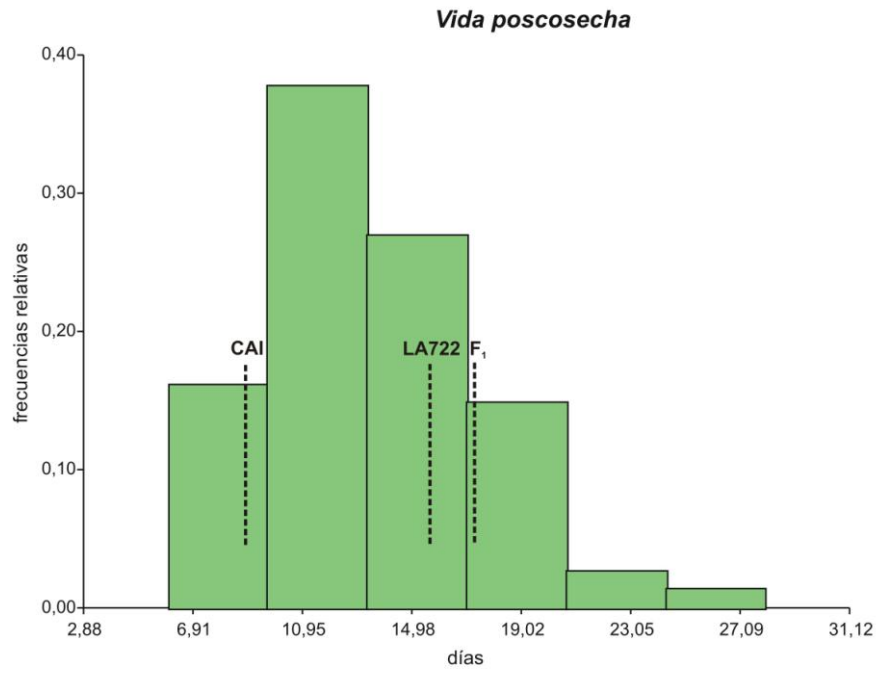
En el caso del contenido en sólidos solubles y pH, se observó una apertura de la variación fenotípica en la generación BC_1 .

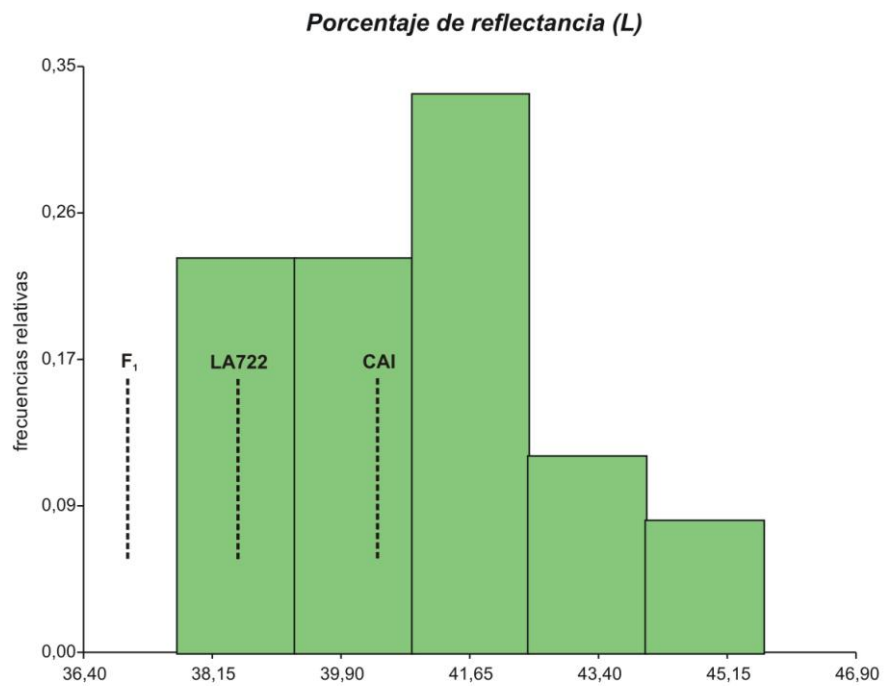
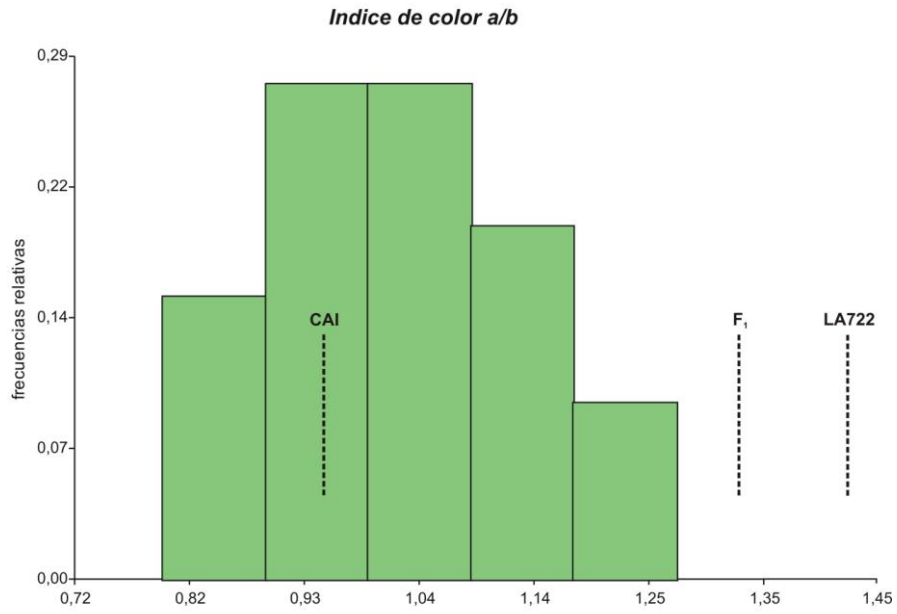
La distribución de frecuencias para At en la generación BC_1 concuerda con la dominancia parcial que se estimara a partir de los progenitores, y que produjo en la distribución fenotípica un sesgo hacia CAI (Figura I-2).

Figura I-2. Distribución de frecuencias para caracteres morfológicos y bioquímicos evaluados en la generación BC₁. (En líneas punteadas se indican los valores medios de *S. lycopersicum* (CAI), LA722 de *S. pimpinellifolium* y la F₁).

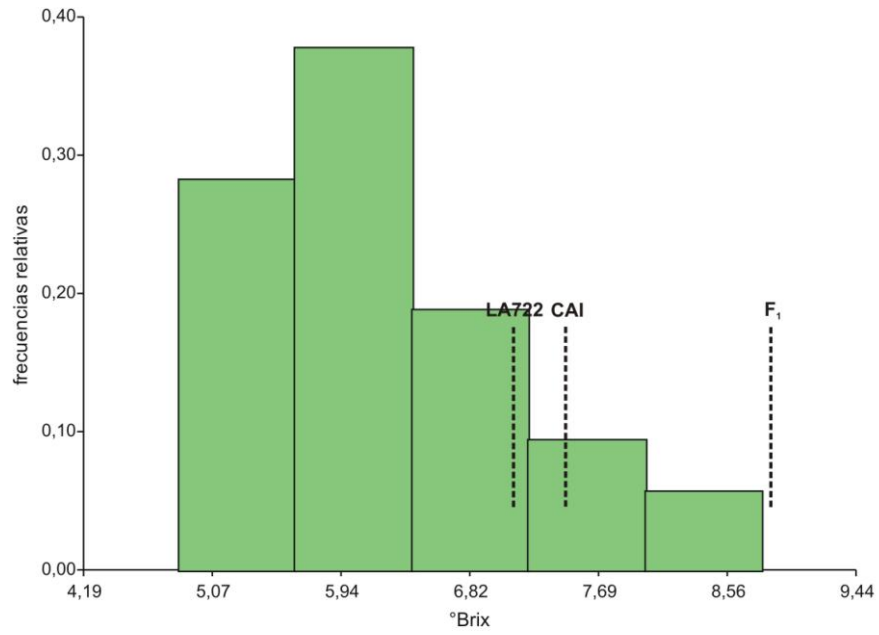




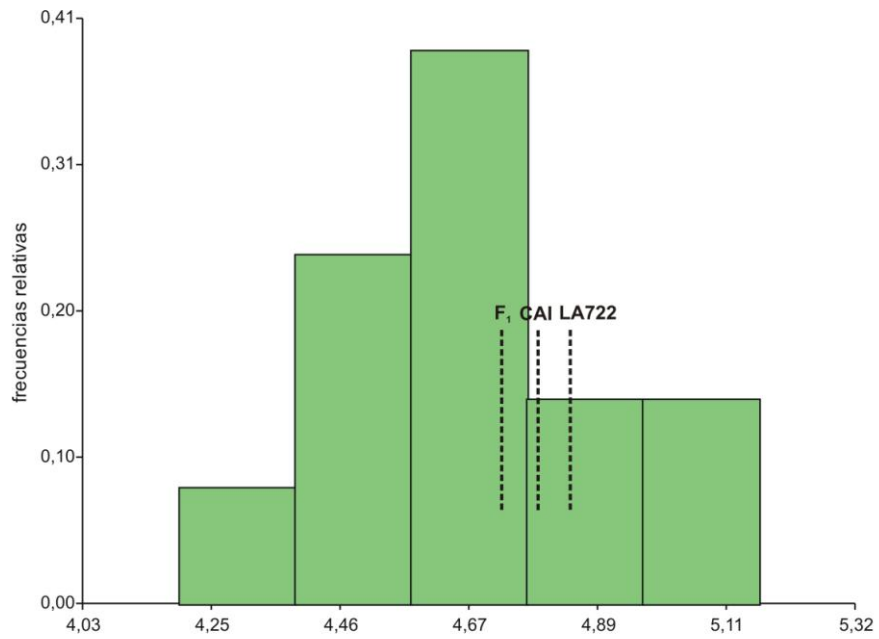


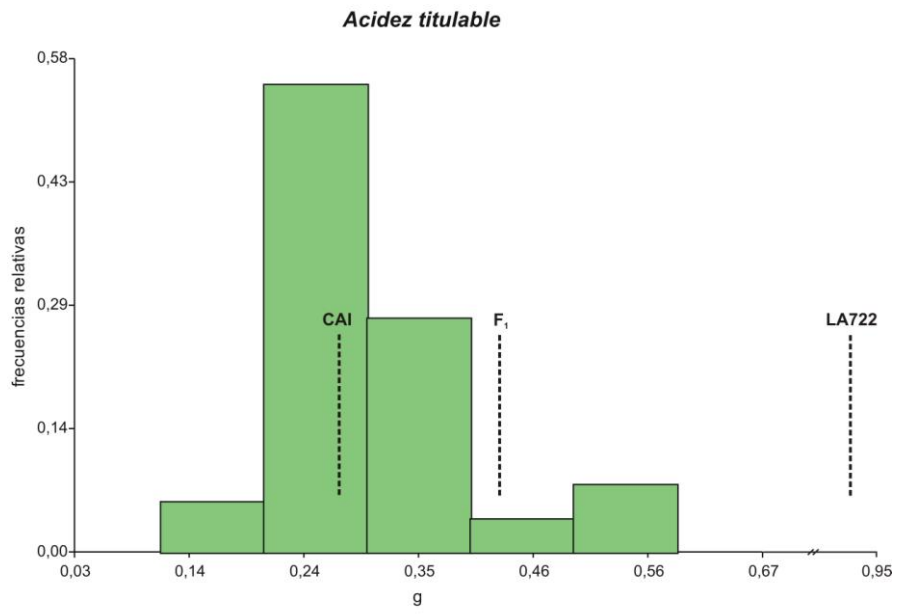


Contenido en sólidos solubles



pH





En la Tabla I-V se muestra el valor medio para cada carácter junto con el error estándar y los valores máximos y mínimos observados en la generación BC₁ para cada variable estudiada, además se indican los porcentajes de variación genética (% VG) para cada una de las variables.

Tabla I-V. Valores fenotípicos medios, mínimos y máximos de la generación BC₁ y el porcentaje de variación genética de cada carácter (VG).

Carácter	Media	BC ₁		N	% VG
		Mín	Máx		
Diámetro (cm)	3,50 ± 0,07	1,35	4,66	74	61
Altura (cm)	2,97 ± 0,05	1,27	3,90	74	59
Forma	0,86 ± 0,01	0,63	1,02	74	56
Peso (g)	23,63 ± 1,14	1,39	42,94	74	53
Lv (días)	13,53 ± 0,49	6,00	28,00	74	30
Firmeza	49,71 ± 1,15	27,60	76,50	51	62
L	41,04 ± 0,27	37,67	45,63	51	45
a/b	1,02 ± 0,02	0,80	1,27	51	59
SS (°Brix)	6,27 ± 0,12	4,83	8,80	53	89
pH	4,68 ± 0,03	4,19	5,16	49	96
At (g)	0,31 ± 0,01	0,11	0,59	51	89

Mín.: Valor mínimo de la variable, **Máx.:** Valor máximo de la variable, **N:** número de plantas evaluadas, **% VG:** porcentaje de variación genética, **Lv:** vida poscosecha, **L:** porcentaje de reflectancia, **a/b:** índice de color, **SS:** contenido en sólidos solubles, **At:** acidez titulable.

Los caracteres bioquímicos, en especial SS, pH y At presentaron los valores más altos de porcentaje de variación genética (89, 96 y 89, respectivamente), mientras que la vida poscosecha de los frutos fue el carácter con menor valor (% VG = 30).

El análisis de correlaciones fenotípicas entre las variables estudiadas en la generación BC₁ se presenta a continuación en la Tabla I-VI.

Tabla I-VI. Correlaciones fenotípicas entre los 11 caracteres fenotípicos evaluados en las generación BC₁ del cruzamiento entre CAI de *S. lycopersicum* y LA722 de *S. pimpinellifolium*.

	Diámetro	Altura	Forma	Peso	Lv	Firmeza	L	a/b	SS	pH	At
Diámetro (cm)	1,000										
Altura (cm)	0,769**	1,000									
Forma	- 0,492**	0,170	1,000								
Peso (g)	0,971**	0,819**	- 0,385*	1,000							
Lv (días)	- 0,224	- 0,090	0,220	- 0,260	1,000						
Firmeza	- 0,080	0,050	0,150	- 0,030	0,050	1,000					
L	0,020	- 0,100	- 0,170	0,080	- 0,020	0,310	1,000				
a/b	0,120	0,070	- 0,090	0,030	- 0,190	- 0,330	- 0,645**	1,000			
SS (°Brix)	- 0,290	- 0,240	0,110	- 0,290	0,170	- 0,110	- 0,030	0,190	1,000		
pH	0,010	0,180	0,250	0,020	0,130	- 0,080	- 0,180	0,060	0,489**	1,000	
At (g)	0,130	- 0,160	- 0,424**	0,090	- 0,270	- 0,150	0,080	0,330	0,040	- 0,561**	1,000

Lv: vida poscosecha, L: porcentaje de reflectancia, **a/b**: índice de color, **SS**: contenido en sólidos solubles, **At**: acidez titulable. *p < 0,01, **p < 0,001.

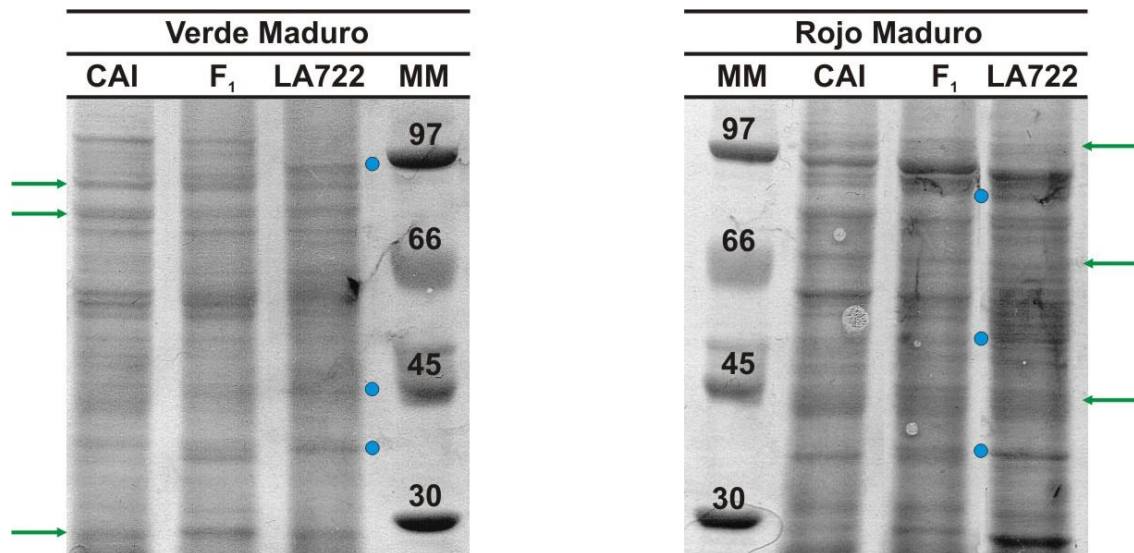
Correlaciones significativas ($p < 0.01$) fueron encontradas entre varios caracteres. Entre ellas, el diámetro con la altura y peso de los frutos ($r = 0,77$ y $r = 0,97$ respectivamente). La forma y la acidez titulable estuvieron correlacionados negativamente ($r = -0,42$). Se observaron correlaciones negativas entre forma y diámetro ($r = -0,49$), forma y peso ($r = -0,39$), parámetros de color L y a/b ($r = -0,65$) y pH y acidez titulable ($r = -0,56$). El pH además estuvo correlacionado positivamente con el contenido en sólidos solubles ($r = 0,49$).

I.B. Análisis Molecular

I.B.1. Marcadores de polipéptidos en los progenitores y la F₁

La Figura I-3 muestra los perfiles de polipéptidos totales de pericarpio para cada uno de los genotipos progenitores y la F₁ en los dos estados de madurez. Con flechas verdes se señalan algunas de las bandas monomórficas encontradas y los círculos celestes indican algunas bandas presentes en LA722 y F₁ y ausentes en CAI.

Figura I-3. Perfiles de polipéptidos para los progenitores *S. lycopersicum* (CAI) y LA722 de *S. pimpinellifolium* y F₁ en dos estados de madurez verde y rojo maduro.



MM: marcador de peso molecular en kDa. Con flechas verdes se indican algunas de las bandas monoméricas y con círculos celestes algunas de las bandas polimórficas detectadas.

El análisis de los perfiles de polipéptidos en los genotipos progenitores permitió la detección de 27 bandas al estado verde maduro (VM) y 28 al estado rojo maduro (RR). Un nivel de polimorfismo similar entre CAI y LA722 fue observado al estado VM (70 %) que al estado RR (64 %). Al comparar CAI con la F_1 se encontraron 27 bandas y 33 % fue el porcentaje de polimorfismo al estado VM. En el mismo estado de madurez se detectaron 26 bandas cuando se comparó la F_1 con LA722 y siendo el polimorfismo mayor (50 %). En el estado rojo, un 15 % de polimorfismo fue observado al comparar CAI y F_1 , habiéndose detectado un total de 20 bandas. Cuando se comparó LA722 y F_1 el porcentaje de polimorfismo fue mayor (54 %) con un total de 28 bandas. Las bandas de 64 y 38 kDa fueron detectadas únicamente en el estado VM, mientras que las bandas de 92 y 47 kDa fueron exclusivas del estado RR (Tabla I-VII).

Tabla I-VII. Presencia (1) y ausencia (0) de bandas al estado verde maduro (VM) y rojo maduro (RR) en los genotipos progenitores *S. lycopersicum* y LA722 de *S. pimpinellifolium* y la F₁.

Verde Maduro (VM)				Rojo Maduro (RR)			
Bandas (kDa)	CAI	LA722	F ₁	Bandas (kDa)	CAI	LA722	F ₁
102	1	0	1	102	1	0	1
97	1	0	1	97	0	1	0
94	1	1	1	94	1	0	1
90	0	1	1	92	1	1	1
85	1	0	1	90	1	1	1
81	1	1	1	85	0	1	1
76	0	1	1	81	1	1	1
74	1	1	1	76	1	1	1
69	1	0	0	74	0	1	0
66	1	1	1	69	1	1	1
64	1	0	0	66	0	1	1
62	0	1	1	62	1	1	1
60	1	0	1	60	0	1	0
58	1	1	1	58	1	1	1
56	1	0	1	56	0	1	0
54	0	1	1	54	0	1	1
51	1	0	1	51	1	0	1
49	1	1	1	49	0	1	0
45	0	1	1	47	1	0	1
44	1	0	1	45	1	1	1
41	0	0	1	44	1	0	1
38	0	1	1	41	0	1	0
36	1	0	1	36	1	1	1
34	1	0	1	34	0	1	0
31	1	0	1	31	1	0	1
30	1	0	1	30	0	1	0
29	1	1	1	29	1	0	1
27	1	1	0	27	1	1	1

El peso de los polipéptidos se indican en kDa. En rojo se indican aquellos polipéptidos que resultaron monomórficos entre los progenitores y la generación F₁. En gris se destacan los polipéptidos que tienen origen en el progenitor silvestre LA722 de *S. pimpinellifolium*.

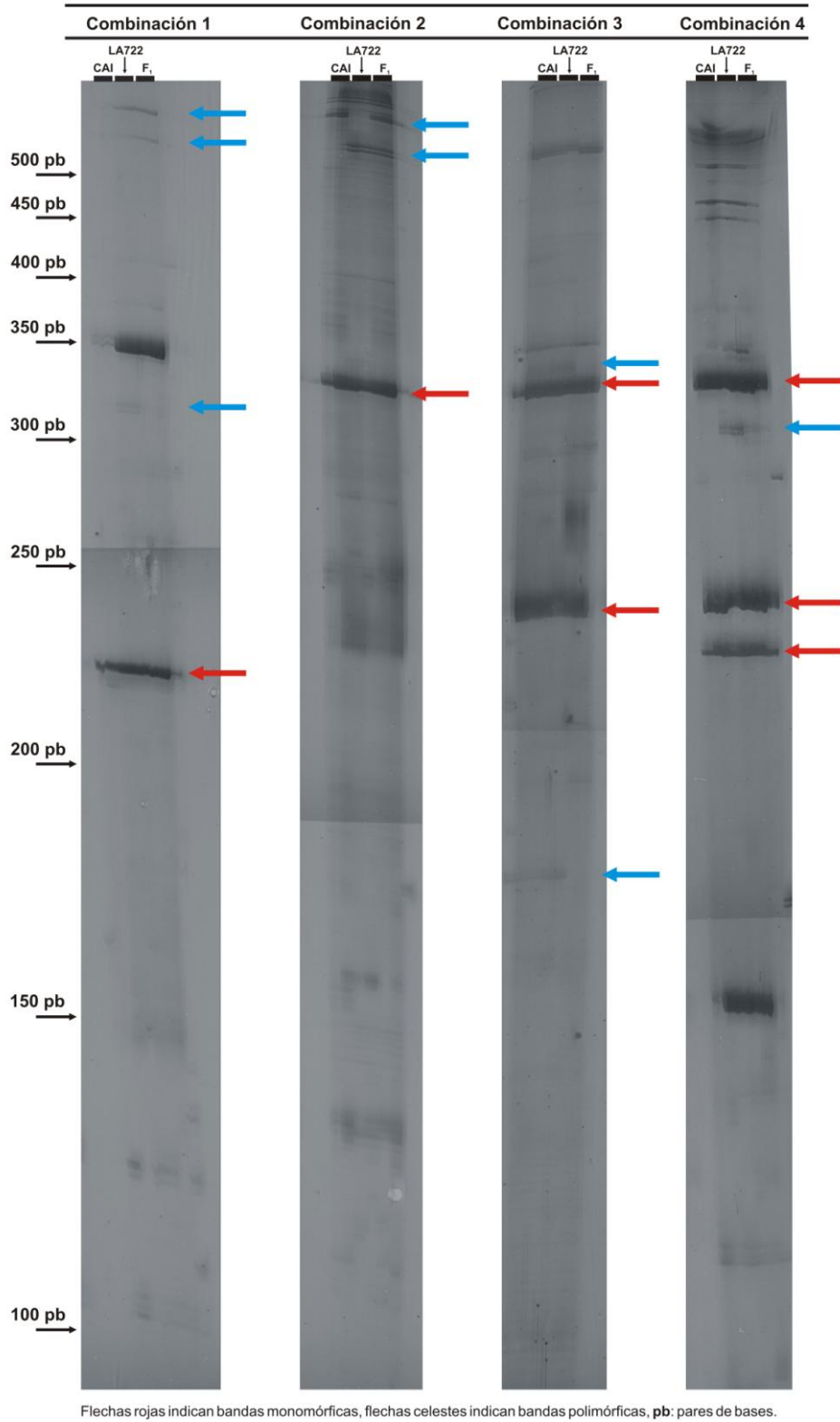
En rojo se indican aquellas bandas que resultaron monomórficas entre los genotipos progenitores y la generación F_1 . Para el estado VM se encontraron 7 bandas monomórficas (94, 81, 74, 66, 58, 49 y 29 kDa), mientras que al estado rojo fueron 10 las bandas monomórficas detectadas (92, 90, 81, 76, 69, 62, 58, 45, 36 y 27 kDa). Se resaltaron en gris aquellas bandas que tienen origen en el progenitor silvestre y que luego serán consideradas para probar la segregación 1:1 esperada para marcadores dominantes en una población BC_1 , con el posterior objetivo de buscar su asociación con caracteres de calidad de fruto.

I.B.2. Marcadores de ADN en los progenitores y la F₁

I.B.2.1. *SRAP (Sequence Related Amplified Polymorphism)*

Los geles de poliacrilamida al 5 % en los que se corrieron los productos de amplificación de *SRAP* fueron analizados para detectar cada una de las bandas. La Figura I-4 muestra los geles en los cuales se corrieron las combinaciones 1 a la 4. Con flechas celestes y rojas se indican algunas bandas polimórficas y monomórficas, respectivamente.

Figura I-4. Geles de poliácridamida al 5 % utilizando cuatro combinaciones de cebadores de *SRAP* (*Sequence Related Amplified Polymorphism*) en los progenitores (*S. lycopersicum* y *S. pimpinellifolium*) y la F_1 .



Las dos repeticiones por genotipo de cada combinación de *SRAP* dieron el mismo producto de amplificación.

La Tabla I-VIII muestra las bandas detectadas en las cuatro combinaciones de cebadores de *SRAP*. En gris se resaltan aquellas bandas que están presentes en la generación F_1 y que tiene origen en la especie silvestre. Estas bandas serán utilizadas para probar en la generación BC_1 la segregación 1:1 (presencia: ausencia) con el objetivo de ser usadas como marcador y buscar su asociación con los caracteres fenotípicos analizados.

Tabla I-VIII. Bandas detectadas en las combinaciones de cebadores de SRAP (*Sequence Related Amplified Polymorphism*) 1, 2, 3 y 4 en los progenitores *S. lycopersicum* y LA722 de *S. pimpinellifolium* y la F₁.

Combinación 1				Combinación 2			
MM	CAI	LA722	F ₁	MM	CAI	LA722	F ₁
715	0	1	1	570	1	0	1
700	0	1	1	532	0	1	1
692	0	1	1	430	1	1	1
595	0	1	1	412	1	0	1
558	0	1	1	394	1	0	1
400	0	0	1	350	1	1	1
380	0	1	1	320	1	1	1
350	1	1	1	300	0	1	1
320	0	1	1	271	0	1	1
317	0	1	1	260	1	1	1
222	1	1	1	237	0	1	1

Combinación 3				Combinación 4			
MM	CAI	LA722	F ₁	MM	CAI	LA722	F ₁
605	1	1	1	480	1	1	1
525	1	1	1	425	1	1	1
518	1	1	1	362	1	1	1
450	1	1	1	330	1	0	1
400	0	0	1	279	1	0	1
397	0	1	1	270	1	0	1
350	1	1	1	234	1	1	1
323	1	1	1	174	1	0	1
300	1	0	1	171	1	1	1
296	1	1	1	140	1	1	1
278	1	1	1	137	1	1	1
238	1	1	1	134	0	1	1
200	1	0	0	104	0	0	1
176	0	1	1	100	1	1	1
				95	0	1	1
				91	0	1	1

MM: marcador de peso molecular en pares de bases. En gris se destacan los fragmentos de amplificación que están presentes en la F₁ y que tienen origen en la especie silvestre *S. pimpinellifolium* (LA722).

Todas las combinaciones de cebadores de *SRAP* evaluados en los genotipos progenitores y la F_1 fueron polimórficas. La Tabla I-IX resume los resultados obtenidos indicando el número total de bandas detectadas junto con las bandas polimórficas y de *novo*, además del porcentaje de polimorfismo encontrado.

Tabla I-IX. Bandas totales detectadas, bandas polimórficas y bandas *de novo* encontradas en las cuatro combinaciones de cebadores de *SRAP* (*Sequence Related Amplified Polymorphism*) ensayadas en los genotipos CAI de *S. lycopersicum*, LA722 de *S. pimpinellifolium* y la F₁.

	Combinación 1	Combinación 2	Combinación 3	Combinación 4
Bandas detectadas	11	11	14	16
Bandas polimórficas	8	7	3	7
Bandas <i>de novo</i>	1	0	2	1
% de polimorfismo	72%	64%	21%	44%

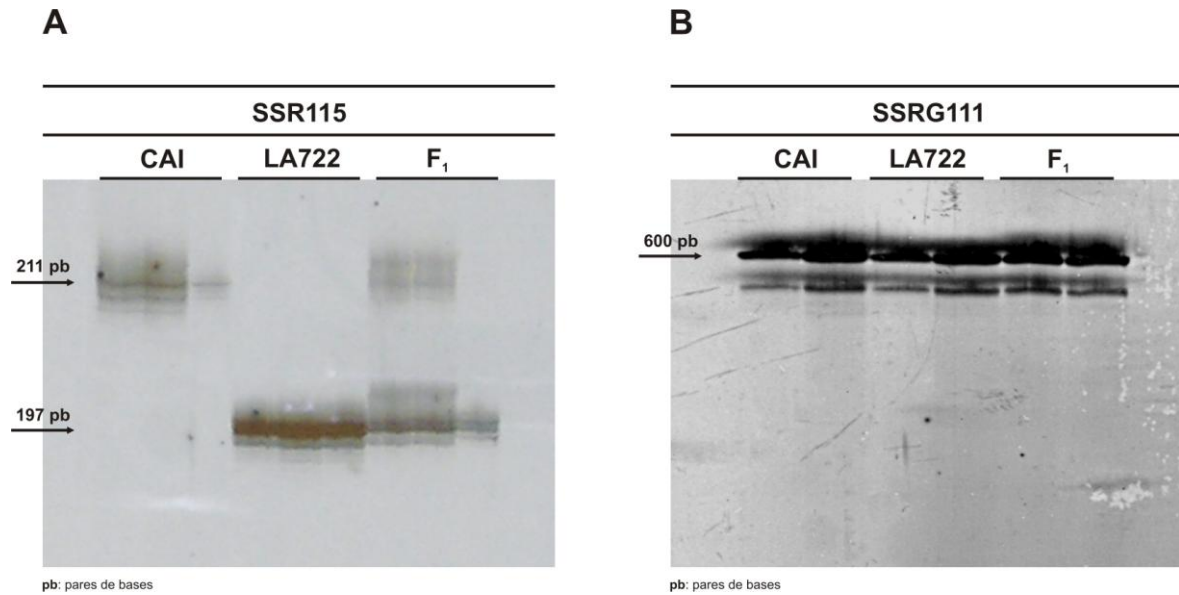
Se detectó una banda *de novo* en las combinaciones 1 y otra en la 4, las cuales se mostraron presentes en la generación F_1 . Las otras dos bandas de *novo* encontradas en la combinación 3 mostraron un comportamiento similar para una de las bandas mientras que la otra estuvo ausente en la F_1 . Las combinaciones 1 y 2 resultaron las más polimórficas mientras que las combinación 4 presentó el mayor número de bandas totales encontradas. Todas las combinaciones fueron utilizadas en el análisis de la generación BC_1 .

I.B.2.2. *SSR (Simple Sequence Repeat)*

En promedio se probaron cuatro *SSR* por cromosoma, resultando un total de 51 microsatélites analizados. Las dos repeticiones por genotipo de cada *SSR* y para todos los *SSR* dieron el mismo producto de amplificación.

La Figura I-5 muestra los *SSR115* y *SSRG111* corridos en geles de poliacrilamida al 6% para los progenitores y la F_1 .

Figura I-5. El gel **A** muestra el SSR115 que resultó polimórfico entre los genotipos CAI de *S. lycopersicum*, LA722 de *S. pimpinellifolium* y la F₁. El gel **B** muestra el SSRG111 que se comportó como monomórfico en los mismos genotipos.



La Tabla I-X resume el comportamiento observado para cada *SSR* además de los tamaños en pares de bases esperados para los alelos de los progenitores LA722 y CAI. También se informa la ubicación cromosómica.

Tabla I-X. SSR (*Simple Sequence Repeat*) probados en los progenitores CAI de *S. lycopersicum* y LA722 de *S. pimpinellifolium*, su ubicación cromosómica y el tamaño del alelo de LA722 y CAI.

Lista de Microsatélites			
Nombre	Cr	Tamaño	Comportamiento
SSR009	1	168	Dom Pimpi
SSR134	1	-	Sin amplificación
SSR095	1	229-242	Codominante
SSR266	1	-	Sin amplificación
SSR316	1	251	Monomórfico
SSR308	1	300	Monomórfico
SSR288	1	260-275	Codominante
SSR032	2	186-194	Codominante
SSR295	2	204-224	Codominante
SSR598	2	186-170	Codominante
SSR349	2	249	Monomórfico
SSR601	3	174-184	Codominante
SSR111	3	214	Dom Cai
SSR014	3	166-174	Codominante
SSR320	3	165-171	Codominante
SSR296	4	200	Monomórfico
SSR310	4	158	Dom Cai
SSR450	4	275	Monomórfico
SSR306	4	258	Monomórfico
SSR043	4	230	Monomórfico
SSR115	5	211-231	Codominante
SSR152	5	-	Sin amplificación
SSR162	5	260-264	Codominante
SSR128	6	139-147	Codominante
SSR211044	6	209-218	Codominante
SSR045	7	158-167	Codominante
SSR276	7	160-194	Codominante
SSR286	7	120-130	Codominante
SSR344	8	185-217	Codominante
SSR063	8	200-211	Codominante
SSR327	8	180-186	Codominante
SSR038	8	215-223	Codominante
SSR069	9	146-164	Codominante
SSR383	9	-	Sin amplificación
SSR070	9	138-244	Codominante
SSR110	9	-	Sin amplificación
SSR333	9	-	Sin amplificación
SSR223	10	216	Monomórfico
SSR318	10	276-290	Codominante
SSR034	10	200-208	Codominante
SSR596	10	184-191	Codominante
SSRG036	11	175-187	Codominante
SSR080	11	167-170	Codominante
SSR220060	11	135-142	Codominante
SSR1061	11	231-240	Codominante
SSR1526	11	173	Monomórfico
SSRH301	12	164-185	Codominante
SSRG111	12	600	Monomórfico
SSR020	12	172	Monomórfico
SSR176	12	180	Monomórfico

Cr: cromosoma. El tamaño de los alelos es indicado en pares de bases. En negrita se destacan los SSR utilizados para evaluar la generación BC₁.

En negrita se destacan aquellos *SSR* seleccionados para ser utilizados para la caracterización de los individuos de la población BC₁.

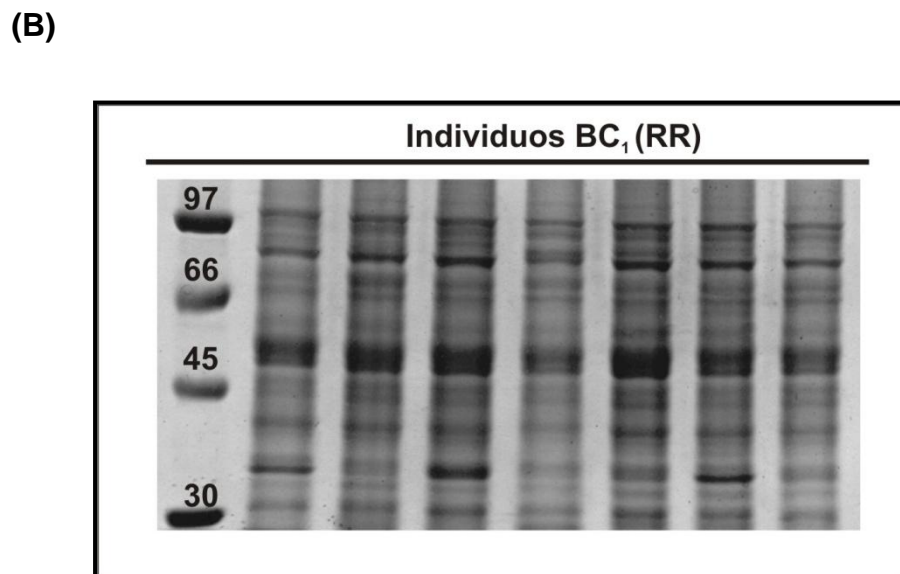
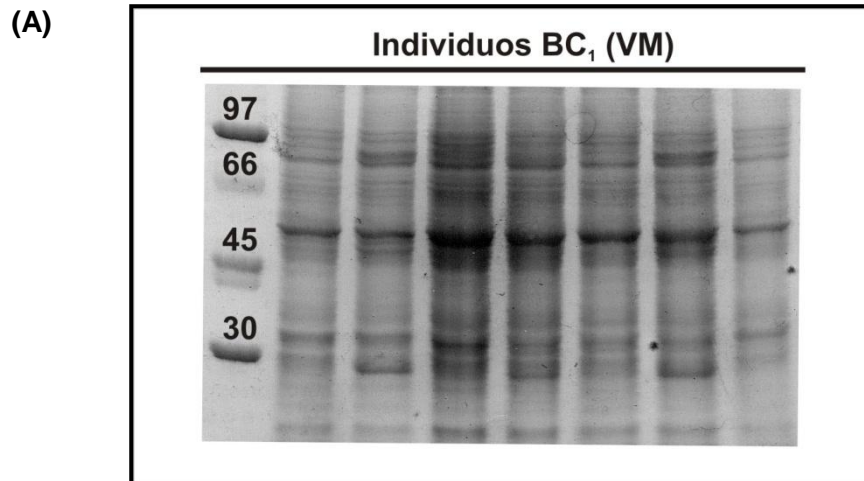
Se observó que de 45 *SSR* que amplificaron, el 27 % fue monomórfico mientras que los restantes mostraron polimorfismo entre genotipos. De estos, 88 % del total se comportaron como codominantes, de acuerdo a lo esperado, mientras que el 12 % restante se comportó como dominante, siendo LA722 el padre dominante para uno de ellos (*SSR009*) y CAI para los otros. Todos los cromosomas contuvieron al menos dos *SSR* polimórficos, con excepción del cromosoma 12 el cual contiene un único *SSR* y el cromosoma 4 para el cual no hubo *SSR* polimórfico. De los 51 *SSR* estudiados, aquellos que presentaron comportamiento codominante (29) o dominante (1), donde la banda presente es de origen silvestre fueron empleados para caracterizar la BC₁ ya que permitieron discriminar inequívocamente la segregación de genotipos en esa generación.

I.C. Marcadores moleculares en la generación BC₁

I.C.1. Marcadores de polipéptidos

Las siguientes figuras muestran geles de proteínas para los dos estados de madurez para algunas de las plantas BC₁ (Figura I-6 A y B).

Figura I-6: SDS-PAGE al 10 % para polipéptidos de frutos al estado verde maduro (VM) (A) y rojo maduro (RR) (B) para algunas plantas BC₁ del cruzamiento entre CAI de *S. lycopersicum* y LA722 de *S. pimpinellifolium*. En la primera calle de cada gel se indican los marcadores de peso molecular en kDa.



El análisis de los geles de poliacrilamida en los que se corrieron los polipéptidos totales de frutos es resumido en la Tabla I-XI.

Tabla I-XI. Bandas con comportamiento mendeliano en progenitores y segregación mendeliana en la BC₁ del cruzamiento entre CAI de *S. lycopersicum* y LA722 de *S. pimpinellifolium* en estado verde maduro (A) y rojo maduro (B).

A

Verde Maduro						
Banda (kDa)	CAI	LA722	F ₁	P	A	χ ²
90	A	P	P	29	12	7,0*
76	A	P	P	31	10	10,8*
62	A	P	P	27	14	4,1*
54	A	P	P	24	17	1,2ns
45	A	P	P	22	19	0,2ns
38	A	P	P	18	23	0,6ns

B

Rojo Maduro						
Banda (kDa)	CAI	LA722	F ₁	P	A	χ ²
85	A	P	P	10	31	10,8*
66	A	P	P	15	26	3,0ns
54	A	P	P	23	18	0,6ns

P: presencia, A: ausencia, *significativo (p < 0,05), ns: no significativo. En negrita se destacan las bandas con segregación 1:1 en la generación BC₁. Las bandas indicadas en gris son aquellas que presentaron asociación con algún carácter fenotípico. El peso de las bandas es indicado en kDa.

La Tabla I-XI muestra las bandas con comportamiento mendeliano entre los progenitores y F_1 , es decir bandas presentes en LA722 y F_1 y ausentes en CAI. La segregación 1:1 de estas bandas fue probada en la BC_1 ; las bandas en negritas son aquellas que segregaron 1:1 en dicha población. Las bandas indicadas en gris en la Tabla I-XI son aquellas que mostraron asociación con algún carácter cuantitativo, tanto para el estado VM como para el RR.

En el estado verde maduro tres polipéptidos (54, 45 y 38 kDa) presentaron herencia mendeliana, de los cuales el de 54 kDa estuvo asociado a pH y firmeza y el de 45 kDa presentó asociación significativa con la altura, forma y vida poscosecha de los frutos. Al estado rojo sólo dos bandas (66 y 54 kDa) mostraron patrones de herencia mendeliana y únicamente el polipéptido 66 kDa estuvo asociado a pH, siendo estos polipéptidos putativos marcadores para caracteres fenotípicos.

A continuación se presentan las bandas de proteínas en estado verde maduro (VM) y rojo (RR) que resultaron asociadas a algunos de los caracteres estudiados en la generación BC_1 (Tabla I-XII).

Tabla I-XII: Asociaciones detectadas entre polipéptidos y caracteres fenotípicos en la generación BC₁ del cruzamiento entre CAI de *S. lycopersicum* y LA722 de *S. pimpinellifolium*.

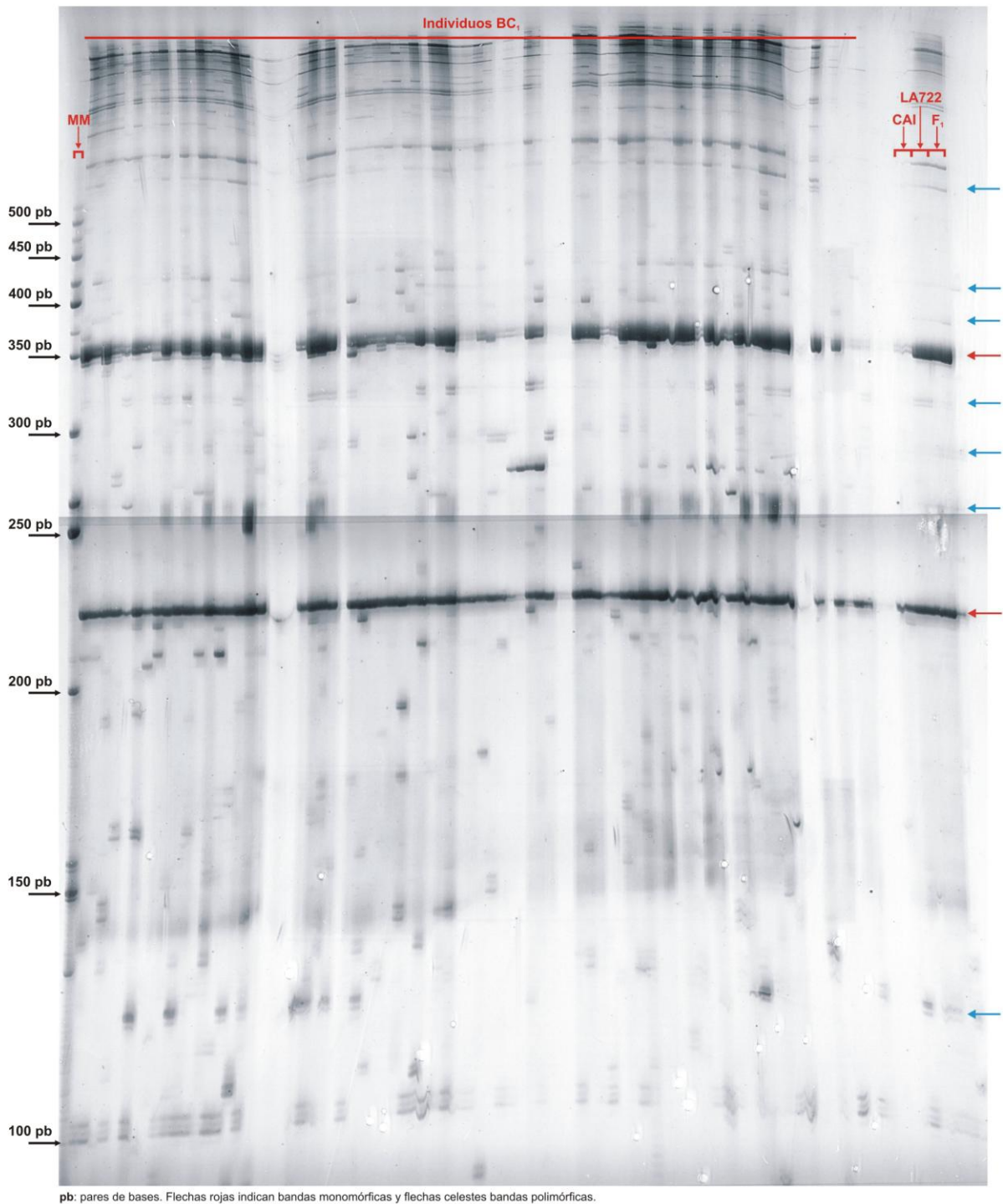
	Banda	Carácter	Media P	nP	Media A	nA	R ²	p
VM	54 kDa	Firmeza	51,90 ± 1,61b	24	46,52 ± 1,93a	17	0,08	0,0380
		pH	4,64 ± 0,04a	24	4,80 ± 0,05b	17	0,11	0,0220
	45 kDa	Altura (cm)	3,11 ± 0,07b	22	2,88 ± 0,08a	19	0,07	0,0491
		Forma	0,88 ± 0,01b	22	0,84 ± 0,02a	19	0,08	0,0407
		Lv (días)	15,59 ± 1,04b	22	12,37 ± 0,87a	19	0,10	0,0232
RR	66 kDa	pH	4,62 ± 0,05a	17	4,76 ± 0,04b	27	0,12	0,0286

VM: estado verde maduro, RR: estado rojo maduro, **Media P**: valor medio del carácter para individuos con presencia de la banda, **nP**: número de individuos con presencia de la banda, **Media A**: valor medio del carácter para individuos con ausencia de la banda, **nA**: número de individuos con ausencia de la banda, **R²**: fracción de la variación fenotípica explicada, **p**: probabilidad asociada, **Lv**: vida poscosecha. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

I.C.2. Marcadores *SRAP* (*Sequence Related Amplified Polymorphism*)

Los productos de amplificación de la combinación 1 de *SRAP* se muestran a continuación en la Figura I-7.

Figura I-7. Gel de poliacrilamida al 5 % v/v para la combinación 1 de marcadores *SRAP* (*Sequence Related Amplified Polymorphism*). Se muestran el perfil de los progenitores (*S. lycopersicum* y *S. pimpinellifolium*), la F_1 y todos los individuos BC_1 .



Con flechas celestes y rojas se indican alguna de las bandas polimórficas y monomórficas, respectivamente encontradas para la combinación 1 de cebadores.

A continuación se resume en la Tabla I-XIII el análisis de los geles de cada combinación de *SRAP*. Se indican el número total de bandas detectados en la generación BC_1 , como así también las bandas de *novo* detectadas en dicha generación. Además se observan aquellas bandas que presentan herencia mendeliana en BC_1 que tienen origen en el genotipo silvestre LA722. La misma información de los progenitores y F_1 puede encontrarse en las primeras columnas. Se observa que bandas que se comportaban como monomórficas en los progenitores ya no lo son en BC_1 .

Tabla I-XIII. Bandas totales, monomórficas, de *novo* y mendelianas encontradas con las cuatro combinaciones de cebadores de *SRAP* (*Sequence Related Amplified Polymorphism*) en progenitores (*S. lycopersicum* y *S. pimpinellifolium*) y generaciones F₁ y BC₁.

	Progenitores y F ₁				BC ₁			
	Comb.1	Comb. 2	Comb.3	Comb. 4	Comb.1	Comb. 2	Comb.3	Comb. 4
Bandas totales	11	11	14	16	28	13	18	18
Bandas monomórficas	2	4	9	8	2	1	5	5
Bandas de novo	1	0	2	1	17	2	4	2
Bandas que segregan 1:1	-	-	-	-	2	1	2	1
					(r1 715 yr7 595)	(r9 300)	(r9 397 yr19 176)	(r18 134)

Entre todas las combinaciones de cebadores se encontraron un total de 52 bandas, de las cuales sólo seis (11,5 %) mostraron segregación mendeliana y tan sólo dos (5,7 %) resultaron asociadas con algún carácter fenotípico estudiado. No se encontraron bandas asociadas a más de un carácter.

La Tabla I-XIV muestra las bandas de *SRAP* asociadas a porcentaje de reflectancia L, firmeza, acidez titulable (At) y contenido en sólidos solubles (SS), los valores medios del carácter para individuos con presencia y ausencia de la banda, el porcentaje de variación fenotípica explicada y el valor de probabilidad asociada. Las bandas están indicadas por una letra y un número (r9, por ejemplo) que representa el número de la banda detectada por el *software* Gelpro Analyzer 3.0 para una dada combinación de cebadores. El número que sigue (por ejemplo 397) indica el tamaño en pares de bases del fragmento amplificado.

Tabla I-XIV. Bandas de *SRAP* (*Sequence Related Amplified Polymorphism*) con asociación a caracteres de calidad de fruto en la generación BC₁ del cruzamiento entre CAI de *S. lycopersicum* y LA722 de *S. pimpinellifolium*.

Banda	Combinación	Carácter	Media P	nP	Media A	nA	R ²	p
r9 397	3	L	41,80 ± 0,46b	22	40,5 ± 0,29a	28	0,10	0,0043
r9 397	3	Firmeza	52,46 ± 1,74b	22	47,90 ± 1,46a	28	0,08	0,0158
r9 397	3	At (g)	0,33 ± 0,02b	22	0,28 ± 0,01a	28	0,07	0,0159
r18 134	4	SS (°Brix)	6,58 ± 0,23b	19	6,06 ± 0,13a	33	0,07	0,0130

Media P: valor medio del carácter para individuos con presencia de la banda, **nP:** número de individuos con presencia de la banda, **Media A:** valor medio del carácter para individuos con ausencia de la banda, **nA:** número de individuos con ausencia de la banda, **R²:** fracción de la variación fenotípica explicada, **p:** probabilidad asociada, **L:** porcentaje de reflectancia, **At:** acidez titulable, **SS:** contenido en sólidos solubles. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). En gris se indica la única asociación encontrada con $p < 0,01$.

Una banda de *SRAP* (r9 397) con origen en la combinación 3 estuvo asociada a L ($p < 0.01$) y a firmeza y At con una $p < 0.05$, su presencia aumento el valor medio de los tres caracteres y explicó entre un 7 y 10 % de la variación fenotípica observada. Una banda (r18 134) proveniente de la combinación 4 mostró asociación con el contenido en sólido soluble ($p < 0,05$) y su presencia aumentó el valor medio, explicando el 7 % de la variación fenotípica observada. En gris se indica la única asociación encontrada con una probabilidad menor al 1 %.

I.C.3. Marcadores *SSR* (*Simple Sequence Repeat*)

Las siguientes figuras muestran los geles al 6 % para dos de los *SSR* probados en la generación BC₁ (Figuras I-8 y I-9).

Figura I-8: Marcador *SSR095* probado en los progenitores, la F_1 y la generación BC_1 del cruzamiento entre CAI de *S. lycopersicum* y LA722 de *S. pimpinellifolium*.

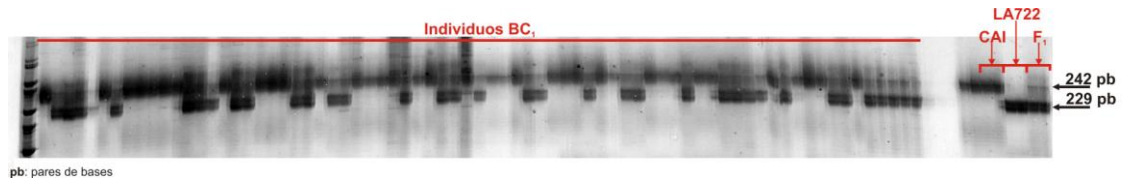
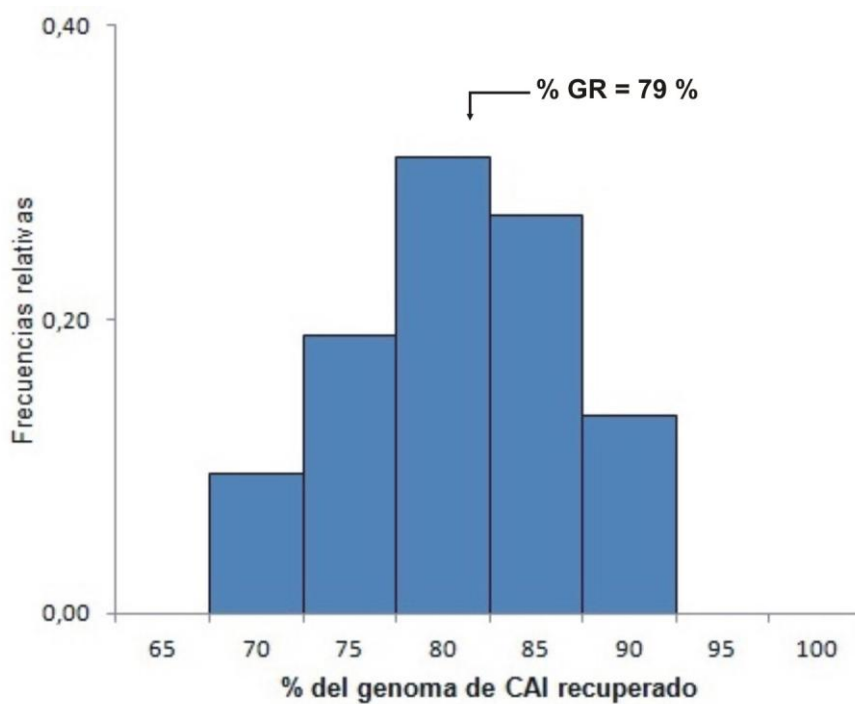


Figura I-9: Marcador *SSR295* probado en los progenitores, la F_1 y la generación BC_1 del cruzamiento entre CAI de *S. lycopersicum* y LA722 de *S. pimpinellifolium*.



El porcentaje del genoma del padre recurrente (CAI) recuperado fue de 79 % variando entre 67 y 90 %. En la Figura I-10 se muestra la distribución de frecuencias del porcentaje recuperado del progenitor recurrente.

Figura I-10. Distribución de frecuencias de plantas con el porcentaje de genoma (% GR) de *S. lycopersicum* (CAI) recuperado en la generación BC₁.



La Tabla I-XV muestra la segregación de los marcadores *SSR* en la generación BC_1 , indicando el cromosoma donde se encuentra, el número de individuos para cada genotipo observado, el número total de plantas evaluadas y el valor de χ^2 .

Tabla I-XV. Segregación de los marcadores *SSR* (*Simple Sequence Repeat*) en la generación BC₁ del cruzamiento entre CAI de *S. lycopersicum* y LA722 de *S. pimpinellifolium*.

Marcador	Cr	CC	CP	N total	χ^2
SSR095	1	37	37	74	0ns
SSR009	1	31	33	64	1,94ns
SSR288	1	39	35	74	0,21ns
SSR032	2	48	26	74	6,54*
SSR295	2	37	36	73	0,01ns
SSR598	2	48	26	74	6,54*
SSR601	3	48	26	74	6,54*
SSR014	3	24	48	72	8*
SSR320	3	48	26	74	6,54*
SSR115	5	46	27	73	4,94*
SSR162	5	35	37	72	0,05ns
SSR128	6	42	32	74	1,35ns
SSR211044	6	36	37	73	0,01ns
SSR276	7	35	39	74	0,21ns
SSR045	7	49	22	71	10,26*
SSR286	7	32	41	73	1,10ns
SSR344	8	41	33	74	0,86ns
SSR063	8	47	21	68	9,94*
SSR038	8	40	33	73	0,67ns
SSR327	8	30	44	74	2,64ns
SSR070	9	44	30	74	2,64ns
SSR069	9	49	21	70	11,2*
SSR318	10	38	33	71	0,35ns
SSR596	10	41	31	72	1,38ns
SSR034	10	36	34	70	0,05ns
SSRG036	11	37	37	74	0ns
SSR080	11	50	24	74	9,13*
SSR220060	11	33	39	72	0,5ns
SSR1061	11	50	23	73	9,98*
SSRH301	12	58	13	71	28,52*

Cr: cromosoma, C: alelo del progenitor cultivado CAI, P: alelo del progenitor silvestre LA722, N: número de individuos, χ^2 : valor de chi-cuadrado, ns: no significativo, *significativo ($p < 0,05$). En gris se destacan aquellos SSR que no presentaron segregación 1:1 en la generación BC₁.

De los 30 *SSR* analizados 12 (40 %) mostraron segregación distorsionada, de los cuales 11 presentaron un exceso de homocigotas mientras que solamente uno (*SSR014*) mostró un exceso de heterocigotas. (Tabla I-XV).

En la Tabla I-XVI se muestran los marcadores *SSR* que presentaron asociación con alguno de los caracteres fenotípicos evaluados, la ubicación cromosómica del marcador, las clases genotípicas y el número de individuos de cada genotipo, la fracción de la variación fenotípica explicada por el *QTL* y la probabilidad asociada.

A partir del análisis de asociación de 30 *SSR*, se encontraron 42 *QTLs* con significando menor al 5 %. De ese total, 17 (40 %) fueron significativos al 1 % y 6 (14 %) fueron significativos al 0,1 %. Estos últimos son resaltados en gris en la Tabla I-XVI. Se detectaron en promedio 3,5 *QTLs* por cromosoma y 3,8 *QTLs* por carácter analizado. No se encontró ningún *QTL* para el carácter vida poscosecha. El carácter con mayor número de *QTLs* detectado fue el peso con siete *QTLs* y el carácter con el menor número de *QTLs* detectados fue el contenido en sólidos solubles con solamente un *QTL*. En los cromosomas 9 y 10 se encontró la mayor cantidad de *QTLs* (siete en cada uno), mientras que en el cromosoma 5 sólo se encontró un *QTL*. Dado que no hubo marcadores para el cromosoma 4, no se detectaron *QTLs* allí localizados.

De los 42 *QTLs* que resultaron significativos, 16 (38 %) mostraron efectos alélicos opuesto a los esperados de acuerdo al fenotipo del padre que lo aporta. Se encontraron *QTLs* de este tipo para todos los caracteres excepto

para firmeza donde el alelo del padre silvestre siempre aumentó la media del carácter.

La proporción de variación fenotípica explicada por cada *loci* marcador asociado con un *QTL* específico se determinó por el coeficiente R^2 del modelo. Este valor varió entre 6 y 18 %, siendo este último para un *QTL* para diámetro ubicado en el cromosoma 8. Ninguno de los *QTLs* encontrados explicó más del 25 % de la variación fenotípica observada para los caracteres estudiados, por lo que no se encontraron *QTLs* con efectos mayores. Del total de *QTLs* encontrados 21 (50 %) explican menos del 10 % de la variación fenotípica.

Tabla I-XVI. Marcadores *SSR* (*Simple Sequence Repeat*) asociados a caracteres de calidad en la generación BC₁ del cruzamiento entre CAI de *S. lycopersicum* y LA722 de *S. pimpinellifolium*.

Marcador	Cr	Carácter	Media CP	nCP	Media CC	nCC	R ²	p
SSR 095	1	pH	4,73 ± 0,04b	26	4,62 ± 0,04a	23	0,06	0,0226
SSR 288	1	pH	4,62 ± 0,20a	22	4,73 ± 0,22b	27	0,07	0,0240
SSR 032	2	a/b	0,98 ± 0,03a	18	1,04 ± 0,02b	33	0,06	0,0436
		At (g)	0,27 ± 0,01a	18	0,33 ± 0,02b	33	0,12	0,0025
SSR 598	2	a/b	0,98 ± 0,03a	18	1,04 ± 0,02b	33	0,06	0,0436
		At (g)	0,27 ± 0,01a	18	0,33 ± 0,02b	33	0,12	0,0024
SSR 601	3	Firmeza	53,72 ± 1,77b	19	47,33 ± 1,35a	32	0,14	0,0009
SSR 014	3	Firmeza	51,14 ± 1,38b	16	46,36 ± 2,12a	33	0,07	0,0212
SSR 320	3	Firmeza	53,72 ± 1,77b	19	47,33 ± 1,35a	32	0,14	0,0009
SSR 162	5	pH	4,75 ± 0,05b	21	4,61 ± 0,04a	26	0,10	0,0067
SSR 211044	6	Firmeza	52,06 ± 1,28b	26	47,47 ± 1,84a	24	0,08	0,0170
		L	41,54 ± 0,36b	26	40,60 ± 0,39a	24	0,06	0,0344
SSR 276	7	L	40,34 ± 0,35a	24	41,67 ± 0,37b	27	0,12	0,0024
SSR 286	7	a/b	0,99 ± 0,02a	28	1,06 ± 0,03b	22	0,07	0,0208
SSR 038	8	Diámetro (cm)	3,21 ± 0,10a	33	3,73 ± 0,09b	40	0,18	0,0002
		Altura (cm)	2,83 ± 0,09a	33	3,09 ± 0,06b	40	0,08	0,0154
		Forma	0,89 ± 0,01b	33	0,84 ± 0,01a	40	0,11	0,0039
		Peso (g)	19,27 ± 1,50a	33	27,29 ± 1,49b	40	0,17	0,0004
SSR 327	8	pH	4,73 ± 0,04b	27	4,61 ± 0,05a	22	0,08	0,0145
SSR 070	9	Diámetro (cm)	3,72 ± 0,10b	30	3,35 ± 0,09a	44	0,09	0,0099
		Forma	0,84 ± 0,01a	30	0,88 ± 0,01b	44	0,07	0,0228
		Peso (g)	27,03 ± 1,83b	30	21,31 ± 1,36a	44	0,08	0,0128
		a/b	1,06 ± 0,03b	21	0,99 ± 0,02a	30	0,10	0,0058
		At (g)	0,34 ± 0,02b	22	0,28 ± 0,01a	29	0,10	0,0062
SSR 069	9	pH	4,61 ± 0,05a	18	4,73 ± 0,04b	27	0,06	0,0375
		At (g)	0,34 ± 0,02b	18	0,29 ± 0,01a	29	0,10	0,0065
SSR 318	10	Diámetro (cm)	3,25 ± 0,08a	33	3,68 ± 0,11b	38	0,12	0,0027
		Altura (cm)	2,81 ± 0,07a	33	3,10 ± 0,08b	38	0,11	0,0056
		Peso (g)	19,39 ± 1,23a	33	29,89 ± 1,69b	38	0,15	0,0009
SSR 596	10	Diámetro (cm)	3,27 ± 0,09a	31	3,63 ± 0,10b	41	0,09	0,0107
		Altura (cm)	2,76 ± 0,07a	31	3,11 ± 0,07b	41	0,14	0,0010
		Peso (g)	19,26 ± 1,37a	31	26,19 ± 1,56b	41	0,12	0,0019
SSR 034	10	Forma	0,83 ± 0,01a	34	0,89 ± 0,01b	36	0,16	0,0007
SSR G036	11	Diámetro (cm)	3,65 ± 0,09b	37	3,34 ± 0,11a	37	0,07	0,0274
		Altura (cm)	3,09 ± 0,06b	37	2,85 ± 0,09a	37	0,07	0,0247
		Peso (g)	26,14 ± 1,56b	37	21,11 ± 1,58a	37	0,07	0,0263
SSR 080	11	SS (°Brix)	6,59 ± 0,20b	19	6,09 ± 0,14a	34	0,08	0,0454
SSR 220060	11	Peso (g)	21,03 ± 1,29a	39	25,95 ± 1,88b	33	0,07	0,0303
SSR H301	12	Diámetro (cm)	3,10 ± 0,10a	13	3,59 ± 0,08b	58	0,10	0,0089
		Peso (g)	16,3 ± 1,36a	13	25,30 ± 1,32b	58	0,12	0,0025
		pH	4,79 ± 0,08b	9	4,65 ± 0,03a	37	0,07	0,0251
		At (g)	0,25 ± 0,02a	10	0,32 ± 0,01b	38	0,13	0,0023

Cr: cromosoma, **Media CP**: valor medio del carácter para individuos heterocigotas, **nCP**: número de individuos heterocigotas, **Media CC**: valor medio del carácter para individuos homocigotas, **nCC**: número de individuos homocigotas, **R²**: fracción de la variación fenotípica explicada, **p**: probabilidad asociada, **a/b**: índice de color, **At**: acidez titulable, **L**: porcentaje de reflectancia, **SS**: contenido en sólidos solubles. Letras distintas indican diferencias significativas (p < 0,05). En gris se resaltan aquellas asociaciones detectadas con p < 0,001.

Para el diámetro de los frutos se encontraron seis *QTLs*, dos de los cuales se ubicaron en el cromosoma 10 y el resto en los cromosomas 8, 9, 11 y 12. El *QTL* del cromosoma 8 mostró el más alto porcentaje de la variación fenotípica explicada, no solo para este carácter sino de todos los *QTLs* detectados y fue del 18 %. Una observación importante es que los alelos de los *QTLs* ubicados en el cromosoma 9 y 11 provenientes del progenitor silvestre aumentan el valor medio del carácter de forma contraria a lo esperado según los valores medios observados en los progenitores.

Se encontraron cuatro *QTLs* para la altura de los frutos, estando dos de ellos localizados en el cromosoma 10 y uno en los cromosomas 8 y 11. Nuevamente los alelos silvestres del *QTL* del cromosoma 11 mostraron un efecto contrario al lo esperado, aumentando el valor medio.

Para el carácter forma se encontraron tres *QTLs* ubicados en los cromosomas 8, 9 y 10. El porcentaje de variación fenotípica explicada por estos *QTLs* varió entre 7 y 16 %. Los alelos del genotipo silvestre para los *QTLs* en los cromosomas 9 y 10, disminuyeron el valor fenotípico, mostrando un comportamiento opuesto a lo esperado según los fenotipos de los progenitores.

Para el peso de los frutos se encontraron siete *QTLs* de los cuales dos estuvieron localizados en los cromosomas 10 y 11 y uno en los cromosomas 8, 9 y 12. De todos ellos el *QTL* localizado en el cromosoma 8 explicó el mayor porcentaje de la variación fenotípica (17%). Los alelos contribuidos por el padre silvestre aumentaron el valor medio del peso en dos *QTLs* localizados en el cromosoma 9 y 11, de modo contrario a lo esperado según el fenotipo observado en el progenitor LA722.

Para uno de los caracteres más importantes desde el punto de vista comercial del tomate como es la firmeza se encontraron cuatro *QTLs*, estando tres de ellos localizados en el mismo cromosoma (Cr3) y uno en el Cr6. El alelo silvestre aumentó el valor fenotípico en todos los *QTLs*. La variación fenotípica explicada por cada marcador varió entre 7 y 14 %.

Con respecto a los caracteres bioquímicos, en el caso particular del pH de los frutos se encontraron seis *QTLs*, estando localizados dos de ellos en el cromosoma 1 y los restantes en los cromosomas 5, 8, 9 y 12. La variación fenotípica explicada por estos *QTLs* varió entre el 6 y 10 %. El alelo proveniente del padre silvestre disminuyó el valor medio del pH en cuatro *QTLs* y lo aumentó en los dos restantes.

En el caso del color de los frutos, analizado a través de los índices L y a/b, se encontraron seis *QTLs*, dos para L en los cromosomas 6 y 7 y cuatro *QTLs* para el índice a/b de los cuales dos se ubicaron en el cromosoma 2 y uno en los cromosomas 7 y 9. Todos explicaron menos del 10 % de la variación fenotípica con excepción de un *QTL* para L ubicado en el cromosoma 7 que explicó el 12 %.

Un único *QTL* fue encontrado para el contenido en sólidos solubles y se encuentra en el cromosoma 11. El porcentaje de variación fenotípica explicada por este marcador fue del 8 %, y la presencia del alelo silvestre tuvo un efecto no esperado, de acuerdo con el fenotipo del progenitor LA722, aumentando el valor promedio de SS.

Por último, se encontraron cinco marcadores *SSR* asociados a la acidez titulable, explicando ellos entre el 10 y el 13 % de la variación fenotípica

observada. Dos *QTLs* estuvieron localizados en el cromosoma 2, otros dos en el Cr9 y uno en el Cr12. Los alelos de origen silvestres disminuyeron el valor medio del carácter para los *QTLs* localizados en el cromosoma 2 y el 12 mientras que se observó un comportamiento opuestos para los alelos silvestres de los *QTLs* ubicados en el cromosoma 9.

Un mismo marcador estuvo asociado a más de un carácter. Los marcadores *SSR032* y *SSR598* del cromosoma 2 estuvieron asociados a a/b y At. El *SSR211044* (Cr6) asociado a firmeza y L. El *SSR039* (Cr8) mostró asociación con el diámetro, altura, forma, firmeza y peso de los frutos. El marcador *SSR070* (Cr9) estuvo asociado a cinco caracteres distintos (diámetro, forma, peso, a/b y At) y el *SSR069* del mismo cromosoma a pH y At, mientras que los marcadores *SSR318*, *SSR596* (Cr10) y *SSRG036* (Cr11) mostraron asociación a diámetro, altura y peso. Por último el *SSRH301* (Cr12) se presentó asociado a diámetro, peso, pH y At.

Por otro lado, todos los caracteres con excepción del contenido en sólidos solubles fueron explicados por más de un marcador *SSR* mientras que para la vida poscosecha no se encontró ningún *SSR* asociado.

El ANOVA a dos criterios de clasificación para aquellos caracteres con más de un marcador asociado, mostró evidencias de espistasis. De las 82 interacciones probadas para los 42 *QTLs* encontrados, apenas el 2,43 % evidenció interacciones significativas al 5 %.

La Tabla I-XVII muestra el cuadro de análisis de la variancia para aquellas interacciones que resultaron significativas. En ambos casos los efectos individuales de los marcadores permanecieron significativos a pesar de

la epistasis encontrada. Los *SSR* en conjunto explicaron un mayor porcentaje de la variación fenotípica que en forma individual, tanto para el pH como para a/b.

Tabla I-XVII. Cuadro de análisis de la variancia a dos criterios de clasificación para el pH (A) e índice de color a/b (B) de los frutos.

A

Carácter	N	R ²
pH	47	0,18

F.V.	G.L.	CM	F	p
SSR095	1	0,17	4,14	0,0480
SSR162	1	0,18	4,28	0,0447
SSR095xSSR162	1	0,17	4,03	0,0490
Error	43	0,04		

B

Carácter	N	R ²
a/b	50	0,24

F.V.	G.L.	CM	F	p
SSR070	1	0,08	7,22	0,0100
SSR286	1	0,07	6,13	0,0170
SSR070xSSR286	1	0,05	4,52	0,0390
Error	46	0,01		

N: número de plantas, R²: coeficiente de determinación del modelo, a/b: índice de color, F.V.: Fuente de variación, G.L.: Grados de libertad, CM: cuadrados medios, F: valor F de Snedecor, p: probabilidad asociada. En gris se destaca la probabilidad asociada para la interacción de los SSR.

En gris se resalta la probabilidad asociada para la interacción de los *SSR*.

Se encontró alta variabilidad entre los progenitores y la F_1 tanto para caracteres de calidad como en perfiles polipeptídicos y marcadores de ADN. Se observó a través del cálculo de los porcentajes de variación genética que la variabilidad en los caracteres estudiados se debe en gran parte al componente genético. Además, los *SSR*, los *SRAP* y los marcadores polipeptídicos permitieron identificar efectos de los genes del genotipo silvestre que podrán ser introgresadas al cultivar Caimanta. No obstante, debido a que los marcadores de *SSR* fueron más eficientes en la detección de *QTLs* para caracteres de calidad de fruto en esta primera retrocruza evaluada se siguió trabajando con este tipo de marcadores. Estos marcadores fueron elegidos por su condición codominante que permiten evaluar el porcentaje de genoma recuperado en retrocruzas avanzadas y porque además en una generación de autofecundación permiten ver el efecto de la segregación de los tres genotipos. Por lo tanto la elección de este tipo de marcadores moleculares permitió ampliar los objetivos en una forma más eficiente, los cuales son desarrollados en los Capítulos siguientes.

CAPITULO II

CARACTERIZACION FENOTIPICA Y MOLECULAR E IDENTIFICACION DE REGIONES GENOMICAS ASOCIADAS A CARACTERES DE CALIDAD DE FRUTOS EN LA GENERACION BC₂

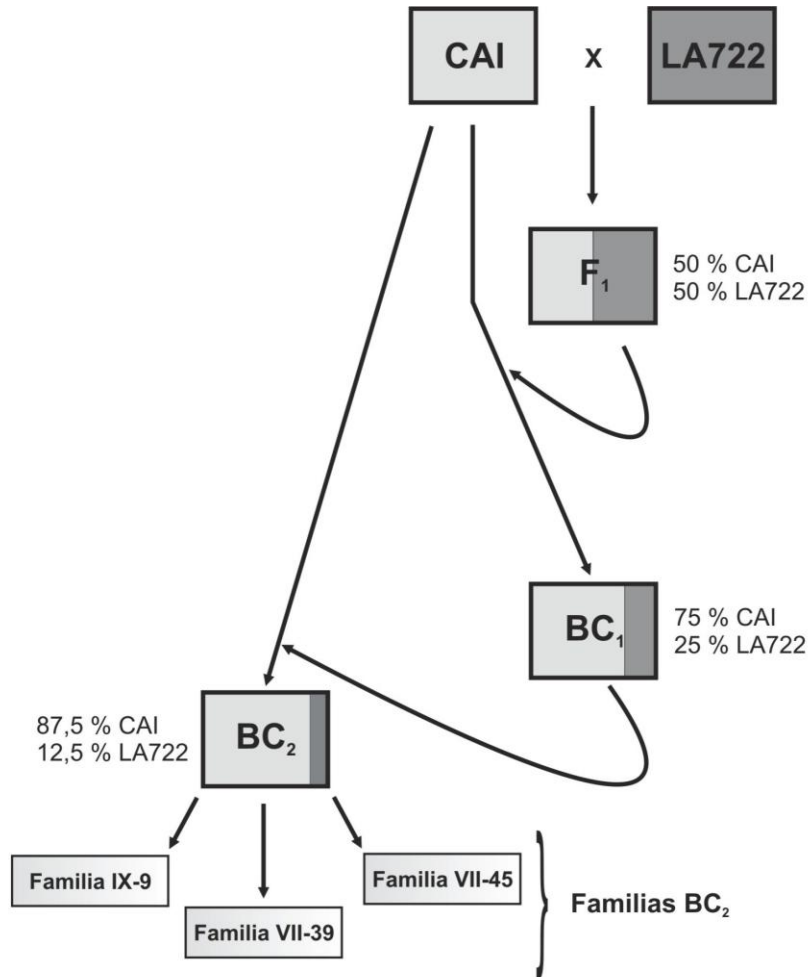
OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Analizar los caracteres de calidad de frutos en tres familias de la segunda retrocruza (BC₂).
- Caracterizar por marcadores de ADN (*SSR*, *Simple Sequence Repeat*) estas tres familias de plantas BC₂.
- Estimar el porcentaje del genoma del padre recurrente (Caimanta) en la generación BC₂.
- Detectar *QTLs* para caracteres de calidad de frutos en familias de BC₂.

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal: La población BC₂ se obtuvo de plantas BC₁ durante los meses de Septiembre a Diciembre de 2008 empleando al cultivar Caimanta como progenitor femenino y a las diferentes plantas BC₁ como progenitores masculinos, siguiendo la misma metodología desarrollada en la sección Materiales y Métodos del Capítulo I. En el mes de Julio de 2010, las semillas obtenidas de cada cruzamiento se colocaron en cajas de Petri para su germinación, plantándose posteriormente en vasos de plásticos de 330 cc. Los plantines fueron trasplantados en un diseño completamente aleatorizado cuando presentaron cuatro hojas verdaderas totalmente desplegadas. Las condiciones de cultivo fueron similares a las informadas en la sección de Materiales y Métodos del Capítulo I. La figura II-1 indica el diagrama de cruzamientos utilizado para la obtención del material vegetal de este estudio. Debido a condiciones ambientales adversas para la efectividad en la obtención de los cruzamientos, de un total de 50 cruzamientos realizados siguiendo la metodología propuesta por Rick (1973), sólo seis prosperaron que fueron aquellos que involucraron a las plantas BC₁ (III-21, IX-9, IX-12, IX-59, VII-39 y VII-45). A su vez, en tres de estos cruzamientos (IX-9, VII-39 y VII-45) se obtuvo una cantidad de semillas suficiente para la caracterización fenotípica y molecular. Estas familias fueron la IX-9, VII-39 y VII-45 como se detalla en la Figura II-1.

Figura II-1. Diagrama de cruzamientos para la obtención de las familias BC₂ a partir del cultivar Caimanta (CAI) de *S. lycopersicum* y LA722 de *S. pimpinellifolium*.



Distintos tonos de gris indican los porcentajes teóricos del genoma de cada progenitor en cada generación.

Se extrajeron muestras de hoja para la posterior extracción de ADN, siguiendo la metodología empleada en el Capítulo I en cada una de las plantas de familias BC₂. Sobre estas plantas también se evaluaron los mismos caracteres fenotípicos señalados en la sección Materiales y Métodos del Capítulo I. La Tabla II-I muestra la cantidad de frutos evaluados para cada conjunto de caracteres en cada una de las familias BC₂ analizadas.

Tabla II-I. Número de plantas y de frutos evaluados en cada familia BC₂ para caracteres de calidad de fruto.

Genotipos	Nro. de plantas	Nro. de frutos evaluados
BC₂(IX-9)	10	93
BC₂(VII-39)	23	397
BC₂(VII-45)	7	105
Total	40	595

Marcadores moleculares: La extracción de ADN y la amplificación de los marcadores *SSR* se llevó a cabo siguiendo la metodología propuesta en el Capítulo I. Los marcadores *SSR* amplificados en cada progenie de plantas BC_2 fueron aquellos que resultaron heterocigotas en las plantas BC_1 . El porcentaje de Caimanta recuperado se calculó a partir de la fórmula detallada en la sección Materiales y Métodos del Capítulo I.

Análisis estadístico: La distribución normal de los caracteres cuantitativos evaluados en esta generación BC_2 se verificó a través de la prueba de Shapiro-Wilk (1965).

Asociación entre caracteres cuantitativos y marcadores moleculares de ADN (*SSR*): Dado que la familia BC_2 (VII-39) presentó un número de plantas suficiente para el análisis estadístico, sobre este conjunto de plantas se probó la segregación de los marcadores *SSR* y su asociación con caracteres de calidad. Considerando la naturaleza codominante de los marcadores microsatélites, se probó la segregación mendeliana esperada para una generación BC_2 (1:1, homocigotas CC: heterocigotas CP, donde C representa el alelo de CAI y P el alelo de LA722 para un *locus* microsatélite dado) a través de una prueba de χ^2 (Snedecor, 1964).

La asociación entre los marcadores moleculares y los caracteres de interés agronómico se determinó a través del método de un solo punto (*single point analysis*, Tanksley, 1993) con el fin de detectar su ligamiento como fue detallado en el Capítulo I. En este experimento, también se consideraron aquellos *QTLs* detectados con una probabilidad de $p < 0,05$, dado que pueden ser validados si dichas asociaciones coinciden con *QTLs* detectados con una probabilidad menor al 5 % en la generación BC_1 .

RESULTADOS

Los análisis fenotípicos y moleculares se realizaron sobre las familias BC₂ originadas a partir de las plantas BC₁ (IX-9, VII-39 y VII-45) que tuvieron las siguientes características: tamaño intermedio, con bajo índice de forma y corta vida poscosecha para la planta IX-9. Tamaño y valores de vida poscosecha intermedio, con alto contenido en sólidos solubles y pH y baja acidez titulable para la planta VII-39. La planta VII-45 mostró tamaño intermedio con alta vida poscosecha, frutos más rojos con bajo L y alto índice de color a/b y pH menos ácido.

La Tabla II-II muestra los valores medios y error estándar para cada uno de los caracteres evaluados en aquellas plantas BC₁ que fueron cruzadas con el cultivar Caimanta para obtener la generación BC₂. En la Tabla II-III se muestran los perfiles de *SSR* para dichas plantas BC₁ y en gris se encuentran resaltados aquellos *SSR* probados en cada familia de la generación BC₂. También en la Tabla II-III se muestra el porcentaje del genoma del progenitor recurrente recuperado en cada planta BC₁.

Tabla II-II. Valores medios y errores estándar de cada carácter para cada una de las plantas BC₁ retrocruzadas con el cultivar Caimanta de *S. lycopersicum*.

Caracteres Fenotípicos						
Planta	Diámetro (cm)	Altura (cm)	Forma	Peso (g)	Lv (días)	Firmeza
IX-9	3,31 ± 0,25	2,58 ± 0,15	0,79 ± 0,02	18,81 ± 3,65	9,56 ± 0,88	sd
VII-39	3,24 ± 0,04	3,20 ± 0,05	0,99 ± 0,01	18,83 ± 0,66	12,80 ± 2,22	52,64 ± 1,72
VII-45	3,31 ± 0,09	2,91 ± 0,08	0,88 ± 0,01	17,90 ± 1,16	15,80 ± 3,64	60,30 ± 2,20

Caracteres Fenotípicos (cont.)					
Planta	L	a/b	SS (°Brix)	pH	At (g)
IX-9	sd	sd	sd	sd	sd
VII-39	42,22 ± 0,70	0,98 ± 0,03	7,60 ± 0,01	5,16 ± 0,02	0,18 ± 0,04
VII-45	39,62 ± 0,34	1,11 ± 0,01	5,50 ± 0,07	4,75 ± 0,06	0,29 ± 0,01

Lv: vida poscosecha, L: porcentaje de reflectancia, a/b: índice de color, SS: contenido en sólidos solubles, At: acidez titulable, sd: sin dato.

Tabla II-III. Perfil de *SSR* (*Simple Sequence Repeat*) para cada una de las plantas BC₁ que dieron origen a la generación BC₂.

SSR	Cr	Plantas BC ₁		
		IX-9	VII-39	VII-45
095	1	CC	CP	CP
009	1	CP	CP	CC
288	1	CC	CC	CC
032	2	CC	CC	CP
295	2	CC	CP	CP
598	2	CC	CC	CP
601	3	CP	CP	CP
014	3	CP	CP	CP
320	3	CP	CP	CP
115	5	CC	CP	CP
162	5	CP	CP	CP
128	6	CC	CC	CP
211044	6	CC	CC	CP
276	7	CP	CC	CC
045	7	CP	CP	sd
286	7	CP	CC	CC
344	8	CC	CP	CC
063	8	CC	CP	CC
038	8	CP	CP	CC
327	8	CC	CC	CP
070	9	CP	CC	CC
069	9	CC	CC	sd
318	10	CP	CP	CC
596	10	CP	CP	CC
034	10	CC	CC	sd
G036	11	CP	CC	CP
080	11	CP	CP	CP
220060	11	CC	CP	CP
1061	11	CC	CC	CP
H301	12	CC	CP	CC
% de CAI recuperado		77	72	69

Cr: cromosoma, C: alelo del cultivar Caimanta de *S. lycopersicum* (CAI), P: alelo de LA722 de *S. pimpinellifolium*. En gris se destacan aquellos marcadores *SSR* que resultaron heterocigotas en las plantas BC₁, retrocruzadas y la última fila muestra los porcentajes del genoma de CAI recuperado en dichas plantas.

II.A. Análisis fenotípico de las familias BC₂

El análisis de Shapiro-Wilk indicó distribución normal de todos los caracteres con valores de W cercanos a 1.

En la Tabla II-IV se informan los valores medios y errores estándar para cada uno de los caracteres analizados junto con los valores máximos y mínimos del rango en el que varió dicho carácter en cada una de las tres familias BC₂.

En las tres familias pudo observarse un rango similar de variación.

Tabla II-IV. Valor medio con su error estándar y rango de variación de cada una de las variables para cada familia BC₂.

Carácter	BC ₂ (IX-9)			BC ₂ (VII-39)			BC ₂ (VII-45)		
	Media	Mín.	Máx.	Media	Mín.	Máx.	Media	Mín.	Máx.
Diámetro (cm)	4,42 ± 0,13	3,00	8,60	4,42 ± 0,04	2,80	6,50	5,18 ± 0,12	3,30	7,60
Altura (cm)	3,60 ± 0,07	2,50	4,70	3,90 ± 0,03	2,80	5,00	4,10 ± 0,07	2,80	5,30
Forma	0,83 ± 0,01	0,53	1,06	0,89 ± 0,01	0,64	1,15	0,80 ± 0,01	0,58	0,94
Peso (g)	44,48 ± 4,10	13,40	200,40	45,14 ± 1,22	3,30	115,00	67,93 ± 3,94	16,60	155,40
Lv (días)	8,25 ± 0,59	2,00	23,00	11,08 ± 0,28	2,00	19,00	7,64 ± 0,42	2,00	16,00
Firmeza	44,00 ± 1,07	34,00	58,00	56,42 ± 0,56	25,00	76,50	50,10 ± 0,70	39,50	57,50
L	38,87 ± 0,32	35,96	44,26	40,00 ± 0,18	35,24	50,49	38,47 ± 0,15	36,55	41,02
a/b	1,08 ± 0,02	0,79	1,34	1,12 ± 0,15	0,57	1,37	1,11 ± 0,02	0,86	1,32
SS (°Brix)	7,52 ± 0,15	6,20	8,30	5,79 ± 0,08	2,90	8,30	6,12 ± 0,12	5,00	7,60
pH	4,47 ± 0,07	4,26	4,96	4,67 ± 0,02	4,39	5,00	4,52 ± 0,04	4,12	4,95
At (g)	0,39 ± 0,04	0,19	0,56	0,29 ± 0,01	0,20	0,42	0,33 ± 0,02	0,23	0,47

Mín.: Valor mínimo de la variable, **Máx.:** Valor máximo de la variable, **Lv:** vida poscosecha, **L:** porcentaje de reflectancia, **a/b:** índice de color, **SS:** contenido en sólidos solubles, **At:** acidez titulable.

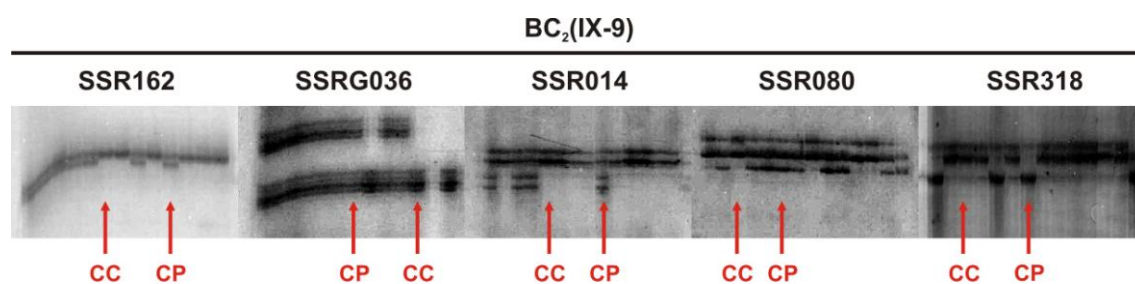
II.B. Análisis Molecular

II.B.1. Perfiles de marcadores *SSR* en familias BC₂

A continuación se presentan los resultados para cada una de las familias BC₂.

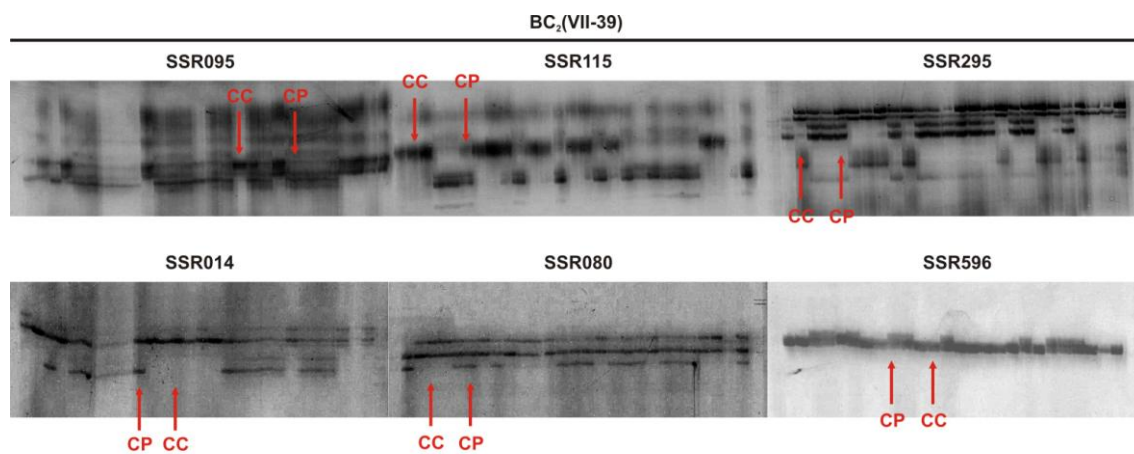
La Figura II-2, II-3 y II-4 muestran los geles de acrilamida al 6 % para algunos de los *SSR* probados en la familia BC₂ (IX-9), BC₂ (VII-39) y BC₂ (VII-45), respectivamente. Las flechas naranjas indican los genotipos encontrados en la generación BC₂, donde CC son los individuos homocigotas para el alelo de CAI y CP son individuos heterocigotas donde P es el alelo de LA722.

Figura II-2. Geles de acrilamida al 6 % para los *SSR* (*Simple Sequence Repeat*): *SSR162*, *SSRG036*, *SSR014*, *SSR080* y *SSR318* analizados en la familia BC_2 (IX-9).



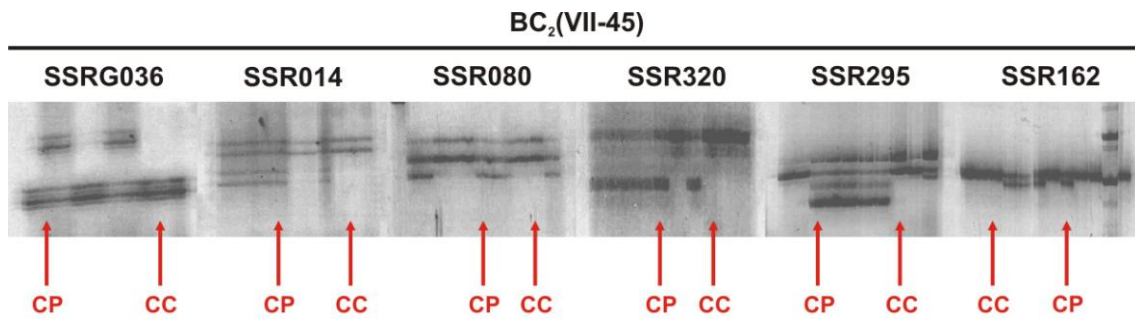
CC: individuos homocigotas para el alelo de Caimanta de *S. lycopersicum*, **CP:** individuos heterocigotas.

Figura II-3. Geles de acrilamida al 6 % para los *SSR* (*Simple Sequence Repeat*): *SSR095*, *SSR115*, *SSR295*, *SSR014*, *SSR080* y *SSR596* analizados en la familia BC_2 (VII-39).



CC: individuos homocigotas para el alelo de Caimanta de *S. lycopersicum*, CP: individuos heterocigotas.

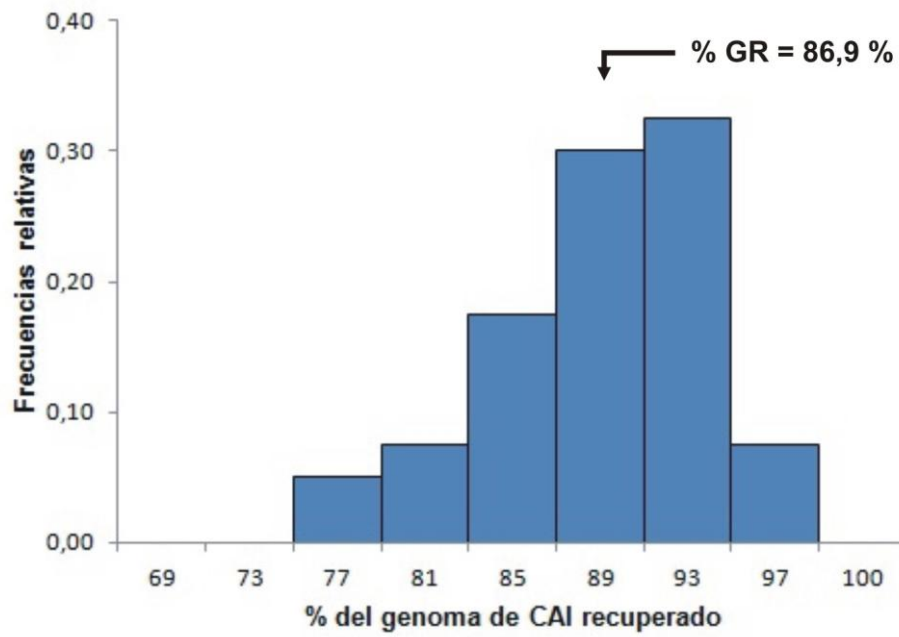
Figura II-4. Geles de acrilamida al 6 % para los *SSR* (*Simple Sequence Repeat*): *SSRG036*, *SSR014*, *SSR080*, *SSR320*, *SSR295* y *SSR162* analizados en la familia BC_2 (VII-45).



CC: individuos homocigotas para el alelo de Caimanta de *S. lycopersicum*, **CP:** individuos heterocigotas.

La Figura II-5 indica la distribución de frecuencias del porcentaje del genoma del progenitor recurrente (CAI) recuperado en la BC₂ al evaluar las tres familias BC₂. Se indica además el porcentaje promedio de genoma recuperado (% GR).

Figura II-5. Distribución de frecuencias para el porcentaje de genoma (% GR) de *S. lycopersicum* (CAI) recuperado en las plantas de la generación BC₂.



El porcentaje promedio del genoma recuperado del padre recurrente (86,9 %) resultó muy cercano al porcentaje teórico para una BC₂ (87,5 %) y varió en un rango de 76 % al 93 %.

II.B.2. Análisis de segregación de SSR y asociación con caracteres fenotípicos en la familia BC₂ (VII-39).

A continuación en la Tabla II-V se muestra la segregación de SSR para la familia BC₂ (VII-39) indicando el número de plantas homocigotas para alelos de CAI, el número de individuos heterocigotas, el número total de plantas evaluadas y el valor χ^2 calculado. En gris se indican aquellos marcadores que presentaron distorsión en la segregación.

Tabla II-V. Segregación de marcadores *SSR* (*Simple Sequence Repeat*) en la familia BC₂ (VII-39).

Familia BC ₂ (VII-39)				
Marcador	n CC	n CP	N	X ²
SSR095	4	19	23	9,783 *
SSR115	10	13	23	0,391 ns
SSR295	9	14	23	1,087 ns
SSR601	10	13	23	0,391 ns
SSR596	13	10	23	0,391 ns
SSR063	15	8	23	2,130 ns
SSR038	15	8	23	2,130 ns
SSRH301	12	11	23	0,043 ns
SSR014	10	13	23	0,391 ns
SSR080	10	13	23	0,391 ns
SSR045	11	10	21	0,048 ns
SSR318	13	10	23	0,391 ns
SSR320	9	14	23	1,087 ns
SSR220060	7	16	23	3,522 ns
SSR344	18	5	23	7,348 *
SSR162	13	10	23	0,391 ns

nCC: número de individuos homocigotas para el alelo del cultivar Caimanta de *S. lycopersicum*, nCP: número de individuos heterocigotas, N: número total de plantas, X²: valor chi-cuadrado, ns: no significativo, *p < 0,05. En gris se destacan aquellos marcadores *SSR* que no segregaron en forma mendeliana.

Dos de 16 SSR (12,5 %) evaluados en la familia BC₂ (VII-39) presentaron distorsión en la segregación y no fueron considerados para probar la asociación con los caracteres cuantitativos.

La Tabla II-VI muestra las asociaciones encontradas entre los SSR y los caracteres fenotípicos evaluados. Se indican la media del carácter para cada genotipo, el número de plantas por clase genotípica, el porcentaje de variación fenotípica explicada y la probabilidad asociada. En gris se encuentran resaltadas aquellas asociaciones detectadas con una probabilidad igual a 0,1 %.

Tabla II-VI. Asociaciones detectadas entre marcadores *SSR* (*Simple Sequence Repeat*) y caracteres fenotípicos en la familia BC₂ (VII-39).

Marcador	Cr	Carácter	Media CC	nCC	Media CP	nCP	R ²	p
SSR601	3	Altura (cm)	4,04	10	3,77	13	0,14	0,0438
	3	At (g)	0,26	9	0,31	12	0,17	0,0272
SSR014	3	Altura (cm)	4,04	10	3,77	13	0,14	0,0438
	3	At (g)	0,26	9	0,31	12	0,17	0,0272
SSR320	3	Diámetro (cm)	4,76	9	4,20	14	0,23	0,0117
	3	Altura (cm)	4,11	9	3,74	14	0,30	0,0040
	3	Peso (g)	54,55	9	38,77	14	0,26	0,0070
	3	At (g)	0,26	8	0,31	13	0,25	0,0082
SSR596	10	Altura (cm)	4,00	13	3,74	10	0,13	0,0483
	10	Lv (días)	10,07	13	12,07	10	0,14	0,0470
	10	Firmeza	59,83	12	53,18	10	0,38	0,0010
SSR318	10	Altura (cm)	4,00	13	3,74	10	0,13	0,0483
	10	Lv (días)	10,07	13	12,07	10	0,14	0,0470
	10	Firmeza	59,83	12	53,18	10	0,38	0,0010
SSR080	11	At (g)	0,27	11	0,31	11	0,15	0,0407
	11	Diámetro (cm)	4,81	16	4,25	7	0,23	0,0199
	11	Altura (cm)	4,17	16	3,76	7	0,36	0,0023
SSR220060	11	Peso (g)	56,76	16	39,77	7	0,27	0,0067
	11	a/b	1,03	16	1,16	6	0,17	0,0281
	11	At (g)	0,25	15	0,30	6	0,19	0,0210
SSRH301	12	SS (°Brix)	6,10	9	5,38	12	0,16	0,0325

Cr: cromosoma, **Media CC:** valor medio del carácter para individuos homocigotas para alelos de *S. lycopersicum* (CAI), **nCC:** número de individuos homocigotas, **Media CP:** valor medio del carácter para individuos heterocigotas, **nCP:** número de individuos heterocigotas, **R²:** fracción de la variación fenotípica explicada, **p:** probabilidad asociada, **At:** acidez titulable, **Lv:** vida poscosecha, **a/b:** índice de color, **SS:** contenido en sólidos solubles. En gris se destacan aquellas asociaciones con $p < 0,001$.

Los 16 *SSR* analizados permitieron detectar un total de 21 *QTLs* de los cuales siete (33 %) fueron significativos al 1 % y dos (9,5 %) al 0,1 %. Los *QTLs* detectados se encontraron localizados en los cromosomas 3, 10, 11 y 12, con un promedio de cinco *QTLs* por cromosoma, habiendo detectado un único *QTL* en el cromosoma 12 y seis en los cromosomas 10 y 11.

Dos *SSR* localizados en el cromosoma 3 (*SSR601* y *SSR014*) presentaron asociación con los mismos caracteres fenotípicos (altura y *At*), con iguales valores medios para cada clase genotípica e igual probabilidad asociada, indicando que ambos *SSR* están marcando el mismo *QTL*. La presencia del alelo silvestre disminuyó el valor medio de la altura y aumento la acidez titulable de los frutos, explicando el 14 % y 17 % de la variación fenotípica observada, respectivamente.

El *SSR320* localizado en el cromosoma 3 estuvo asociado con probabilidad menor al 1 % con la altura, peso y *At* de los frutos, para el cual el alelo aportado por el genotipo silvestre LA722 disminuyó el valor medio de la altura y el peso y aumentó la *At*. Este *QTL* explicó el 30 %, 26 % y 25 % de la variación fenotípica observada para cada carácter, respectivamente. El *SSR320* también mostró asociación con el diámetro de los frutos con una probabilidad menor al 5 %, siendo el alelo silvestre el responsable de una disminución en el valor medio del carácter.

El *SSR596* (Cr10) presentó asociación con la firmeza de los frutos con una probabilidad igual a 0,1 % y a altura y vida poscosecha con $p < 0,05$. El alelo silvestre disminuyó la firmeza promedio y explicó el 38 % de la variación fenotípica observada entre los individuos de esta familia. Los mismos valores

fueron observados para el *SSR318* del cromosoma 10, indicando una proximidad entre ambos *SSR* de modo que se encuentran marcando el mismo *QTL*. El alelo de LA722 de ambos *SSR* disminuyó la altura, esperable de acuerdo al fenotipo de los progenitores, y aumentaron la vida poscosecha.

Para altura y peso se detectó un *QTL* localizado en el cromosoma 11 que explica el 36 % y 27 % de la variación fenotípica, respectivamente y el alelo de LA722 disminuyó el valor medio de la altura y el peso de los frutos.

EL *SSR* ubicado en el cromosoma 11 mostró asociación con caracteres como diámetro, *a/b* y *At* con probabilidad menor al 5 % y porcentaje de variación fenotípica que varían entre el 17 % y 23 %. La media de los genotipos homocigotas para el alelo de CAI fue significativamente más alta para diámetro pero más baja para *a/b* y *At*.

Un único *QTL* para el contenido en sólidos solubles fue detectado en el cromosoma 12, y fue significativo al 5 %. En oposición con lo observado en los genotipos testigos, el alelo silvestre disminuyó el valor medio del carácter y explicó el 16 % de la variación fenotípica.

El efecto de la presencia del alelo silvestre sobre el fenotipo fue el esperado de acuerdo a lo observado en los genotipos testigos para todos los caracteres para los cuales se encontró asociación ($p < 0,01$) con excepción de la firmeza y la acidez titulable. En el caso de la firmeza de los frutos, el genotipo silvestre LA722 fue significativamente más firme que el genotipo cultivado, mientras que no se observaron diferencias entre CAI y LA722 para la acidez titulable.

Los *SSR* evaluados en la generación BC_2 permitieron detectar nuevos *QTLs* no detectados en la generación BC_1 . Sin embargo, para todos ellos el efecto del alelo silvestre fue principalmente dominante o semi dominante.

Es conocido que las generaciones de retrocruzas son poblaciones ineficientes para detectar *QTLs* que tienen algún grado de acción génica recesiva. Probablemente la naturaleza de los *QTLs* (si existiera más de uno) que rigen la vida poscosecha son de este tipo y por este motivo no han sido detectados muchos *QTLs* y con un alto valor probabilístico asociado en las generaciones de retrocruzas analizadas. Por estas razones en el siguiente Capítulo se pretende analizar la autofecundación de plantas de la BC_1 como estrategia para detectar alelos donantes de *QTLs* recesivos además de los alelos de *QTLs* con efectos aditivos y dominantes.

CAPITULO III

VALIDACION DE QTLS PARA CARACTERES DE CALIDAD DE FRUTO EN FAMILIAS BC₁S₁

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Detectar *QTLs* para calidad de fruto en la progenie de plantas autofecundas de la primera retrocruza (BC_1).
- Validar *QTLs* detectados en la BC_1 y BC_2 evaluando la progenie de estas plantas.

MATERIALES Y METODOS

Material Vegetal: se seleccionaron cinco plantas de la generación BC₁ siguiendo dos criterios. El primer criterio de selección fue elegir aquellas plantas que mostraron los mayores valores medios para el carácter vida poscosecha (Tabla III-I). El segundo criterio de selección fue que las cinco plantas segregaran en conjunto para los 30 SSR estudiados en la generación BC₁ (Tabla III-II). Estas plantas fueron afecondadas para dar origen a las familias BC₁S₁ (ver esquema de cruzamiento en la Figura III-1) durante el mes de Diciembre de 2008. Estas familias se utilizaron para validar los SSR asociados a caracteres de calidad de frutos encontrados en las generaciones de la primera y la segunda retrocruza. En el mes de Julio de 2010 se sembraron 15 semillas de cada progenitor y F₁ como testigo y 50 semillas de cada progenie de las plantas BC₁ seleccionadas en cajas de Petri para su germinación, plantándose posteriormente en vasos de plásticos de 330 cc. Los plantines fueron trasplantados en un diseño completamente aleatorizado cuando presentaron cuatro hojas verdaderas totalmente desplegadas. Las condiciones de cultivo fueron similares a las informadas en la sección de Materiales y Métodos del Capítulo I (Foto III-1).

Tabla III-I. Valores medios y errores estándares para todas las variables en las plantas de la generación BC₁ seleccionadas por los valores de la vida poscosecha de los frutos.

Caracteres Fenotípicos						
Planta	Diámetro (cm)	Altura (cm)	Forma	Peso (g)	Lv (días)	Firmeza
III-21	3,45 ± 0,14	3,16 ± 0,10	0,92 ± 0,01	21,73 ± 2,27	18,4 ± 2,14	50,85 ± 2,38
IX-14	3,69 ± 0,06	3,06 ± 0,05	0,83 ± 0,01	24,46 ± 1,15	23,67 ± 2,51	44,00 ± 1,87
VII-31	3,00 ± 0,09	2,72 ± 0,07	0,91 ± 0,02	14,41 ± 1,14	28,2 ± 1,64	49,42 ± 1,79
VII-51	3,93 ± 0,13	3,12 ± 0,08	0,80 ± 0,01	28,96 ± 2,48	22,30 ± 3,80	56,25 ± 0,88
VII-91	2,94 ± 0,04	2,75 ± 0,04	0,93 ± 0,01	14,9 ± 0,62	19,8 ± 1,59	46,72 ± 1,58

Caracteres Fenotípicos (cont.)					
Planta	L	a/b	SS (°Brix)	pH	At (g)
III-21	41,64 ± 0,55	1,06 ± 0,03	8,80 ± 0,09	5,03 ± 0,04	0,27 ± 0,04
IX-14	39,25 ± 0,30	1,05 ± 0,03	6,03 ± 0,06	4,59 ± 0,04	0,37 ± 0,02
VII-31	42,02 ± 0,38	0,87 ± 0,04	6,30 ± 0,17	4,69 ± 0,11	0,24 ± 0,01
VII-51	44,66 ± 0,64	0,81 ± 0,05	5,23 ± 0,13	4,60 ± 0,03	0,28 ± 0,00
VII-91	41,34 ± 0,66	1,06 ± 0,03	8,03 ± 0,03	4,82 ± 0,03	0,27 ± 0,03

Lv: vida poscosecha, L: porcentaje de reflectancia, a/b: índice de color, SS: contenido en sólidos solubles, At: acidez titulable.

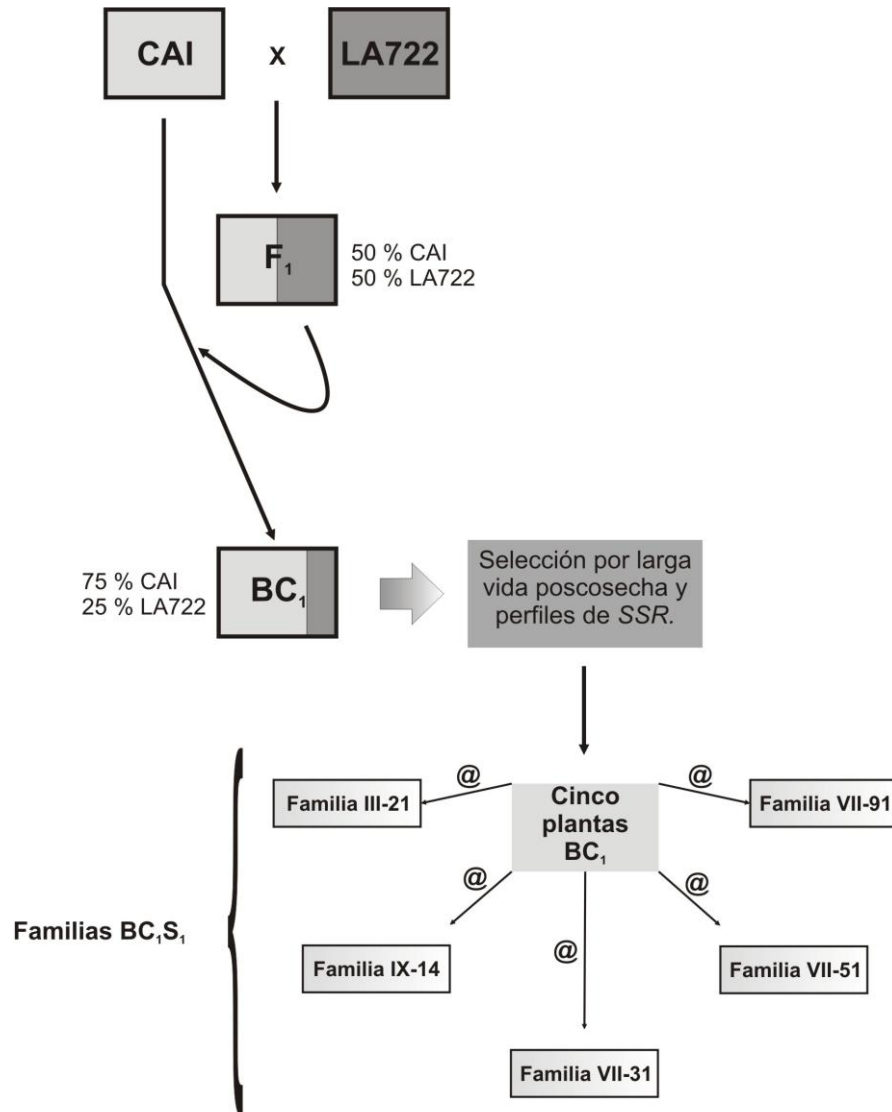
Tabla III-II. Perfil de *SSR* (*Simple Sequence Repeat*) para plantas BC_1 seleccionadas.

SSR	Cr	Plantas BC_1				
		III-21	IX-14	VII-31	VII-51	VII-91
095	1	CC	CC	CP	CC	CP
009	1	CP	CC	CC	CC	CP
288	1	CC	CC	CC	CP	CP
032	2	CP	CC	CC	CC	CC
295	2	CC	CP	CC	CC	CC
598	2	CP	CC	CC	CC	CC
601	3	CP	CC	CC	CP	CP
014	3	CC	CC	CC	CP	CP
320	3	CP	CC	CC	CP	CP
115	5	CP	CC	CC	CC	CC
162	5	CC	CC	CC	CC	CP
128	6	CP	CC	CP	CP	CP
211044	6	CP	CC	CP	CP	CP
276	7	CC	CC	CP	CC	CC
045	7	CC	CC	CP	CP	CC
286	7	CC	CC	CP	CC	CC
344	8	CC	CP	CP	CC	CC
063	8	CC	CP	CP	CC	CC
038	8	CP	CP	CP	CC	CP
327	8	CP	CP	CP	CC	CC
070	9	CP	CC	CC	CC	CP
069	9	CP	CC	CC	CC	CC
318	10	CC	CC	CP	CC	CP
596	10	CC	CC	CP	CP	CP
034	10	CP	CP	CC	CP	CP
G036	11	CC	CC	CC	CC	CP
080	11	CP	CC	CP	CP	CC
220060	11	CC	CP	CP	CP	CP
1061	11	CC	CC	CC	CC	CP
H301	12	CC	CC	CP	CC	CP
% de CAI recuperado		77	83	75	82	70

Cr: cromosoma, C: alelo del cultivar Caimanta (CAI) de *S. lycopersicum*, P: alelo de LA722 de *S. pimpinellifolium*. En gris se destacan aquellos SSR que resultaron heterocigotas en las plantas BC_1 autofecundadas y la última fila muestra los porcentajes del genoma de CAI recuperado en dichas plantas.

Los valores de porcentajes del genoma de CAI recuperado se calcularon de acuerdo a la formula explicada para el análisis estadístico y genéticos de los datos moleculares de la sección Materiales y Métodos del Capítulo I.

Figura III-1. Diagrama de cruzamientos para la obtención de las familias BC₁S₁ a partir del cultivar Caimanta (CAI) de *S. lycopersicum* y LA722 de *S. pimpinellifolium*.



Distintos tonos de gris indican los porcentajes teórico del genoma de cada progenitor en cada generación.

Foto III-1. Distribución de las plantas de las familias BC₁S₁ en invernadero en la campaña 2010/2011.



Se extrajeron muestras de hoja para la posterior extracción de ADN, siguiendo la metodología empleada en el Capítulo I. Sobre estas plantas también se evaluaron los mismos caracteres fenotípicos señalados en la sección Materiales y Métodos del Capítulo I.

La siguiente tabla muestra la cantidad de plantas y frutos evaluados en cada generación (Tabla III-III).

Tabla III-III. Número total de plantas y de frutos evaluados para los caracteres estudiados en *S. lycopersicum* (CAI), LA722 de *S. pimpinellifolium*, F₁ y en las generaciones BC₁S₁.

Genotipos	Nro. de plantas	Nro. de frutos evaluados
CAI	10	74
LA722	8	93
F ₁	4	99
BC ₁ S ₁ (III-21)	42	670
BC ₁ S ₁ (IX-14)	48	695
BC ₁ S ₁ (VII-31)	37	649
BC ₁ S ₁ (VII-51)	34	564
BC ₁ S ₁ (VII-91)	43	764
Total	226	3608

Marcadores moleculares: La extracción de ADN y la amplificación de los marcadores *SSR* se llevó a cabo siguiendo la metodología propuesta en el Capítulo I. Los marcadores *SSR* amplificados en cada progenie de plantas BC_1 seleccionadas fueron aquellos que resultaron heterocigotas en dichas plantas. La lista de *SSR* analizados por familia BC_1S_1 son los resaltados en gris en la Tabla III-II.

Análisis estadístico: La distribución normal de los caracteres cuantitativos evaluados en todas las generaciones se verificó a través de la prueba de Shapiro-Wilk (1965) y se compararon las medias entre los genotipos uniformes para todos los caracteres con la prueba de la *t* de Student (Snedecor, 1964). Se calcularon los porcentajes de variación genética (% VG) para cada uno de los caracteres en cada una de las familias por ANOVA (adaptado de Mariotti, 1986).

Asociación entre caracteres cuantitativos y marcadores moleculares de ADN (*SSR*): Dada la naturaleza codominante de los marcadores microsatélites, se probó la segregación mendeliana esperada para una generación BC_1S_1 (1:2:1, homocigotas CC: heterocigotas CP: homocigotas PP, donde C representa el alelo de CAI y P el alelo de LA722 para un *locus* microsatélite dado) a través de una prueba de χ^2 (Snedecor, 1964).

La asociación entre los marcadores moleculares y los caracteres de interés agronómico se determinó a través del método de un solo punto (*single point analysis*, Tanksley, 1993) con el fin de detectar su ligamiento, como fuese detallado en el Capítulo I. En este experimento, también se consideraron aquellos *QTLs* detectados con una probabilidad de $p < 0,05$, dado que pueden ser validados si dichas asociaciones son encontradas en dos o más progenies BC_1S_1 o coinciden con *QTLs* detectados con una probabilidad menor al $p < 0,05$ en la generación BC_1

y/o BC₂. Se calcularon los grados de dominancia (d/a) para cada *QTL* detectado a partir de los tres genotipos posibles y los datos fenotípicos para dicho *QTL*.

En aquellos casos en los que se detectó más de una banda asociada a un mismo carácter se llevó a cabo un ANOVA a dos criterios de clasificación para comprobar el efecto conjunto de las bandas y segregar el efecto de la interacción.

RESULTADOS

III.A. Análisis fenotípico

El análisis de Shapiro-Wilk indicó distribución normal de todos los caracteres con valores de W cercanos a 1.

El valor medio y error estándar para cada carácter en los genotipos son mostrados en la Tabla III-IV.

Tabla III-IV. Valor medio y error estándar para cada carácter en genotipos testigos (*S lycopersicum* (CAI), LA722 de *S. pimpinellifolium* y la F₁).

Carácter	Genotipos testigos		
	CAI	LA722	F ₁
Diámetro (cm)	8,63 ± 0,20c	1,28 ± 0,02a	2,83 ± 0,06b
Altura (cm)	5,74 ± 0,09c	1,23 ± 0,02a	2,61 ± 0,05b
Forma	0,67 ± 0,01a	0,97 ± 0,01c	0,93 ± 0,01b
Peso (g)	244,78 ± 14,45c	1,22 ± 0,04a	13,25 ± 0,56a
Lv (días)	3,98 ± 0,24a	12,79 ± 0,51c	10,59 ± 0,44b
Firmeza	38,54 ± 1,75a	52,28 ± 2,65b	53,86 ± 0,71b
L	41,53 ± 0,97b	39,25 ± 0,44ab	38,41 ± 0,20a
a/b	0,83 ± 0,03a	1,33 ± 0,03c	1,20 ± 0,02b
SS (°Brix)	4,93 ± 0,13a	7,38 ± 0,06c	5,68 ± 0,07b
pH	4,23 ± 0,05a	4,26 ± 0,03ab	4,29 ± 0,02b
At (g)	0,45 ± 0,02a	0,84 ± 0,01b	0,46 ± 0,01a

Lv: vida poscosecha, L: porcentaje de reflectancia, **a/b**: índice de color, **SS**: contenido en sólidos solubles, **At**: acidez titulable. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

El genotipo cultivado CAI fue quien presentó los frutos de mayor tamaño mostrando valores más altos de diámetro ($D = 8,63 \pm 0,20$), altura ($A = 5,74 \pm 0,09$) y peso ($P = 244,78 \pm 14,45$). El genotipo LA722 evidenció más larga vida poscosecha ($Lv = 12,79 \pm 0,51$) y firmeza ($F = 52,28 \pm 2,65$) como así también mostró frutos más rojos ($a/b = 1,33 \pm 0,03$), de mayor contenido en sólidos solubles ($SS = 7,38 \pm 0,06$) y acidez titulable ($At = 0,84 \pm 0,01$) que el genotipo cultivado. Éste último presentó frutos más aplanados, es decir, menor índice forma ($Fo = 0,67 \pm 0,01$). El híbrido F_1 mostró valores medios que se ubican entre los progenitores para la mayoría de caracteres analizados, con excepción del pH, L y firmeza de los frutos cuyos valores no presentaron diferencia con LA722 y At con valores similares al progenitor cultivado.

Con respecto a las progenies de plantas BC_1 , en la Tabla III-V se muestran los valores medios y el rango de variación de cada variable para cada familia. Los rangos de variación fueron amplios para la mayoría de los caracteres en cada una de las familias. Se destacan las familias III-21, VII-31, VII-51 y VII-91 que presentaron frutos amarillos, evidenciado en valores mínimos negativos para el índice de color a/b y de valores altos para el parámetro L. Todas las familias presentaron los valores máximos altos del contenido en sólidos solubles que son similares al progenitor LA722.

Las Fotos III-2 a III-6 muestran la segregación del tamaño y color para cada una de las familias estudiadas.

La Tabla III-VI muestra los porcentajes de la variación fenotípica explicada por la variación genética. En gris se resaltan los valores más altos y con recuadros los valores más bajos para la proporción de variación fenotípica atribuible a variación genética.

Tabla III-V. Valor medio, error estándar y rango de variación para cada una de las variables en las familias BC₁S₁.

Familias BC ₁ S ₁						
Carácter	III-21		IX-14		VII-31	
	Media	Rango	Media	Rango	Media	Rango
Diámetro (cm)	3,41 ± 0,10	1,97 - 4,55	3,72 ± 0,06	2,80 - 4,53	2,95 ± 0,07	2,03 - 3,93
Altura (cm)	2,93 ± 0,07	1,95 - 3,88	3,02 ± 0,05	2,31 - 3,84	2,77 ± 0,06	1,84 - 3,57
Forma	0,87 ± 0,01	0,74 - 0,99	0,82 ± 0,01	0,73 - 0,92	0,95 ± 0,01	0,88 - 1,08
Peso (g)	23,42 ± 1,62	4,90 - 44,95	26,76 ± 1,13	11,34 - 42,76	15,56 ± 0,98	5,35 - 33,03
Lv (días)	11,91 ± 0,63	4,40 - 22,50	11,50 ± 0,32	6,13 - 16,38	13,19 ± 0,60	5,00 - 20,00
Firmeza	57,53 ± 1,66	40,35 - 83,43	55,52 ± 1,10	40,50 - 66,50	58,4 ± 1,78	37,15 - 78,50
L	40,32 ± 1,04	35,56 - 62,85	37,29 ± 0,24	35,27 - 41,98	43,50 ± 1,59	35,37 - 61,95
a/b	1,09 ± 0,06	-0,15 - 1,45	1,26 ± 0,02	1,07 - 1,46	0,80 ± 0,11	-0,24 - 1,33
SS (°Brix)	7,01 ± 0,25	4,55 - 9,98	6,19 ± 0,18	4,37 - 9,42	6,74 ± 0,21	5,12 - 10,18
pH	4,44 ± 0,03	4,14 - 4,75	4,42 ± 0,03	4,02 - 4,93	4,53 ± 0,06	3,92 - 5,17
At (g)	0,45 ± 0,03	0,23 - 0,82	0,45 ± 0,02	0,27 - 0,68	0,42 ± 0,02	0,17 - 0,71

Familias BC ₁ S ₁ (cont.)				
Carácter	VII-51		VII-91	
	Media	Rango	Media	Rango
Diámetro (cm)	3,51 ± 0,08	2,64 - 4,36	2,76 ± 0,07	2,02 - 4,17
Altura (cm)	2,88 ± 0,06	2,31 - 3,49	2,48 ± 0,07	1,74 - 3,65
Forma	0,82 ± 0,01	0,71 - 0,95	0,91 ± 0,01	0,78 - 1,01
Peso (g)	22,73 ± 1,45	9,95 - 41,02	13,38 ± 1,00	4,79 - 38,08
Lv (días)	10,95 ± 0,59	6,00 - 20,00	13,38 ± 0,73	7,29 - 26,40
Firmeza	57,24 ± 1,48	38,86 - 77,83	54,41 ± 1,54	39,46 - 80,56
L	43,93 ± 1,49	36,78 - 68,44	43,49 ± 1,66	36,82 - 63,50
a/b	0,89 ± 0,09	-0,17 - 1,43	0,95 ± 0,11	-0,17 - 1,40
SS (°Brix)	6,92 ± 0,20	5,47 - 9,95	7,23 ± 0,22	5,10 - 9,97
pH	4,33 ± 0,03	3,96 - 4,54	4,33 ± 0,05	3,79 - 4,72
At (g)	0,58 ± 0,03	0,35 - 0,95	0,58 ± 0,03	0,40 - 0,94

Lv: vida poscosecha, L: porcentaje de reflectancia, a/b: índice de color, SS: contenido en sólidos solubles, At: acidez titulable.

Foto III-2. Segregación de tamaño y color para la familia III-21.

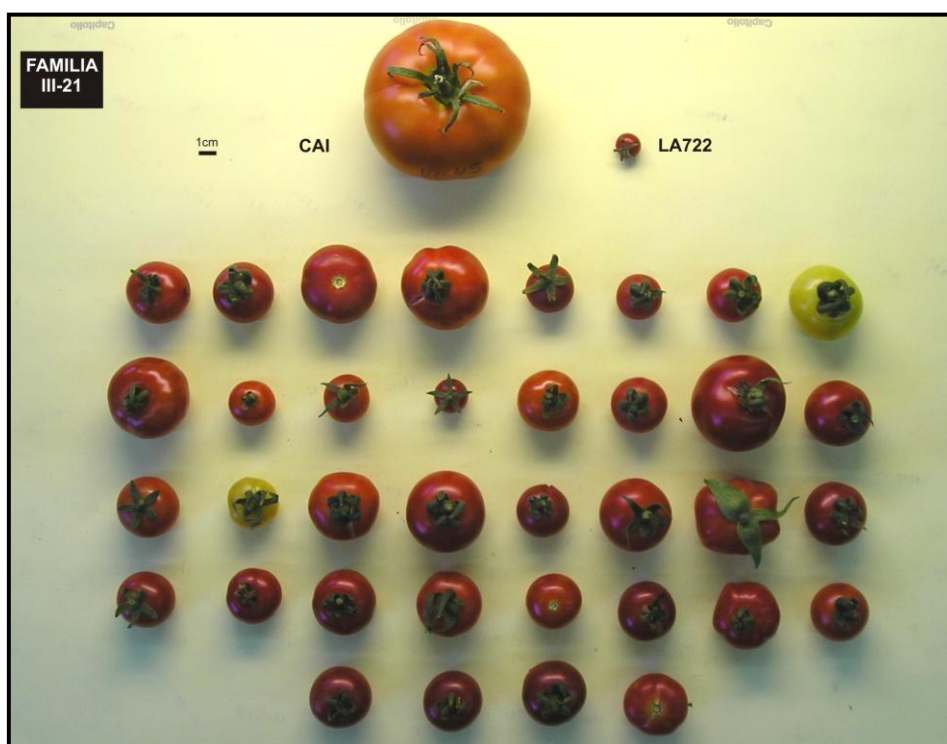


Foto III-3. Segregación de tamaño y color para la familia IX-14.



Foto III-4. Segregación de tamaño y color para la familia VII-31.

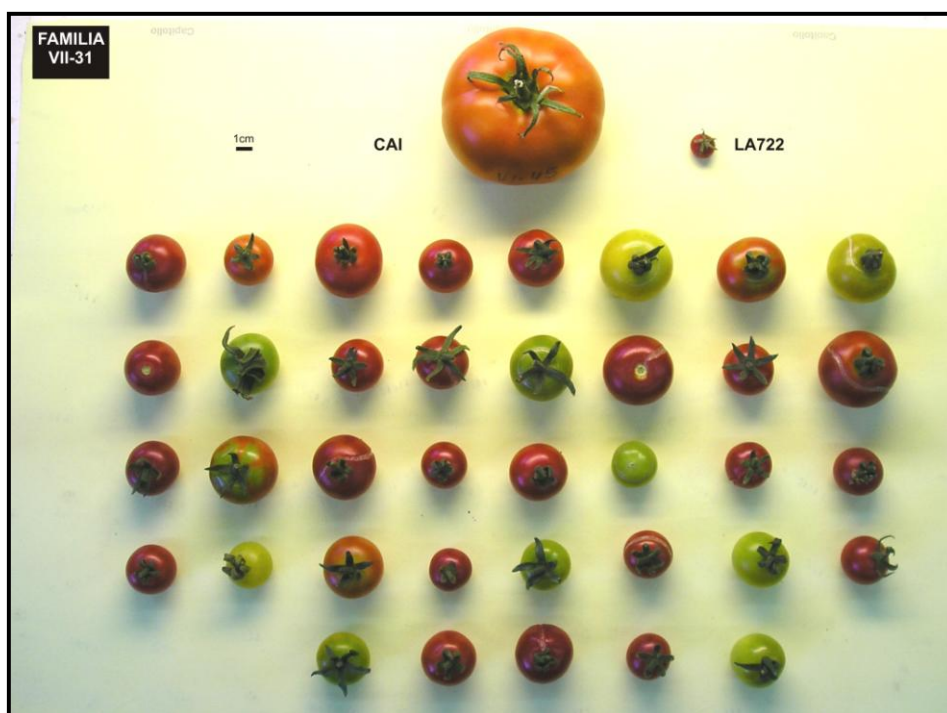


Foto III-5. Segregación de tamaño y color para la familia VII-51.

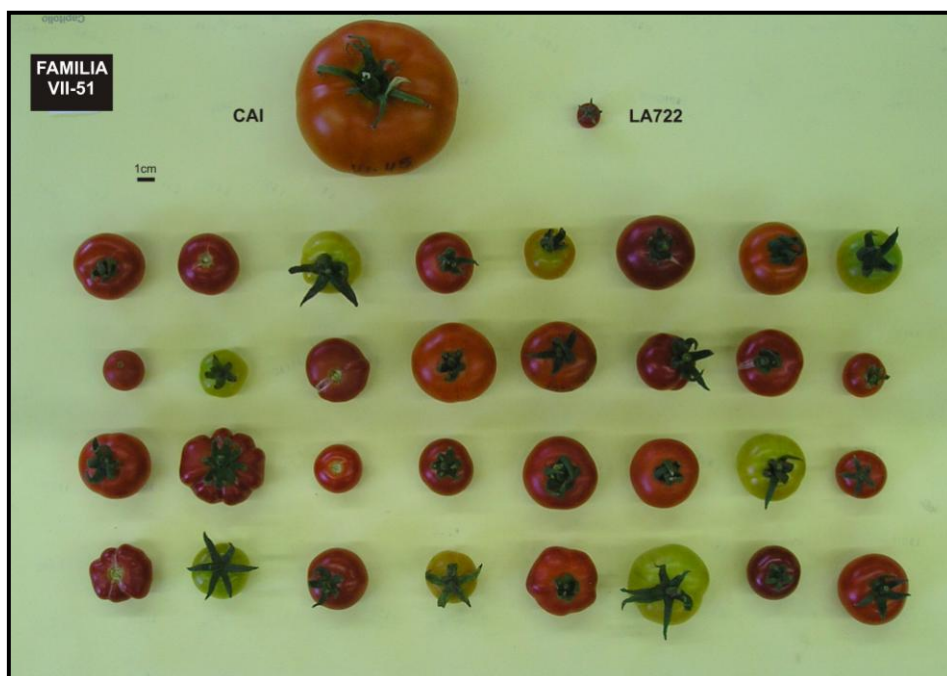


Foto III-6. Segregación de tamaño y color para la familia VII-91.

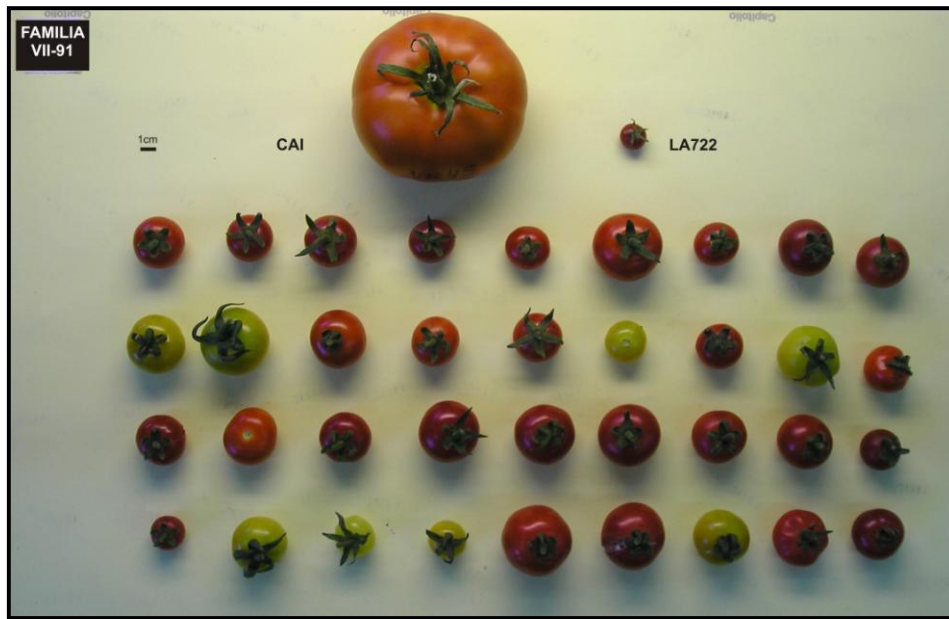


Tabla III-VI. Porcentajes de variación genética (% VG) para cada carácter en cada familia BC₁S₁.

Carácter	% VG				
	BC ₁ S ₁ (III-21)	BC ₁ S ₁ (IX-14)	BC ₁ S ₁ (VII-31)	BC ₁ S ₁ (VI-51)	BC ₁ S ₁ (VII-91)
Diámetro (cm)	62,5	44,3	60,0	47,6	71,8
Altura (cm)	58,6	43,7	60,9	44,2	73,3
Forma	57,7	27,3	39,9	41,0	36,7
Peso (g)	53,5	44,4	62,6	42,1	72,0
Lv (días)	61,4	21,7	44,8	46,0	60,2
Firmeza	80,5	55,7	78,5	71,0	84,0
L	93,5	53,3	96,5	95,4	93,7
a/b	92,1	41,1	97,5	96,0	97,5
SS (°Brix)	94,6	95,2	95,0	93,0	95,5
pH	74,0	90,1	90,6	63,5	94,5
At (g)	94,6	75,1	91,7	88,8	87,5

Lv: vida poscosecha, L: porcentaje de reflectancia, a/b: índice de color, SS: contenido en sólidos solubles, At: acidez titulable. Con recuadros se señalan los valores más bajos de % VG entre las familias BC₁S₁. En gris se destacan los valores más altos de % VG entre las familias BC₁S₁.

La familia BC₁S₁ (III-21) presentó los valores más altos de % VG para forma (57,7 %), vida poscosecha (61,4 %) y acidez titulable (94,6 %). Para los demás caracteres el porcentaje de variación genética presentó valores relativamente altos en dicha familia.

La familia BC₁S₁ (IX-14) fue la que mostró los valores más bajo para todos los caracteres de calidad de frutos, con excepción del contenido en sólidos solubles, carácter que evidenció variación genética elevada para todas la familias evaluadas.

Los caracteres de color L y a/b presentaron valores altos para % VG en la familia BC₁S₁ (VII-31) (% VG = 96,5 % y % VG = 97,5 %, respectivamente) mientras que los demás valores fueron relativamente altos y similares a los de la familia BC₁S₁ (III-21).

El % VG para el peso de los frutos (% VG = 42,1 %) mostró el valor más bajo en la familia BC₁S₁ (VII-51) al igual que el pH (% VG = 63,5 %).

Por último la familia BC₁S₁ (VII-91) presentó los más altos valores de % VG para la mayoría de los caracteres analizados.

Si se comparan los % VG entre las familias, se observa que en la BC₁S₁ (IX-14), la variación observada para los caracteres como diámetro, altura y peso de los frutos se debieron principalmente a variaciones ambientales. Por el contrario, para el contenido en sólidos solubles hubo un importante componente genético en la variación fenotípica observada en cada una de las familias.

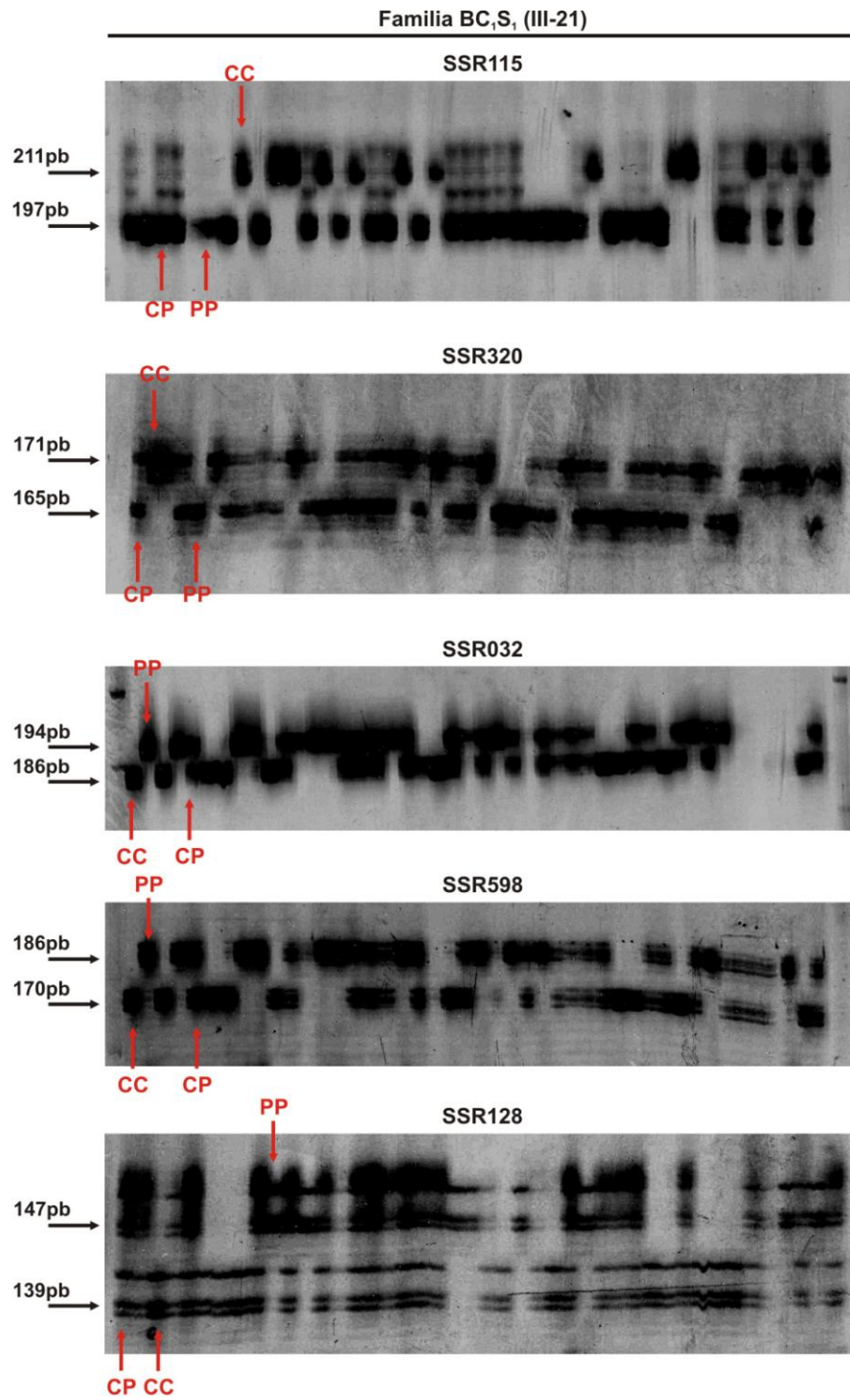
III.B. Análisis Molecular

A continuación se presentan los resultados para cada una de las progenies de plantas BC₁ autofecundadas.

III.B.1. Familia BC₁S₁ (III-21)

La Figura III-2 muestra los geles de poliacrilamida al 6 % para cinco de los *SSR* amplificados en la progenie III-21. Con flechas naranjas se indican las distintas clases genotípicas en la generación segregante.

Figura III-2. Geles de poliacrilamida al 6 % para los *SSR* (*Simple Sequence Repeat*): *SSR115*, *SSR320*, *SSR032*, *SSR598* y *SSR128* en la familia BC_1S_1 (III-21).



pb: pares de bases, CC: individuos homocigotas para el alelo de CAI, CP: individuos heterocigotas, PP: individuos homocigotas para el alelo de LA722.

La segregación mendeliana de los *SSR* que fueron heterocigotas en la planta BC₁ III-21, fue probada y se muestra en la Tabla III-VII.

Tabla III-VII. Segregación de los *SSR* (*Simple Sequence Repeat*) probados en la familia III-21.

Marcador	Familia BC ₁ S ₁ (III-21)				X ²
	N	n CC	n CP	n PP	
SSR211044	40	8	17	15	3,35 ns
SSR327	40	26	14	0	37,40 *
SSR034	42	11	21	10	0,05 ns
SSR038	42	22	20	0	23,14 *
SSR320	42	13	22	7	1,81 ns
SSR598	41	9	19	13	1,00 ns
SSR080	41	8	22	11	0,66 ns
SSR128	42	11	23	8	0,81 ns
SSR601	40	9	25	6	2,95 ns
SSR032	41	11	19	11	0,22 ns
SSR115	42	13	19	10	0,81 ns
SSR069	31	8	16	7	0,10 ns
SSR070	38	15	16	7	4,32 ns

N: número total de individuos, **n CC:** número de individuos homocigotas para el alelo de Caimanta (CAI) de *S. lycopersicum*, **n CP:** número de individuos heterocigotas, **n PP:** número de individuos homocigotas para el alelo de LA722 de *S. pimpinellifolium*, **X²:** valor de chi-cuadrado, **ns:** no significativo, *p < 0,05. En gris se indican los *SSR* que no segregaron en forma mendeliana.

Los *SSR* resaltados en gris no ajustaron a la segregación mendeliana (1:2:1) esperada. Sólo dos *SSR* (15 %) no ajustaron, mientras que el resto fueron utilizados para probar la asociación con los caracteres fenotípicos de calidad de fruto. En la Tabla III-VIII se muestran las asociaciones detectadas, indicando además las medias y los grados de dominancia para cada *QTL*. También se indican la fracción de la variación fenotípica explicada por el *QTL* y la probabilidad asociada.

Tabla III-VIII. Asociaciones de *SSR* (*Simple Sequence Repeat*) a caracteres fenotípicos en la familia III-21.

Familia BC ₁ S ₁ (III-21)								
Carácter	Marcador	Cr	Media CC	Media CP	Media PP	R ²	p	d/a
SS (°Brix)	SSR 598	2	5,84 ± 0,35a	7,29 ± 0,38b	7,50 ± 0,45b	0,26	0,0032	0,75
pH	SSR 598	2	4,25 ± 0,05a	4,52 ± 0,03b	4,50 ± 0,08b	0,38	0,0001	1,16
SS (°Brix)	SSR 032	2	6,11 ± 0,41a	7,29 ± 0,38b	7,50 ± 0,45b	0,19	0,0180	0,70
pH	SSR 032	2	4,27 ± 0,05a	4,52 ± 0,03b	4,50 ± 0,08b	0,35	0,0002	1,17
L	SSR 115	5	43,64 ± 2,77b	39,19 ± 0,66a	37,88 ± 0,49a	0,19	0,0183	-0,55
a/b	SSR 115	5	0,87 ± 0,17a	1,15 ± 0,04b	1,27 ± 0,03b	0,21	0,0093	0,40
pH	SSR 128	6	4,52 ± 0,05b	4,49 ± 0,05b	4,32 ± 0,05a	0,21	0,0090	0,70
At (g)	SSR 034	10	0,36 ± 0,03a	0,45 ± 0,04a	0,55 ± 0,06b	0,23	0,0064	-0,05
L	SSR 080	11	44,47 ± 3,47b	38,65 ± 0,52a	40,43 ± 2,10ab	0,15	0,0423	sc

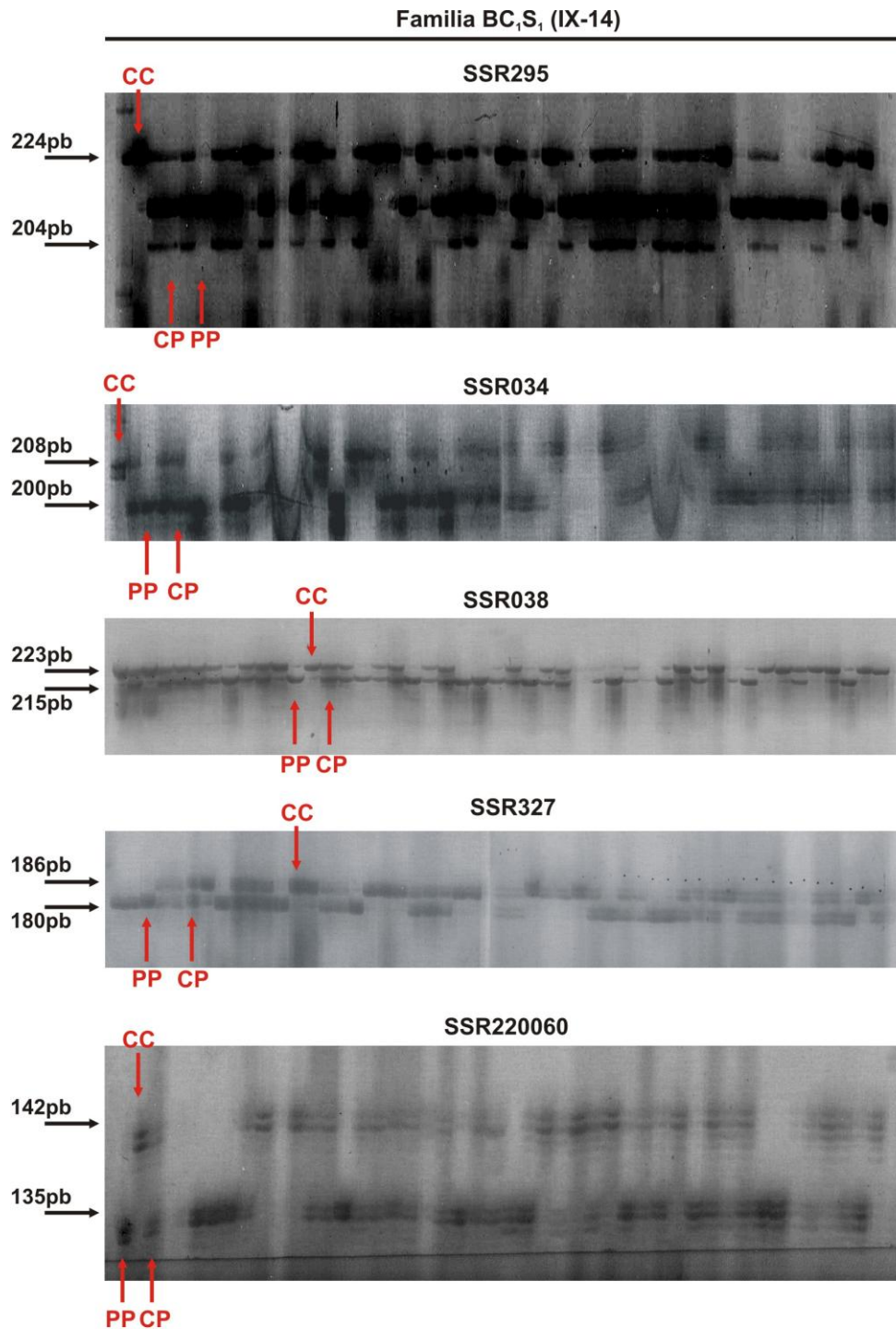
Cr: cromosoma, **Media CC:** valor medio del carácter para individuos homocigotas para el alelo de Caimanta (CAI) de *S. lycopersicum*, **Media CP:** valor medio del carácter para individuos heterocigotas, **Media PP:** valor medio del carácter para individuos homocigotas para el alelo de LA722 de *S. pimpinellifolium*, **R²:** fracción de la variación fenotípica explicada, **p:** probabilidad asociada, **d/a:** grados de dominancia, **SS:** contenido en sólidos solubles, **L:** porcentaje de reflectancia, **a/b:** índice de color, **At:** acidez titulable, **sc:** sin cálculo. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). En gris se destacan las asociaciones detectadas con $p < 0,001$.

Los 11 *SSR* analizados permitieron detectar nueve *QTLs* con significado al 5 % de los cuales cuatro (44,4 %) fueron significativos al 1 % y dos (22,2 %) al 0,1% (resaltados en gris). El porcentaje de variación fenotípica explicada por todos ellos varió del 15 % al 38 %. Todos los *QTLs* encontrados en la familia III-21 fueron para caracteres bioquímicos y los parámetros de color. El pH fue el carácter con mayor cantidad de *QTLs* (3), dos ubicados en el cromosoma 2 y uno en el cromosoma 6. Los *QTLs* para pH localizados en el cromosoma 2 fueron significativos al 0,1 %, explicaron el 38 y 35 % de la variación fenotípica observada y en ambos, el alelo silvestre tuvo un efecto dominante sobre el carácter ($d = 1,16$ y $d = 1,17$), aumentando el valor medio. Para SS se encontraron dos *SSR* (598 y 032) (Cr2) asociados, que explicaron el 26 y 19 % de la variación fenotípica, respectivamente. Para ambos *QTLs*, la presencia del alelo P aumenta el carácter. Dos *QTLs* ubicados en los cromosoma 5 y 11 fueron detectados para el parámetro de color L y explican el 19 y 15 % de la variación fenotípica encontrada, respectivamente. El marcador *SSR115* localizado en el cromosoma 5 estuvo asociado al índice de color a/b, la presencia del alelo silvestre aumentó la media del carácter y explicó el 21 % de la variabilidad fenotípica. Por último, se encontró un *QTLs* localizado en el cromosoma 10 que explica el 23 % de la variación fenotípica observada para la acidez titulable, en el que la presencia del alelo silvestre aumenta el valor medio de dicho carácter.

III.B.2. Familia BC₁S₁ (IX-14)

La Figura III-3 muestra los geles de poliacrilamida al 6 % para cinco de los SSR amplificados en la progenie IX-14. Con flechas naranjas se indican las distintas clases genotípicas en la generación segregante.

Figura III-3. Geles de poliacrilamida al 6 % para los *SSR* (*Simple Sequence Repeat*): *SSR295*, *SSR034*, *SSR038*, *SSR327* y *SSR220060* en las familia BC_1S_1 (IX-14).



pb: pares de bases, CC: individuos homocigotas para el alelo de CAI, CP: individuos heterocigotas, PP: individuos homocigotas para el alelo de LA722.

La segregación mendeliana de los *SSR* que fueron heterocigotas en la planta BC₁ IX-14 fue probada y se muestra en la Tabla III-IX.

Tabla III-IX. Segregación de los *SSR* (*Simple Sequence Repeat*) probados en la familia IX-14.

Familia BC ₁ S ₁ (IX-14)					
Marcador	N	n CC	n CP	n PP	X ²
SSR063	45	11	21	13	0,38 ns
SSR220060	45	8	27	10	1,98 ns
SSR327	45	13	23	9	0,73 ns
SSR038	45	12	20	13	0,60 ns
SSR344	43	8	23	12	0,95 ns
SSR034	47	6	30	11	4,66 ns
SSR295	46	11	24	11	0,09 ns

N: número total de individuos, **n CC:** número de individuos homocigotas para el alelo de Caimanta (CAI) de *S. lycopersicum*, **n CP:** número de individuos heterocigotas, **n PP:** número de individuos homocigotas para el alelo de LA722 de *S. pimpinellifolium*, **X²:** valor de chi-cuadrado, **ns:** no significativo.

Todos los marcadores probados en la familia IX-14 ajustaron a la segregación mendeliana (1:2:1) esperada.

En la Tabla III-X se muestran las asociaciones detectadas, indicando además las medias y los grados de dominancia para cada *QTL*. También se indican la fracción de la variación fenotípica explicada por el *QTL* y la probabilidad asociada.

Tabla III-X. Asociaciones de *SSR* (*Simple Sequence Repeat*) a caracteres fenotípicos en la familia IX-14.

Familia BC ₁ S ₁ (IX-14)								
Carácter	Marcador	Cr	Media CC	Media CP	Media PP	R ²	p	d/a
Peso (g)	SSR 295	2	29,89 ± 2,18b	28,00 ± 1,41b	22,35 ± 2,23a	0,14	0,0391	0,50
SS (°Brix)	SSR 295	2	5,81 ± 0,11a	6,14 ± 0,19ab	6,85 ± 0,72b	0,14	0,0429	-0,37
SS (°Brix)	SSR 327	8	6,93 ± 0,44b	5,98 ± 0,15a	5,56 ± 0,21a	0,27	0,0013	-0,39
At (g)	SSR 327	8	0,52 ± 0,04b	0,44 ± 0,02a	0,37 ± 0,03a	0,23	0,0044	-0,07
a/b	SSR 038	8	1,29 ± 0,03b	1,20 ± 0,03a	1,31 ± 0,02b	0,24	0,0028	sc
At (g)	SSR 038	8	0,52 ± 0,04b	0,40 ± 0,02a	0,43 ± 0,04a	0,26	0,0020	-1,67
SS (°Brix)	SSR 344	8	5,37 ± 0,36a	6,47 ± 0,27b	6,26 ± 0,34ab	0,16	0,0276	sc
At (g)	SSR 344	8	0,38 ± 0,06a	0,46 ± 0,03ab	0,51 ± 0,03b	0,15	0,0389	0,23
At (g)	SSR 034	10	0,36 ± 0,05a	0,44 ± 0,02a	0,55 ± 0,04b	0,24	0,0021	-0,16
Peso (g)	SSR220060	11	29,34 ± 2,72b	28,25 ± 1,36b	21,21 ± 2,48a	0,16	0,0280	0,73
SS (°Brix)	SSR220060	11	6,44 ± 0,39ab	5,80 ± 0,17a	6,46 ± 0,30b	0,18	0,0168	sc

Cr: cromosoma, **Media CC**: valor medio del carácter para individuos homocigotas para el alelo de Caimanta (CAI) de *S. lycopersicum*, **Media CP**: valor medio del carácter para individuos heterocigotas, **Media PP**: valor medio del carácter para individuos homocigotas para el alelo de LA722 de *S. pimpinellifolium*, **R²**: fracción de la variación fenotípica explicada, **p**: probabilidad asociada, **d/a**: grados de dominancia, **SS**: contenido en sólidos solubles, **At**: acidez titulable, **a/b**: índice de color, **sc**: sin cálculo. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Once *QTLs* fueron detectados a partir del análisis de asociación con un significado menor al 5 %, cinco de ellos (45 %) fueron significativos al 1 % y ningún marcador mostró asociación con una probabilidad menor al 0,1 %. El porcentaje de variación fenotípica explicada por ellos varió entre 14 y 27 %. Un mismo marcador estuvo asociado a más de un carácter, esto se observó en todos los marcadores a excepción del *SSR034* asociado únicamente a *At*.

Se encontraron cuatro *QTLs* para el contenido en sólidos solubles y para acidez titulable. Dos de los *QTLs* encontrados para *SS* estuvieron localizados en el cromosoma 8 y los restantes en los cromosomas 2 y 11, para dos de ellos (*SSR295* (Cr2) y *SSR344* (Cr8)) el alelo del padre silvestre aumento el valor medio del carácter, mientras que se observó un efecto contrario para el marcador *SSR327* del cromosoma 8.

Para acidez titulable, los alelos aportados por el progenitor silvestre disminuyeron la media del carácter en dos *QTLs* (*SSR327* (Cr8) y *SSR038* (Cr8)), mientras que los otros dos mostraron un efecto contrario.

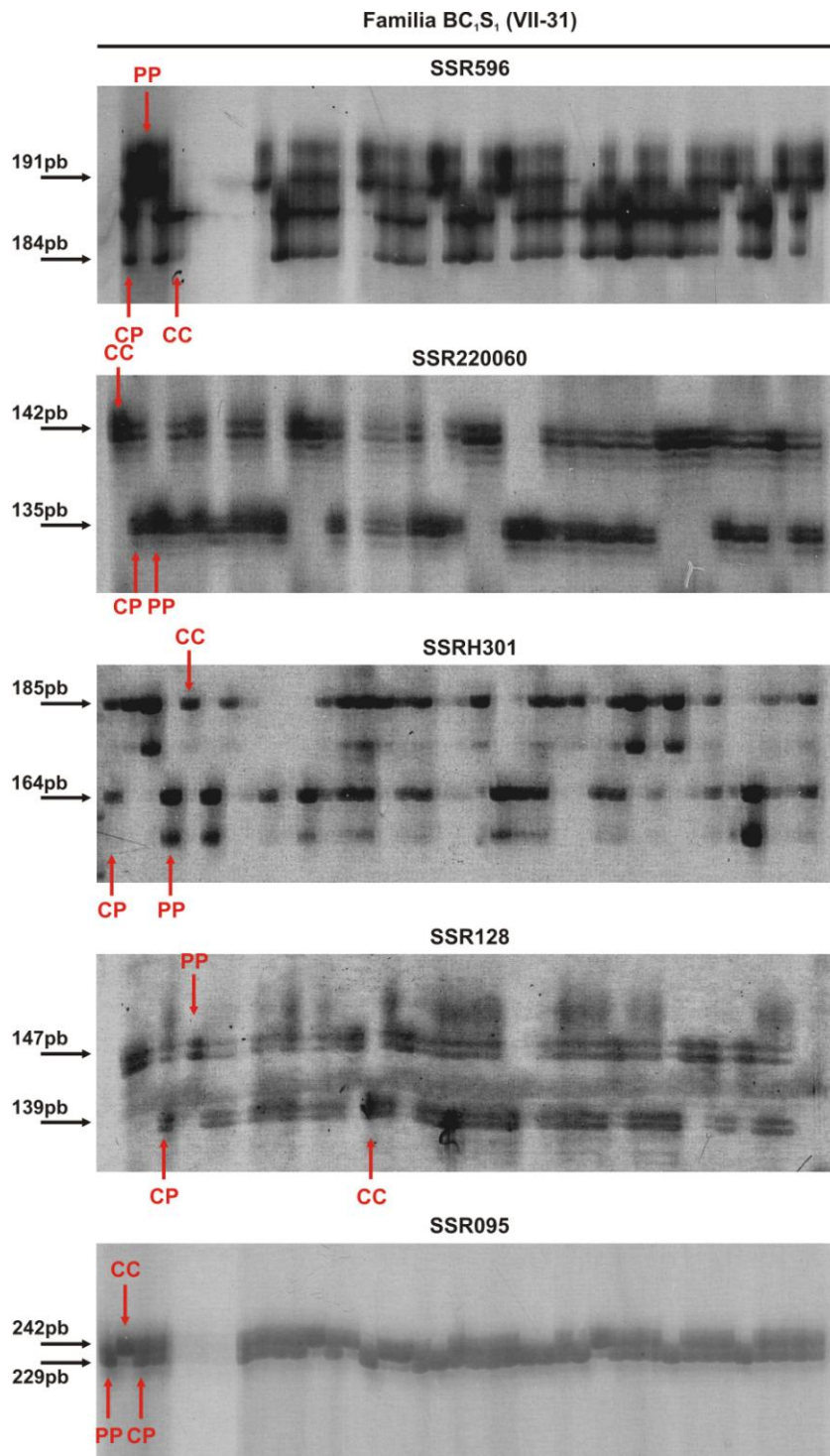
Los alelos de origen silvestre de los dos marcadores que presentaron asociación con el peso de los frutos, disminuyeron la media del carácter, estuvieron localizados en el cromosoma 2 y 11 y explicaron el 14 y 16 %, respectivamente de la variación fenotípica observada.

Por último el índice de color fue explicado por un único *QTL* ubicado en el cromosoma 8, explicando el 24 % de la variación fenotípica y la acción combinada de los alelos de ambos progenitores disminuyeron el valor medio.

III.B.3. Familia BC₁S₁ (VII-31)

La Figura III-4 muestra los geles de poliacrilamida al 6 % para cinco de los *SSR* amplificados en la progenie VII-31. Con flechas naranjas se indican las distintas clases genotípicas en la generación segregante.

Figura III-4. Geles de poliacrilamida al 6 % para los *SSR* (*Simple Sequence Repeat*): *SSR596*, *SSR220060*, *SSRH301*, *SSR128* y *SSR095* en la familia BC_1S_1 (VII-31).



pb: pares de bases, CC: individuos homocigotas para el alelo de CAI, CP: individuos heterocigotas, PP: individuos homocigotas para el alelo de LA722.

La segregación mendeliana de los *SSR* que fueron heterocigotas en la planta BC₁ VII-31 fue probada y se muestra en la Tabla III-XI.

Tabla III-XI. Segregación de los *SSR* (*Simple Sequence Repeat*) probados en la familia VII-31.

Marcador	Familia BC ₁ S ₁ (VII-31)				X ²
	N	n CC	n CP	n PP	
SSR038	37	9	22	6	1,81 ns
SSR286	34	4	21	9	3,35 ns
SSR128	37	10	16	11	0,73 ns
SSR095	37	6	23	8	2,41 ns
SSR318	35	9	14	12	1,91 ns
SSR596	36	7	20	9	0,67 ns
SSR327	37	12	15	10	1,54 ns
SSR220060	35	9	20	6	1,23 ns
SSR211044	37	10	13	14	4,14 ns
SSR063	37	9	18	10	0,08 ns
SSR080	34	6	18	10	1,06 ns
SSR344	32	12	16	4	4,00 ns
SSRH301	36	9	19	8	0,17 ns
SSR045	37	8	16	13	2,03 ns
SSR276	37	6	20	11	1,59 ns

N: número total de individuos, **n CC:** número de individuos homocigotas para el alelo de Caimanta (CAI) de *S. lycopersicum*, **n CP:** número de individuos heterocigotas, **n PP:** número de individuos homocigotas para el alelo de LA722 de *S. pimpinellifolium*, **X²:** valor de chi-cuadrado, **ns:** no significativo.

Todos los marcadores probados en la familia VII-31 ajustaron a la segregación mendeliana (1:2:1) esperada.

En la Tabla III-XII se muestran las asociaciones detectadas, indicando además las medias y los grados de dominancia para cada *QTL*. También se indican la fracción de la variación fenotípica explicada por el *QTL* y la probabilidad asociada.

Tabla III-XII. Asociaciones de *SSR* (*Simple Sequence Repeat*) a caracteres fenotípicos en la familia VII-31.

Familia BC ₁ S ₁ (VII-31)								
Carácter	Marcador	Cr	Media CC	Media CP	Media PP	R ²	p	d/a
Forma	SSR 128	6	0,98 ± 0,02b	0,94 ± 0,01a	0,93 ± 0,01a	0,17	0,0424	-0,60
Forma	SSR 286	7	1,00 ± 0,04b	0,96 ± 0,01b	0,91 ± 0,01a	0,31	0,0033	0,11
SS (°Brix)	SSR 286	7	7,92 ± 0,81b	6,62 ± 0,26a	6,47 ± 0,32a	0,18	0,0449	-0,79
a/b	SSR 038	8	1,14 ± 0,04b	0,74 ± 0,16ab	0,21 ± 0,43a	0,20	0,0229	0,14
Lv (días)	SSR 327	8	12,00 ± 1,13a	12,47 ± 0,97a	15,70 ± 0,58b	0,18	0,0331	-0,75
Diámetro (cm)	SSR 063	8	3,18 ± 0,15b	2,98 ± 0,11a	2,68 ± 0,11a	0,17	0,0451	0,20
a/b	SSR 063	8	1,13 ± 0,04b	0,78 ± 0,17ab	0,42 ± 0,42a	0,19	0,0303	0,01
Altura (cm)	SSR 220060	11	3,02 ± 0,12b	2,72 ± 0,09a	2,55 ± 0,07a	0,18	0,0409	-0,28
SS (°Brix)	SSR 080	11	6,38 ± 0,29a	6,43 ± 0,23a	7,54 ± 0,48b	0,22	0,0182	-0,91
Altura (cm)	SSR H301	12	2,78 ± 0,16ab	2,91 ± 0,08b	2,48 ± 0,06a	0,20	0,0227	sc

Cr: cromosoma, **Media CC**: valor medio del carácter para individuos homocigotas para el alelo de Caimanta (CAI) de *S. lycopersicum*, **Media CP**: valor medio del carácter para individuos heterocigotas, **Media PP**: valor medio del carácter para individuos homocigotas para el alelo de LA722 de *S. pimpinellifolium*, **R²**: fracción de la variación fenotípica explicada, **p**: probabilidad asociada, **d/a**: grados de dominancia, **SS**: contenido en sólidos solubles, **a/b**: índice de color, **Lv**: vida poscosecha, **sc**: sin cálculo. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Ocho SSR permitieron encontrar 10 QTLs para algunos de los caracteres fenotípicos estudiados con un nivel de significación menor al 5 % y de ellos sólo uno (10 %) lo fue al 1 %. Los SSR286 y SSR063 presentaron asociación con más de un carácter.

Para la variable forma de los frutos se encontraron dos QTLs, localizados en los cromosomas 6 y 7 que explican el 17 % y 31 %, respectivamente de la variación fenotípica observada. El alelo del progenitor cultivado aumenta el valor medio del carácter en ambos casos.

Dos QTLs ubicados en los cromosomas 7 y 11 que explicaron el 18 % y 22 % respectivamente de la variación fenotípica fueron encontrados para el contenido en sólidos solubles. El alelo silvestre mostró efectos opuestos en ambos QTLs siendo el ubicado en el cromosoma 7 el que disminuyó el valor medio.

El índice de color a/b fue explicado por dos QTLs que se ubicaron en el cromosoma 8. El alelo silvestre tuvo el mismo efecto en los dos, disminuyendo el valor medio, y ambos explicaron cerca del 20 % de la variación fenotípica.

Para el diámetro de los frutos se encontró un QTL ubicado en el cromosoma 8, donde el alelo cultivado aumentó la media y dicho QTL explicó el 17 % de la variación fenotípica.

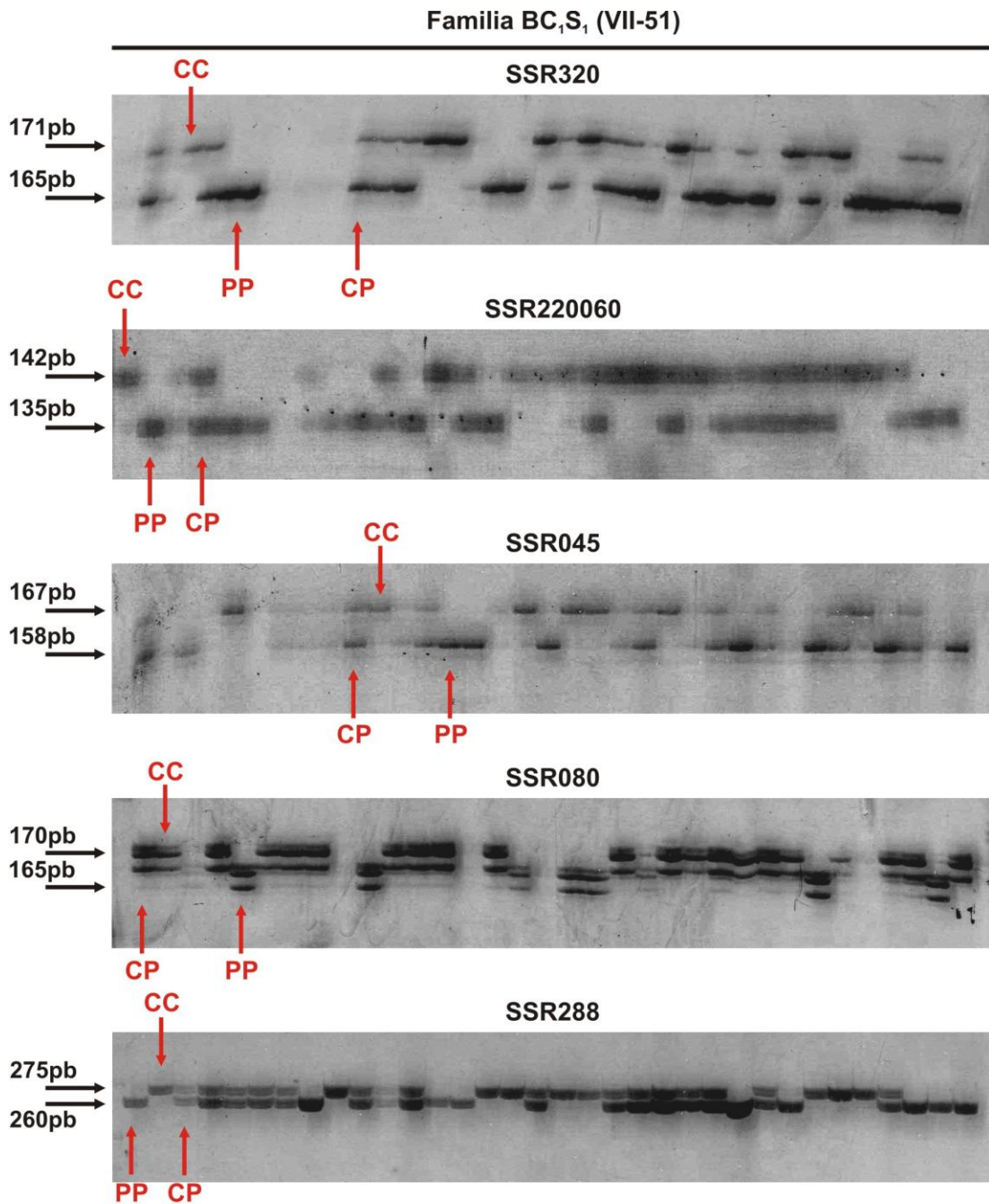
Otro carácter relacionado con el tamaño de los frutos es la altura, para la cual se detectaron dos marcadores (SSR220060 y SSRH301) localizados en los cromosomas 11 y 12 respectivamente. El efecto del alelo aportado por el padre cultivado fue el mismo en los dos, aumentando el valor medio de la altura y ambos explicaron alrededor del 20 % de la variabilidad.

Se encontró un último marcador (*SSR327*) asociado a la vida poscosecha que se ubica en el cromosoma 8. Su presencia explicó el 18 % de la variación fenotípica observada y el alelo de origen cultivado disminuyó la media del carácter.

III.B.4. Familia BC₁S₁ (VII-51)

La Figura III-5 muestra los geles de poliacrilamida al 6 % para cinco de los SSR amplificados en la progenie VII-51. Con flechas naranjas se indican las distintas clases genotípicas en la generación segregante.

Figura III-5. Geles de poliacrilamida al 6 % para los *SSR* (*Simple Sequence Repeat*): *SSR320*, *SSR220060*, *SSR045*, *SSR080* y *SSR288* en la familia BC_1S_1 (VII-51).



pb: pares de bases, CC: individuos homocigotas para el alelo de CAI, CP: individuos heterocigotas, PP: individuos homocigotas para el alelo de LA722.

La segregación mendeliana de los *SSR* que fueron heterocigotas en la planta BC₁ VII-51 fue probada y se muestra en la Tabla III-XIII.

Tabla III-XIII. Segregación de los *SSR* (*Simple Sequence Repeat*) probados en la familia VII-51.

Familia BC ₁ S ₁ (VII-51)					
Marcador	N	n CC	n CP	n PP	χ^2
SSR128	31	3	20	8	4,23 ns
SSR211044	33	7	18	8	0,33 ns
SSR034	27	7	12	8	0,41 ns
SSR320	33	8	14	11	1,30 ns
SSR080	28	7	15	6	0,21 ns
SSR288	33	8	16	9	0,09 ns
SSR045	29	7	13	9	0,59 ns
SSR014	30	5	15	10	1,67 ns
SSR596	33	9	15	9	0,27 ns
SSR601	31	7	15	9	0,29 ns
SSR220060	32	10	13	9	1,19 ns

N: número total de individuos, **n CC:** número de individuos homocigotas para el alelo de Caimanta (CAI) de *S. lycopersicum*, **n CP:** número de individuos heterocigotas, **n PP:** número de individuos homocigotas para el alelo de LA722 de *S. pimpinellifolium*, **χ^2 :** valor de chi-cuadrado, **ns:** no significativo.

Todos los marcadores mostraron segregación mendeliana (1:2:1).

En la Tabla III-XIV se muestran las asociaciones detectadas, indicando además las medias y los grados de dominancia para cada *QTL*. También se indican la fracción de la variación fenotípica explicada por el *QTL* y la probabilidad asociada.

Tabla III-XIV. Asociaciones de *SSR* (*Simple Sequence Repeat*) a caracteres fenotípicos en la familia VII-51.

Familia BC ₁ S ₁ (VII-51)								
Carácter	Marcador	Cr	Media CC	Media CP	Media PP	R ²	p	d/a
SS (°Brix)	SSR 288	1	6,47 ± 0,16a	6,65 ± 0,21a	7,78 ± 0,50b	0,26	0,0101	-0,73
pH	SSR 288	1	4,23 ± 0,06a	4,34 ± 0,04ab	4,41 ± 0,03b	0,19	0,0391	0,22
Diámetro (cm)	SSR 045	7	3,06 ± 0,20a	3,80 ± 0,09b	3,27 ± 0,08a	0,47	0,0003	sc
Altura (cm)	SSR 045	7	2,69 ± 0,14a	3,06 ± 0,09b	2,66 ± 0,07a	0,30	0,0097	sc
Peso (g)	SSR 045	7	16,74 ± 2,71a	27,54 ± 2,11b	17,56 ± 1,28a	0,41	0,0011	sc
Forma	SSR 045	7	0,89 ± 0,02b	0,80 ± 0,01a	0,82 ± 0,02a	0,38	0,0019	-1,57
Diámetro (cm)	SSR 034	10	4,03 ± 0,10b	3,38 ± 0,15a	3,34 ± 0,11a	0,36	0,0044	-0,88
Altura (cm)	SSR 034	10	3,28 ± 0,05c	2,86 ± 0,11b	2,59 ± 0,07a	0,48	0,0004	-0,22
Peso (g)	SSR 034	10	31,91 ± 2,28b	21,41 ± 2,51a	18,02 ± 1,90a	0,38	0,0029	-0,51
Forma	SSR 034	10	0,82 ± 0,01ab	0,84 ± 0,02b	0,78 ± 0,02a	0,22	0,0495	sc
SS (°Brix)	SSR 034	10	6,01 ± 0,27a	7,57 ± 0,37b	7,00 ± 0,38ab	0,31	0,0125	sc
Altura (cm)	SSR 596	10	3,12 ± 0,13b	2,81 ± 0,08a	2,75 ± 0,10a	0,18	0,0476	-0,68
Lv (días)	SSR 596	10	10,19 ± 0,94a	10,01 ± 0,84a	13,27 ± 1,10b	0,18	0,0480	-1,12
Lv (días)	SSR 080	11	10,52 ± 1,10ab	12,53 ± 0,92b	8,72 ± 0,70a	0,22	0,0483	sc

Cr: cromosoma, **Media CC**: valor medio del carácter para individuos homocigotas para el alelo de Caimanta (CAI) de *S. lycopersicum*, **Media CP**: valor medio del carácter para individuos heterocigotas, **Media PP**: valor medio del carácter para individuos homocigotas para el alelo de LA722 de *S. pimpinellifolium*, **R²**: fracción de la variación fenotípica explicada, **p**: probabilidad asociada, **d/a**: grados de dominancia, **SS**: contenido en sólidos solubles, **Lv**: vida poscosecha, **sc**: sin cálculo. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Con gris se destacan las asociaciones detectadas con $p < 0,001$.

Seis *SSR* permitieron detectar un total de 14 *QTLs* con significado al 5 % de los cuales cinco (35,7 %) fueron significativos al 1 % y dos (14,3 %) al 0,1 % (indicados en gris). La variación fenotípica explicada por los *QTLs* estuvo en un rango de 18 al 48 %. Varios marcadores estuvieron asociados a más de un carácter.

La altura de los frutos fue el carácter con más *QTLs* encontrados (3) y uno de ellos, que se ubicó en el cromosoma 10 fue significativo al 0,1 % ($p = 0,0004$) y mostró el mayor porcentaje de variación fenotípica explicada (48 %). El alelo del progenitor cultivado incrementó el valor medio de la altura. Los dos *QTLs* restantes encontrados para altura se localizaron en los cromosoma 7 y 10. Los efectos del alelo cultivado fueron similares al anterior para el *QTL* localizado en el Cr10 mientras que el localizado en el Cr7 no presentó diferencias entre los individuos homocigotas para los alelos de CAI y LA722.

El diámetro y el peso fueron explicados por dos *QTLs* cada uno. Los marcadores *SSR045* y *SSR034* de los cromosoma 7 y 10 respectivamente presentaron asociación tanto con el diámetro como con el peso de los frutos. El alelo silvestre y cultivado del marcador *SSR045* no mostraron diferencias en su contribución al fenotipo, dado que el valor medio del diámetro fue similar en individuos homocigotas para dicho *locus*. Además este *QTL* explicó el 47 % de la variación fenotípica y estuvo asociado con una probabilidad altamente significativa ($p = 0,0003$). Los restantes *QTLs* para diámetro y peso tuvieron un comportamiento esperado de acuerdo al fenotipo de los progenitores, dado que aumentaron la media excepto el *SSR045* para el cual las plantas homocigotas para alelos de CAI y LA722 no mostraron diferencias significativas entre sus medias.

Dos *QTLs* fueron identificados para el índice forma, uno localizado en el cromosoma 7 y otro en el 10, explicando el 38 % y 22 % respectivamente de la variación fenotípica. El efecto del alelo cultivado fue contrario al esperado dado que incrementó los valores medios.

En el caso del contenido en sólidos solubles dos fueron los *QTLs* encontrados que explicaron el 26 % y 31 % de la variación fenotípica y se localizaron en los cromosomas 1 y 10 respectivamente. Los alelos de LA722 estuvieron asociados con un aumento en SS.

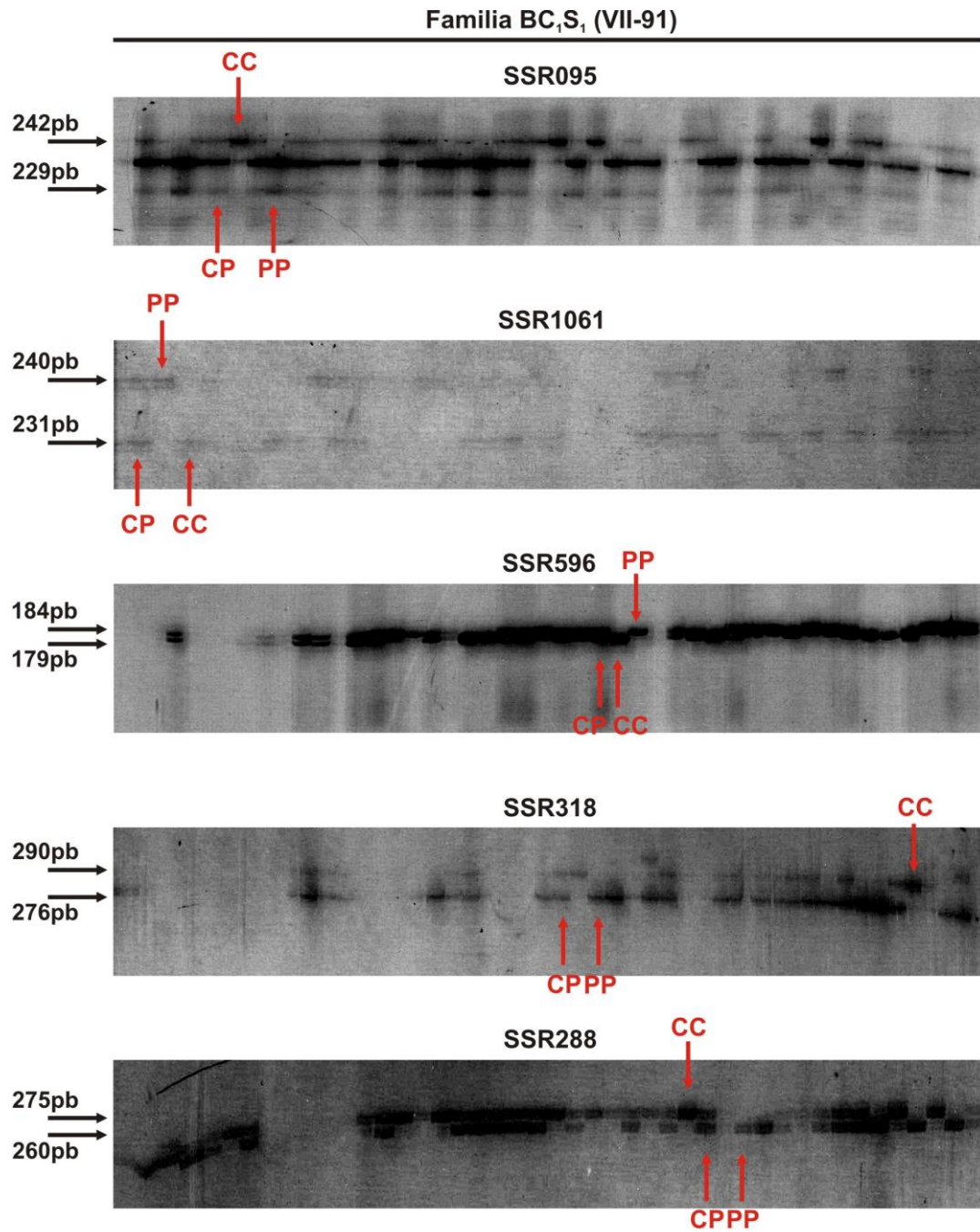
El 19 % de la variación fenotípica observada para el pH fue atribuida a un *QTL* encontrado en el cromosoma 1 cuyo alelo de origen silvestre aumenta el valor medio del carácter.

Finalmente, se detectaron dos *QTL* que explicaron el 18 % y 22 % de la variación fenotípica observada para la vida poscosecha de los frutos y se localizaron en los cromosomas 10 y 11, respectivamente. El primero, en concordancia con lo esperado, el alelo de LA722 aumentó el valor medio del carácter, mientras que en el segundo, los individuos heterocigotas tuvieron mayores valores medios de Lv.

III.B.5. Familia BC₁S₁ (VII-91)

La Figura III-6 muestra los geles de poliacrilamida al 6 % para cinco de los *SSR* amplificados en la progenie VII-91. Con flechas naranjas se indican las distintas clases genotípicas en la generación segregante.

Figura III-6. Geles de poliacrilamida al 6 % para los *SSR* (*Simple Sequence Repeat*): *SSR095*, *SSR1061*, *SSR596*, *SSR318* y *SSR288* en la familia BC1S1 (VII-91).



pb: pares de bases, CC: individuos homocigotas para el alelo de CAI, CP: individuos heterocigotas, PP: individuos homocigotas para el alelo de LA722.

La segregación mendeliana de los *SSR* que fueron heterocigotas y que lograron ser amplificados en la planta BC₁ VII-91 fue probada y se muestra en la Tabla III-XV.

Tabla III-XV. Segregación de los *SSR* (*Simple Sequence Repeat*) probados en la familia VII-91.

Marcador	Familia BC ₁ S ₁ (VII-91)				
	N	n CC	n CP	n PP	X ²
SSR034	41	8	23	10	0,80 ns
SSR095	41	9	20	12	0,46 ns
SSR070	34	5	20	9	2,00 ns
SSR220060	35	8	17	10	0,26 ns
SSR596	36	6	21	9	1,50 ns
SSR601	24	2	11	11	6,92 *
SSR211044	30	10	14	6	1,20 ns
SSR162	36	6	25	5	5,50 ns
SSR1061	31	12	13	6	3,13 ns
SSR288	41	12	20	9	0,46 ns
SSR318	33	3	19	11	4,74 ns
SSR128	31	12	15	4	4,16 ns

N: número total de individuos, **n CC:** número de individuos homocigotas para el alelo de Caimanta (CAI) de *S. lycopersicum*, **n CP:** número de individuos heterocigotas, **n PP:** número de individuos homocigotas para el alelo de LA722 de *S. pimpinellifolium*, **X²:** valor de chi-cuadrado, **ns:** no significativo, *p < 0,05. En gris se indican los *SSR* que no segregaron en forma mendeliana.

El *SSR* resaltado en gris no ajustó a la segregación mendeliana (1:2:1) esperada. Un sólo *SSR* (7,6 %) no ajustó, mientras que el resto fueron utilizados para probar la asociación con los caracteres fenotípicos de calidad de fruto. En la Tabla III-XVI se muestran las asociaciones detectadas, indicando además las medias y los grados de dominancia para cada *QTL*. También se indican la fracción de la variación fenotípica explicada por el *QTL* y la probabilidad asociada.

Tabla III-XVI. Asociaciones de *SSR* (*Simple Sequence Repeat*) a caracteres fenotípicos en la familia VII-91.

Familia BC ₁ S ₁ (VII-91)								
Carácter	Marcador		Media CC	Media CP	Media PP	R ²	p	d/a
Diámetro (cm)	SSR 095	1	3,24 ± 0,17b	2,69 ± 0,09a	2,56 ± 0,11a	0,29	0,0017	-0,62
Altura (cm)	SSR 095	1	2,83 ± 0,15b	2,48 ± 0,09a	2,27 ± 0,11a	0,21	0,0110	-0,25
Peso (g)	SSR 095	1	19,4 ± 2,88b	12,68 ± 1,17a	10,85 ± 1,29a	0,23	0,0062	-0,57
SS (°Brix)	SSR 095	1	8,01 ± 0,66b	6,80 ± 0,21a	7,19 ± 0,48ab	0,15	0,0478	sc
Lv (días)	SSR 288	1	16,27 ± 1,58b	12,82 ± 0,91a	10,42 ± 0,88a	0,21	0,0115	-0,18
a/b	SSR 288	1	0,51 ± 0,29a	1,09 ± 0,11b	1,24 ± 0,06b	0,22	0,0085	0,59
Firmeza	SSR 288	1	60,43 ± 4,32c	53,58 ± 1,27b	46,18 ± 1,78a	0,32	0,0007	0,04
At (g)	SSR 162	5	0,60 ± 0,12ab	0,55 ± 0,03a	0,80 ± 0,06b	0,24	0,0113	sc
Firmeza	SSR 128	6	48,87 ± 2,29 a	55,38 ± 1,79b	51,94 ± 1,19ab	0,25	0,0163	sc
Lv (días)	SSR 034	10	10,47 ± 0,70a	14,79 ± 1,06b	11,23 ± 1,11a	0,18	0,0228	sc
Firmeza	SSR 034	10	53,4 ± 2,47ab	56,75 ± 2,25b	47,55 ± 1,93a	0,18	0,0096	sc
SS (°Brix)	SSR 034	10	7,02 ± 0,28a	7,02 ± 0,28a	8,13 ± 0,62b	0,15	0,0456	-1,00
Altura (cm)	SSR 1061	11	2,62 ± 0,12b	2,59 ± 0,11b	2,11 ± 0,15a	0,21	0,0340	0,88
Forma	SSR 1061	11	0,89 ± 0,01a	0,94 ± 0,01b	0,86 ± 0,02a	0,40	0,0008	sc
Firmeza	SSR 1061	11	60,89 ± 4,98b	52,90 ± 2,00a	50,05 ± 3,23a	0,21	0,0363	-0,47

Cr: cromosoma, **Media CC**: valor medio del carácter para individuos homocigotas para el alelo de Caimanta (CAI) de *S. lycopersicum*, **Media CP**: valor medio del carácter para individuos heterocigotas, **Media PP**: valor medio del carácter para individuos homocigotas para el alelo de LA722 de *S. pimpinellifolium*, **R²**: fracción de la variación fenotípica explicada, **p**: probabilidad asociada, **d/a**: grados de dominancia, **SS**: contenido en sólidos solubles, **Lv**: vida poscosecha, **a/b**: índice de color, **At**: acidez titulable, **sc**: sin cálculo. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Con gris se destacan las asociaciones detectadas con $p < 0,001$.

El análisis de asociación en la familia BC₁S₁ (VII-91), permitió detectar 15 *QTLs* con un nivel de significancia menor al 5 %, de los cuales cuatro (27 %) fueron significativos al 1 % y dos (13 %) lo fueron al 0,1 % (indicados en gris). Varios marcadores estuvieron asociados a más de un carácter fenotípico. El porcentaje de variación fenotípica explicada por los *QTLs* varió entre 15 % y 40 %.

La firmeza de los frutos presentó cuatro *SSR* asociados (*SSR288* (Cr1), *SSR128* (Cr6), *SSR034* (Cr10) y *SSR1061* (Cr11)) que explicaron entre el 18 y 32 % de la variación fenotípica observada. En dos de ellos (*SSR288* y *SSR1061*) los alelos aportados por el progenitor cultivado aumentaron la media del carácter de manera contraria a lo esperado según los fenotipos de los progenitores. En los *QTLs* restantes no hubo diferencias significativas entre los genotipos homocigotas.

Para la altura de los frutos se encontraron dos *QTLs* localizados en los cromosomas 1 y 11, donde el efecto del alelo silvestre disminuyó el valor medio y cada uno explicó el 21 % de la variación fenotípica.

Dos *QTL* fueron detectados para el contenido en sólidos solubles. Estuvieron ubicados en los cromosoma 1 y 10 y explicaron el 15 % de la variación fenotípica cada uno. El alelo silvestre mostró efectos opuestos en cada uno de ellos, disminuyendo la media para el *QTL* ubicado en el Cr1.

La vida poscosecha de los frutos pudo ser explicada por dos *QTLs* localizados en los cromosomas 1 y 10. Para el *QTL* del Cr10 no se observaron diferencias significativas en la media de los individuos homocigotas, mientras

que para el *QTL* del Cr1 los alelos cultivados tuvieron un efecto opuesto a lo esperado, incrementando significativamente la media del carácter.

El *SSR095* (Cr1) estuvo asociado a diámetro y peso presentando el mismo efecto sobre la media del alelo CAI que incrementó el valor de ambos caracteres en los individuos homocigotas. El *QTL* explicó el 29 % de la variación fenotípica del diámetro y el 23 % del peso de los frutos.

El índice de color a/b mostró un único marcador (*SSR288*, Cr1) asociado, cuyo alelo de LA722 aumentó significativamente valor medio del carácter.

El *QTL* encontrado para el índice de forma de los frutos no sólo fue quien más explicó la variación fenotípica de un carácter (40 %) sino que también fue uno de los más significativamente asociado ($p = 0,0008$).

Finalmente, un único *QTL* fue detectado para At ubicado en el cromosoma 5 que explicó el 24 % de la variación fenotípica y en el cual, el alelo silvestre, incrementó los valores medios de acidez de los frutos en concordancia con el fenotipo observado en los progenitores.

En el análisis de asociación de los marcadores *SSR* con caracteres fenotípicos en las cinco progenies BC₁S₁ se encontraron seis nuevos *QTLs* dos para pH y uno para altura, diámetro, forma y firmeza del fruto con probabilidad menor a 0,1% (Tabla III-XVII).

Tabla III-XVII. QTLs detectados en progenies BC₁S₁ con probabilidad menor a 0,1 %.

Carácter	Marcador	Cr	Media CC	Media CP	Media PP	R ²	p	d/a	Flia. BC ₁ S ₁
pH	SSR 598	2	4,25 ± 0,05a	4,52 ± 0,03b	4,50 ± 0,08b	0,38	0,0001	1,16	III-21
pH	SSR 032	2	4,27 ± 0,05a	4,52 ± 0,03b	4,50 ± 0,08b	0,35	0,0002	1,17	III-21
Diámetro (cm)	SSR 045	7	3,06 ± 0,20a	3,80 ± 0,09b	3,27 ± 0,08a	0,47	0,0003	sc	VII-51
Altura (cm)	SSR 034	10	3,28 ± 0,05c	2,86 ± 0,11a	2,59 ± 0,07b	0,48	0,0004	-0,22	VII-51
Firmeza	SSR 288	1	60,43 ± 4,32c	53,58 ± 1,27b	46,18 ± 1,78a	0,32	0,0007	0,04	VII-91
Forma	SSR 1061	11	0,89 ± 0,01a	0,94 ± 0,01b	0,86 ± 0,02a	0,40	0,0008	sc	VII-91

Cr: cromosoma, **Media CC**: valor medio del carácter para individuos homocigotas para el alelo de Caimanta (CAI) de *S. lycopersicum*, **Media CP**: valor medio del carácter para individuos heterocigotas, **Media PP**: valor medio del carácter para individuos homocigotas para el alelo de LA722 de *S. pimpinellifolium*, **R²**: fracción de la variación fenotípica explicada, **p**: probabilidad asociada, **d/a**: grados de dominancia, **sc**: sin cálculo. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Con gris se destacan las asociaciones detectadas con $p < 0,001$.

En la última columna de la Tabla III-XVII se indica la familia BC₁S₁ en la cual fue detectado el *QTL*. El porcentaje de variación fenotípica explicada por ellos varió entre 32 % y 48 %. Para el *QTL* encontrado para firmeza el alelo aportado por el progenitor cultivado tuvo un efecto opuesto al esperado según los fenotipos de CAI y LA722, mientras que no se observaron diferencias significativas entre los individuos homocigotas para alelos de CAI y LA722 en los *QTLs* detectados para diámetro y forma.

El ANOVA a dos criterios de clasificación para aquellos caracteres con más de un marcador asociado en cada una de las familias BC₁S₁, mostró evidencias de epistasis entre los *SSR295* (Cr2) y *SSR327* (Cr8), ambos asociados al contenido en sólidos solubles en la familia BC₁S₁ (IX-14), y que explicaron en conjunto el 63 % de la variación fenotípica observada. De las 44 interacciones probadas para los *QTLs* encontrados, apenas el 2,27 % evidenció interacciones significativas al 5 %.

La Tabla III-XVIII muestra el cuadro de análisis de la variancia para aquellas interacciones que resultaron significativas. Los efectos individuales de los marcadores permanecieron significativos a pesar de estar afectados por la epistasis detectada.

Tabla III-XVIII. Cuadro de análisis de la variancia a dos criterios de clasificación para el contenido en sólidos solubles en la familia BC₁S₁ (IX-14).

Carácter	N	R ²
SS	30	0,63

F.V.	G.L.	CM	F	p
SSR 295	2	1,92	4,03	0,0323
SSR 327	2	3,82	8,01	0,0024
SSR 295xSSR 327	3	2,08	4,36	0,0148
Error	22	0,48		

N: número de plantas, R²: coeficiente de determinación del modelo, SS: contenido en sólidos solubles, F.V.: Fuente de variación, G.L.: Grados de libertad, CM: cuadrados medios, F: valor F de Snedecor, p: probabilidad asociada. En gris se destaca la probabilidad asociada para la interacción de los SSR.

III.C. Validación de *QTLs*

La comparación entre *QTLs* detectados en la generación BC_1 y las cinco familias BC_1S_1 permitió la validación de seis *QTLs*. Se validaron marcadores asociados a altura, forma, peso, porcentaje de reflectancia (L), pH y contenido en sólidos solubles de los frutos, los cuales se muestran en las primeras filas de la Tabla III-XIX, también se indica la generación con la cual cada *QTL* fue validado.

La comparación entre progenies de plantas BC_1 autofecundadas permitió detectar dos marcadores (*SSR034* y *SSR038*) asociados los mismos carácter en al menos dos familias los cuales se indican en la Tabla III-XIX. Estos marcadores presentaron asociación con los siguientes caracteres de calidad: índice de color a/b, acidez titulable (At) y contenido en sólidos solubles (SS).

Únicamente los marcadores *SSR288* asociado a pH, *SSR038* asociado a a/b y *SSR034* asociado a forma, no presentaron el mismo efecto en las generaciones donde se detectaron, aumentando o disminuyendo la media del carácter para aquellos individuos que portaron el alelo silvestre de dicho *QTL*.

En la Tabla III-XIX se presentan los *QTLs* validados entre progenies BC_1S_1 y entre estas últimas y la generación BC_1 , como así también el efecto sobre la media del carácter que tiene el alelo silvestre.

Tabla III-XIX. QTLs validados entre BC₁ y progenies BC₁S₁ y entre familias BC₁S₁. Efecto sobre el fenotipo del alelo del progenitor LA722 de *S. pimpinellifolium*.

Carácter	Marcador	Cr	Generación	p	Efecto alelo LA722
Altura	SSR 596	10	BC ₁	0,0010	disminuye
Altura	SSR 596	10	BC ₁ S ₁ (VII-51)	0,0476	disminuye
Forma	SSR 034	10	BC ₁	0,0007	disminuye
Forma	SSR 034	10	BC ₁ S ₁ (VII-51)	0,0495	**
Peso	SSR 220060	11	BC ₁	0,0303	disminuye
Peso	SSR 220060	11	BC ₁ S ₁ (IX-14)	0,0280	disminuye
L	SSR 211044	6	BC ₁	0,0344	aumenta
L	SSR 211044	6	BC ₁ S ₁ (VII-51)	0,0556	aumenta
pH	SSR 288	1	BC ₁	0,0240	disminuye
pH	SSR 288	1	BC ₁ S ₁ (VII-51)	0,0391	aumenta
SS	SSR 080	11	BC ₁	0,0454	aumenta
SS	SSR 080	11	BC ₁ S ₁ (VII-31)	0,0182	aumenta
a/b	SSR 038	8	BC ₁ S ₁ (IX-14)	0,0028	**
a/b	SSR 038	8	BC ₁ S ₁ (VII-31)	0,0229	disminuye
At	SSR 034	10	BC ₁ S ₁ (III-21)	0,0064	aumenta
At	SSR 034	10	BC ₁ S ₁ (IX-14)	0,0021	aumenta
SS	SSR 034	10	BC ₁ S ₁ (VII-51)	0,0125	**
SS	SSR 034	10	BC ₁ S ₁ (VII-91)	0,0456	**

Cr: cromosoma, L: porcentaje de reflectancia, **SS**: contenido en sólidos solubles, **a/b**: índice de color, **At**: acidez titulable. ** Sin diferencias entre individuos homocigotas para el alelo de Caimanta (CAI) de *S. lycopersicum* y el alelo de LA722 de *S. pimpinellifolium*.

La Tabla III-XX muestra los *QTLs* detectados en BC_2 que también fueron encontrados en las demás generaciones segregantes evaluadas anteriormente. Se indica la probabilidad asociada y el efecto sobre el carácter que tiene el alelo silvestre.

Tabla III-XX. Validación de *QTLs* detectados en la generación BC_2 por comparación con las generaciones BC_1 y BC_1S_1 y efecto sobre el fenotipo del alelo del progenitor LA722 de *S. pimpinellifolium*.

Carácter	Marcador	Cr	Generación	p	Efecto alelo LA722
Peso	SSR 220060	11	BC_1S_1 (IX-14)	0,0280	disminuye
Peso	SSR 220060	11	BC_1	0,0303	disminuye
Peso	SSR 220060	11	BC_2	0,0067	disminuye
Altura	SSR 220060	11	BC_1S_1 (VII-31)	0,0409	disminuye
Altura	SSR 220060	11	BC_2	0,0023	disminuye
Altura	SSR 596	10	BC_1S_1 (VII-51)	0,0476	disminuye
Altura	SSR 596	10	BC_1	0,0010	disminuye
Altura	SSR 596	10	BC_2	0,0483	disminuye
Lv	SSR 596	10	BC_1S_1 (VII-51)	0,0480	aumenta
Lv	SSR 596	10	BC_2	0,0470	aumenta
Altura	SSR 318	10	BC_1	0,0056	aumenta
Altura	SSR 318	10	BC_2	0,0483	disminuye

Cr: cromosoma, p: probabilidad asociada, Lv: vida poscosecha.

Un *QTL* para peso localizado en el cromosoma 11 fue detectado en las tres generaciones segregantes analizadas. En la generación BC_2 , la asociación fue más significativa. El alelo silvestre disminuyó la media del carácter en las generaciones BC_1S_1 (IX-14), BC_1 y BC_2 .

Para la altura del fruto se validaron tres *QTL*, dos localizados en el cromosoma 10 y el restante en el cromosoma 11. El *QTL* localizado en el cromosoma 10 ligado al *SSR596* fue detectado en las tres generaciones segregantes. El efecto del alelo silvestre sobre la media del carácter fue consistente entre las generaciones en las que se detectaron los *QTLs*, con excepción del *QTL* ligado al *SSR318* cuyo alelo silvestre disminuyó la media del carácter en la generación BC_2 y lo aumentó en la BC_1 .

Finalmente se validó un *QTL* para vida poscosecha ubicado en el cromosoma 10 cuyo efecto fue consistente entre generaciones. El alelo de LA722 incrementó la vida poscosecha media de los frutos constituyendo un *QTL* de importancia para la introgresión en el germoplasma de CAI.

En la Tabla III-XXI se encuentran resumidas las asociaciones detectadas al 0,1 % en al menos una de las generaciones evaluadas, como así también aquellas asociaciones detectadas al 5 % que se encontraron en dos o más generaciones, ya sea BC_1 , BC_1S_1 o BC_2 . En dicha tabla se indican el marcador asociado a cada carácter y el cromosoma donde se encuentra localizado, además se muestran las generaciones en las cuales fueron detectados y el efecto del alelo silvestre sobre el valor medio del carácter. En gris se destacan los *SSR596* y *SSR220060* asociados a altura y peso, respectivamente cuyos efectos fueron consistentes a lo largo de las tres generaciones evaluadas. El

SSR596 (Cr10) también resultó interesante, dada su asociación con la vida poscosecha de los frutos, siendo el alelo silvestre el que produce un aumento del valor medio.

La Tabla III-XXI muestra, a modo de resumen, todas las asociaciones detectadas en las tres generaciones segregantes evaluadas en esta experiencia.

Tabla III-XXI. Asociaciones detectadas en las tres generaciones segregantes analizadas según marcador y el efecto provocado por el alelo de LA722 de *S. pimpinellifolium*.

Cr	Carácter asociado	Marcador	Generación	Efecto del alelo de LA722
1	Firmeza	SSR288	BC₁S₁	disminuye
	pH	SSR288	BC ₁ /BC ₁ S ₁	disminuye/aumenta
2	pH	SSR598	BC₁S₁	aumenta
	pH	SSR032	BC₁S₁	aumenta
3	Firmeza	SSR601 y SSR320	BC₁	aumenta
6	L	SSR211044	BC ₁ /BC ₁ S ₁	aumenta/aumenta
7	Diámetro	SSR045	BC₁S₁	**
	Diámetro	SSR038	BC₁	disminuye
8	Peso	038	BC₁	disminuye
	a/b	038	BC ₁ S ₁ /BC ₁ S ₁	**/disminuye
10	Forma	SSR034	BC₁/BC₁S₁	disminuye/**
	Altura	SSR596	BC₁/BC₁S₁/BC₂	disminuye/disminuye/disminuye
	Peso	SSR318	BC₁	disminuye
	Altura	SSR034	BC₁S₁	disminuye
	Firmeza	SSR596 y SSR318	BC₂	disminuye
	At	SSR034	BC ₁ S ₁ /BC ₁ S ₁	aumenta/aumenta
	SS	SSR034	BC ₁ S ₁ /BC ₁ S ₁	**/**
	Lv	SSR596	BC ₂ /BC ₁ S ₁	aumenta/aumenta
	Altura	SSR318	BC ₁ /BC ₂	aumenta/disminuye
	Forma	SSR1061	BC₁S₁	**
11	SS	SSR080	BC ₁ /BC ₁ S ₁	aumenta/aumenta
	Peso	SSR220060	BC₁/BC₁S₁/BC₂	disminuye/disminuye/disminuye
	Altura	SSR220060	BC₂/BC₁S₁	disminuye/disminuye

Cr: cromosoma, L: porcentaje de reflectancia, a/b: índice de color, At: acidez titulable, SS: contenido en sólidos solubles, Lv: vida poscosecha. ** Sin diferencias entre individuos homocigotas para el alelo de Caimanta (CAI) de *S. lycopersicum* y el alelo de LA722 de *S. pimpinellifolium*. En gris se resaltan aquellas asociaciones detectadas en las tres generaciones segregantes evaluadas. En negrita se indican aquellas generaciones donde la asociación entre el marcador SSR y el carácter fenotípico fue detectada con $p < 0,001$.

En este Capítulo se observaron diferentes porcentajes de variación genética en cada familia BC₁S₁ para cada uno de los caracteres de calidad estudiados. También, nuevos *QTLs* con significado al 0,1 % fueron encontrados que no fueron detectados ni en BC₁ ni en BC₂. Además hubo *QTLs* con efectos recesivos que fueron aportados por el progenitor silvestre.

Estos resultados permitieron validar varios *QTLs* por comparación de las asociaciones detectadas en las familias BC₁S₁, y que se habían observado en las dos retrocruzas BC₁ y BC₂.

DISCUSION

Se supone que el tomate ha sido domesticado a partir de los que posiblemente fueron sus antecesores *S. pimpinellifolium* y/o *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (Rick, 1976). Durante mucho tiempo los mejoradores han explorado el germoplasma de tomate en su intento de crear variedades con frutos cada vez más grandes. Como resultado, existe una enorme diferencia en el tamaño de los frutos de especies silvestre tal como *S. pimpinellifolium* y los cultivares de *S. lycopersicum*, y se han descuidado aspectos relacionados con la calidad del fruto de tomate como son la textura y/o el sabor.

Caracteres fenotípicos

En el presente trabajo todos los caracteres fenotípicos evaluados en todas las generaciones segregantes mostraron variación continua con ajuste a la distribución normal.

El genotipo silvestre LA722 de *S. pimpinellifolium* presentó frutos significativamente más pequeños que el genotipo cultivado CAI, con valores medios de diámetro, altura y peso más bajos, característicos de las especies silvestres (Rick, 1976; Labate *et al.*, 2007). El valor medio de la F₁ difirió de los valores medios observados en los genotipos LA722 y CAI para cada uno de los caracteres antes mencionados. Estos resultados concuerdan con estudios clásicos en los cuales híbridos F₁, que resultan del cruzamiento entre una especie de frutos grandes y otra de frutos chicos, exhiben típicamente frutos con pesos similares al progenitor de frutos pequeños. En consecuencia se ha postulado que los alelos aportados por dicho progenitor son semidominantes sobre los aportados por el progenitor de frutos grandes (Grandillo *et al.*, 1999b).

En concordancia con esto último, la estimación de los grados de dominancia evidenció una dominancia parcial del genotipo silvestre para diámetro, altura, y peso de los frutos (Tabla I-IV). Estos resultados concuerdan además, con los encontrados por Pratta *et al.* (2000) y Pereira da Costa *et al.* (2009a), quienes observaron dominancia parcial para el peso en el mismo cruzamiento entre la especie cultivada y silvestre. Por otro lado Weller *et al.* (1988) postularon que en las especies silvestres existen poligenes dominantes responsables de la reducción del peso. Trabajos de genetistas clásicos han sugerido que entre 5 y 20 genes estarían involucrados en la herencia del peso del fruto de tomate (Powers, 1941; Fogle y Currence, 1950; Ibarbia y Lambeth, 1969).

Los frutos de tomate exhiben formas y tamaños diversos que van desde los pequeños y redondos a los grandes y alargados. Los genotipos progenitores estudiados aquí, difirieron significativamente para la forma de los frutos, presentando el genotipo cultivado menor índice de forma, evidenciado por frutos más aplanados que los denominados tipo platense (Foto I-2). La F₁ no presentó diferencias con LA722, con valores cercanos a uno, lo cual indica frutos con altura y diámetro similares, que se traduce en frutos esféricos. A través del cálculo de los grados de dominancia se encontró dominancia completa de LA722 sobre CAI para dicho carácter.

Otro carácter importante desde el punto de vista comercial, y que es abordado en este trabajo, es la vida poscosecha de los frutos. En *S. lycopersicum* se conocen algunos genes mutantes como *rin* (*ripening inhibitor*) o *nor* (*non ripening*) que prolongan la vida poscosecha de los frutos pero además ejercen efectos pleiotrópicos indeseables sobre otros componentes de calidad. Zorzoli *et al.* (2000); Pereira da Costa *et al.* (2009a) y Rodríguez *et al.*

(2010) han demostrado la utilidad de las especies silvestres para incrementar la variabilidad genética y como fuentes alternativas de genes que alargan la vida poscosecha sin los efectos indeseables que provocan sobre caracteres de calidad los genes *rin* o *nor*. En este trabajo los genotipos progenitores fueron significativamente distintos para la vida poscosecha de los frutos, siendo el progenitor LA722 el de mayor valor ($Lv = 15,26 \pm 0,60$). La F_1 no mostró diferencias significativas con el progenitor silvestre y los grados de dominancia indicaron dominancia completa hacia LA722 para *Lv*. Estos resultados concuerdan con los presentados por Zorzoli *et al.* (2000) y avalan la idea de que las especies silvestres y en particular *S. pimpinellifolium* serían recursos genéticos alternativos para los programas de mejoramiento en los que se intenta prolongar la vida poscosecha.

En un primer momento se pensó que el ablandamiento de los frutos estaba relacionado con la vida poscosecha de los frutos y que esto dependía exclusivamente del metabolismo de la pared celular. Sin embargo recientes estudios moleculares han demostrado que otros factores como la turgencia y la estructura de la cutícula son también importantes para la prolongación de la vida poscosecha (Saladié *et al.*, 2007; Matas *et al.*, 2009). La firmeza observada en los frutos de *S. pimpinellifolium* fue significativamente más alta que en los frutos de CAI. Mientras que la F_1 entre ellos mostró valores intermedios, evidenciando aditividad ya que el valor encontrado ($d/a = -0,09$), no difirió significativamente de cero. Sin embargo Rodríguez *et al.* (2010) encontraron resultados opuestos al trabajar con un cruzamiento entre el tomate cultivado CAI y el tomate *cherry*, siendo este último genotipo el que presentó mayor vida poscosecha pero con menor firmeza.

Es un hecho conocido que el sabor de los frutos de tomate tiene una estrecha relación con el contenido en sólidos solubles, el pH y la acidez titulable. Los constantes intentos en mejorar caracteres relacionados con el tamaño de los frutos del tomate, han relegado a un segundo plano los caracteres relacionados con la calidad. Existen varias accesiones de fruto pequeño con alto contenido en sólidos solubles que fueron utilizados como progenitores en distintos programas de mejoramiento. Estos incluyeron accesiones de *S. chmielewskii* (Chetelat *et al.*, 1995), *S. habrochaites* (Hadas *et al.*, 1995; Schaffer *et al.*, 1998) y varios tomates *cherry* (Saliba-Colombani *et al.*, 2001). En el presente estudio, contrariamente a lo expresado en trabajos anteriores (Rick, 1979; Poysa, 1993; Rodríguez *et al.*, 2006), no hubo diferencias significativas entre CAI y LA722 para el contenido en sólidos solubles y por este motivo no fue posible obtener la estimación de los grados de dominancia. La F_1 entre estos genotipos mostró valores significativamente mayores que los progenitores. Georgelis y Scott (2006) encontraron interacción genotipo x ambiente para el contenido en sólidos solubles, siendo los genotipos con más alto contenido en sólidos solubles los más afectados.

En los últimos años ha habido un creciente interés en el mejoramiento de componentes nutricionales dado su importancia en la dieta humana. Un componente beneficioso que recientemente ha generado el interés de los consumidores es el carotenoide licopeno. Este compuesto es el que le da el color rojo a los frutos de tomate y es un fuerte antioxidante y precursor de la producción de α y β -carotenos. Hyman *et al.* (2004) desarrollaron una rápida forma de estimar el contenido de licopeno mediante parámetros de color y encontraron una relación lineal entre el índice de color $(a/b)^{2.5}$ y el contenido en

licopeno. Los valores de a/b entre los genotipos progenitores fueron significativamente distintos, siendo el tomate silvestre el que presentó los valores más altos ($a/b = 1,42 \pm 0,02$). Valores altos de este carácter indican frutos más rojos y con mayor contenido en licopeno. La F_1 no presentó diferencias estadísticamente significativas con el progenitor silvestre, evidenciando así una acción génica de dominancia completa de LA722. Resultados similares fueron encontrados por Rodríguez *et al.* (2010) para un cruzamiento entre el cultivar Caimanta y una accesión del tomate *cherry*, en la cual este último mostró valores más altos de a/b que CAI y el mismo patrón de herencia que en este estudio. Otro carácter evaluado para la determinación del color es el parámetro L que mide el porcentaje de luz reflejada, pudiendo variar entre 0 % y 100 %. Valores altos de L indican frutos más brillantes. Para el caso de los genotipos estudiados la especie silvestre presentó valores más bajos de L en comparación con el genotipo cultivado. En este caso en particular se observó sobredominancia ($d/a = -2,30$) hacia los valores más bajos, dado que la F_1 mostró valores de L menores que los observados en LA722. Valores más bajos de L en relación al genotipo cultivado fueron encontrados por Rodríguez *et al.* (2010) en un tomate *cherry*. Según Saks y Francis (2001), el ideotipo de color consiste de valores altos de a/b y bajos de L. En función de esta observación la accesión de *S. pimpinellifolium* sería un buen material de partida para un programa de mejoramiento en el cual se intenta mejorar el color.

El sabor de los frutos de tomate depende principalmente del contenido de azúcares y ácidos (Stevens *et al.*, 1977) por lo que un correcto balance entre ellos se traduce en un buen sabor. Es decir que para un nivel dado de

azúcares se corresponde a un contenido óptimo de ácidos (Malundo *et al.*, 1995). Fulton *et al.* (2002), han encontrado que el pH de los frutos está determinado principalmente por el contenido de ácido cítrico y ácido málico, dado que estos compuestos presentaron una alta correlación con el pH. En el caso de los genotipos cultivado y silvestre, en esta experiencia, no se encontraron diferencias significativas para este carácter, así mismo tampoco se encontraron diferencias con la F_1 entre ellos.

Algunos autores han informado que la relación entre el contenido en sólidos solubles y la acidez titulable es de importancia pues permite definir diferencias en el sabor entre cultivares (De Bruyn *et al.*, 1971; Stevens, 1972). Otros sugieren que el sabor del tomate puede ser mejorado aumentando el contenido en sólidos solubles y ácidos de los frutos (Stevens *et al.*, 1977; Jones y Scott, 1983). Generalmente un aumento en estos dos compuestos orgánicos resulta en un incremento de la intensidad del sabor. Para el caso de la acidez titulable (At) se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre CAI y LA722. El valor medio encontrado en la F_1 se ubicó entre los progenitores y fue significativamente diferente de ellos, sugiriendo dominancia parcial de CAI, avalado por el grado de dominancia encontrado ($d/a = -0,46$) y que fuera significativamente distinto de cero.

Respecto al estudio de los caracteres fenotípicos en la generación segregante BC_1 , originada a partir del cruzamiento de la F_1 con el progenitor cultivado que fuera utilizado como progenitor recurrente, y en concordancia con observaciones realizadas en estudios previos (Ibarbia y Lambeth, 1969; Tanksley *et al.*, 1982; Paterson *et al.*, 1988), el peso de los frutos mostró en su distribución asimetría hacia el progenitor silvestre. Para el diámetro de los

frutos, los individuos se distribuyeron cercanos al valor de la F_1 de modo que la recuperación de parte del genoma de CAI en la retrocruza compensó el efecto de dominancia parcial del genotipo silvestre. Sin embargo la distribución de frecuencias para la altura de los frutos mostró un desplazamiento en la BC_1 hacia el progenitor cultivado, siendo así más importante el efecto de la recuperación del genoma de CAI para este carácter. Esto demuestra que el desplazamiento de la distribución de frecuencias en la generación BC_1 para un carácter dado, no sólo depende de los grados de dominancia sino también de la proporción del genoma del progenitor recurrente. Grandillo y Tanksley (1996) observaron el mismo comportamiento para el peso de los frutos en la distribución de frecuencias fenotípicas de una BC_1 que fue generada por un cruzamiento con la misma especie silvestre.

Por otro lado la dominancia completa exhibida por el progenitor silvestre para la forma y vida poscosecha de los frutos se evidenció por el sesgo de las distribuciones de estas variables en la BC_1 (ver Figura I-2). Pereira da Costa *et al.* (2009a) encontraron que es posible obtener variancia genética para el peso y vida poscosecha de los frutos a través de hibridaciones con especies silvestres. En esa experiencia observaron que en la generación F_2 y en ambas retrocruzas hacia los progenitores (también obtenidas a partir del cruzamiento entre Caimanta y la accesión LA722 de *S. pimpinellifolium*) se encontraron diferencias en la distribución para estos caracteres, lo que indicaría que los progenitores aportan distintos alelos que están segregando en dichas generaciones. Resultados similares también habían sido sugeridos por Pratta *et al.* (2000) y Rodríguez *et al.* (2006).

Similar tendencia pudo observarse para la firmeza, aunque la media en la generación BC₁ estuvo más cercana al punto medio entre los progenitores, hecho coincidente con el grado de aditividad encontrada (Tabla I-IV, Figura I-2). La distribución para parámetros de color como L y a/b presentaron un desplazamiento hacia el genotipo cultivado, contrariamente a lo esperado por sus acciones génicas estimadas previamente, sugiriendo un efecto importante sobre estos caracteres del genoma recuperado de CAI y dominancia parcial del genotipo cultivado para dichos parámetros (Figura I-2). En el caso del contenido en sólidos solubles y pH, para los cuales no se encontraron diferencias significativas entre los progenitores, se observó una apertura de la variación fenotípica en la generación BC₁. Esto podría deberse a que, por efecto de la recombinación, habría nuevas combinaciones de *loci* que participan en la determinación del carácter provocando la presencia de nuevos fenotipos que amplían la variación observada. Rodríguez *et al.* (2006) demostraron que la recombinación producida durante el proceso de obtención de *RILs* a partir de un cruzamiento interespecífico entre estos mismos progenitores originó líneas con pH inferior a los progenitores. La distribución de frecuencias para At en la generación BC₁ concuerda con la dominancia parcial que se estimara a partir de los progenitores, y que produjo en la distribución fenotípica un sesgo hacia CAI.

El cálculo del porcentaje de variación genética que se estimó en la retrocruza, si bien no se realizó en una generación F₂, aporta una idea acerca de cuánto de la variación fenotípica observada se debió a la variación genética del carácter en esta generación de retrocruza. Todas las variables analizadas presentaron valores de % VG relativamente altos, con excepción de Lv (% VG

= 30) (Tabla I-V). Si bien estos parámetros son propios de cada población y ambiente, estos resultados son similares a los presentados por Pereira da Costa *et al.* (2009a) que informaron una heredabilidad en sentido amplio para Lv de 35 % para un cruzamiento entre CAI y LA722 y que el mayor componente de la variación genética fue la variancia aportada por los efectos aditivos de los genes (heredabilidad en sentido estricto de 0,52). Estos valores sugieren entonces que sería posible realizar selección para este carácter a fin de aumentar su valor medio. Probablemente una explicación para el bajo valor de VG observado en esta experiencia sería la generación utilizada y el tamaño de la misma (74 plantas, 1534 frutos). Sin embargo, Pratta *et al.* (2011b) encontraron valores bajos (menor a 0,25) de heredabilidad en sentido estricto para la vida poscosecha de los frutos, estimados a partir del ANOVA, al evaluar este carácter en 16 *RILs* de tomate derivadas a partir del cruzamiento entre el cultivar Caimanta y la accesión LA722 de *S. lycopersicum*. Generalmente una generación BC₁ no es la más adecuada para el cálculo de este parámetro pues en las retrocruzas sólo hay dos genotipos posibles (homocigotas para alelos del padre recurrente y heterocigotas) para cada uno de los *loci* que determinan un carácter dado, por lo tanto la variancia genética sería subestimada debido a la ausencia de homocigotas para alelos del progenitor donante.

En la generación BC₂ no se calcularon los porcentajes de variancia genética dado que este tipo de generaciones (BC) no son las más adecuadas para hacerlo y el número de plantas evaluadas no fueron suficientes para determinar con precisión dicho parámetro.

Con respecto al otro tipo de generación utilizada, las autofecundaciones de las BC₁, los rangos de variación de cada uno de los caracteres evaluados

en las cinco familias BC_1S_1 (Tabla III-V) demuestran la variabilidad genética generada a partir de la autofecundación de estas plantas BC_1 . A diferencia de la variabilidad que puede observarse en una BC, la autofecundación de BC permite la expresión de la recombinación entre *loci* en ambos gametos progenitores incrementando de esta manera la variabilidad y que por consiguiente la misma pueda ser expresada. Además cada familia se originó a partir de plantas BC_1 con diferentes porcentajes del genoma de CAI recuperado, lo que significa que diferentes fracciones del genoma de LA722 estarían segregando en distintas proporciones. Esto probablemente explica las diferencias encontradas en el cálculo de los porcentajes de variancia genética, donde por ejemplo en la familia BC_1S_1 (IX-14) el % VG observado fue relativamente menor que en las restantes familias (Tabla III-VI). La BC_1S_1 (IX-14), al igual que la familia BC_1S_1 (VII-51) se originó a partir de plantas BC_1 con el mayor porcentaje de CAI recuperado, 83 % y 82 %, respectivamente (Tabla III-II). Por lo tanto un menor % VG estaría en correspondencia con el mayor porcentaje recuperado del padre recurrente y por ende con mayor posibilidad de homocigosis.

Para el resto de las familias, si bien el porcentaje de CAI recuperado es similar, no significa que sean las mismas regiones del genoma las que se hayan recuperado y en consecuencia la fracción de germoplasma silvestre que se encuentra segregando en cada una ellas es distinta. Por esta razón la proporción de *loci* que controlan los distintos caracteres es distinta en cada BC_1S_1 , y resulta lógico encontrar bajos % VG dado que se han fijado alelos del padre cultivado.

Correlaciones fenotípicas significativas ($p < 0,01$) fueron encontradas entre varios caracteres en la generación BC₁. Entre ellas se encontraron: el diámetro con la altura y peso de los frutos ($r = 0,77$; $p < 0,001$ y $r = 0,97$; $p < 0,001$, respectivamente) (Tabla I-VI). Estas correlaciones pueden darse como consecuencias de efectos pleiotrópicos y concuerdan con aquellas encontradas por Grandillo y Tanksley (1996). La forma y la acidez titulable estuvieron correlacionados negativamente ($r = -0,42$; $p < 0,01$). Se observaron correlaciones negativas entre forma y diámetro ($r = -0,49$; $p < 0,001$) producto probablemente de la relación matemática que vincula una variable con otra y entre forma y peso ($r = -0,39$; $p < 0,001$) que concuerda con lo observado en los progenitores. Es decir, frutos con mayor peso tuvieron menor índice de forma (frutos más aplanados) como el genotipo cultivado. Los parámetros de color L y a/b estuvieron negativamente correlacionados ($r = -0,65$; $p < 0,001$), esperable de acuerdo con los fenotipos de los progenitores, donde frutos más rojos (mayor a/b) y menos brillantes (menor L) se observaron en el genotipo silvestre. El pH y la acidez titulable se correlacionaron negativamente ($r = -0,56$; $p < 0,001$) lo que estaría indicando que el ácido cítrico sería el principal contribuyente al pH dado que cuanto mayor es At (acidez titulable, mayor cantidad ácido cítrico) menor es el pH. Estos resultados concuerdan con los expuestos por Fulton *et al.* (2002), quienes detectaron el mismo tipo de correlación entre el contenido en ácido cítrico y el pH de los frutos. El pH además estuvo correlacionado positivamente con el contenido en sólidos solubles ($r = 0,49$; $p < 0,001$). Esta correlación resultaría interesante dado que diversos trabajos sugieren que el sabor del tomate puede ser mejorado si se aumenta el contenido en sólidos solubles y ácidos de los frutos (Stevens *et al.*,

1977; Jones y Scott, 1983). Generalmente un aumento en estos valores resulta en un incremento en la intensidad del sabor. Otro hecho interesante entre las asociaciones fue que la vida poscosecha y la firmeza de los frutos no tuvieron una correlación significativa entre ellos ni con los otros caracteres ya que el genotipo LA722 fue el que tuvo una más larga vida poscosecha y a su vez una más alta firmeza. Estos resultados no indicarían una relación entre Lv con el metabolismo de la pared celular sino que serían el resultado de otros mecanismos que tienen lugar en el pericarpio del fruto, hecho que también fuera sugerido por Rodríguez *et al.* (2010).

Marcadores moleculares

Actualmente una biotecnología que ofrece amplias posibilidades de ser incorporada para hacer más eficiente un programa de mejoramiento genético es la utilización de las técnicas de marcadores moleculares. Es un hecho conocido que mediante el uso de marcadores moleculares se puede aumentar la eficiencia de la selección fenotípica practicada en los programas de mejoramiento.

Marcadores polipeptídicos

Entre los marcadores moleculares eficientes para los programas de mejora se encuentran los perfiles polipeptídicos que han sido exitosamente utilizados en diversas especies (Hamada, 1998; Del Luca *et al.*, 2000; Garelo *et al.*, 2000). Aunque son menos polimórficos que los marcadores de ADN podrían brindar rápidamente información sobre la presencia de variabilidad genética para caracteres que estarían asociados a distintos aspectos que hacen a la calidad de los frutos.

Según Grierson y Tucker (1983), la síntesis proteica parece ser un componente esencial en el proceso de madurez de los frutos. Por lo tanto, la obtención de fracciones polipeptídicas por medio de SDS-PAGE se convierte en un método sencillo y relativamente poco costoso que en una primera etapa permitiría caracterizar, seleccionar y manejar material genético exótico (Bretting y Widrlechner, 1995). Si bien existen antecedentes en los que se han caracterizados genotipos uniformes de tomate en diferentes estados de madurez por la técnica de SDS-PAGE (Biggs *et al.*, 1986; Rose *et al.*, 2000; Pratta *et al.*, 2001; Jagadeesh *et al.*, 2004) esta metodología ha sido muy pocas veces utilizada en generaciones que presentan variabilidad genética tal como son las generaciones segregantes (Rodríguez *et al.* 2008; Pereira da Costa *et al.* 2011) y nunca fueron utilizadas en una primera retrocruza de tomate. Por lo tanto en una generación BC₁ la co-segregación de polipéptidos polimórficos con caracteres de calidad de frutos permitiría detectar posibles asociaciones genéticas.

El primer paso para la utilización de los perfiles de polipéptidos totales de pericarpio de frutos de tomate como marcadores moleculares es la caracterización en los genotipos progenitores y F₁. El análisis de estos perfiles en los genotipos progenitores permitió la detección de 27 bandas al estado verde maduro (VM) y 28 al estado rojo (RR) (Tabla I-VII). Gallo *et al.* (2010) encontraron un número levemente menor de bandas tanto al estado VM como RR en los mismos genotipos. Estas diferencias pueden deberse tanto a una diferencia en la resolución de los geles de poliacrilamida como a diferencias ambientales dado que según Carbone *et al.* (2005), el desarrollo del fruto del tomate es el resultado de varios cambios fisiológicos controlados por señales

hormonales y ambientales. Un nivel de polimorfismo similar entre CAI y LA722 fue observado al estado VM (70 %) y al estado RR (64 %), también levemente superiores a los informados por Gallo *et al.* (2010) atribuible al menor número de bandas detectadas y en consecuencia a una posible pérdida de polimorfismo. Al comparar CAI con la F₁ se encontraron 27 bandas y 33 % fue el porcentaje de polimorfismo entre ellas al estado VM (Tabla I-VII). En el mismo estado de madurez se detectaron 26 bandas cuando se comparó la F₁ con LA722 y siendo el polimorfismo mayor (50 %). Si bien estos resultados no concuerdan con los informados por Gallo *et al.* (2010) si habría una concordancia con el aumento de la cantidad de polipéptidos encontrados en F₁ y en consecuencia con la aparición de bandas de *novo*. La aparición de bandas con comportamiento de *novo* no es exclusivo de este cruzamiento, dado que Pereira da Costa *et al.* (2011) encontraron el mismo tipo de comportamiento al comparar los perfiles polipeptídicos de pericarpio de frutos en la F₁ de un cruzamiento entre Caimanta y la especie *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*. Resultados similares fueron encontrados en estudios de expresión génica en tomate así como en otras especies (Fender y O'Connell, 1990; Kitagawa *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006). Por ejemplo, Fender y O'Connell (1990) demostraron que en la F₁ entre *S. lycopersicum* y *S. pennellii* no estaban los polipéptidos presentes en ambos progenitores para las proteínas relacionadas al *shock* térmico (HSPs) sino que la F₁ presentó todas las HSPs pertenecientes al progenitor *S. pennellii* y algunas, pero no todas, de las HSPs pertenecientes a *S. lycopersicum*. Estos perfiles polipeptídicos particulares que presentan los genotipos híbridos podrían deberse a interacciones que resultan de la contribución genética de ambos progenitores o bien a la alteración de los

mecanismos transcripcionales y/o pos-transduccionales que tendrían lugar en el *background* genético del híbrido. Al comparar los resultados de Pereira da Costa *et al.* (2011), el número de bandas detectadas en CAI fue similar a los encontrados en esta experiencia para ambos estados de madurez, aunque el porcentaje de polimorfismo fue menor. En el estado rojo, un 15 % de polimorfismo fue observado al comparar CAI y F_1 , habiéndose detectado un total de 20 bandas (Tabla I-VII). Cuando se comparó LA722 y la F_1 el porcentaje de polimorfismo fue mayor (54 %) con un total de 28 bandas. Las bandas de 64 y 38 kDa fueron detectadas únicamente en el estado VM, mientras que las bandas de 92 y 47 kDa fueron exclusivas del estado RR (Tabla I-VII). La presencia de bandas exclusivas de cada estado fue también observado por Pereira da Costa *et al.* (2011) y de hecho Gallo *et al.* (2010) observaron que los perfiles polipeptídicos del pericarpio del fruto de tomate en los estados verde maduro y rojo maduro permitieron identificar inequívocamente estos dos estados de la madurez de los frutos de tomate al estudiar 18 *RILs*.

Al evaluar una generación segregante (BC_1) de un cruzamiento entre dos líneas puras diploides, significa que como máximo se analizan dos alelos por *locus*. De ese modo se puede seguir el efecto del polipéptido aportado por el progenitor silvestre en el *background* del genotipo cultivado. A su vez fue posible considerar los perfiles polipeptídicos de los progenitores como testigos del experimento, descartando para el análisis las bandas que no mostraron robustez.

En el estado verde maduro se encontraron seis bandas que presentaron un comportamiento mendeliano entre los progenitores (Tabla I-XI), es decir

bandas que se encuentran presentes en LA722 y ausentes en CAI y que luego aparecen en la F_1 . Estas bandas fueron de interés ya que son las que se probaron para segregación 1:1 en la generación BC_1 y que luego fueron probadas para su asociación con caracteres de calidad.

Aquellas bandas que presentaron segregación mendeliana en la generación BC_1 (54 kDa, 45 kDa y 38 kDa, en estado verde maduro y 66 kDa y 54 kDa en estado rojo) analizadas a través del test de χ^2 fueron utilizadas para probar la asociación con los caracteres de calidad. Algunas bandas no presentaron segregación 1:1 en la BC_1 , probablemente debido a la distorsión en la segregación. Las bandas con distorsión en la segregación no se tuvieron en cuenta para el análisis de asociación pudiendo haber perdido información (Rose *et al.*, 2004). Este hecho también fue observado por Pereira da Costa *et al.* (2011), quienes observaron bandas que no se ajustaron a la proporción 3:1 esperada para un marcador dominante en una generación F_2 .

Los resultados encontrados indican la existencia de una amplia variación genética para la presencia de polipéptidos en estos dos estados fisiológicos de la madurez del fruto y confirman la importancia de la elección de genotipos progenitores con diferencias significativas en su comportamiento para caracteres que afectan la calidad del fruto.

En el análisis de los perfiles polipeptídicos para el estado VM la banda de 54 kDa estuvo asociada ($p < 0,05$) al pH y firmeza de los frutos (Tabla I-XII). La presencia de la banda de origen silvestre aumentó el valor medio de firmeza en aquellos individuos que la presentaron, lo cual es esperable de acuerdo con el fenotipo observado en los progenitores, ya que el genotipo silvestre mostró mayor firmeza que el cultivado (Tabla I-IV). En todo programa de mejoramiento

del tomate, el aumento de la firmeza es una característica deseada, dado que reduce el daño de los frutos durante el transporte para su comercialización en el mercado en fresco. El bajo valor de R^2 ($R^2 = 0,08$) encontrado es esperable para un carácter cuantitativo, ya que muchos *loci* con efectos menores contribuyen al fenotipo final y la variación ambiental afecta más a la herencia poligénica del carácter. Por otro lado, Kearsey y Pooni (1996) sugirieron que la relativamente baja proporción de variación fenotípica explicada por un marcador molecular indicaría que los efectos génicos aditivos no son predominantes en la expresión de los caracteres. Pereira da Costa *et al.* (2011) encontraron una banda de 75 kDa en VM aportada por el progenitor cultivado (CAI) asociada a un aumento de la firmeza y una reducción de la vida poscosecha de los frutos, al evaluar una generación F_2 obtenida a partir del cruzamiento con una accesión del tomate *cherry*. La no detección de este polipéptido de 75 kDa en el presente trabajo, se debe posiblemente a que las bandas con origen en CAI (progenitor recurrente) no segregaron en la BC_1 lo que impediría su detección. Por otro lado, diferentes tipos de generaciones segregantes presentan diferentes tipos de segregación y por lo tanto determinarían diferentes frecuencias génicas, por lo que la detección de los marcadores puede estar distorsionada por efecto de estas diferencias de frecuencias. Si bien son necesarios otros estudios para validar estos *QTLs*, estos resultados indican que tanto el genotipo cultivado como el silvestre presentan *QTLs* que tiene un efecto deseado sobre el fenotipo buscado y que la introgresión de estas secuencias de LA722, en el genotipo cultivado, contribuiría a un aumento en el valor medio de la firmeza.

Con respecto a la asociación del polipéptido de 54 kDa con el pH de los frutos en estado VM se observó una reducción de este carácter en aquellos genotipos que la presentaron (Tabla I-XII). El porcentaje de variación fenotípica atribuible a la presencia de la banda fue de 11 %. Estudios derivados de esta experiencia realizados por Vega *et al.* (2010) en los que se llevaron a cabo análisis proteómicos por la técnica de electroforesis en dos dimensiones demostraron que este polipéptido presenta elevada homología con la subunidad α de la ATPasa cloroplástica.

En el estado verde maduro se detectó una banda de 45 kDa asociada a altura, forma y vida poscosecha. En forma contraria a lo esperado de acuerdo a los fenotipos observados en los progenitores, la presencia de la banda evidenció un aumento de la altura de los frutos en los individuos BC₁ que la presentaron. La presencia de la banda produjo frutos más altos con mayor índice de forma (más redondos) y con más alta vida poscosecha. Varios *QTLs* para altura y forma de fruto se han informado en los últimos 15 años (Grandillo *et al.*, 1996; Gonzalo y van der Knaap, 2008). El polipéptido de 45 kDa aportado por LA722 ejerce un efecto sobre la forma del fruto en la dirección esperada, haciendo el índice más grande, y por ende frutos más redondos. El efecto es ejercido principalmente sobre la altura de los frutos dado que la asociación resultó significativa con este carácter (Tabla I-XII). Esta observación daría indicios de efectos pleiotrópicos de esta banda sobre dichos caracteres. Sin embargo no se observaron correlaciones significativas entre altura y forma, aunque sí la hubo con el diámetro ($r = -0,49$, $p < 0,001$) (Tabla I-VI), sugiriendo la existencia de otros *QTLs* que afectan estos caracteres, no detectados en este experimento. Esta banda de 45 kDa resulta particularmente importante

dado que el efecto que ejerce sobre los caracteres a los que se encuentra asociado es el buscado como ideotipo de tomate (frutos grandes con larga vida poscosecha y buena calidad) en los programas de mejoramiento. Además ninguno de estos caracteres mostró correlaciones significativas indeseadas con otros caracteres, excepto la forma, que estuvo correlacionada negativamente con el peso de los frutos (Tabla I-VI). De mantenerse estas correlaciones fenotípicas en las siguientes generaciones podría convertirse, dicho polipéptido, en un putativo marcador para caracteres fenotípicos para ser usado en un proceso de selección asistido por marcadores.

En estado rojo se detectó una única banda (66 kDa) asociada a pH cuya presencia disminuyó el valor medio de los individuos que la portaron (Tabla I-XII). Esto es coincidente con los resultados que encontraron Pereira da Costa *et al.* (2011) con un polipéptido de 30 kDa proveniente del genotipo silvestre *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* cuya presencia estuvo asociada con una disminución del pH.

Si bien existen pocos trabajos donde se utilizan los perfiles polipeptídicos de pericarpio de fruto como marcadores moleculares, estos resultados son promisorios, y convierten a esta técnica en una alternativa para el estudio de generaciones segregantes en búsqueda de *QTLs* para caracteres de calidad de frutos.

Marcadores SRAP

En este trabajo se utilizaron dos tipos de marcadores moleculares de ADN, *SRAP* y *SSR*. Cuatro combinaciones de cebadores de *SRAP* evaluados en los genotipos progenitores y la F_1 resultaron polimórficas (Tabla I-IX). El

porcentaje de polimorfismo encontrado en este trabajo es similar al observado por Ruiz *et al.* 2005, al analizar 13 combinaciones de cebadores de *SRAP* en distintas especies de tomate. Se detectaron dos bandas *de novo* en las combinaciones 1 y 4 (una por cada combinación), las cuales se mostraron presentes en la generación F_1 , no habiéndose detectado en ninguno de los progenitores. Una banda (400 pb) encontrada en la combinación 3 mostró un comportamiento similar mientras que otra (200 pb) estuvo presente en CAI y ausente en la F_1 (Tabla I-VIII). Las bandas *de novo* serían indicadores quizás de nuevas fracciones genéticas que aumentan los niveles de polimorfismos, pero que al no utilizar los *SRAP* en las siguientes generaciones no hay posibilidad de verificar si son artefactos de la técnica. Las combinaciones 1 y 2 resultaron las más polimórficas mientras que la combinación 4 presentó el mayor número de bandas totales encontradas.

Las cuatro combinaciones de *SRAP* ensayadas en progenitores y F_1 fueron seleccionadas en base al alto polimorfismo que evidenciaron para ser evaluadas en la generación BC_1 . Entre las cuatro combinaciones de *SRAP* se detectaron 52 bandas, con un promedio de 13 bandas por combinación de cebadores resultados que son similares a los encontrados por Ruiz *et al.*, 2005, quienes detectaron en promedio 14 fragmentos por combinación. El número de bandas detectadas por combinación de cebadores es también similar al encontrado por Li y Quiros (2001) para diferentes cultivares de *Brassica oleracea*. Por otro lado el número promedio de fragmentos amplificados y el porcentaje de polimorfismo encontrado por Ferriol *et al.* (2003) al estudiar 69 accesiones de *Cucurbita pepo* también fueron similares a los del presente trabajo. Del total de bandas detectadas entre progenitores, 15 (29 %) bandas

de origen silvestre mostraron un patrón de segregación mendeliano. Es decir fragmentos amplificados en el progenitor silvestre LA722 que no aparecieron en CAI y sí lo hicieron en F_1 . Estas bandas fueron importantes al igual que para proteínas, porque fueron probadas en la generación BC_1 para su segregación mendeliana (1:1) esperada. Únicamente seis bandas segregaron en forma mendeliana en la generación BC_1 y fueron utilizadas para probar su asociación (Tabla I-XIII). Estas bandas tendrían singular importancia, dado que su asociación con caracteres fenotípicos permitiría evaluar el efecto de los fragmentos cromosómicos del progenitor donante introgresados en el germoplasma de CAI.

Al estudiar la BC_1 con marcadores de SRAP, se encontró un fragmento de 397 pb originado a partir de la amplificación con la combinación 3 de cebadores asociado a tres caracteres fenotípicos: parámetro de color L ($p < 0,01$), firmeza y acidez titulable ($p < 0,05$) (Tabla I-XIV). Para los dos últimos caracteres el segmento de ADN aportado por el progenitor silvestre tuvo un efecto esperado sobre el valor medio en aquellos individuos que presentaron la banda. Por el contrario, para el parámetro de color L, la presencia de la banda incrementó dicho carácter de forma contraria a los esperado según los fenotipos observados en los progenitores. En el caso del fragmento de 134 pb originado en la combinación 2 de cebadores, el efecto también fue el esperado y la presencia de la banda aumentó el contenido promedio en sólidos solubles en aquellas plantas BC_1 que portaron dicha introgresión. Dado que los SRAP amplifican secuencias de ADN que se expresan (Li y Quiros, 2001), estos segmentos cromosómicos introgresados contendrían secuencias expresadas en LA722 pero que no se encuentran en CAI. La secuenciación de las bandas

polimórficas encontradas permitiría determinar si se corresponden con variantes alélicas de un mismo gen o corresponden a secuencias exclusivas del genotipo silvestre. Por otro lado existen antecedentes en los cuales se han secuenciado bandas de *SRAP* para convertir un marcador dominante en uno codominante para la especie *Brassica oleracea* dado que el polimorfismo puede estar dado por una inserción o delección (en cuyo caso puede convertirse en codominante) o a cambios en nucleótidos que afecta la unión de los cebadores (Li y Quiros, 2001).

Hasta el momento no existen antecedentes del uso de generaciones de retrocruzas de tomate en las cuales los perfiles polipeptídicos o *SRAP* hayan sido utilizados para la detección de *QTLs* para caracteres de calidad de frutos. La técnica de marcadores moleculares de ADN, *SRAP*, pocas veces fue utilizada para el estudio de generaciones segregantes de tomate. Ruiz *et al.* (2005) usaron esta técnica para estudiar la variabilidad genética entre cultivares de tomate tradicionales de España. Así mismo Ferriol *et al.* (2003, 2004) analizaron la variabilidad genética en una colección de germoplasma de zapallo por medio de *SRAP* y *AFLP*. Otros antecedentes en el empleo de *SRAP* para la caracterización de genotipos de tomate es el trabajo de Yu *et al.* (2005), quienes encontraron que los *SRAP* fueron los marcadores más efectivos para la identificación de 10 genotipos de tomate *cherry* a partir de la información obtenida por el perfil de bandas generado por una combinación de cebadores. Por otro lado Comlekcioglu *et al.* (2010) llevaron a cabo una caracterización genética, con *SRAP* y *RAPD*, de genotipos de tomates cultivados domesticados en regiones áridas y calurosas, para compararlos con los genotipos resistentes a altas temperaturas.

Marcadores SSR

Una de las principales razones para el desarrollo de microsatélites fue su potencial como marcador para caracteres fenotípicos en programas de mejoramiento vegetal. El primer ejemplo de SSR ligado a un gen de resistencia a enfermedades fue publicado por Yu *et al.* (1994) al encontrar un SSR ligado al gen *Rsv* que confiere resistencia al virus de mosaico de la soja. En tomate, varios microsatélites han sido desarrollados y mapeados en los últimos años (Broun y Tanksley, 1996; Smulders *et al.*, 1997; Areshchenkova y Ganal, 1999; He *et al.*, 2003) y su utilidad para el mapeo de caracteres cuantitativos y cualitativos, selección asistida por marcadores, identificación de germoplasma y estudios de diversidad genética ha sido probada por Frary *et al.* (2005).

En este trabajo se probaron 50 SSR en progenitores y F₁, de los cuales 45 amplificaron y de éstos el 27 % fue monomórfico. En definitiva, 30 SSR mostraron polimorfismo entre CAI y LA722. Un SSR (SSR009) se comportó como dominante para el alelo silvestre, es decir, hubo amplificación del alelo de LA722 pero no del alelo de CAI, conocido como alelo nulo. Probablemente alteraciones propias del genotipo en las secuencias *target* de los cebadores impidió el apareamiento de los mismos evitando la amplificación. Este mismo comportamiento se observó en otros dos SSR (SSR310 y SSR111) pero el fragmento amplificado correspondió al alelo del genotipo cultivado, los cuales no fueron evaluados en la BC₁ ya que no son útiles para rastrear los fragmentos introgresados en dicha población provenientes de LA722. La presencia de alelos nulos fue también informada por Frary *et al.* (2005) al evaluar el genotipo cultivado E6203 y la accesión LA1589 de la especie silvestre *S. pimpinellifolium* dado que, de los 46 SSR que fueron polimórficos

entre ambos genotipos, 10 presentaron alelos nulos en LA1589 y uno en E6203.

En el presente trabajo los *SSR* que resultaron polimórficos entre los progenitores fueron utilizados para identificar regiones genómicas asociadas a caracteres de calidad provenientes del genotipo silvestre LA722 en la generación de retrocruza hacia el genotipo cultivado CAI.

Los porcentajes de recuperación variaron entre 67 % y 90 % y la media se ubicó en 79 %. La pequeña diferencia en el porcentaje recuperado puede deberse a que la mayoría de los *SSR* que presentaron distorsión lo hicieron a favor de los genotipos homocigotas.

La evaluación de los *SSR* en las tres familias de plantas BC_2 permitió evaluar el porcentaje del genoma de CAI recuperado, que se encontró muy cercano al valor teórico (Figura II-5). El menor porcentaje de LA722 (13,1 % aproximadamente) que está segregando en la generación BC_2 en relación a una BC_1 , explica el menor número de asociaciones detectadas en BC_2 . Este hecho es también evidenciado por los valores medio y rango de variación de cada una de las variables estudiadas, las cuales claramente muestran en la distribución un sesgo hacia el progenitor recurrente, es decir, los valores fenotípicos para la generación BC_2 son más similares a los observados en el progenitor cultivado CAI (Tabla II-IV). En esta generación se observaron dos *SSR* (*SSR095* y *SSR344*) que mostraron distorsión de la segregación, sin embargo sus efectos se vieron compensados dado que el *SSR095* presentó exceso de heterocigotas y el *SSR344* exceso de homocigotas, hecho que se vio reflejado en el porcentaje teórico de genoma recuperado que resultó cercano al 87,5 % (Figura II-5). La mayor similitud entre los germoplasmas

(BC₁ x CAI) explicaría la menor proporción de *SSR* con segregación sesgada observados en la BC₂. Resulta interesante que el porcentaje recuperado de CAI varió entre 76 y 93 %. En una planta de la familia BC₂ (VII-39) con el 93 % de genoma recuperado, de los 30 *SSR* evaluados, sólo dos *SSR* están segregando. Según estos resultados en una próxima retrocruza (BC₃), en la cual se incrementa la proporción del genoma recurrente en un 50 % del porcentaje del genoma donante remanente que posee una BC₂, sólo uno de los *SSR* estaría segregando, el cual estaría ligado al único fragmento de ADN de origen silvestre introgresado en CAI conformando una *NIL* (considerando los 30 *SSR* aquí evaluados). Estos resultados concuerdan y avalan la teoría propuesta por Tanksley y Nelson (1996) en la que el análisis de *QTLs* en retrocruzas avanzadas permite alcanzar líneas isogénicas con mayor rapidez, dado que la selección de las plantas de interés en una retrocruza se lleva a cabo en base a la presencia de *QTLs* de importancia y que al mismo tiempo posean el menor porcentaje de genoma del progenitor donante obtenido por medio de la evaluación del resto de los marcadores moleculares. Además según Tanksley y Nelson (1996), cualquier diferencia fenotípica entre el padre recurrente y la *QTL-NIL* (línea isogénica que difieren en un *QTL* específico), beneficiosos o deletéreo, puede en la mayoría de los casos ser atribuido al *QTL* introgresado. Por otro lado, el uso de marcadores moleculares para asistir a la selección en un programa de mejoramiento basado en el método de la retrocruza, reduce el efecto del arrastre por ligamiento (*linkage drag*, genes con efectos indeseados ligados al gen o fragmento de interés). Se ha demostrado (Tanksley *et al.*, 1989) que el uso de marcadores reduce el *linkage drag* en una

fracción de tiempo de al menos 10 veces con respecto al tiempo requerido en el mejoramiento tradicional.

La cantidad de *SSR* con distorsión en la segregación en las familias BC_1S_1 también fue mucho menor que la observada en la generación BC_1 , probablemente debido a la menor proporción de genoma de LA722 y distintas regiones genómicas que se encuentra segregando en cada una de las familias, por consiguiente mayor similitud entre progenitores.

El análisis de asociación de 30 *SSR* permitió detectar 42 asociaciones (Tabla I-XVI) en la generación BC_1 . Para el diámetro de los frutos se encontraron seis *QTLs* localizados, uno en cada uno de los cromosomas 8, 9, 11 y 12 y dos en el cromosoma 10. El *QTL* localizado en el cromosoma 10 presentó el R^2 más alto, explicando el 18 % de la variación fenotípica observada (Tabla I-XVI). Lippman y Tanksley (2001) encontraron seis *QTLs* localizados en los cromosomas 1, 3 y 11 que explicaron el 67 % de la variación fenotípica observada para tamaño de fruto a partir de un cruzamiento entre un cultivar de frutos grandes y la especie silvestre *S. pimpinellifolium*. Para este carácter Grandillo y Tanksley (1996) detectaron tres *QTLs* localizados en los cromosomas 1, 2 y 8, explicando en conjunto el 41 % de la variación fenotípica. Los tres *QTLs* tuvieron un efecto en la dirección esperada por el fenotipo de los padres, con los alelos del progenitor silvestre siempre disminuyendo el diámetro de los frutos. En esta experiencia, en dos de los seis *QTLs* detectados para el diámetro del fruto, ubicados en los cromosomas 9 y 11, la presencia del alelo silvestre produjo un aumento del diámetro en los individuos que eran heterocigotas para estos *loci*. Este comportamiento es opuesto al esperado de acuerdo al fenotipo de los progenitores. Posiblemente la herencia cuantitativa

del carácter y que el fenotipo observado resulta de la expresión de múltiples *loci* con distintos efectos sobre el carácter, haría que los marcadores moleculares detectados solo permitan identificar algunos *loci* con los efectos deseados para el mejoramiento en individuos con fenotipos desfavorables.

Con respecto a la altura de los frutos se encontraron cuatro marcadores asociados, uno ubicado en los cromosomas 8 y 11 y los restantes en el cromosoma 10. Los *SSR* que resultaron asociados con el diámetro también lo estuvieron con la altura de los frutos. Estos dos caracteres están fuertemente correlacionados por lo que resulta difícil definir si es el mismo *QTL* que presenta efectos pleiotrópicos sobre el diámetro y altura o que son varios *QTLs* estrechamente ligados. Es decir que los marcadores *SSR038* (Cr8), *SSR596* (Cr10), *SSR318* (Cr10) y *SSRG036* (Cr11) (Tabla I-XVI) se encuentran cercanos a cuatro *QTLs* distintos y cada uno de ellos ejerce efecto sobre el diámetro y altura de los frutos o están ligados a ocho *QTLs* de los cuales cuatro controlan el diámetro y otros cuatro la altura. El *SSRG036*, asociado a altura y diámetro, en ambos casos aumentó la media de los caracteres cuando el alelo del progenitor silvestre estuvo presente. Este *QTL* explicó el 7 % de la variación fenotípica observada tanto en el diámetro como en la altura. Este marcador resulta de interés dado que estaría asociado con un aumento del tamaño de los frutos, característica deseada por los mejoradores de tomate.

Al analizar la variable peso de los frutos se detectaron siete marcadores *SSR* asociados con este carácter. Nuevamente los *SSR038*, *SSR596*, *SSR318* y *SSRG036* estuvieron asociados con el peso además del diámetro y la altura de los frutos. Esto es esperable dado que un aumento en la altura y diámetro de los frutos resulta en un aumento concomitante con el peso lo que fuera

demostrado también por la alta correlación fenotípica observada entre estas tres variables. Estos resultados indicarían que habría cuatro *QTLs* con efectos pleiotrópicos sobre altura, diámetro y peso, ya que este hecho sería más probable que la presencia de 12 *QTLs* distintos en una misma región cromosómica. El alelo silvestre para el *SSRG036* incrementó el valor medio observado para los tres caracteres ratificando la importancia que tendría este marcador desde el punto de vista del mejoramiento del fruto.

Los *SSR070* (Cr9) y *SSRH301* (Cr12) mostraron asociación tanto con el diámetro como con el peso. Individuos heterocigotas para *SSR070* presentaron diámetro y peso significativamente mayores que los individuos homocigotas, explicando 9 % y 8 % de la variación fenotípica observada (Tabla I-XVI). Estas observaciones también convierten al *QTL* ligado al marcador *SSR070* en un marcador importante para tener en cuenta para el mejoramiento del fruto. La selección a favor de este *QTLs* aumentaría el tamaño del fruto, produciría frutos más aplanados y en consecuencia frutos más similares al denominado fruto tipo platense que es el tipo de fruto del progenitor CAI.

Solo un *QTL* fue exclusivo para peso del fruto y fue detectado ligado al *SSR220060* localizado en el cromosoma 11 (Tabla I-XVI). El efecto del alelo de LA722 fue el esperado de acuerdo con el fenotipo que se observa en los progenitores y produce una disminución en el valor medio del carácter. Grandillo y Tanksley (1996) localizaron siete *QTLs* para peso en los cromosomas 1, 2, 8 y 11 y en ninguno de estos el alelo silvestre del *QTL* presentó un efecto favorable sino que por el contrario todos redujeron el peso.

Para la forma de los frutos se detectaron tres marcadores asociados. Es de destacar que dos de ellos (*SSR038* y *SSR070*) estuvieron asociados con otros caracteres de tamaño tal como son diámetro, altura y peso para el *SSR038* (Cr8) y el diámetro y peso para *SSR070*. Este último produjo una disminución del índice de forma en individuos heterocigotas, como consecuencia probablemente de que está asociado con un aumento en el diámetro de los frutos. Por el contrario el *QTL* ligado al *SSR038* asociado con una disminución en el diámetro y altura de los frutos en individuos que portan el alelo silvestre, estuvo asociado con un aumento de la forma, es decir produjo frutos más redondos, hecho deducible a partir que el mismo *QTL* que afecta a la forma, afecta también al diámetro y la altura y produce por consiguiente un cambio similar en ambos caracteres (Tabla I-XVI). Un *QTL* exclusivo para forma de frutos fue detectado en el cromosoma 10 ligado al *SSR034*, cuyo alelo silvestre produjo una disminución en la media del carácter de forma contraria a lo esperado.

En base a estos resultados resultan interesantes los marcadores *SSRG036* ligado a un *QTL*, cuyo alelo silvestre induce un aumento en el diámetro, altura y peso de los frutos y el marcador *SSR070* ligado a un *QTL* cuyo alelo silvestre, produce un aumento en el diámetro y peso asociado además con una disminución en el índice de forma, dado que sería posible mejorar estos caracteres sin relegar aquellos relacionados con el sabor de los frutos. A su vez este marcador estuvo asociado con otros dos caracteres (índice de color a/b y acidez titulable) presentando el alelo de LA722 un efecto favorable sobre ellos, aumentando el color rojo de los frutos y el contenido de

ácidos que como ya se mencionara se relaciona con un mejor sabor (Stevens *et al.*, 1977; Jones y Scott, 1983).

Resumiendo, para el tamaño del fruto se encontraron cuatro *QTLs* (ligados a *SSR038*, *SSR596*, *SSR318* y *SSRG036*, respectivamente) y cada uno tendría efectos pleiotrópicos sobre el diámetro, altura y peso de los frutos. A su vez uno de ellos (*SSR038*) afectaría al índice de forma. Además se encontró un *QTL* (ligado a *SSR070*) que afectaría al diámetro, peso y forma de los frutos. Finalmente un *QTL* (ligado a *SSR20060*) para peso y un *QTL* (ligado a *SSR034*) para forma fueron detectados usando la *BC₁* como población para la detección de *loci* de caracteres cuantitativos.

Existen hasta el momento distintos *QTLs* para tamaño y forma del fruto que han sido identificados. Frary *et al.* (2000) identificaron y clonaron un *QTL* mayor para peso del fruto (*fw2.2*) localizado en el cromosoma 2 de tomate que codifica un factor de transcripción que actúa como regulador negativo de la división celular y que ha tenido una sustitución alélica durante el proceso de domesticación del tomate (Alpert y Tanksley, 1996). También se ha identificado el *locus sun* (Xiao *et al.*, 2008) que se encuentra en el brazo corto del cromosoma 7 y que ejerce su efecto sobre la forma de los frutos a través de mecanismos pos-polinización aproximadamente dos semanas después de la fertilización y produce principalmente la elongación del pericarpio y septum. Análisis genéticos realizados por van der Knaap *et al.* (2002) sugirieron que la mayoría de la variación principal en la forma de frutos elongados parece ser controlada por un número limitado de *loci* y que estos *loci* representan los interruptores claves para pasar de frutos redondos a elongados.

Otro *locus* que controla la forma de los frutos de tomate es *ovate* (Ku *et al.*, 1999) el cual es expresado en los órganos reproductivos en las etapas tempranas del desarrollo de la flor y el fruto y codifica para una proteína hidrofílica con una señal de localización nuclear. Una mutación puntual genera un codón de *stop* prematuro que causa la transición de frutos redondos a elongados tipo pera (Liu *et al.*, 2002). Grandillo *et al.* (1999b) detectaron un *QTL* mayor para forma del fruto (*fs8.1*) localizado en el brazo corto del cromosoma 8 para el cual el alelo de la especie silvestre reduce la longitud del fruto dando frutos con forma redonda. Gonzalo y van der Knaap (2008), evaluaron tres cruzamientos entre cultivares de frutos alargados que llevan distintos *loci* para forma de fruto (*sun*, *ovate* y *fs8.1*) con la especie silvestre *S. pimpinellifolium* y encontraron que si bien el control genético de la forma de fruto elongada en el germoplasma de tomate se debe principalmente a la acción de unos pocos *loci* mayores, la interacción entre éstos con *QTLs* menores probablemente juega un rol importante en la forma final que muestran los frutos de cada una de las variedades.

En esta experiencia se detectaron cuatro marcadores asociados a la firmeza de los frutos, de los cuales tres (*SSR601*, *SSR014* y *SSR320*) se ubican en el cromosoma 3 y todos ellos produjeron un aumento en el valor medio de firmeza de los frutos cuando el alelo silvestre estuvo presente (Tabla I-XVI). Si bien es posible que estos tres marcadores estén ligados a *QTLs* distintos es posible también que se trate del mismo *QTL*. Un indicio de esto último es que se observaron los mismos valores de firmeza para individuos heterocigotas para *SSR601* y *SSR320* con la misma probabilidad asociada y el mismo R^2 . El restante marcador (*SSR211044*) asociado a un incremento en la

firmeza de los frutos se localizó en el cromosoma 6. Por lo tanto, dos *QTLs* habrían sido detectados y con localización en los cromosomas 3 y 6. Ambos con efecto favorable como era esperable de acuerdo con lo observado en los progenitores. Por otra parte, ninguno de los *SSR* del cromosoma 3 mostró asociación con otros caracteres cuyos efectos fueran indeseables, lo que los convierte en *loci* útiles en programas de mejoramiento para mejorar la firmeza del fruto. Doganlar *et al.* (2002) detectaron dos *QTLs* en los cromosomas 2 y 10, sin embargo en sólo uno de ellos (*firm2.1*) el alelo silvestre estuvo asociado con un aumento en la firmeza. Tanksley *et al.* (1996) encontraron cuatro *QTLs* para firmeza de los cuales uno se localizó en el cromosoma 3 y el alelo silvestre incrementó significativamente la firmeza de los frutos, resultado coincidente con lo hallado en este trabajo. Si bien no podemos confirmar que sea el mismo *QTL* ya que en esta experiencia no se ha mapeado el *QTL* y por lo tanto no se conoce la posición exacta en el cromosoma.

Según Sacks y Francis (2001) mejorar el color del tomate implica un aumento en los valores de *a/b* y disminución en los de *L*. En este trabajo se han encontrado dos marcadores asociados al porcentaje de reflectancia (*L*) localizados en los cromosomas 6 y 7 (Tabla I-XVI). El *SSR211044* (Cr6) produjo un aumento del valor medio del carácter en aquellos individuos que portaron el alelo de LA722. A su vez este marcador estuvo asociado con un aumento en la firmeza de los frutos. El marcador *SSR276*, por el contrario, estuvo asociado a una disminución en los valores de *L* cuando el alelo silvestre estuvo presente pero por otro lado este marcador no mostró ninguna asociación con otro carácter, lo cual lo convierte en un marcador útil para aquellos programas de mejoramiento que intenten mejorar el color.

Para el caso del índice de color a/b se detectaron cuatro *SSR* asociados, de los cuales dos (*SSR032* y *SSR598*) ubicados en el cromosoma 2, estarían ligados al mismo *QTL*, dado que presentaron los mismos valores medios, R^2 y valor probabilístico (Tabla I-XVI). El efecto del alelo de LA722 para este *QTL* fue opuesto a lo esperado según el fenotipo de los progenitores. Otro hecho que corrobora que se trataría de un único *QTL* es que ambos mostraron asociación con la acidez titulable que presentó los mismos valores para ambos marcadores (Tabla I-XVI). Esto indicaría que este *QTL* ejercería efectos pleiotrópicos sobre el color y acidez de los frutos o bien que serían dos *QTLs* estrechamente ligados que controlan por separado estas características del fruto. Estudios adicionales que incluyan mapeo de alta resolución y quizás clonación de genes serán necesarios para discernir entre ambas hipótesis. Estos resultados concuerdan con trabajos realizados por Tanksley *et al.* (1996) quienes detectaron un *QTL* en el cromosoma 2, siendo el alelo silvestre el responsable del aumento de la intensidad del color, si bien no es posible asegurar que se trate en este trabajo del mismo *QTL*. Grandillo y Tanksley (1996) también encontraron *QTLs* que explican la variación del color en los cromosomas 2 y 6. Otros dos *QTLs* ligados a *SSR286* y *SSR070* que se localizan en los cromosoma 7 y 9, respectivamente fueron detectados para a/b (Tabla I-XVI). El primero de ellos disminuyó el carácter mientras que el último, como se mencionó anteriormente, resultó de gran importancia dado que la presencia del alelo silvestre no solo incrementó el color rojo de los frutos así como también el tamaño de los mismos. Dado que el índice de color a/b tiene relación lineal con el contenido en licopeno (Hyman *et al.* 2004) y el marcador *SSR070* del cromosoma 9 también estuvo asociado con un aumento del

tamaño de los frutos, el aumento del color no sería atribuible a un efecto de concentración de pigmentos por reducción del tamaño, sino a un aumento neto de los mismos.

Un único *QTL* fue detectado para el contenido en sólidos solubles, el cual estuvo ligado al *SSR080* localizado en el cromosoma 11. La presencia del alelo de LA722 produjo un aumento significativo en SS. A diferencia de otros trabajos, ningún *QTL* fue detectado en el cromosoma 9 para este carácter. Fridman *et al.* (2000) clonaron un *QTL* mayor (*Brix9-2-5*) localizado en el cromosoma 9 que explica más del 20 % de la variación fenotípica. Este *locus* codifica para una invertasa apoplástica (*LIN5*) que es expresada constitutivamente durante el desarrollo de la flor y el fruto y cataliza el transporte de sacarosa hacia el fruto. Dicho *QTL* reside en una región de 9 cM derivado de *S. pennellii*. Los trabajos de Paterson *et al.* (1988) llevados a cabo sobre una retrocruza originada a partir del cruzamiento entre una especie cultivada (*S. lycopersicum*) y un genotipo silvestre (*S. chmielewskii*) llevaron a la detección de *QTLs* para SS localizados en los cromosomas 3, 4, 5 y 7. Por su parte Saliba-Colombani *et al.* (2001) encontraron tres *QTLs*, para este carácter, dos de los cuales se ubicaron en el cromosoma 2 y el restante en el cromosoma 9. El pH del jugo homogeneizado de los frutos, fue el carácter con mayor cantidad de *QTLs* detectados. Se encontraron dos *QTLs* en el cromosoma 1 ligados a los microsatélites *SSR095* y *SSR288*, cuyos alelos silvestres tuvieron efectos opuestos aumentando y disminuyendo el pH, respectivamente (Tabla I-XVI). Los restantes *QTLs* se localizaron en los cromosomas 5, 8, 9 y 12, todos aumentaron la media con excepción del *QTL* ligado al *SSR069* (Cr9) para el cual el alelo aportado por LA722 produjo una

disminución del carácter. Causse *et al.* (2004) detectaron 15 *QTLs* para pH en un cruzamiento con la especie silvestre *S. pennellii*, de los cuales 11 aumentaron el valor medio del pH en individuos que portaban alelos de origen silvestre, además observaron que cinco *QTLs* eran comunes con la acidez, entre los cuales el alelo de *S. pennellii* aumentó la acidez y redujo el pH. En el presente trabajo sólo se obtuvieron dos marcadores (*SSR069* y *SSRH301*) asociados tanto al pH como a la acidez titulable, habiendo el primero aumentado At y disminuido el pH mientras que con el segundo hubo un comportamiento opuesto. Esta relación concuerda con la correlación fenotípica negativa significativa observada donde un mayor contenido de ácidos disminuye el pH de los frutos.

Debido a que no se observaron diferencias significativas en el pH de los progenitores (CAI y LA722), podría suponerse que todos los alelos de LA722 no tienen efectos en la misma dirección, ya que el pH es aumentado por el efecto de cuatro *QTLs* pero disminuido por el efecto de dos. Esto además daría una explicación de orden genético para la ampliación de la variación fenotípica observada en la generación BC₁ (Figura I-2). Estos resultados concuerdan con los encontrados por Paterson *et al.* (1988) quienes detectaron *QTLs* para pH localizados en los cromosomas 3, 6, 7, 8 y 10, donde los efectos del alelo silvestre fueron variables aumentando el pH en algunos casos y en otros disminuyéndolo.

Cinco *SSR* (*SSR032*, *SSR598*, *SSR070*, *SSR069* y *SSRH301*) presentaron asociación con la acidez titulable (Tabla I-XVI). Resulta interesante resaltar que los *SSR032* y *SSR598* localizados en el cromosoma 2 presentaron los mismos valores medios de At, R² y probabilidad asociada, de modo que

probablemente estén ligados al mismo *QTL*, donde el alelo de LA722 produjo una disminución en el carácter. Esto también indicaría que la distancia entre estos dos marcadores sería lo suficientemente pequeña para que no se haya producido recombinación entre los individuos BC₁ en el tamaño de población evaluado. Lo mismo ocurrió con los *SSR069* y *SSR070* ubicados en el cromosoma 9, aparentemente ligados al mismo *QTL*. Sin embargo el efecto sobre At fue opuesto al detectado en el cromosoma 2. El caso del *SSRH301* también mostró asociación con otros caracteres (Tabla I-XVI) y el alelo aportado por LA722 para dicho marcador produjo frutos más pequeños con mayor pH y menor acidez titulable. Como se mencionó anteriormente, el sabor de los frutos de tomate depende principalmente del contenido de azúcares y ácidos (Stevens *et al.*, 1977) y el correcto balance entre ellos se traduce en un buen sabor. Algunos investigadores (Stevens *et al.*, 1977; Jones y Scott, 1983) sostienen que un aumento en alguno de estos compuestos orgánicos produce una mejora en la calidad del sabor. Desde este punto de vista, resulta significativo el aporte del *QTL* asociado a los *SSR069* y *SSR070* donde el alelo silvestre incrementa la acidez titulable. Además el *SSR070* tiene un efecto deseado sobre el tamaño de los frutos que lo convierte en un marcador de interés para la introgresión de regiones genómicas de *S. pimpinellifolium* en la especie cultivada.

Es importante resaltar que la detección de *QTLs* en este trabajo se aplica estrictamente a un ambiente específico y para alelos de LA722 en heterocigosis, por lo tanto sólo *QTLs* con efectos mayormente dominantes o sobredominantes fueron detectados en las generaciones BC₁ y BC₂.

La mayoría de los estudios de detección de *QTL* han utilizado generaciones en las cuales los alelos de los progenitores se encuentran relativamente en alta frecuencia (por ejemplo F_2 , BC_1 , *RILs*). Tales generaciones (llamadas generaciones balanceadas) presentan algunas desventajas cuando son empleadas para transferir *QTLs* útiles desde un germoplasma silvestre a un genotipo cultivado. Entre éstas desventajas se encuentran: (1) alelos indeseables provenientes del progenitor silvestre que aparecen en alta frecuencia y puede reducir seriamente caracteres de interés. (2) Las interacciones epistáticas que son estadísticamente difíciles de detectar (3) Efectos pleiotrópicos sutiles, y a menudo negativos, que pueden no ser detectables en generaciones balanceadas debido a la gran variancia genética y fenotípica generada por la segregación de alelos donantes en alta frecuencia. Por lo tanto Tanksley y Nelson (1996) propusieron retrasar la detección de *QTLs* hasta la generación BC_2 o BC_3 como una posible solución de estos inconvenientes.

En esta experiencia la evaluación de la generación BC_2 con marcadores microsatélites permitió la detección de distintos *QTL* para varios caracteres de calidad (Tabla II-VI) a pesar de ser reducido el número de plantas.

De las asociaciones encontradas al analizar la BC_2 se destacan los *SSR601* y *SSR014* asociados los dos a la altura y la acidez titulable de los frutos (Tabla II-VI). Ambas asociaciones presentaron los mismo valores medios para individuos homocigotos y heterocigotas para ambos *loci*, con lo cual se trataría de un único *QTL* ligado a los dos *SSR* con efectos sobre los caracteres o a dos *QTLs* distintos ligados a los mismos dos *SSR* que controlan en forma separada la altura y la acidez titulable. En referencia a este último carácter, los

individuos que llevaron el alelo silvestre, exhibieron mayor contenido de ácidos, relacionado por otros autores (Stevens *et al.*, 1977) con una mejor calidad de sabor. En el caso de la altura de los frutos, ésta se vió disminuida por la presencia del alelo aportado por LA722. Estos resultados nuevamente concuerdan con estudios anteriores en los que se postula que los genes aportados por los genotipos silvestres presentan efectos dominantes o parcialmente dominantes sobre el tamaño y peso de los frutos (Weller *et al.*, 1988; Grandillo *et al.*, 1999b; Pereira da Costa *et al.*, 2009a).

La asociación de *SSR596* y *SSR318*, localizados en el cromosoma 10, con la altura, firmeza y vida poscosecha de los frutos también resulta interesante dado que al igual que en el caso anterior, ambos microsatélites se encontrarían ligados a tres *QTLs* distintos que controlan cada uno un carácter o a un único *QTL* que presenta efectos pleiotrópicos sobre dichas variables (Tabla II-VI). El efecto del alelo de origen silvestre fue producir un incremento en la vida poscosecha. Si bien este marcador resultaría de utilidad en un programa de mejoramiento sería importante romper el ligamiento que aparentemente existe con el *QTL* que controla la firmeza también ligado al *SSR596*, dado que el alelo silvestre disminuye la firmeza de los frutos y esto resulta un hecho desfavorable para el transporte del fruto durante su comercialización.

El *SSR220060* identificado en este trabajo (Tabla II-VI), asociado con caracteres relacionados con el tamaño (diámetro y altura) y el peso de los frutos, (discutido también con anterioridad), también fue encontrado ligado a un *QTL* detectado en la BC_1 y posiblemente se corresponda con el *locus fas* informado en estudios previos por Cong *et al.* (2008).

En esta experiencia se utilizaron familias BC_1S_1 con el objetivo de detectar nuevos *QTLs* y validar aquellos *QTLs* que fueron detectados previamente en las generaciones BC_1 y BC_2 . Tanksley y Nelson (1996) propusieron el método de retrocruzadas avanzadas utilizando familias BC_2S_1 o BC_2S_2 como estrategia para detectar alelos donantes de *QTLs* recesivos además de los alelos de *QTLs* con efectos aditivos y dominantes. Como se mencionó anteriormente, los *SSR* son altamente informativos debido a su naturaleza codominante, por tal motivo estos marcadores moleculares fueron utilizados para estudiar cada una de las familias de autofecundaciones BC_1S_1 .

En cada una de las familias fueron detectadas varias asociaciones ($p < 0,05$) con los marcadores microsatélites probados. Sin embargo sólo se tendrán en cuenta para esta discusión aquellas asociaciones detectadas en alguna familia con $p < 0,001$, las asociaciones que hayan validado alguna de las encontradas en BC_1 o BC_2 y también las que fueron encontradas en dos o más familias BC_1S_1 .

En el análisis de asociación de los marcadores *SSR* con caracteres fenotípicos en las cinco progenies BC_1S_1 se encontraron cinco nuevos *QTLs* para pH, altura, diámetro, forma y firmeza del fruto con probabilidad menor a 0,1% (Tabla III-XVII). Los marcadores *SSR598* y *SSR032* localizados en el cromosoma 2 y asociados a pH presentan valores medios para individuos homocigotas (CC), heterocigotas (CP) y homocigotas (PP) muy similares, así como un R^2 y probabilidad asociada también similar. En consecuencia podría interpretarse que los dos marcadores se encuentran ligados a un mismo *QTL* y que explica el 38 % de la variación fenotípica observada. A nivel molecular el cálculo de los grado de dominancia (d/a) indica dominancia del alelo de LA722.

Sin embargo este *QTL* no fue detectado en la BC_1 (Tabla III-VIII). Esto podría deberse a que la recombinación ocurrida durante la autofecundación generó un *background* diferente que pudo haber modificado la expresión de dicho *QTL* o bien a la existencia de un efecto ambiental sobre el mismo. Fulton *et al.* (2000 y 2002) encontraron *QTLs* para el pH localizados en varios cromosomas, incluso en el cromosoma 2, sin embargo el porcentaje de variación fenotípica explicada por dicho *QTL* fue marcadamente inferior que el detectado en la presente experiencia. Además observaron que varios *QTLs* mostraron efectos inconsistentes cuando fueron evaluados en distintas localidades. Estos mismos *SSR* (*SSR598* y *SSR032*) estuvieron asociados a *At* al evaluar la generación BC_1 , variable que mostró correlación negativa significativa con el pH en dicha población.

El marcador *SSR045* (Cr7) fue encontrado asociado ($p < 0,001$) al diámetro de los frutos en la familia BC_1S_1 (VII-51) (Tabla III-XIV), si bien no hubo diferencias significativas entre los individuos homocigotas para el alelo de *CAI* y homocigotas para el alelo de *LA722*, los individuos que presentaron el marcador *SSR045* en estado heterocigota presentaron un diámetro marcadamente superior y este *QTL* explicó casi el 50 % de la variación fenotípica observada, pudiendo considerarse un *QTL* mayor y con efecto heterótico. Lippman y Tanksley (2001) encontraron siete *QTLs* para el diámetro de los frutos los que también coincidieron con *QTLs* detectados para la altura menos uno, localizado en el cromosoma 7, cuyo alelo silvestre reduce el valor medio del carácter.

Para la altura de los frutos se encontró un *QTL* localizado en el cromosoma 10 que explicó el 48 % de la variación fenotípica observada en la

familia BC₁S₁ (VII-51) (Tabla III-XIV). Los grados de acción génica indicaron dominancia parcial de LA722 de acuerdo a lo esperado con el fenotipo de los progenitores. Esto concuerda con trabajos de Grandillo *et al.* (1999b) que han postulado que los alelos aportados por genotipos silvestres son semidominantes sobre los aportados por el progenitor de frutos grandes. El *QTL* para altura encontrado en este trabajo, no ha sido informado hasta el momento, si bien se han informado dos *QTLs* (*fs10.1* y *fs10.2*) para forma de fruto, carácter que está correlacionado con la altura en el cromosoma 10, cuyos alelos silvestres disminuyeron el índice de forma (Fulton *et al.*, 1997; Bernacchi *et al.*, 1998).

Para la firmeza de los frutos se detectó un *QTL* en la familia BC₁S₁ (VII-91) (Tabla III-XVI), que explicó el 32 % de la variación fenotípica, ligado al *SSR288* (Cr1). La presencia del alelo silvestre para dicho *QTL* produjo una disminución en la media, contrariamente a lo esperado de acuerdo a los fenotipos observados en los progenitores. Hasta el momento varios *QTLs* para firmeza de los frutos han sido informados localizados en el cromosoma 4 (Saliba-Colombani *et al.*, 2001; Causse *et al.*, 2002), mientras que Doganlar *et al.* (2002) detectaron *QTLs* para éste carácter en los cromosomas 2 y 10, siendo variables los efectos fenotípicos del alelo silvestre. El *QTL* detectado en este trabajo tiene relevancia desde el punto de vista del mejoramiento, dado que el aumento de la firmeza de los frutos es otro carácter deseado ya que reduce el daño de los frutos de tomate durante el transporte en su comercialización.

Finalmente un *QTL* para forma de fruto fue identificado en la familia BC₁S₁ (VII-91) ligado al *SSR1061* localizado en el cromosoma 11 (Tabla III-

XVI). No hubo diferencias significativas entre los individuos que llevaron los alelos de CAI y LA722 al estado homocigota, pero aquellos que presentaron el *locus* al estado heterocigota mostraron mayor índice de forma, evidenciando una interacción intralocus de heterosis o sobredominancia. La fracción de la variación fenotípica explicada por este *QTL* fue 0,40. van der Knaap *et al.* (2001) encontraron un *QTL* localizado en el cromosoma 11 que afecta a la forma de los frutos de tomate en estudios realizados en una población F_2 generada a partir del cruzamiento entre el cultivar Long John y la accesión LA1589 de *S. pimpinellifolium*, donde el alelo silvestre disminuyó el valor medio del carácter y explicó el 16 % de la variación fenotípica. Efectos similares fueron observados en dos *QTLs* encontrados por Bernacchi *et al.* (1998) en el cromosoma 11 al evaluar una generación BC_3 derivada del cruzamiento entre el cultivar E6203 de *S. lycopersicum* y la accesión LA1777 de *S. habrochites*. Gonzalo y van der Knaap (2008) postularon que si bien la forma elongada de los frutos está determinada por tres *QTLs* mayores (*sun*, *ovate* y *fs8.1*), otros *QTLs* con efectos menores pueden interactuar con los anteriores y probablemente tener un rol importante en la forma final de los frutos de distintos genotipos.

Cabe destacar que todos los *QTLs* detectados con significado al 0,1 % en alguna de las cinco familias presentaron un R^2 elevado (entre 0,32 y 0,48). Solamente dos de ellos (un *QTL* para diámetro asociado a *SSR045* y un *QTL* para forma asociado a *SSR1061*) concuerdan con *QTLs* informados anteriormente (Lippman y Tanksley, 2001; van der Knaap *et al.*, 2001). Estos *QTLs* podrían considerarse como mayores.

No se detectaron *SSR* asociados a vida poscosecha con significado al 0,1 %, pero si al 5 %. Los *SSR327* (Cr8) y *SSR596* (Cr10) estuvieron asociados a la vida poscosecha (Tabla III-XII y Tabla III-XIV) y el alelo de LA722 produjo un aumento de la media, pero su efecto fue recesivo frente al efecto del alelo de CAI, razón por la cual probablemente no fue detectado en la BC₁ ni en la BC₂. En concordancia con Pereira da Costa *et al.* (2009a) y Rodríguez *et al.* (2010) los alelos aportados por el progenitor silvestre contribuyeron a aumentar la vida poscosecha. Uno de los marcadores (*SSR596*) se encuentra en el mismo cromosoma (Cr10) donde fue mapeado el gen *nor* (Tigchelaar *et al.*, 1973), el cual es un mutante natural que prolonga la vida poscosecha de los frutos. Es posible que dicho marcador se encuentre cercano a un *QTL* que podría ser una versión alélica del gen *nor*. Recientemente, Casals *et al.* (2011) han demostrado que el gen mutante *alc*, presente en distintas variedades españolas de tomate cultivado Penjar, es alélico al gen *nor* y consiste de una mutación en posición 317 del gen codificante que genera una alteración en la secuencia de la proteína, cambiando una valina por un L-aspártico.

Otros dos microsatélites (*SSR034* y *SSR080* del cromosoma 10 y 11, respectivamente) (Tabla III-XVI y Tabla III-XIV) también estuvieron asociados con la vida poscosecha de los frutos, sin embargo en este caso los individuos heterocigotas fueron quienes presentaron más larga vida, mientras que los homocigotas para CAI y LA722 no mostraron diferencias; esto indicaría algún tipo de interacción intralocus (heterosis o sobredominancia). Por último, el *SSR288* del cromosoma 1 estuvo ligado a un *QTL* para vida poscosecha, pero a diferencia de los anteriores, fue el alelo de origen cultivado el que prolongó la

vida poscosecha (Tabla III-XVI). Estos resultados demuestran la presencia de alelos favorables para este carácter en el genotipo cultivado. Sin embargo el fenotipo observado para CAI resulta inferior al del progenitor silvestre. Es probable que otros *loci* con efectos negativos sobre Lv presentes en CAI, no detectados en este trabajo, determinen el valor fenotípico final. Esta idea fue también sugerida por Pratta *et al.* (2011a), quienes al evaluar 16 *RILs* derivadas de un cruzamiento entre el cultivar Caimanta y la accesión LA722 de *S. pimpinellifolium* encontraron un fragmento de *AFLP* originado en Caimanta que prolongó la vida poscosecha.

La comparación de los *QTLs* detectados en la generación BC₂ con aquellos encontrados en las generaciones anteriores BC₁ y BC₁S₁ con el propósito de validarlos permitió establecer que el marcador SSR220060 (Cr11) estuvo asociado al peso de los frutos en las tres generaciones estudiadas y a la altura en dos de ellas. Siempre el alelo silvestre disminuyó el carácter demostrando consistencia en su comportamiento (Tabla III-XX). Otro *QTL* que se detectó en las tres generaciones es un *QTL* para altura de los frutos ligado al SSR596 del cromosoma 10, para el cual el efecto del alelo aportado por LA722 también fue consistente, disminuyendo la altura promedio de los frutos en aquellas plantas que lo portaron (Tabla III-XX). Este mismo marcador presentó asociación con la vida poscosecha de los frutos en dos de las generaciones analizadas (BC₂ y BC₁S₁) siendo favorable el efecto del alelo silvestre al aumentar el carácter. Este marcador, como ya se indicó cobra real importancia en programas de mejoramiento tendiente a aumentar la vida poscosecha de los frutos. Si bien no se observó ningún tipo de correlación entre la vida poscosecha y la altura de los frutos sería importante determinar si

es un mismo *QTL* con efectos pleiotrópicos sobre la altura y *Lv* o si son dos *QTL* estrechamente ligados.

La altura de los frutos también se vio asociada al *SSR318* en las BC_1 y BC_2 , pero el efecto del alelo silvestre no fue consistente, ya que aumentaba la altura de los frutos en el primer caso y la disminuía en el segundo (Tabla III-XX). En la BC_2 a diferencia de la BC_1 este marcador no mostró asociación con otros caracteres relacionados con el tamaño. Si bien en un primer momento se podría haber pensado que un mismo *QTL* ejercía efectos pleiotrópicos sobre la altura, diámetro y peso, estos resultados estarían indicando que se trataban de diferentes *QTL* de modo que en la generación BC_2 dichos *QTLs* recombinaron segregando únicamente el *QTL* asociado a *SSR318* para altura de los frutos. En caso de que dicho *QTL* hubiese ejercido efectos pleiotrópicos deberían haberse detectados también en la BC_2 .

La comparación entre los *QTL* detectados en la BC_1 y en las familias BC_1S_1 permitió validar nueve asociaciones (Tabla III-XIX). El hecho de que la BC_1 sea una generación segregante, impide el ensayo replicado en diferentes ambientes, por tal motivo, probar la detección de *QTL* en familias generadas por autofecundación es una alternativa para validar las asociaciones encontradas. Por otro lado, durante el proceso de introgresión de regiones genómicas cuyos efectos resultan recesivos sobre un determinado carácter de interés, es apropiado obtener la autofecundación, para identificar entre estas plantas, aquellas que sean homocigotas para dicha región, para luego ser cruzadas nuevamente con el progenitor recurrente. El *SSR034* (Cr10) fue encontrado asociado al contenido en sólidos solubles en las familias BC_1S_1 (VII-51) y BC_1S_1 (VII-91) y su efecto sobre el carácter fue consistente en ambas

familias, siendo el alelo silvestre el que contribuyó a un aumento del contenido en sólidos solubles (Tabla III-XIX). Este marcador resulta interesante, dado que se encuentra asociado a una región cromosómica de interés para ser introgresada en la línea cultivada para mejorar el sabor de los frutos. Otro marcador (*SSR220060*) asociado a peso de los frutos mostró consistencia en el efecto del alelo de LA722, disminuyendo el carácter tanto en la BC_1 como en la familia BC_1S_1 (IX-14) donde fue detectado (Tabla III-XIX). Estudios anteriores (Brewer *et al.*, 2007; Gonzalo *et al.*, 2009) encontraron dos *QTLs* de efecto mayor localizados en el cromosoma 11, denominados *fw11.3* y *fas*. El gen *FAS* codifica para un factor de transcripción YABBY y la disminución de la expresión del gen es causado por una inserción en el primer intrón (estimada en 6 a 8 kb) que resulta en frutos con mayor número de lóculos y en consecuencia en frutos más grande. Estudios recientes de Huang y van der Knaap (2011) han demostrado que estos dos *loci* no son alélicos, sino que se tratan de dos *loci* separados que controlan el peso de los frutos. A diferencia de la mayoría de los *loci* que controlan este carácter, el alelo mutante de *fw11.3* es parcialmente dominante sobre el alelo silvestre. En el caso del *QTL* detectado en esta experiencia, la evaluación en la familia BC_1S_1 (IX-14) permitió determinar el efecto dominante del alelo aportado por el progenitor cultivado. Si bien en este trabajo no se evaluó el número de lóculos se ha informado que CAI presenta mayor número de lóculos que el genotipo silvestre (Pereira da Costa *et al.*, 2009b).

El resto de las asociaciones validadas al comparar familias o éstas con la generación BC_1 no mostraron un efecto consistente del efecto del alelo silvestre sobre el carácter al cual mostraron asociación. Estudios realizados por

Asíns *et al.* (1994) en el que evaluaron 15 caracteres cuantitativos durante tres años en una crucea intervartietal, detectaron al menos 17 *QTL* putativos, de los cuales solamente tres tuvieron efectos consistentes durante los tres años, postulando tres posibles causas en relación a esta carencia de estabilidad: el poder del test estadístico usado, la baja contribución del *QTL* a la variación genética del carácter y la expresión génica diferencial dependiendo del año (interacción G x E). La mayoría de los casos que muestran carencia de estabilidad involucran caracteres cuya heredabilidad cambia drásticamente año a año y/o cuyos coeficientes de correlación entre años es bajo, sugiriendo la presencia de G x E como la causa más probable (Pratta *et al.*, 2011a). Como es sabido, la variación genética que subyace a los caracteres cuantitativos, resulta de la segregación de numerosos *loci* para caracteres cuantitativos (*QTL*) donde cada uno explica una baja proporción de la variación total y cuya expresión es modificada por interacción con otros genes o por el ambiente (Mackay, 2001). Todas estas observaciones son causas que explican la falta de consistencia en el efecto de un *QTL*. La discrepancia en la expresión de *QTLs* puede atribuirse tanto a causas biológicas como experimentales. De hecho, Chaïb *et al.* (2006) estudiaron la estabilidad de los *QTLs* en generaciones avanzadas y sobre distintos *background* genéticos, comparando los *QTLs* detectados en una población de *RILs* con aquellos detectados en generaciones BC_3S_1 y *QTL-NILs* y encontraron grandes diferencias en el efecto alélico de los *QTLs* en los diferentes *background* genéticos. Por otro lado, el poder de detección de *QTLs*, que está relacionado con la estructura genética de la población, podría ser una de las razones experimentales que puede participar en las diferencias observadas.

La no detección de *QTLs* en las familias, que previamente fueron detectados en la BC_1 o BC_2 , como así también la observación de caracteres asociados a marcadores que no fueron evidenciadas anteriormente, puede deberse a la pérdida en el primer caso o formación de ligamiento en el segundo, entre microsatélites y *QTLs* como consecuencia de la recombinación ocurrida durante los cruzamientos. Chaïb *et al.* (2006) postularon que nuevos *QTLs* pueden aparecer debido a la fijación de *QTLs* mayores que previamente segregaban y que esta fijación puede explicar además la variación en los efectos de *QTLs* detectados en más de una generación. Otra causa posible de la falta de consistencia en el efecto de un *QTLs* o la detección en una generación y no en otra serían las interacciones epistáticas entre *QTLs* para un determinado carácter. De hecho hubo evidencias de epistasis entre los *SSR295* y *SSR327* asociados al contenido en sólidos solubles en la familia BC_1S_1 (IX-14), que no fueron detectados en BC_1 , y ambos *SSR* explicaron en conjunto el 63 % de la variación fenotípica observada en dicha familia.

Es importante destacar que en todos los cromosomas se encontró (con $p < 0,001$) o validó al menos un *QTL* con excepción de los cromosomas 4, 5, 9 y 12. La no detección de *QTLs* en el cromosoma 4 se debe a que no se evaluó ningún marcador *SSR* localizado en dicho cromosoma. Se han informado previamente varios *QTLs* localizados en estos cromosomas para los caracteres aquí evaluados (Grandillo y Tanksley, 1996; Lippman y Tanksley, 2001; Bertin *et al.*, 2009). El análisis de todas las generaciones estudiadas en esta experiencia permitió detectar *QTLs* para todos los caracteres en al menos una generación segregante.

La presencia de marcadores relacionados a caracteres de calidad para el fruto aquí detectados demostraría que habría una variabilidad genética encubierta que puede ser aprovechada y que aún no ha sido suficientemente explorada. Estos diseños de cruzamientos interespecíficos serían sumamente apropiados para aquellos caracteres que han sido descuidados durante el proceso de domesticación de esta especie y que quieren ser introgresados en programas de mejoramiento.

CONCLUSIONES

El genotipo silvestre LA722 de *S. pimpinellifolium* tuvo mejores características de calidad y más larga vida poscosecha, aunque presentó frutos de menor tamaño y peso que el genotipo cultivado Caimanta de *S. lycopersicum*. A su vez, LA722 presentó dominancia parcial sobre caracteres de calidad y tamaño y dominancia completa sobre la vida poscosecha al evaluar la F₁ respecto de sus genotipos progenitores.

Se observó una ampliación de la variación fenotípica en la generación BC₁ originada al cruzar la F₁, del cruzamiento entre Caimanta y LA722 hacia el progenitor cultivado, para todos los caracteres, incluso para aquellos (pH y SS) en los que no se encontraron diferencias significativas entre los genotipos progenitores.

Una gran proporción de la variación fenotípica observada en las generaciones BC₁ y BC₁S₁ para los caracteres de calidad es debida a componentes genéticos.

Se encontraron correlaciones fenotípicas significativas entre algunos caracteres de calidad de fruto en la primera generación de retrocruza.

Se encontró polimorfismo en los perfiles polipeptídicos de pericarpio entre los progenitores y la F₁ en ambos estados de madurez del fruto, observándose variabilidad para dichos perfiles en la generación BC₁.

Se detectaron polipéptidos asociados a caracteres de calidad tales como firmeza, pH, altura, forma y vida poscosecha de los frutos en la generación BC₁.

La presencia de un polipéptido en estado verde maduro de 45 kDa aportado por LA722 en la BC₁ prolonga la vida poscosecha de los frutos.

En estado rojo maduro un polipéptido de 66 kDa proveniente del genotipo silvestre disminuyó el pH de los frutos en la BC₁.

Se encontró un alto polimorfismo para bandas de *SRAP* en los progenitores y la F₁. Así mismo, una gran variabilidad fue observada para fragmentos de *SRAP* en la generación BC₁.

Se encontraron fragmentos de *SRAP* asociados a varios caracteres fenotípicos, demostrando la utilidad de este tipo de marcadores para analizar asociaciones con caracteres de calidad de fruto en generaciones segregantes tal como una primera retrocruza.

Los marcadores microsatélites (*SSR*) permitieron detectar *QTLs* para todos los caracteres de calidad que fueron evaluados en las generaciones segregantes (BC₁, BC₂ y BC₁S₁) obtenidas de un mismo tipo de cruzamiento interespecífico.

Los alelos de origen silvestre de los *QTLs* que fueron detectados en las generaciones BC₁ y BC₂ presentaron principalmente efectos dominantes o semidominantes.

Varios *QTLs* cuyos alelos silvestres tienen efecto recesivo fueron recién detectados en familias BC₁S₁ entre los que se destacan los *QTLs* para vida poscosecha de los frutos.

La comparación de *QTLs* detectados en más de una generación permitió validar 12 *QTLs* entre los que se encuentra un *QTL* para vida poscosecha de

los frutos (*SSR596*), localizado en el cromosoma 10. Por otro lado 11 *QTLs* asociados a otros caracteres de calidad fueron detectados ($p < 0,001$) en alguna de las generaciones evaluadas.

Los marcadores moleculares utilizados en esta experiencia permiten detectar regiones genómicas asociadas a caracteres de calidad y vida poscosecha de los frutos las que fueron introgresadas desde el germoplasma de LA722.

Estos resultados permiten concluir que la introgresión de regiones genómicas asociadas a la vida poscosecha y a la calidad del fruto de *S. pimpinellifolium* pueden mejorar a la especie cultivada. Además, el uso de marcadores moleculares hace más eficiente la identificación de los fragmentos del genotipo donante y la recuperación del genoma del genotipo recurrente.

CONSIDERACIONES FINALES

Se define a las líneas casi isogénicas (*NILs*, *Near Isogenic Lines*) como aquellas que difieren en uno o unos pocos genes. Son líneas que contienen un fragmento cromosómico de un progenitor que actúa como donante dentro del fondo genético de otro progenitor que actúa como receptor. En esta experiencia el progenitor donante fue la línea LA722 de *S. pimpinellifolium* y el progenitor receptor, utilizado como recurrente en el esquema de cruzamientos de las retrocruzas, ha sido el cultivar argentino Caimanta de *S. lycopersicum*. Este diseño de cruzamientos y a posteriori retrocruzas, permitió obtener los genotipos que se describen en el trabajo y que serán la base de futuras *NILs*.

La posibilidad de obtener *NILs*, a partir de los resultados obtenidos en esta experiencia, se ha visto favorecida por el uso de distintos marcadores moleculares. De hecho es posible reducir la cantidad de generaciones de retrocruzas al seleccionar plantas BC₂ individuales en las que un único *SSR* se encuentre al estado heterocigota y la mayoría de los *SSR* restantes se encuentre al estado homocigota. De esta manera en una generación BC₃ o BC₄ será posible obtener 30 *NILs* (una para cada uno de los 30 marcadores *SSR* aquí utilizados) donde cada una de ellas contenga un fragmento de ADN distinto, introgresado a partir de LA722 en el *background* del genotipo cultivado.

La información generada a partir de esta Tesis Doctoral permitió seleccionar plantas BC₂ con un número reducido de microsatélites en estado heterocigota, que fueron retrocruzadas hacia Caimanta, para obtener las generaciones BC₃ y BC₄ que serán evaluadas en la campaña 2012/2013. La posterior evaluación de estas *NILs* y su comparación con el cultivar Caimanta,

permitirá adjudicar las diferencias fenotípicas encontradas al fragmento de ADN introgresado.

La ventaja de contar con una población de *NILs* radica en la posibilidad de evaluar el efecto de los segmentos introgresados en distintas localidades y años, constituyéndose además en una población de mapeo eterna. Por otro lado, este tipo de generación de nuevos materiales permitiría realizar estudios posgenómicos (proteómica, transcriptómica, etc.) de aquellas regiones genómicas que rigen caracteres de interés agronómico.

La generación de estos genotipos (con fragmentos genómicos de la accesión LA722 de la especie silvestre *S. pimpinellifolium* introducidos en el cultivar argentino Caimanta) son excelentes recursos genéticos para el mejoramiento de este cultivo.

BIBLIOGRAFIA

Alpert, K. and Tanksley, S.D. (1996) High-resolution mapping and isolation of a yeast artificial chromosome contig containing *fw2.2*: a major fruit weight quantitative *locus* in tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93: 15503-15507.

Andrade Júnior, V.C.; Maluf, W.R.; Faria, M.V.; Gandolfi Benites, F.R.; Santos Júnior, A.M. (2005) Produção e qualidade de frutos de tomateiros portadores de alelos mutantes de madurecimento e coloração. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 40(6):555-561.

Angosto Trillo, T.; Lozano Ruíz, R.; Martínez Zapater, J.M.; Capel Salinas, J.; Jamilena Quesada, M.; Cervera, M.; Anastasio Ramón, G.; Arroyo García, R.; Abad, J. (2001) Mejora genética del sabor en tomate: Identificación de marcadores moleculares (PCR-AFLPs) para selección de genotipos de interés agronómico. FIAPA, Fundación para la Investigación Agraria de la Provincia de Almería; <http://www.fiapa.es>.

Areshchenkova, T. and Ganal, M.W. (1999) Long tomato microsatellites are predominantly associated with centromeric regions. *Genome* 42: 536-544.

Asíns, M.J.; Mestre, P.; Gracia, J.E.; Dicenta, F.; Carbonell, E.A. (1994) Genetic x environment interaction in QTL analysis of an intervarietal almond cross by means of genetic markers. *Theoretical and Applied Genetics* 89(2-3): 358-364.

- Azanza, F.; Young, T.E.; Kim, D.; Tanksley, S.D.; Juvik, J.A. (1995) Characterization of the effects of the introgressed segments of chromosome 7 and 10 from *Lycopersicon chmielewskii* on tomato soluble solids, pH and yield. *Theoretical and Applied Genetics* 87: 965-972.
- Bartoszewski, G.; Niedziela, A.; Szwacka, M.; Niemirowicz-Szczytt, K. (2003) Modification of tomato taste in transgenic plants carrying a thaumathin gene from *Thaumatococcus daniellii* Benth. *Plant Breeding* 122: 347-351.
- Barry, C.S. and Giovannoni, J.J. (2006) Ripening in the tomato *Green-ripe* mutant is inhibited by ectopic expression of a protein that disrupts ethylene signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 10(20):7923-7928.
- Bernacchi, D.; Beck-Bunn, T.; Emmatly, D.; Eshed, Y.; Inai, S.; Lopez, J.; Petiard, V.; Sayama, H.; Uhlig, J.; Zamir, D.; Tanksley, S.D. (1998) II Evaluation of near isogenic lines carrying single-donor introgressions for desirable wild QTL–alleles derived from *Lycopersicon hirsutum* and *L. pimpinellifolium*. *Theoretical and Applied Genetics* 97: 170-180.
- Bertin, N.; Causse, M.; Brunel. B.; Tricon, D.; Génard, M. (2009) Identification of growth processes involved in QTLs for tomato fruit size and composition. *Journal of Experimental Botany* 60(1): 237-248.
- Biggs, M.S.; Harriman, R.W.; Handa, A.K. (1986) Changes in genes expression during tomato fruit ripening. *Plant Physiology* 81: 395-403.

- Blum, A.; Merei, M.; Wirsansky, I.; Ben-Arzi, S. (2005) The beneficial effects of tomatoes. *Experimental Journal of Internal Medicine* 16: 402-404.
- Bretting, P.K. and Widrechner, M.P. (1995) Genetic markers and plant genetic resource management. *Plant Breeding Review* 13: 11-86.
- Brewer, M.T.; Moyseenko, J.B.; Monforte, A.J.; van der Knaap, E. (2007) Morphological variation in tomato: a comprehensive study of quantitative trait loci controlling fruit shape and development. *Journal of Experimental Botany* 58(6): 1339-1349.
- Broun, P. and Tanksley, S.D. (1996) Characterization and genetic mapping of simple repeat sequences in the tomato genome. *Molecular and General Genetics* 250: 39-49.
- Buescher, R.W.; Sistrunk, W.A.; Tigchelaar, E.C.; Ng, T.J. (1976) Softening, pectolytic activity and storage life of *rin* and *nor* tomato hybrids. *HortScience* 11(5): 603-605.
- Carbone, F.; Pizzichini, D.; Giuliano, G.; Rosati, C.; Perrotta, G. (2005) Comparative profiling of tomato fruits and leaves evidences a complex modulations of global transcript profiles. *Plant Science* 169: 165-175.
- Casals, J.; Pascual, L.; Cañizares, J.; Cebolla-Cornejo, J.; Casañas, F.; Nuez, F. (2011) Genetic basis of long shelf life and variability into Penjar tomato. *Genetic Resources and Crop Evolution* doi: 10.1007/s10722-011-9677-6.

- Causse, M.; Saliba-Colombani, V.; Lecomte, L.; Duffé, P.; Rousselle, P.; Buret, M. (2002) QTL analysis of fruit quality in fresh market tomato: a few chromosome regions control the variation of sensory and instrumental traits. *Journal of Experimental Botany* 53(377): 2089-2098.
- Causse, M.; Duffé, P.; Gomez, M.C.; Buret, M.; Damidaux, R.; Zamir, D.; Gur, A.; Chevalier, C.; Lemaire-Chamlay, M.; Rothan, C. (2004) A genetic map of candidate genes and QTLs involved in tomato fruit size and composition. *Journal of Experimental Botany* 1-15.
- Chalukova, M. and Manuehyan, H. (1991) Breeding for carotenoid pigments in tomato. In: Kalloo, G. (Ed.) Genetic improvement of tomato. Springer – Verlag. Berlin: 179–195.
- Chaïb, J.; Lecomte, L.; Buret, M.; Causse, M. (2006) Stability over genetic backgrounds, generations and years of quantitative trait locus (QTL) for organoleptic quality in tomato. *Theoretical and Applied Genetics* 112: 934-944.
- Chetelat, R.T.; De Verna, J.W.; Bennett, A.B. (1995) Introgression into tomato (*Lycopersicon esculentum*) of the *L. chmielewskii* sucrose accumulator gene (sucr) controlling fruit sugar composition. *Theoretical and Applied Genetics* 91: 327-333.
- Comlekcioglu, N.; Simsek, O.; Boncuk, M.; Aka-Kacar, Y. (2010) Genetic characterization of heat tolerant tomato (*Solanum lycopersicon*) genotypes by SRAP and RAPD markers. *Genetics and Molecular Research* 9(4): 2263-2274.

- Cong, B.; Barrero, L.S.; Tanksley, S.D. (2008) Regulatory change in YABBY-like transcription factor led to evolution of extreme fruit size during tomato domestication. *Nature Genetics* 40: 800-804.
- Corominas, J. (1990) Breve diccionario etimológico de la lengua castellana. Ed. Gredos, Madrid, pp 628.
- De Candolle, A. (1886) Origin of cultivated plants. Ed. Hafner Publishing Company, New York, pp. 468 (reprint 1959).
- De Bruyn, J.W.; Garretsen, F.; Kooistra, E. (1971) Variation in taste and chemical composition of the tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Euphytica* 20: 214-227.
- Del Luca, S.; Bregoli, A.M.; Serafín-Fracassini, D.; Dondini, L.; Creus, J.; D'Orazi, D. (2000). Tuber vegetative stages and cell cycle in *Helianthus tuberosus* protein pattern and their modification by spermidine. *Jornal of Plant Physiology* 156: 17-25.
- Di Renzo, J.A.; Casanoves, F.; Balzarini, M.G.; Gonzalez, L.; Tablada, M.; Robledo, C.W. (2001). *Infostat*, versión 2001, Grupo Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Doganlar, S.; Frary, A.; Ku, H.M.; Tanksley, S.D. (2002) Mapping quantitative trait loci in inbred backcross lines of *Lycopersicon pimpinellifolium* (LA1589). *Genome* 45: 1189-1202.

Falconer, D.S. and Mackay, T.F.C. (1996) Introduction to Quantitative Genetics. Fourth Edition Longman Group Ltd., Edinburgh Gate England, pp 184-201.

FAO. Base de datos Estadísticos (2009) FAOSTAT Agriculture data. <http://faostat.fao.org>.

Fender, S.E. and O'Connell, M.A. (1990) Expression of the heat shock response in a tomato interspecific hybrid is not intermediate between the two parental responses. *Plant Physiology* 93: 1140-1146.

Ferriol, M.; Picó, B.; Nuez, F. (2003) Genetic diversity of germplasm collection of *Curcubita pepo* using SRAP and AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 271-282.

Ferriol, M.; Picó, B.; Fernández de Córdova, P.; Nuez, F. (2004) Molecular diversity of a germplasm collection of Squash (*Cucurbita moschata*) determined by SRAP and AFLP markers. *Crop Science* 44: 653-664.

Fogle, H.W. and Currence, T.M. (1950) Inheritance of fruit weight and earliness in a tomato cross. *Genetics* 35: 363-380.

Frary, A.; Nesbitt, C.; Frary, A.; Grandillo, S.; van der Knaap, E.; Cong, B.; Liu, J.; Meller, J.; Elber, R.; Alpert, K.; Tanksley, S.D. (2000) *fw2.2*: a quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science* 289: 85-88.

Frary, A.; Xu, J.; Liu, L.; Mitchell, S.; Tedeschi, E. and Tanksley, S.D. (2005) Development of a set of PCR-based anchor markers encompassing the

tomato genome and evaluation of their usefulness for genetics and breeding experiments. *Theoretical and Applied Genetics* 111: 291-312.

Fridman, E.; Pleban, T.; Zamir, D. (2000) A recombination hot spot delimits a wild species quantitative trait locus for tomato sugar content to 484 pb within an invertase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 4718-4723.

Fridman, E.; Carrari, F.; Liu, Y-S.; Fernie, A.; Zamir, D. (2004) Zooming-in on a Quantitative Trait Nucleotide (QTN) for Tomato Yield using Wild Species Introgression Lines. *Science* 305: 1786-1789.

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

Fulton, T.M.; Grandillo, S.; Beck-Bunn, T., Fridman, E.; Frampton, A.; Lopez, J.; Petiard, V.; Uhlig, J.; Zamir, D.; Tanksley, S.D. (2000) Advanced backcross QTL analysis of a *Lycopersicon esculentum* x *Lycopersicon parviflorum* cross. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 1025-1042.

Fulton, T.M.; Bucheli, P.; Voirol, E.; López, J.; Pétiard, V.; Tanksley, S.D. (2002) Quantitative Trait Loci (QTL) affecting sugar organic acids and other biochemical properties possibly contributing to flavour identified in four advanced backcross population of tomato. *Euphytica* 127: 163-177.

- Gallo, M.; Rodríguez, G.R.; Pratta, G.R.; Zorzoli, R.; Picardi, L.A. (2010) Proteómica de la madurez del tomate: identificación de dos estados de madurez del fruto por perfiles proteicos totales del pericarpio en *RILs* de tomate. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo* 42(2): 119-133.
- Garello, G; Barthe, P.; Bonelli, M.; Bianco-Trinchant, J.; Le Page-Degivry, M.T. (2000) Abscisic acid regulated responses of dormant and non-dormant embryos of *H. annuus*: Role of ABA-inducible proteins. *Plant Physiology and Biochemistry* 38: 473-482.
- Georgelis, N. and Scott, J.W. (2006) Inheritance of high sugars from tomato accession PI270248 and environmental variation between seasons. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 131(1): 41-45.
- Giovannoni, J.J. (2004) Genetic regulation of fruit development and ripening. *The Plant Cell* 16: 170-180 (Supplement).
- Gonzalo, M.J. and van der Knaap, E. (2008) A comparative analysis into the genetic bases of morphology in tomato varieties exhibiting elongated fruit shape. *Theoretical and Applied Genetics* 116: 647-656.
- Gonzalo, M.J.; Brewer, M.T.; Anderson, C.; Sullivan, D.; Gray, S.; van der Knaap, E. (2009) Tomato fruit shape analysis using morphometric and morphology attributes implemented in tomato analyzer software program. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 134:77-87.

Grandillo, S.; Ku, H.M.; Tanksley, S.D. (1996) Characterization of *fs8.1*, a major QTL influencing fruit shape in tomato. *Molecular Breeding* 2: 251-260.

Grandillo, S. and Tanksley, S.D. (1996) Genetic analysis of RFLPs, GATA microsatellites and RAPDs in a cross between *L. esculentum* and *L. pimpinellifolium*. *Theoretical and Applied Genetics* 92: 957-965.

Grandillo, S.; Zamir, D.; Tanksley, S.D. (1999a) Genetic improvement of processing tomatoes: A 20 years perspective. *Euphytica* 110: 85-97.

Grandillo, S.; Ku, H.M.; Tanksley, S.D. (1999b) Identifying the loci responsible for natural variation in fruit and shape in tomato. *Theoretical and Applied Genetics* 99: 978-987.

Grierson, D. and Tucker, G. (1983) Timing of ethylene and polygalacturonase synthesis in relation to the control of tomato fruit ripening. *Planta* 157: 174-179.

Hadas, R.; Schaffer, A.; Miron, D.; Fogelman, M.; Granot, D. (1995) PCR-generated molecular markers for the invertase gene and sucrose accumulation in tomato. *Theoretical and Applied Genetics* 90: 1142-1148.

Hamada, A.M. (1998) Genotypic differences and alterations of protein patterns of tomato plants under copper stress. *Biologia Plantarum* 41: 555-564.

He, C.; Poysa, V.; Yu, K. (2003) Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers and their use in determining

- relationships among *Lycopersicon* cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 363-373.
- Heiser, C.J. (1969) Love apples. In "Nighthshades: The Paradoxical Plants, Freeman, San Francisco, CA", pp 53-105.
- Hermesen, J.G. (1984) Some fundamental considerations on interspecific hybridization. *Iowa State Journal of Research* 58(4): 461-474.
- Huang, Z. and van der Knaap, E. (2011) Tomato fruit weight 11.3 maps close to *fasciated* on the bottom of chromosome 11. *Theoretical and Applied Genetics* 123(3): 465-474.
- Hurkman, W.J. and Tanaka, C.K. (1986) Phenol extraction followed by methanolic ammonium precipitation an effective protocol for sample preparation from protein-poor, recalcitrant tissues such as plants. *Plant Physiology* 81: 802-806.
- Hyman, J.H.; Gaus, J.; Foolad, M.R. (2004) A rapid and accurate method for estimating tomato lycopene content by measuring chromaticity values of fruit puree. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 129(5): 717-723.
- Ibarbia, E.A. and Lambeth, V.N. (1969) Inheritance of soluble solids in a large/small-fruited tomato cross. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 94: 496-498.
- Jagadeesh, B.H.; Prabha, T.N.; Srinivasan, K. (2004) Activities of glycosidases during fruit development and ripening of tomato (*Lycopersicum*

- esculentum* L.): implication in fruit ripening. *Plant Science* 166: 1451-1459.
- Jenkins, J.A. (1948) The origin of the cultivated tomato. *Economic Botany* 2: 379-392.
- Jones, R.A. and Scott, S.J. (1983) Improvement of tomato flavor by genetically increasing sugar and acid contents. *Euphytica* 32:845.
- Kader, A.A.; Chastagner, G.A.; Morris, L.L.; Ogawa, J.M. (1978) Effects of carbon monoxide on decay, physiological responses, ripening and composition of tomato fruits. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 103: 665-670.
- Kardolus, J.P.; van Eck, H.J. and van der Berg, R.G. (1998) The potential of AFLPs in biosystematics: a first application in *Solanum* taxonomy (*Solanaceae*). *Plant Systematics and Evolution* 210:87-103.
- Kearsey, M.J. and Pooni, H.S. (1996) The genetical analysis of quantitative traits. Chapman and Hall, London.
- Kitagawa, M.; Ito, H.; Shiina, T.; Nakamura, N.; Inakuma, T.; Kasumi, T.; Ishiguro, Y.; Yabe, K.; Ito, Y. (2005) Characterization of tomato fruit ripening and analysis of gene expression in F-1 hybrids of the ripening inhibitor (*rin*) mutant. *Physiologia Plantarum* 123: 331-338.
- Ku, H.M.; Doganlar, S.; Chen, K.Y.; Tanksley, S.D. (1999) Genetic basis of pear-shaped fruit in tomato. *Theoretical and Applied Genetics* 99: 844-850.

Labate, J.A.; Grandillo, S.; Fulton, T.; Muños, S.; Caicedo, A.L.; Peralta, I.E.; Ji, Y.; Chetelat, R.T.; Scott, J.W.; Gonzalo, M.J.; Francis, D.; Yang, W.; van der Knaap, E.; Baldo, A.M.; Smith-White, B.; Mueller, L.A.; Prince, J.P.; Blanchard, N.E.; Dylan, B.; Storey, D.B.; Stevens, M.R.; Robbins, M.D.; Wang, J.; Liedl, B.E.; O'Connell, M.A.; Stommel, J.R.; Koh Aoki, K.; Iijima, Y.; Slade, A.J.; Hurst, S.R.; Loeffler, D.; Steine, M.N.; Vafeados, D.; McGuire, C.; Freeman, C.; Amen, A.; Goodstal, J.; Facciotti, D.; van Eck, J. and Causse, M. (2007) Tomato. In "Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants, Volume 5 Vegetables. Ed. C. Kole Springer-Verlag, Berlin, pp. 1-125.

Lecomte, L.; Duffé, P.; Buret, M.; Servin, B.; Hospital, F.; Causse, M. (2004) Marker-Assisted introgression of 5 QTL controlling fruit quality traits into three tomato lines revealed interactions between QTLs and genetic background. *Theoretical and Applied Genetics* 109: 658-668.

Li, G. and Quiros, C.F. (2001) Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. *Theoretical and Applied Genetics* 103: 455-461.

Lippman, Z. and Tanksley, S.D. (2001) Dissecting the genetic pathway to extreme fruit size in tomato using a cross between the small-fruited wild species *Lycopersicon pimpinellifolium* and *L. esculentum* var. Giant Heirloom. *Genetics* 158: 413-422.

- Liu, B.H. (1998) *Statistical genomics: linkage, mapping, and QTL analysis*. CRC Press., Boca Raton.
- Liu, J.; van Eck, J.; Cong, B.; Tanksley, S.D. (2002) A new class of regulatory genes underlying the cause of pear-shaped tomato fruit. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(20): 13302-13306.
- Mackay, T.F.C. (2001) The genetic architecture of quantitative traits. *Annual Review of Genetics* 35: 303-339.
- Malundo, T.M.M.; Shewfelt, R.L.; Scott, J.W. (1995) Flavor quality of fresh tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) as affected by sugar and acid levels. *Postharvest Biology and Technology* 6: 103-110.
- Mariotti, J.A. (1986) *Fundamentos de la genética biométrica - Aplicaciones al mejoramiento genético vegetal*. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Washington, D.C. Editora: Chesneau, E.V.
- Matas, A.J.; Gapper, N.E.; Chung, M.Y.; Giovannoni, J.J.; Rose, J.K.C. (2009) Biology and genetic engineering of fruit maturation for enhanced quality and shelf life. *Current Opinion in Biotechnology* 20: 197-203.
- Meli, V.S.; Ghosh, S.; Prabha, T.N.; Chakraborty, N.; Chakraborty, S.; Datta, A. (2010) Enhancement of fruit shelf life by suppressing N-glycan processing enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(6): 2413-2418.

- Miller, J.C. and Tanksley, S.D. (1990) RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. *Theoretical and Applied Genetics* 80: 437-448.
- Nuez, F. (1995) El cultivo del tomate. Editorial: Multi-Prensa. Lugar: Madrid. 793 p.
- Paterson, A.H.; Lander, E.S.; Hewitt, J.D.; Peterson, S.; Lincoln, S.E.; Tanksley, S.D. (1988) Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Nature* 335: 721-726.
- Peralta, I.E.; Spooner, D.M.; Knaap, S. (2008) Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (*Solanum* Sect. *Lycopersicoides*, Sect. *Juglandifolia*, Sect. *Lycopersicon*, Solanaceae). In: Systematic Botany Monographs. *The American Society of Plant Taxonomists* 84: 186 pp.
- Pereira da Costa, J.H.; Martínez, V.A.; Rodríguez, G.R.; Pratta, G.R.; Zorzoli, R. (2009a) Influencia de genes exóticas sobre la vida poscosecha y el peso del fruto de tomate. *Agriscientia* 26(1): 7-13.
- Pereira da Costa, J.H.; Rodríguez, G.R.; Pratta, G.R.; Zorzoli, R.; Picardi, L.A. (2009b) Characterization of tomato germplasm by pericarp protein profiles and morphologic and biochemical fruit traits. *Fruit, Vegetable and Cereal Sciences and Biotechnology* 3(1): 48-53.
- Pereira da Costa, J.H.; Rodríguez, G.R.; Tomat, D.D.; Pratta, G.R.; Zorzoli, R.; Picardi, L.A. (2011) Pericarp total protein profiles as molecular markers

- of tomato fruit quality traits in two segregating populations. *Scientia Horticulturae* 130(1): 60-66.
- Powell, W.; Machray, G.C.; Provan, J. (1996) Polymorphism revealed by simple sequence repeat. *Trends in Plant Science* 1(7):215-227.
- Powers, L. (1941) Inheritance of quantitative characters in crosses involving two species of *Lycopersicon*. *Journal of Agricultural Research* 63:149-174.
- Poysa, V. (1993) Use of *Lycopersicon cheesmanii* and *L. chmielewskii* to increase dry matter content of tomato fruit. *Canadian Journal of Plant Science* 73: 273 -279.
- Pratta, G.R., Zorzoli, R.; Picardi, L.A. (1996) Evaluación de caracteres de interés agronómico en especies del género *Lycopersicon*. *Horticultura Argentina* 15: 25-32.
- Pratta, G.R.; Zorzoli, R.; Picardi L.A. (2000) Interacciones genéticas entre germoplasma silvestre y cultivado de *Lycopersicon* spp. con efectos sobre la calidad del fruto de tomate. *Plant Genetic Resources Newsletter* 124: 7-12.
- Pratta, G.R.; Zorzoli, R.; Picardi, L.A.; Valle, E.M.; Carrillo, N. (2001) Characterization of tomato genotypes that differ in their fruit shelf-life by analysis of total pericarp protein patterns at two ripening stages. *Acta Horticulturae* 546:483-487.
- Pratta, G.R. (2004) Caracterización de genotipos discrepantes para el tiempo de madurez de los frutos en *Lycopersicon*. (Tesis para optar al grado de

Doctor en Ciencias Biológicas) Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas UNR.

Pratta, G.R.; Rodríguez, G.R.; Zorzoli, R.; Valle, E.M.; Picardi, L.A. (2011a) Molecular markers detect stable genomic regions underlying tomato fruit shelf life and weight. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 11: 157-164.

Pratta, G.R.; Rodríguez, G.R.; Zorzoli, R.; Valle, E.M.; Picardi, L.A. (2011b) Phenotypic and molecular characterization of selected recombinant inbred lines derived from the cross *Solanum lycopersicum* x *S. pimpinellifolium*. *Journal of Genetics* 90(2): 229-237.

Primieri Carelli, B.P.; Gerald, L.T.S.; Grazziotin, F.; Echeverrigaray, S. (2006) Genetic diversity among Brazilian cultivars and landraces of tomato revealed by RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53: 395-400.

Rick, C.M. (1973) Potential genetic resources in tomato species: clones from observations in native habitats. In "Genes, Enzymes and Populations. Ed. Sbn. Plenum, New York", pp 255-269.

Rick, C.M. (1974) High soluble solids content in large fruited tomato lines derived from a wild green fruited species. *Hilgardia* 42: 493-510.

Rick, C.M. and Fobes, J.F. (1975) Allozyme variation in the cultivated tomato and closely related species. *Torrey Botanical Club* 102: 376-386.

- Rick, C.M. (1976) Tomato. In "Simmonds, N.W.(Ed.). Evolution of crops plants. Longman, London & New York", pp 262-273.
- Rick, C.M. (1979) Biosystematic studies in *Lycopersicon* and closely related species of *Solanum*. In "Hawkes, J.G.; Lester, R.N.; Skelding, A.D. (Eds.). The biology and taxonomy of the Solanaceae. Academic Press, New York & London", pp 667-678.
- Rick, C.M. (1988) Tomato-like nightshades: affinities, autoecology and breeders' opportunities. *Economic Botany* 42: 145-154.
- Rick, C.M. and Holle, M. (1990) Andean *Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme* genetic variation and its evolutionary significance. *Economic Botany* 44: 69-78.
- Rick, C.M. (1991) Tomato resources of South America reveal many genetic treasures. *Diversity* 7: 54-56.
- Rodríguez, G.R.; Pratta, G.R.; Zorzoli, R.; Picardi, L.A. (2006) Evaluación de caracteres de planta y fruto en líneas recombinantes endocriadas de tomate. *Ciencia e Investigación Agraria* 33(2): 127-135.
- Rodríguez, G.R.; Sequin, L.; Pratta, G.R.; Zorzoli, R.; Picardi, L.A. (2008) Protein profiling in F1 and F2 generations of two tomato genotypes differing in ripening time. *Biología Plantarum* 52: 548-552.
- Rodríguez, G.R.; Liberatti, D.R.; Pratta, G.R.; Zorzoli, R.; Picardi, L.A. (2010) Inheritance of shelf life and other quality traits of tomato fruit estimated from F₁'s, F₂'s and backcross generations derived from the standard

- cultivar, *nor* homozygote and wild cherry tomato. *Euphytica* 176: 137-147.
- Rose, J.K.C; Cosgrove, D.J.; Albersheim, P.; Darvill, A.G.; Bennett, A.B. (2000) Detection of expansin proteins and activity during tomato fruit ontogeny. *Plant Physiology* 123: 1583–1592.
- Rose, J.K.C.; Bashir, S.; Giovannoni, J.J.; Jahn, M.M.; Saravanan, R.S. (2004) Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools. *Plant Journal* 39: 715-733.
- Rosseaux, M.C.; Jones, C.M.; Adams, D.; Chetelat, R.; Bennett, A.; Powell, A. (2005) QTL analysis of fruit antioxidants in tomato using *Lycopersicon pennelli* introgression lines. *Theoretical and Applied Genetics* 111: 1396-1408.
- Ruiz, J.J.; Gracia-Márquez, S.; Picó, B.; Gao, M.; Quiros, C.F. (2005) Genetic variability and relationship of closely related Spanish traditional cultivars of tomato as detected by SRAP and SSR markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 130(1): 88-94.
- Sacks, E.J. and Francis, D.M. (2001) Genetic and environmental variation for tomato flesh color in a population of modern breeding lines. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 162(2): 221-226.
- Saladié, M.; Matas, A.J.; Isaacson, T.; Jenks, M.A.; Goodwin, M.S.; Niklas, K.J.; Xiaolin, R.; Labavitch, J.M.; Shackel, K.A.; Fernie, A.R.; Lytovchenko, A.; O'Neill, M.A.; Watkins, C.B.; Rose, J.K.C. (2007) A reevaluation of the

key factors that influence tomato fruit softening and integrity. *Plant Physiology* 144: 1012-1028.

Saliba-Colombani, V.; Causse, M.; Langlois, D.; Philouze, J.; Buret, M. (2001) Genetic analysis of organoleptic quality in fresh market tomato. 1. Mapping QTL for physical and chemical traits. *Theoretical and Applied Genetics* 102: 259-272.

Shapiro, S.S.; Wilk, M.B. (1965) An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* 52: 591-611.

Schaffer, A.A.; Petreikov, M.; Miron, D.; Fogelman, M.; Spiegelman, M.; Bnei-Moshe, Z.; Shen, S.; Granol, D.; Hadas, R.; Dai, N.; Levin, I.; Bar, M.; Friedman, M.; Pilowsky, M.; Gilboa, N.; Chen, L. (1998) Modification of carbohydrate content in developing tomato fruit. *HortScience* 34: 12-15.

Schauer, N.; Semel, Y.; Roessner, U.; Gur, A.; Balbo, I.; Carrari, F.; Pleban, T.; Perez-Melis, A.; Bruedigam, C.; Kopka, J.; Willmitzer, L.; Zamir, D.; Fernie, A.R. (2006) Profiling of tomato interspecific introgression lines facilitated the identification of pathway and network quantitative trait loci revealing that plant morphological traits are major determinants of fruit metabolic networks. *Nature Biotechnology* 24(4):447-454.

Schuelter, A.R.; Finger, F.L.; Casali, V.W.D.; Brommonschenkel, S.H.; Otoni, W.C. (2002) Inheritance and genetic linkage analysis of a firm-ripening tomato mutant. *Plant Breeding* 121: 338-342.

- Sim, S.C.; Robbins, M.D.; Chilcott, C.; Zhu, T; Francis, D.M. (2009) Oligonucleotide array discovery of polymorphisms in cultivated tomato (*Solanum lycopersicum* L.) reveals patterns of SNP variation associated with breeding. *BMC Genomics* 10: 466-476.
- Smith, C.J.S.; Watson, C.F.; Ray, J.; Bird, C.R.; Morris, P.C.; Schuch, W.; Griersoon, D. (1988) Antisense RNA inhibition of polygalacturonase gene expression in transgenic tomatoes. *Nature* 334: 724-726.
- Smith, J.S.C. and Smith, O.S. (1992) Fingerprinting crop varieties. *Advances in Agronomy* 47: 85-140.
- Smulders, M.J.M.; Bredemeijer, G.; Rus-Kortekaas, W.; Arens, P.; Vosman, B. (1997) Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species. *Theoretical and Applied Genetics* 97: 264-272.
- Snedecor, G. (1964) Métodos Estadísticos - 5ta Edición. México, D.F., Compañía Editorial, pp 631.
- Sokal, R. and Rohlf, F. (1969) Biometry. H. W. Freeman, San Francisco, pp 543.
- Spooner, D.M; Peralta, I.E.; Knapp, S. (2005) Comparison of AFLPs with other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes [*Solanum* L. section *Lycopersicon* (Mill.) Wettst.]. *Taxon* 54(1): 43-61.

- Stevens, M.A. (1972) Relationships between components contributing to quality variation among tomato lines. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 97: 70-73.
- Stevens, M.A.; Kader, A.A.; Albright-Holton, M. (1977) Genotypic variation for flavor and composition in fresh market tomatoes. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 102: 680-689.
- Stevens, M.A. and Rick, C.M. (1986) Genetics and Breeding. En: The Tomato Crop. Ed. por Atherton, J.G. and Rudich, J. Chapman and Hall. London. New York pp. 35-100.
- Tanksley, S.D.; Medina-Philo, H.; Rick, C.M. (1982) Use of naturally occurring enzyme variation to detect and map genes controlling quantitative trait in an interspecific backcross of tomato. *Heredity* 49(1): 11-25.
- Tanksley, S.D.; Young, N.D.; Paterson, A.H.; Bonierbale, M.W. (1989) RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. *Biotechnology* 7: 257-264.
- Tanksley, S.D. (1993) Mapping polygenes. *Annual Review of Genetics* 27: 205-233.
- Tanksley, S.D.; Grandillo, S.; Fulton, T.M.; Zamir, D.; Eshed, Y.; Petiard, V.; Lopez, J.; Beck-Bunn, T. (1996) Advanced backcross QTL analysis in a cross between an elite processing line of tomato and its wild relative *L. pimpinellifolium*. *Theoretical and Applied Genetics* 92: 213-224.

- Tanksley, S.D. and Nelson, J.C. (1996) Advanced backcross QTL analysis a method for the simultaneous discovery and transfer of valuable QTLs from unadapted germoplasm into elite breeding lines. *Theoretical and Applied Genetics* 92: 191-203.
- Thompson, A.J.; Tor, M.; Barry, C.S.; Vrebalov, J.; Orfila, C.; Jarvis, M.C.; Giovannoni, J.J.; Grierson, D.; Seymour, G.B. (1999) Molecular and genetic characterization of a novel pleiotropic tomato-ripening mutant. *Plant Physiology* 120:383-390.
- Tigchelaar, E.C.M.; Tomes, M.L.; Kerr, E.A.; Barman, R.J. (1973) A new fruit ripening mutant, *non-ripening (nor)*. *Report of the Tomato Genetics Cooperative* 23: 33.
- van der Knaap, E. and Tanksley, S.D. (2001) Identification and characterization of novel locus controlling early fruit development in tomato. *Theoretical and Applied Genetics* 103: 353-358.
- van der Knaap, E.; Lippman, Z.B.; Tanksley, S.D. (2002) Extremely elongated tomato fruit controlled by four quantitative trait loci with epistatic interactions. *Theoretical and Applied Genetics* 104: 241-247.
- Vega, T.A.; Pereira da Costa, J.H., Rodríguez, G.R., Pratta, G.R., Zorzoli, R. y Picardi, L.A. En: Reunión Argentina de Fisiología Vegetal (28°, 2010, La Plata, Buenos Aires, Argentina). Análisis de grupos segregantes (*Bulk Segregant Analysis*) para polipéptidos asociados al pH en pericarpio de tomate. Libro de Resúmenes, Buenos Aires, Septiembre de 2010, p 293.

- Wang, Z.K.; Ni, Z.F.; Wu, H.L.; Nie, X.L.; Sun, Q.X. (2006) Heterosis in root development and differential gene expression between hybrids and their parental inbreds in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 133: 1283-1294.
- Warnock, S.J. (1988) A review of taxonomy and phylogeny of the genus *Lycopersicon*. *HortScience* 23: 669-673.
- Weller, J.I.; Soller, M.; Brody, T. (1988) Linkage analysis of quantitative traits in an interspecific cross of tomato (*Lycopersicon esculentum* x *Lycopersicon pimpinellifolium*) by means of genetic markers. *Genetics* 118: 329-339.
- Xiao, H.; Jiang, N.; Schaffer, E.; Stockinger, E.J.; van der Knaap, E. (2008) A retrotransposon-mediated gene duplication underlies morphological variation of tomato fruit. *Science* 319: 1527-1530.
- Yu, Y. G.; Saghai Maroof, M. A.; Buss, G. R.; Maughan, P. J.; Tolim, S. A. (1994) RFLP and microsatellite mapping of a gene for soybean mosaic virus resistance. *Phytopathology* 84: 60-64.
- Yu,S.C.; Chai, M.; Jiang, L.G. (2005) Varieties identification of cherry tomato using molecular markers. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica* (http://en.enki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-HBNB200505009.htm).
- Zorzoli, R.; Pratta, G.R.; Picardi, L.A. (1998) Efecto de los mutantes *nor* y *rin* y de genes silvestres sobre características del fruto en *Lycopersicon*. *Mendeliana* 13: 12-19.

Zorzoli, R., Pratta, G.R.; Picardi, L.A. (2000) Variabilidad genética para la vida poscosecha y el peso de los frutos en tomate para familias F_3 de un híbrido interespecífico. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 35(12): 2423-2427.