

**TESIS DOCTORAL**

# **Genética de la fisiopatía de la mancha solar del fruto de tomate**

**Carmen Ruiz Rubio**



**Director: Dr. Rafael Fernández Muñoz**

Programa de Doctorado: Análisis de Sistemas Biológicos. Facultad de Ciencias.

Universidad de Málaga. 2016



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL

# Genética de la fisiopatía de la mancha solar del fruto de tomate

Memoria de Tesis Doctoral presentada por la Licenciada en Biología  
**Carmen Ruiz Rubio**

para optar al grado de  
**Doctora en Biología por la Universidad de Málaga**

Director:  
**Dr. Rafael Fernández Muñoz**



Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora"  
(IHSM UMA-CSIC)

Málaga, febrero de 2016



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

AUTOR: Carmen Ruiz Rubio

 <http://orcid.org/0000-0002-0483-1595>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): [riuma.uma.es](http://riuma.uma.es)





D. Rafael Fernández Muñoz, Doctor en Ciencias Biológicas y Científico Titular del CSIC en el Departamento de Mejora Genética y Biotecnología del Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM UMA-CSIC), instituto de carácter mixto entre el Consejo Superior de Investigaciones Científicas y la Universidad de Málaga.

#### CERTIFICA

Que la Licenciada Carmen Ruiz Rubio ha realizado bajo su dirección en el IHSM "La Mayora" (UMA-CSIC) el trabajo que con el título "**Genética de la fisiopatía de la mancha solar del fruto de tomate**" se presenta en esta memoria y que constituye su Tesis Doctoral para aspirar al grado de Doctora en Biología.

Y para que así conste y tenga los efectos que correspondan en cumplimiento de la legislación vigente, firma el presente informe en Algarrobo-Costa (Málaga) a 6 de noviembre de 2015.

Fdo.: Dr. Rafael Fernández Muñoz



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

D. Miguel Ángel Quesada Felice, Catedrático de Universidad adscrito al Departamento de Biología Vegetal de la Universidad de Málaga

#### RATIFICA

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “**Genética de la fisiopatía de la mancha solar del fruto de tomate**” realizada por la Licenciada Carmen Ruiz Rubio para optar al Título de Doctora en Biología.

Y para que así conste y tenga los efectos que correspondan en cumplimiento de la legislación vigente, firma la presente autorización en Málaga, 11 de noviembre de 2015.

Fdo.: Dr. Miguel Ángel Quesada Felice  
Tutor de la Tesis



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

D. Antonio Flores Moya, Director del Departamento de Biología Vegetal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga

### AUTORIZA

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “**Genética de la fisiopatía de la mancha solar del fruto de tomate**” realizada por la Licenciada Carmen Ruiz Rubio para optar al Título de Doctora en Biología.

Y para que así conste y tenga los efectos que correspondan en cumplimiento de la legislación vigente, firma la presente autorización en Málaga, 11 de noviembre de 2015.

Fdo.: Dr. Antonio Flores Moya  
Director del Departamento de  
Biología Vegetal de la UMA

Durante el periodo comprendido entre Noviembre de 2004 y Abril de 2008 he disfrutado de una Beca Predoctoral del Programa de Ayudas para la Formación de Doctores en Centros de Investigación y Universidades Andaluzas.

Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto trilateral (Alemania, Francia y España) GEN2003-20211-C02-02/INTER de la convocatoria de Acción Estratégica de Genómica y Proteómica del antiguo Ministerio de Ciencia y Tecnología: *Genomic and metabolomic exploration of natural variability of fruit development and quality in tomato*.

Los resultados del mismo han sido obtenidos en su mayor parte en el IHSM La Mayora CSIC con aportaciones de una estancia en el INRA-Avignon (Francia) y colaboraciones con el IBMCP UPV-CSIC (Valencia) y el Max Planck Institute en Golm (Alemania) en el marco de dicho proyecto.

## Agradecimientos

La realización de esta tesis ha sido una de las experiencias más enriquecedoras de mi vida. Quizá porque me ha llevado buena parte de ella y se han ido sumando en estos años vivencias en diferentes etapas, lugares, acompañada desde el principio por los que siempre están ahí, pero incorporando nuevas caras a lo largo del camino. Tengo suerte porque de todos me llevo algo bueno. Para decir gracias a todos tengo que pararme en el tiempo y necesitaré mucho papel y memoria, y como no puedo presumir de ésta última, desde ya recibid un enorme gracias y una sonrisa a todos los que me habéis acompañado hasta aquí; perdonad mi torpeza por no saber nombraros, pero saberos agradecidos.

He de comenzar con un gracias a La Mayora, como ente vivo y completo, del que estoy muy orgullosa de pertenecer, y hablo en presente porque siempre la sentiré como mi casa.

Comenzando por el principio, muchas gracias Fali por ayudarme a hacer esto posible, desde los primeros conocimientos del trabajo en invernadero hasta las dudas que ayer me resolvías, pasando por protocolos puestos a punto, la emoción del descubrimiento, conversaciones interminables y bromas... han pasado muchos años y he aprendido muchísimo, tanto que he llegado aquí, por lo que parece que el objetivo está cumplido desde que aquel señalado 11 de marzo decidiera embarcarme en esta aventura.

A María José, mi compañera de tantos caminos, mi amiga. Gracias por enseñarme humildad y buen hacer, señas de tu trabajo y tu carácter. Llegaste después y acabaste antes, pero no sin grandes sacrificios en un duro camino. Gracias de corazón por estar siempre ahí. Gracias Adri por abrirme los ojos, si hoy estoy aquí es en gran parte por ti, amigo.

Al gran Juanmita, que sabe esperar para decir algo de provecho, el mejor anfitrión que he podido tener, paciente y donador de paciencia, y de todo lo que esté en su mano. Gracias por abrirme las puertas y mostrarme “las cosas de la Mayora”. A mis compis mayores del cuartillo, a Antonio que le recuerdo escribiendo incansable, a Tere que compartió sus sufrimientos conmigo, al final todo llega. Y a Xavi, del que aprendí que la vida siempre te pone en el camino tarde o temprano.

A todo el departamento de Mejora, a Anabel, Merce, Marisa, el profesor Cuartero, gracias por recibirme entonces y por vuestros ánimos en el camino. A los que se mueven por los laboratorios, Marina, Ana... gracias por vuestra ayuda en cada experimento. Gracias Toñi porque aquí hay mucho trabajo tuyo, a Luis por tenerlo todo siempre a mano. Gracias Eva por tu punto de vista, por compartirlo, es enriquecedor. De ti me llevo el tesón y el coraje para hacer las cosas, y no sólo para la tesis. A Zipi y Zape, gracias Emilio por ofrecer siempre tu sonrisa sincera, y a Fernando por enseñarme a ser productiva. He visto florecer el departamento surgiendo salas llenas de becarios y nuevos laboratorios más allá de las fronteras, gracias a todos con los que los he compartido.

Del mucho tiempo de trabajo en el invernadero siempre me quedará sobre todo la alegría de los que trabajan en él, a pesar del calor y la fatiga, gracias a todos por cuidar de las plantas como tan bien sabéis. A Rafa el rubio, a Paco Sánchez, un placer teneros en el equipo.

A Antonio Cordón por estar siempre disponible, por escuchar, por decidir en la dificultad, gracias por facilitarme el camino siempre que pudiste. A Eduardo, en incansable búsqueda por aquello que necesitas, gracias por disponer de todo. A todo el equipo de administración, gracias por ayudarme con los papeleos.

A los que también han acompañado mi vida en la Mayora, aunque desde otros departamentos, gracias por abrirme las puertas de vuestros laboratorios y ayudarme, siempre me he sentido como en casa. Gracias a Elena “la petarda”, a Cañi, a Isa, por esas carreras por la playa. A María Victoria por su diligencia y dulzura. A Helena por hacerme actriz en un plis plas. A Yolanda por su energía y nuestras charlas en positivo. A Fran por venir a rescatarme aquel día en la residencia sin vacilar un momento, no me olvido.

Si la Mayora es un mundo aparte, la residencia es un micromundo. Mezcla de culturas. Torre de Babel. Suerte de poder vivir allí. Gracias a todos los vecinos que he tenido, de aquí o del otro confín. Recuerdo con cariño las cenas en la azotea, las charlas en la lavadora, los carteles informativos... Antonio, Susana, María José, Rocío, Chus, Gloria, todos me habéis dado un pedacito de vosotros y ahora me doy cuenta. Gracias.

Y me fui a Avignon, y allí aprendí lo que se aprende cuando sales fuera. A sobrevivir, a no querer parar de descubrir, a sentir cómo se hacen las cosas de otra manera, para poder volver recargado de nuevas sensaciones. Allí gracias a Eugenia, Monika, Juan, Manolo, Nico, me surgió lo que decidí llamar el “espíritu de Avignon”, entre calles y muros de piedra, con el sonido de los pedales, comprendí que llenarme de cosas nuevas no me cansará nunca. Gracias Mathilde, Mireille, Caroline, Esther, por dejarme inaugurar los laboratorios, qué bien se trabaja con vosotros.

A los de fuera de la Mayora, los amigos de siempre, ya saben quiénes son, gracias por preguntar por mis “tomates” cada dos por tres. Cada empujoncito ha servido.

A mi nueva familia del CAD, que va para ocho años, gracias por enseñarme el trabajo en equipo que tanto me gusta, somos privilegiados. Irene de ti he aprendido la capacidad de ver lo bueno de las personas, entre otras muchas cosas útiles para la vida. Gracias.

A los que van sobre ruedas, que va para seis años ya, gracias por preguntar, insistir, animar... Formáis parte de una pasión renovada cada día. Gracias por estar.

A mi gran familia, mis hermanos, cuñados, sobrinos, quiero disfrutaros más. A mi otra familia, gracias siempre por el apoyo incondicional, sois de lujo. A los que me han sufrido en todos mis caminos, desde siempre, mis padres. Imposible agradecerles en unas líneas TODO, por eso este trabajo va para vosotros. A mis abuelos, que siguen conmigo.

Y a mi compañero de vida, desde el primer tomate que recogiste hasta la última parrafada escrita, esta tesis es tuya. Gracias por entenderme, apoyarme, ayudarme, por tu amor infinito. Sin ti no lo habría logrado.

***A mis padres***

# INDICE GENERAL

Descripción de la tesis.....	5
<b>Introducción general .....</b>	<b>7</b>
I. EL TOMATE: ASPECTOS BOTÁNICOS Y TAXONÓMICOS, VARIABILIDAD NATURAL E IMPORTANCIA ECONÓMICA. ....	7
I.1. Descripción botánica.....	7
I.2. Situación taxonómica. ....	8
I.3. Origen y domesticación de la especie.....	10
I.4. Importancia del tomate. ....	13
II. MEJORA GENÉTICA DE LA CALIDAD DEL FRUTO DE TOMATE.....	15
II.1. El concepto de calidad del fruto.....	15
II.2. El proceso de mejora genética. ....	17
II.3. Selección del material vegetal. ....	18
III. MANCHA SOLAR Y CALIDAD DEL FRUTO DE TOMATE.....	20
III.1. Descripción de la fisiopatía de la mancha solar. ....	20
III.2. Selección del material vegetal. ....	22
Objetivos .....	25
<b>Capítulo 1</b>	
<b>CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE CARACTERES RELACIONADOS CON LA CALIDAD DEL FRUTO. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LA CALIDAD DEL FRUTO. OBTENCIÓN DE LÍNEAS CONTRASTANTES .....</b>	<b>37</b>
1.1. ANTECEDENTES .....	37
1.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
1.2.1. Material vegetal .....	39
1.2.2. Diseño experimental .....	39
1.2.3. Medida de los caracteres de calidad de fruto y planta .....	42
1.2.3.1. Caracteres Vegetativos.....	42
1.2.3.2. Caracteres de la inflorescencia. ....	43
1.2.3.3. Caracteres del fruto.....	44
1.2.3.4. Caracteres de calidad interna del fruto.....	45
1.2.4. Análisis de los datos .....	46
1.2.4.1. Evaluación del efecto ambiental durante la misma temporada .....	46
1.2.4.2. Estima de las heredabilidades de los caracteres analizados en la población RIL....	46
1.2.4.3. Relación entre los caracteres analizados en la población RIL .....	47

1.2.4.4.	Análisis de QTLs.....	49
1.3.	RESULTADOS .....	50
1.3.1.	Herencia de los caracteres analizados. ....	50
1.3.2.	Evaluación del efecto ambiental durante la misma temporada.....	58
1.3.3.	Heredabilidad de los caracteres analizados en la población RIL.....	58
1.3.4.	Relación entre los caracteres analizados en la población RIL.....	61
1.3.5.	Análisis e identificación de QTLs .....	64
1.4.	DISCUSIÓN.....	70

## Capítulo 2

### APROXIMACIÓN A LA FISIOPATÍA DE LA MANCHA SOLAR. OBTENCIÓN DE MATERIAL VEGETAL PARA EL ESTUDIO DE LA MANCHA SOLAR. ....

2.1.	ANTECEDENTES .....	101
2.2.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	106
2.2.1.	Material vegetal .....	106
2.2.2.	Valoración de los parámetros de color L* y H*.....	107
2.2.3.	Efecto de la calidad de la luz sobre el mismo genotipo. ....	107
2.2.4.	Efecto de la calidad de la luz sobre diferentes genotipos.....	108
2.2.5.	Determinación del momento sensible a la inducción de la mancha solar.....	109
2.2.6.	Evaluación de la transmitancia del material empleado.....	113
2.2.7.	Medida objetiva de color .....	113
2.2.8.	Medidas de radiación, temperatura y humedad relativa .....	114
2.2.9.	Análisis de los datos .....	114
2.3.	RESULTADOS .....	115
2.3.1.	Valoración de los parámetros de color L* y H*.....	115
2.3.2.	Efecto de la calidad de la luz sobre el mismo genotipo. ....	116
2.3.3.	Efecto de la calidad de la luz sobre diferentes genotipos.....	116
2.3.4.	Determinación del momento sensible a la inducción de la mancha solar.....	117
2.3.5.	Obtención de las parejas de sub-RILs contrastantes .....	119
2.3.6.	Medidas de radiación, temperatura y humedad relativa .....	121
2.4.	DISCUSIÓN.....	122

## Capítulo 3

### FISIOPATÍA DE LA MANCHA SOLAR: GENÉTICA Y PROTEÓMICA. ....

3.1.	ANTECEDENTES .....	129
3.2.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	132

3.2.1.	Material vegetal .....	132
3.2.2.	Detección de QTLs asociados a mancha solar.....	133
3.2.3.	Diseño experimental .....	133
3.2.4.	Toma de muestras.....	134
3.2.5.	Evaluación, selección y procesado de las muestras tomadas.....	136
3.2.6.	Extracción de proteínas. Electroforesis bidimensional .....	136
3.2.7.	Análisis de resultados.....	138
3.3.	<b>RESULTADOS</b> .....	139
3.3.1.	Diferencias observadas entre las líneas hermanas .....	139
3.3.2.	Detección de diferencias proteómicas.....	140
3.3.3.	Agrupación jerárquica de los spots variables.....	142
3.3.4.	Identificación de los spots variables .....	143
3.3.5.	QTLs asociados a mancha solar .....	144
3.4.	<b>DISCUSIÓN</b> .....	146
	<b>Conclusiones</b> .....	157
	<b>Anexos y Protocolos</b> .....	159
	Anexo 1.1. Caracteres vegetativos observados en la población RIL. ....	161
	Anexo 1.2. Caracteres de la inflorescencia observados en la población RIL.....	164
	Anexo 1.3. Caracteres externos del fruto observados en la población RIL.....	166
	Anexo 1.4. Caracteres de calidad interna del fruto medidos en la población RIL. ....	173
	Anexo 1.5. ¿Qué es el Espacio CIELab de medida del color? .....	174
	Protocolo 1.1. Cuantificación de licopeno y $\beta$ -caroteno.....	177
	Protocolo 1.2. Cuantificación de sólidos solubles totales.....	179
	Protocolo 1.3. Cuantificación de glucosa, fructosa y sacarosa .....	180
	Protocolo 1.4. Medida de la acidez titulable .....	182



## Descripción de la tesis

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es uno de los vegetales más importantes en el mundo, formando parte de la alimentación en diferentes culturas. La especie comprende más de 100 tipos diferentes y miles de variedades que presentan entre ellas grandes diferencias, no sólo en el aspecto externo del fruto, siendo el color, la morfología y el tamaño las más llamativas; sino en relación a su calidad organoléptica, atendiendo al sabor y el aroma en la mayoría de los casos. Existen numerosos estudios con el interés obvio por mejorar la resistencia de la planta de tomate a plagas y patógenos que afecten a la producción, sin embargo son menos los estudios que han tratado de mejorar la calidad del fruto, así como de profundizar en el conocimiento de los mecanismos que afectan a los atributos sensoriales, y que pueden tener orígenes complejos que engloban factores genéticos y ambientales. En esta tesis se presentan resultados sobre el aspecto genético de factores que afectan a la calidad del fruto de tomate y se aportan resultados clave para el entendimiento de la fisiopatía de la mancha solar, que provoca una merma de la calidad del fruto. El resumen del contenido de los capítulos que forman la tesis se detalla a continuación.

### Capítulo 1:

En este capítulo se describe el estudio de caracteres cuantitativos relacionados con la calidad del fruto en una población de líneas recombinantes consanguíneas (en adelante RIL, acrónimo que procede de *Recombinant Inbred Lines*) procedentes del cruce de *S. lycopersicum* cv. "MoneyMaker" x *S. pimpinellifolium* acc. TO-937. En estas líneas, que ofrecen gran variabilidad para los caracteres, se ha desarrollado un mapa de ligamiento saturado, de manera que se ha podido fenotipar toda la población, descubrir correlaciones fenotípicas y genéticas entre algunos de los caracteres estudiados, estimar la heredabilidad que presentan esos caracteres, y como último paso se han detectado QTLs asociados a algunos de los caracteres estudiados, así como posibles genes candidatos.

## **Capítulo 2:**

En el capítulo 2 se presentan los primeros pasos del estudio de la fisiopatía de la mancha solar, que comienza con la obtención del material vegetal derivado de la población RIL descrita en el capítulo 1, tras una primera preselección, y sigue con diversos experimentos para la evaluación del efecto de algunos de los factores ambientales que puedan provocar la manifestación de la mancha solar y que finalmente llevaron a determinar el momento clave para su aparición.

## **Capítulo 3:**

En el capítulo 3 se continúa el estudio de la mancha solar, esta vez empleando el material vegetal obtenido en la última selección, para comprender los factores genéticos que puedan estar actuando en la manifestación del carácter. Los estudios realizados abordan diferentes aspectos: Proteómica y genética. Se plantea un modelo genético que explique la aparición de la mancha solar.

## Introducción general

*“...a fruit that is almost universally treated as a vegetable and a perennial plant that is almost universally cultivated as an annual”*

(Rick, 1978)

---

### I. EL TOMATE: ASPECTOS BOTÁNICOS Y TAXONÓMICOS, VARIABILIDAD NATURAL E IMPORTANCIA ECONÓMICA.

#### I.1. Descripción botánica.

El tomate cultivado (*Solanum lycopersicum*) pertenece a la familia *Solanaceae*, que se enmarca en el orden *Solanales*, subclase *Asteridae*, clase *Magnoliopsida*, división *Magnoliophyta*. Es una planta perenne y rastrera, que se cultiva como anual. Existen variedades de crecimiento determinado y otras de crecimiento indeterminado. En las plantas de hábito indeterminado, carácter silvestre de la especie, hay un crecimiento nodal continuo a partir de la aparición de la primera inflorescencia, entre la séptima y la décima hoja verdadera. Las plantas de hábito determinado se caracterizan porque la primera inflorescencia aparece relativamente pronto, hay tendencia de que existan menos de tres hojas nodales entre racimos y el tallo principal termina en una inflorescencia, por lo que el crecimiento de la planta ha de seguir por los tallos laterales o secundarios. El sistema radical consta de una raíz principal (corta y débil) y raíces secundarias (numerosas y potentes), además de raíces adventicias. La

raíz es pivotante pero tiende a ser fasciculada si la planta proviene de trasplante. Todos los órganos aéreos están cubiertos por tricomas, por lo que las plantas son pubescentes y glandulares y manchan al tocarlas, dejando un característico aroma “a tomate”. Los tallos son verdes, gruesos y angulosos, con nodos compuestos de 2 ó 3 hojas y una inflorescencia. Las hojas son anchas, planas, compuestas e imparipinnadas, presentando 7-11 foliolos, y se disponen de forma alterna sobre el tallo. En la axila de cada hoja aparece un tallo secundario. Las inflorescencias son de tipo racimo o cima, y se desarrollan cada 2-3 hojas en las axilas, con un número de flores variable, y pueden estar divididas o no. Las flores son hermafroditas, actinomorfas (generalmente pentámeras) e hipóginas. El cáliz está formado por 5 (o más) sépalos lanceolados y fusionados en la base. La corola tiene igual número de pétalos de color amarillo, lanceolados y fusionados en la base. El androceo tiene igual número de estambres, que se encuentran fusionados a la corola por sus filamentos, y poseen anteras largas y de color amarillo, conniventes, que forman un cono estaminal envolviendo al gineceo y encerrando al estilo en su interior. Cada antera posee una extensión apical y generalmente están fusionadas. El polen es binucleado. El pistilo está formado por un ovario bi- o pluricarpelar, un estilo delgado y un estigma cubierto por una secreción fluida de naturaleza lipídica. La flor se une al eje floral por medio de un pedicelo articulado que contiene la zona de abscisión, que se distingue por un engrosamiento con un pequeño surco originado por una reducción del espesor del córtex. El fruto es una baya, generalmente de color rojo, bi- o multiloculada. Está constituido por el pericarpo y el tejido placentario en el que se encuentran numerosas semillas recubiertas de una sustancia mucilaginosa. Tras la abscisión el cáliz permanece en el fruto y al ser de tipo acrescente y permanente, alcanza un mayor tamaño conforme el fruto se va desarrollando y permanece en el fruto tras la abscisión. Se puede encontrar una extensa diversidad de formas, tamaños, composición y sabores del fruto, según la variedad de tomate cultivado.

## **1.2. Situación taxonómica.**

La taxonomía del grupo en el que se enclava el tomate se ha revisado en los últimos años por ser muy controvertida. Hasta el año 2005, la clasificación que

tradicionalmente se había seguido era en esencia la propuesta por Miller desde 1754, que consideraba que el grupo taxonómico que contiene al tomate cultivado y sus parientes silvestres tenía las suficientes características como para formar el género *Lycopersicon*, distinto al del género *Solanum*, donde en los inicios fue incluido por Linneo. En los últimos años, el uso de nuevas herramientas moleculares aplicadas en el campo de la taxonomía está revelando que los géneros *Solanum* y *Lycopersicon* no son tan distintos como se pensaba: datos morfológicos y de marcadores RFLP cloroplastídicos (Spooner et al. 1993), secuenciación del gen GBSSI (Granule-Bound Starch Synthase) (Peralta & Spooner 2001), varios caracteres de la corola, anteras, estigma, apertura de la flor, atracción de polinizadores, junto con datos moleculares (Peralta et al. 2005) y evidencias biogeográficas y caracterización molecular mediante AFLP (Spooner et al. 2005), entre otros estudios, han llevado a reconsiderar la clasificación taxonómica. El resultado de estos amplios estudios es que el género *Lycopersicon* cambia de categoría taxonómica y pasa de ser género a ser la sección *Lycopersicon* dentro del género *Solanum* L., volviéndose así a la clasificación propuesta por Linneo, en la que el tomate cultivado y sus parientes silvestres quedan incluidos en el género *Solanum* L., sección *Lycopersicon*. En la Tabla I.1 se muestran las correspondencias entre la nomenclatura de Miller y los nombres consensuados en la actualidad.

**Tabla I.1.** Lista de especies del género *Solanum*, sección *Lycopersicon*. Se proporciona la correspondencia con la nomenclatura previa. Tomado de Peralta y colaboradores (2005).

<b>Nombre en <i>Solanum</i></b>	<b>Equivalente en <i>Lycopersicon</i></b>
<i>S. arcanum</i> Peralta	Parte de <i>L. peruvianum</i> (L.) Miller
<i>S. chilense</i> (Dunal) Reiche	<i>L. chilense</i> Dunal
<i>S. cheesmaniae</i> (L. Riley) Fosberg	<i>L. cheesmaniae</i> L. Riley (publicado incorrectamente como <i>cheesmanii</i> )
<i>S. chmielewskii</i> (C.M. Rick, Kesicki, Fobes & M. Holle) D.M. Spooner, G.J. Anderson & R.K. Jansen	<i>L. chmielewskii</i> C.M. Rick, Kesicki, Fobes & M. Holle
<i>S. corneliomulleri</i> J.F. Macbr.	Parte de <i>L. peruvianum</i> (L.) Miller; conocido como <i>L. glandulosum</i> C.F. Mull.
<i>S. galapagense</i> S. Darwin & Peralta	Parte de <i>L. cheesmaniae</i> L. Riley (reconocido previamente como forma o variedad <i>minor</i> )
<i>S. habrochaites</i> S. Knapp & D.M Spooner	<i>L. hirsutum</i> Dunal

Nombre en <i>Solanum</i>	Equivalente en <i>Lycopersicon</i>
<i>S. huaylasense</i> Peralta	Parte de <i>L. peruvianum</i> (L.) Miller
<i>S. lycopersicum</i> L.	<i>L. esculentum</i> Miller
<i>S. neorickii</i> (C.M. Rick, Kesicki, Fobes & M. Holle) D.M. Spooner, G.J. Anderson & R.K. Jansen	<i>L. parviflorum</i> C.M. Rick, Kesicki, Fobes & M. Holle
<i>S. pennellii</i> Correll	<i>L. pennellii</i> (Correll) D'Arcy
<i>S. peruvianum</i> L.	Parte de <i>L. peruvianum</i> (L.) Miller
<i>S. pimpinellifolium</i> L.	<i>L. pimpinellifolium</i> (L.) Miller

### I.3. Origen y domesticación de la especie.

El origen de las especies silvestres de tomate se localiza en la región andina que se extiende desde el Sur de Colombia al Norte de Chile y desde la costa del Pacífico (incluidas las islas Galápagos) a las estribaciones orientales de los Andes, comprendiendo los países de Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y Chile (Esquinas-Alcázar & Nuez 1995). Sin embargo, el origen del cultivo del tomate parece que se sitúa en México (Rick et al. 1976), donde se formó un centro de diversificación secundario de la especie, ya que existía un gran número de variedades en cuanto al tamaño, forma y color del fruto, ya antes de la llegada de los españoles en 1523 (Rick 1978). Tras varios estudios realizados, lo que no parece claro es la especie de la que se originó el tomate cultivado; muchos apuntan a un origen probable a partir de *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (Rick 1983), pero se ha demostrado que el conjunto de formas conocidas como var. *cerasiforme* son una mezcla de tomate cultivado y silvestre más que en sí el “ancestro” del tomate cultivado (Nesbitt & Tanksley 2002). Estudios más recientes han descrito que el origen de *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* parece ser una domesticación anterior de *S. pimpinellifolium* (Ranc et al. 2008), que tuvo lugar en Perú (Blanca et al. 2012).

El tomate estaba integrado en la cultura azteca y en la de otros pueblos del área mesoamericana siendo parte básica de la dieta, de hecho el nombre tomate se deriva del náhuatl *tomatl*, un vocablo genérico para plantas con frutos globosos, muchas semillas, pulpa acuosa y a veces encerrados en una membrana; en concreto se

empleaba *xitomatl* (jitomate) para hablar de *S. lycopersicum*, y *miltomatl* (tomate de milpa o simplemente tomate) para referirse a *Physalis philadelphica* Lam. que en el México prehispánico era mucho más apreciado incluso que el jitomate. Tras el curso de los siglos esta preferencia no se ha mantenido salvo en el medio rural y a día de hoy sólo en el centro de México se conoce el fruto de *S. lycopersicum* como jitomate.

Cuando el tomate, ya plenamente domesticado en México, fue llevado por los conquistadores al Viejo Continente, fue introducido con facilidad en la gastronomía popular de España, Portugal e Italia, sin embargo en el resto de Europa fue usado sólo como planta ornamental o medicinal, y no se consumía por temor a intoxicaciones, ya que se conocían otras solanáceas ricas en alcaloides tóxicos que llegaban a ser mortales. La primera descripción botánica del tomate en Europa la realizó Pier Andrea Mattioli, del jardín botánico de Padua (Italia), quien publicó su herbario en 1554. Desde entonces aparece descrito en numerosos herbarios como el de Matthias de L'Obel en 1581, el de Gerard en Inglaterra en 1597 o el de Salmon en Estados Unidos, ya en 1710. Aún así el temor a su utilización y consumo se mantuvo en muchos países hasta principios del siglo XIX, mientras que España y Portugal lo difundieron por todo el mundo a través de sus rutas comerciales y colonias de ultramar.

La domesticación sufrida por el tomate ha llevado al cultivo a varios cuellos de botella consecutivos durante su peregrinación de los Andes a Centroamérica y de allí a Europa, ya que al ir seleccionando los genotipos más apropiados entre los existentes se produjeron grandes reducciones poblacionales debido al bajo número de plantas seleccionadas para los cultivos, lo que se tradujo en una disminución de la variabilidad genética (Rick et al. 1976; Bai & Lindhout 2007). Las variedades de tomate cultivado actual conservan la base genética de los primeros tomates introducidos en Europa por los españoles (Foolad 2007) y se estima que el genoma de los cultivares de tomate contiene alrededor de un 5% de la variación genética total encontrada en sus parientes silvestres (Miller & Tanksley 1990; Bai & Lindhout 2007). Con ello, a pesar de la gran diversidad existente en color, forma y calidad de fruto, tipo de crecimiento y morfología de hoja, otros caracteres agronómicos importantes como la resistencia a

estreses bióticos y abióticos se fueron perdiendo gradualmente durante la domesticación (Schauer et al. 2005).

Las especies silvestres de tomate tienen una enorme diversidad genética (Rick 1978), al ser especies autoincompatibles debido a la ejerción del estigma respecto al cono estaminal y, en varias de dichas especies, a una barrera de autoincompatibilidad genética de tipo gametofítico (Rick et al. 1979). La domesticación de *S. lycopersicum* se acompañó por una transición de estigma exerto a inserto desde una especie ya autocompatible genéticamente como es *S. pimpinellifolium*, por lo que la polinización cruzada derivó a una autogamia forzada y como resultado la mayoría de las variedades cultivadas son esencialmente líneas puras (Foolad 2007). El escenario más probable es que el tomate cultivado no haya tenido intercambios genéticos con las especies silvestres antes de 1940. Por entonces el renombrado genetista Dr. Charles M. Rick de la Universidad de California, Davis, observó que los cruces entre especies silvestres y cultivadas generaban toda una gama de nuevas variaciones genéticas en la descendencia. Desde entonces la mejora genética desde especies silvestres por medio de cruces interespecíficos ha sido la clave para la incorporación de caracteres favorables que estaban ocultos en los germoplasmas exóticos de tomate (Bai & Lindhout 2007).

Este objetivo ha hecho imprescindible la creación y el mantenimiento de bancos de germoplasma de tomate, así como la descripción, propagación y distribución del material genético para facilitar los programas de mejora (Bai & Lindhout 2007). La mayoría de los grandes bancos de germoplasma de tomate silvestre se encuentran en Estados Unidos, necesario mencionar la *Plant Genetic Resources Unit*, en el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, Geneva, New York), y el *Charles Rick Tomato Genetic Resource Center* (TGRC), en el Departamento de Cultivos Hortícolas de la Universidad de California (Davis, California). En España el Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV-UPV), junto con el banco de germoplasma de hortalizas del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA) en Zaragoza, y el Centro de Recursos Fitogenéticos (CRF) en Madrid, conservan el banco de tomate más completo de Europa. El banco de germoplasma de nuestro centro, IHSM La Mayora, UMA-CSIC, también tiene una larga

trayectoria de búsqueda y mantenimiento de nuevas variedades de tomate, tanto cultivado como silvestre, que presenten caracteres agronómicos interesantes. De hecho los materiales empleados en este trabajo de tesis se han originado desde un programa de mejora para encontrar nuevas fuentes de resistencia frente a artrópodos, y que partió de material genético proveniente de nuestro banco de germoplasma (Fernández-Muñoz et al. 2000).

#### **1.4. Importancia del tomate.**

El tomate es una de las hortalizas más consumidas en el mundo y un producto básico de la horticultura española. En el año 2013 se cultivaron más de 4,7 millones de ha en todo el mundo, con una producción total de más de 163,9 millones de toneladas, siendo China, India y Estados Unidos de América los principales países productores. España se situó en el noveno lugar a escala mundial y el segundo tras Italia en el ámbito europeo, con más de 3.5 millones de toneladas producidas, de las que casi el 25% se destina a la exportación, siendo el mercado europeo el principal consumidor (FAO 2013). El consumo de tomate fresco es elevado en la temporada de verano, propicia para su cultivo, pero además se ha adaptado bien a condiciones de invernadero durante el invierno, lo que permite disponer de tomate fresco en todas las estaciones, por lo que el consumo se ha incrementado regularmente durante los últimos 20 años (Causse et al. 2003). A ello se suma el alto consumo de productos de tomate procesado en diferentes formatos (pelado, triturado, concentrado, frito, ketchup). Esto hace que el tomate sea una parte importante de una dieta variada y equilibrada en todo el mundo (Willcox et al. 2003), ya que a pesar de no liderar el ranking de alimentos con valor nutricional, se puede afirmar que contribuye significativamente a la ingesta diaria de antioxidantes como la vitamina C y los carotenoides (licopeno,  $\beta$ -caroteno, luteína, entre otros), minerales, y compuestos saludables (flavonoides, ácido fólico, etc.) (Tabla I.2), ya que la gran cantidad de tomate y productos derivados que se consumen conforman una matriz apropiada en la que estos nutrientes son suministrados en la dieta, además de presentar bajo nivel calórico y un contenido medio de fibra (Davies et al. 1981; Beecher 1998; Dorais et al. 2008).

**Tabla 1.2.** Contenido medio de nutrientes en un tomate fresco, rojo maduro. Selección tomada de Causse y colaboradores (2007).

Nutriente	Valor por 100g de porción comestible	Nutriente	Valor por 100g de porción comestible
Azúcares totales	2.63 g	Vitamina C	12.7 mg
Sacarosa	0.00 g	Ácido ascórbico total	
Glucosa	1.25 g	Folato total	15 µg
Fructosa	1.37 g	Vitamina A	833 UI
Calcio	10 mg	β-caroteno	449 µg
Magnesio	11 mg	α-caroteno	101 µg
Fósforo	24 mg	Lycopeno	2573 µg
Potasio	237 mg	Luteína + zeaxantina	123 µg

El procesado industrial del tomate puede afectar la biodisponibilidad de estos nutrientes. En los productos de tomate procesado, la homogeneización, el calor y la incorporación de aceites llevan a un incremento de la biodisponibilidad de licopeno, a la vez que algunos de estos procesos ocasionan una pérdida importante de otros nutrientes importantes como la vitamina C. El contenido en nutrientes también se ve afectado por la variedad y el estado de maduración. La mayoría de estos nutrientes pueden actuar de manera individual, o conjunta, en la protección de las lipoproteínas y las células vasculares de la oxidación, que es la teoría más ampliamente aceptada para el origen de la aterosclerosis (Willcox et al. 2003). El licopeno es un carotenoide no precursor de la vitamina A, pero es el antioxidante más eficiente entre los carotenoides por su actividad neutralizadora del singlete de oxígeno y de los radicales peróxidos (Dorais et al. 2008), teniendo el doble de capacidad antioxidante que el β-caroteno (Di Mascio et al. 1990). Numerosos estudios epidemiológicos han demostrado que una ingesta diaria de alimentos ricos en licopeno se relacionan con un descenso en la incidencia de ciertos tipos de cáncer, incluyendo el de próstata, pulmón, boca y colon, así como de enfermedades coronarias, cataratas y en cierta medida puede que la degeneración macular (Willcox et al. 2003; Giovannucci 2002; Giovannucci 1999; Gerster 1997). Por tanto, debido a que los tomates contienen varios nutrientes asociados con efectos teóricos o probados y son ampliamente consumidos durante todo el año, deben ser tenidos en cuenta como un componente valioso de una dieta cardioprotectora (Willcox et al. 2003).

A la vez que su consumo se ha incrementado, se observa desde los años 90 que los consumidores tienden a quejarse del sabor del tomate (Hobson 1988; Bruhn et al. 1991; Ratanachinakorn et al. 1997), con frecuencia culpando a los cultivares modernos de falta de sabor. Parece que en el proceso de mejora del cultivo, la búsqueda de la disponibilidad de tomate durante todo el año, por un lado, y la tendencia de los mejoradores hacía un fruto cada vez más firme y de mayor vida poscosecha empleando genes que alteran la maduración normal del fruto, por otro, han desembocado en esta situación (Causse et al. 2010).

## **II. MEJORA GENÉTICA DE LA CALIDAD DEL FRUTO DE TOMATE.**

### **II.1. El concepto de calidad del fruto.**

Los principales objetivos de los programas de mejora de tomate han sido alta productividad, resistencia a enfermedades, uniformidad de tamaño y color de fruto, adaptación a condiciones de crecimiento específicas y la vida post-cosecha del fruto (Causse et al. 2010; Baldwin et al. 1998). Se han conseguido con éxito cultivares e híbridos resistentes, con tomates uniformes y atractivos, sin embargo estas nuevas variedades presentan una calidad de sabor bastante reducida (Galiana-Balaguer et al. 2006). Siguiendo a Llácer et al. (2006), la calidad de un producto hortofrutícola para el consumidor está relacionado con la:

- Calidad organoléptica o sensorial, aquella que capta el consumidor directamente con sus sentidos, y se refiere al color, sabor, aroma, textura.
- Calidad nutricional, la que está relacionada con la capacidad de los alimentos de proporcionar todos los nutrientes que favorezcan una buena salud y eviten la aparición de enfermedades.
- Calidad sanitaria, que tiene en cuenta la presencia o ausencia de tóxicos naturales, contaminantes y/o microorganismos patógenos que puedan dar lugar a una acción tóxica.

La calidad sensorial del fruto de tomate para consumo en fresco está relacionada con la apariencia visual (tamaño, forma y color), la textura (firmeza, jugosidad) y atributos de sabor (Sinesio et al. 2010). La apariencia visual es un factor crítico en la elección inicial del consumidor, sin embargo en las compras posteriores la calidad interna del producto llega a ser el factor más influyente (Maul et al. 1997). El sabor es la impresión sensorial que causa un alimento u otra sustancia al comerlo, y es un carácter complejo que depende de las cantidades y proporciones adecuadas de determinados constituyentes, ya que viene determinado principalmente por sensaciones químicas detectadas por el gusto y el olfato. El mercado europeo de productos frescos incrementa constantemente sus demandas de alimentos fácilmente distinguibles por criterios que reflejen calidad, por tanto, para satisfacer las expectativas del consumidor, los mejoradores de tomate llevan trabajando en la calidad sensorial como uno de sus mayores objetivos durante los últimos años (Fulton et al. 2002; Saliba-Colombani et al. 2001; Chaib et al. 2006; Causse et al. 2001; Zanor et al. 2009; Causse et al. 2003; Sinesio et al. 2010; Causse et al. 2010), aunque la naturaleza compleja de muchos de esos caracteres que componen la calidad y la falta de criterios de selección efectivos hacen que sea una ardua tarea. Pero también es crucial que los frutos carezcan de ciertos defectos como las fisiopatías que merman considerablemente su calidad visual como el agrietado y los defectos de coloración en la maduración como la estudiada en esta memoria conocida como “mancha solar”.

La calidad nutricional en el caso del tomate es un aspecto a destacar, tal y como se ha detallado al hablar de la importancia del tomate, ya que con su consumo se contribuye significativamente a la ingesta diaria de compuestos saludables como vitaminas y antioxidantes, y numerosos estudios avalan la relación positiva de algunos constituyentes del tomate con baja incidencia de diversas enfermedades. De hecho, el enriquecimiento del tomate en compuestos saludables ha llegado a ser un objetivo crucial para los mejoradores (Dorais et al. 2008) aunque los programas de mejora genética para obtener productos con una alta calidad interna se asumen largos, difíciles y muy laboriosos (Scott 2002).

## II.2. El proceso de mejora genética.

El primer paso en el proceso de mejora es estudiar la variación natural que existe para la calidad del fruto, ya sea calidad externa (aspecto visual) o interna (composición química), dentro de las diferentes especies y/o cultivares (Davies et al. 1981; Schauer et al. 2005; Spencer et al. 2005; Tikunov et al. 2005; Fernie et al. 2006; Galiana-Balaguer et al. 2006), o bien empleando poblaciones segregantes como las líneas recombinantes o de introgresión (Chaib et al. 2006; 2007; Schauer et al. 2006; 2008; Tieman et al. 2006; Hovav et al. 2007). Al hablar del origen y la domesticación del tomate se ha comentado el interés que despiertan las especies silvestres como potenciales donadoras de caracteres que sean de interés para el tomate cultivado. El segundo paso es, por tanto, la incorporación de esos caracteres favorables, provenientes de especies silvestres, en el tomate cultivado; diseñando un programa de mejora basado en cruces interespecíficos y posterior selección.

Hay varios ejemplos de la utilidad de alelos de especies silvestres para los que se ha conseguido la introgresión con éxito. Entre los ejemplos están híbridos comerciales que contienen diferentes combinaciones de hasta 15 genes silvestres de resistencia a enfermedades (Pan et al. 2000) y la introducción de genes importantes de *S. pennellii* que incrementan el contenido en sólidos solubles (SSC) en un 15-25% (Fridman et al. 2000) y los niveles de provitamina A ( $\beta$ -caroteno) en más de 15 veces (Ronen et al. 2000).

Los estudios de herencia de un carácter, por medio de análisis clásicos de diseño de un programa de cruces, se han hecho al principio sólo con algunos caracteres, en particular SSC y acidez (Stevens 1986). Con la llegada de los marcadores moleculares se hizo posible identificar las regiones genómicas que controlan la variación del carácter, y que se denominaron *Quantitative Trait Loci* (QTL). De esta manera se han abordado estudios de varios caracteres de calidad para tomate en fresco en diferentes poblaciones, fruto de cruces, bien entre tomate tipo *cherry* y tomate cultivado de fruto grande (Saliba-Colombani et al. 2001; Causse et al. 2001), o bien interespecíficos, entre el tomate cultivado y otras especies del complejo *Solanum*

*lycopersicum*, como *S. pimpinellifolium* (Tanksley et al. 1996; Chen et al. 1999; Zorzoli et al. 2000; Rodríguez et al. 2006; Pratta et al. 2011) o *S. neorickii* (anteriormente *L. parviflorum*) (Fulton et al. 2000) y *S. cheesmaniae* (Goldman et al. 1995); o incluso con especies más alejadas como *S. pennellii* (Eshed & Zamir 1995; Fridman et al. 2004). Siguiendo otra estrategia de mejora, recientemente se ha generado la primera población de tomate que proviene de varios parentales donadores. Este tipo de población, denominada MAGIC por sus siglas en inglés *Multiparent Advanced Generation InterCross*, ofrece una alternativa a las poblaciones tradicionales empleadas en los estudios de ligamiento, incrementando la precisión del mapeo de QTLs, ya que la población se ha desarrollado cruzando 8 líneas fundadoras, seleccionadas para incluir un amplio rango de diversidad genética (Pascual, Albert, et al. 2015; Pascual, Desplat, et al. 2015).

Los resultados de estos estudios apuntan que la mayoría de estos caracteres presentan herencia poligénica, de ahí la complejidad con la que siempre se les ha descrito. Se han identificado varios QTL que controlan los niveles de azúcares, ácidos orgánicos o volátiles, caracteres estos relacionados con la calidad interna (Saliba-Colombani et al. 2001; Causse et al. 2002; Schauer et al. 2008; Schauer et al. 2006; Tieman et al. 2006); y también QTL que controlan los aspectos más físicos de la calidad organoléptica (Lecomte et al. 2004; Chaïb et al. 2007). El conocimiento de estos QTL ha sido empleado para la selección de líneas en programas de mejora (Saliba-Colombani et al. 2001; Causse et al. 2001; Causse et al. 2002; Lecomte et al. 2004; Fulton et al. 2000; Fulton et al. 2002).

### **II.3. Selección del material vegetal.**

La mejora de la calidad interna necesita parentales donadores equilibrados, con altos contenidos en los constituyentes de la calidad de manera individual, para poder desarrollar la estrategia de mejora en sus primeros pasos (Galiana-Balaguer et al. 2006). El tomate cultivado, *S. lycopersicum*, se puede cruzar con facilidad con otras especies de *Solanum*, incluyendo *S. pimpinellifolium*, *S. neorickii*, *S. habrochaites*, *S. chmielewskii* y *S. pennellii*, y con más dificultad, requiriendo técnicas como el rescate

de embriones, con el resto de las especies del grupo como las del complejo *S. peruvianum* y *S. chilense*. Estas especies muestran un fenotipo muy diferente de *S. lycopersicum* respecto al fruto, ya que todas producen frutos de mucho menor tamaño que los de las especies cultivadas, y sólo *S. pimpinellifolium* tiene fruto rojo (Schauer et al. 2005), apareciendo por tanto como la mejor alternativa para iniciar proceso de mejora. Entre las especies de *Solanum*, sólo *S. lycopersicum* se ha domesticado como cultivo, aunque *S. pimpinellifolium* también se ha plantado a veces para consumo; sin embargo, para la mayoría de la gente no presenta cualidades organolépticas agradables (Rick 1978). Estudios de la variación en la actividad antioxidante y en el contenido en antioxidantes en varias entradas de ambas especies, determinaron que la media de las entradas del grupo de *S. pimpinellifolium* era significativamente más alta para la actividad antioxidante y el contenido de licopeno, vitamina C, fenoles y otros caracteres como el contenido en sólidos solubles (SSC), sugiriendo que la introgresión de alelos de *S. pimpinellifolium* podría tener potencial para la mejora del tomate cultivado en estos caracteres (Hanson et al. 2004). Hace más de 70 años que se determinó el alto contenido en vitamina C, licopeno,  $\beta$ -caroteno y SSC en *S. pimpinellifolium*, respecto a *S. lycopersicum* (Lincoln et al. 1943), sin embargo estos caracteres son poligénicos y la introgresión de genes que mejoren estos caracteres en cultivares élite de tomate por mejora tradicional ha sido difícil (Hanson et al. 2004).

En el banco de germoplasma de La Mayora se contaba con una línea pura silvestre de *S. pimpinellifolium* denominada TO-937, derivada por selección y fijación de la entrada PE-2, que posee numerosos caracteres de gran interés: la resistencia a plagas como la araña roja (Fernández-Muñoz et al. 2000) conferida por la presencia en sus hojas de un tipo especial de tricoma glandular (Fernández-Muñoz et al. 2003); determinadas características relacionadas con la tolerancia a la salinidad y la eficiencia en el uso del agua (González-Fernández et al. 1995); y, por evaluaciones previas del grupo de Mejora de la EELM, alto contenido en compuestos relacionados con la calidad del fruto como ácidos orgánicos, sólidos solubles y licopeno (no publicadas). Los frutos de TO-937 son comestibles pero en catas sencillas realizadas por parte del personal del centro, el fruto no se describe como agradable, ya que por su pequeño

tamaño la proporción de semillas es mucho mayor que la de pericarpo y su sabor es muy ácido.

Se diseñó un programa de mejora que se inició con la generación de una población de 169 líneas recombinantes consanguíneas (partiendo de 185 plantas F<sub>2</sub>), de tipo RIL (*Recombinant Inbred Lines*), desarrollada por el método del *single seed descent* hasta llegar a la generación F<sub>8</sub>. Esta población se desarrolló a partir del cruzamiento interespecífico de una variedad de tomate cultivado *S. lycopersicum* “Moneymaker”, con la entrada de *S. pimpinellifolium* antes mencionada, TO-937, del banco de germoplasma de la Estación Experimental La Mayora. Cuando esta población alcanzó la generación F<sub>7</sub> se empleó como material vegetal de partida para el trabajo que se describe en esta Memoria. En ese momento ya se habían desarrollado o estaban en marcha en otros laboratorios algunos trabajos que generaron también poblaciones RILs interespecíficas (Goldman et al. 1995; Rodríguez et al. 2006), en las que se analizaba la herencia de algunos caracteres relacionados con la calidad, como el peso del fruto o el contenido en sólidos solubles, pero el número de caracteres estudiados era muy bajo y por otra parte no prestaban atención a la apariencia externa, como la presencia de fisiopatías como la mancha solar.

De los aspectos que se refieren a la calidad del fruto se hablará con más detalle en el capítulo 1 de esta Memoria, ya que se presentan resultados del estudio de la población RIL obtenida, para caracteres que afectan a la calidad sensorial y nutricional del fruto.

### **III. MANCHA SOLAR Y CALIDAD DEL FRUTO DE TOMATE.**

#### **III.1. Descripción de la fisiopatía de la mancha solar.**

Una fisiopatía se define como un desorden fisiológico que sufre la planta como consecuencia de la carencia o el exceso de algún factor necesario para su desarrollo normal, por ello también puede llamarse enfermedad no infecciosa o abiótica. El exceso o defecto de algún nutriente, agua, temperatura o luz suelen encontrarse

detrás de la mayoría de las fisiopatías, así como valores extremos del pH del suelo. Se caracterizan porque ocurren en ausencia de patógenos, por lo que no se transmiten de una planta enferma a una sana, y pueden presentarse en cualquier estado fenológico del desarrollo. Son aquellas fisiopatías que afectan a la calidad del fruto las que representan un mayor problema a su producción y exportación. En el fruto de tomate se han descrito varias fisiopatías que afectan a la apariencia externa y en gran medida a la calidad interna del fruto. Su aparición merma la producción y la calidad de los frutos de tomate recolectados, provocando una pérdida en el valor comercial del fruto y un deterioro en la imagen de este producto en los mercados internacionales.

En tomate es especialmente importante la fisiopatía conocida como mancha solar. La mancha solar en tomate es una fisiopatía caracterizada por la aparición de una zona amarilla de tamaño variable y más o menos endurecida en la región peduncular del fruto, que se continúa algunos milímetros en el interior del pericarpo y que contrasta con el resto del fruto que presenta una apariencia de rojo maduro normal (Picha 1987). Esta zona amarilla no sufre un retraso, sino una alteración en el desarrollo y la maduración del fruto (Francis et al. 2000), y presenta bajo contenido en carotenoides y otros compuestos (Darrigues et al. 2008), además de no ser agradable para su consumo. A nivel comercial la presencia de mancha solar en los frutos degrada la calidad del fruto completo, ya sea para consumo en fresco o procesado. En el mercado genera un rechazo visual en el consumidor, que busca un alimento saludable. En la industria de productos de tomate procesado, donde el color y el contenido en sólidos solubles del producto final están entre los parámetros más importantes, se emplea el color del fruto como un indicador de la madurez real del fruto, que según Young y col. (1993) es más fiable que el número de días post-antesis. La presencia en los lotes de producción de frutos con mancha solar podría enmascarar la calidad real del fruto empleado como materia prima, empobreciendo la calidad del producto final.

Las causas por las que aparece la mancha solar no están claras, pudiendo ser nutricionales, ambientales y genéticas (Francis et al. 2000; Picha & Hall 1981). Numerosos estudios establecen un factor nutricional en la aparición de la mancha solar, observándose una correlación negativa entre el nivel de potasio en el suelo y el

número de frutos afectados y su severidad, ya sea en invernadero o en campo (Picha & Hall 1981; Hartz et al. 1999; Hartz 2005; Trudel & Ozbun 1971). Entre los factores ambientales se ha observado que la radiación solar sobre el fruto verde está implicada en la aparición posterior de la mancha en fruto rojo maduro, y así, evitando la exposición a la radiación solar se consigue impedir su aparición (Ruiz-Rubio C. et al. 2006). Acerca de los factores genéticos, experimentos anteriores en la Estación Experimental La Mayora-CSIC (EELM) han mostrado que la mancha solar parece tener un carácter poligénico. El único gen conocido que parece estar relacionado con la mancha solar es el gen *u*, de maduración uniforme, responsable del fenotipo hombro verde en los frutos inmaduros. Los genotipos de maduración uniforme (*u/u*) tienden a mostrar “yellow ring”; y la mancha solar tal y como se describe anteriormente se encuentra normalmente en genotipos de maduración no uniforme (*U/U*), que presentan hombro verde durante el comienzo de la maduración (Francis et al. 2000).

### **III.2. Selección del material vegetal.**

Debido al carácter poligénico de la mancha solar, para su estudio se hace necesario conseguir un material vegetal con pocas diferencias en su fondo genético, pero a su vez contrastante para el carácter, de manera que las diferencias entre ese material vegetal contrastante deben responder a diferencias genéticas directamente relacionadas con la mancha solar. En el proceso de obtención de la población de las líneas recombinantes se observó que varias líneas RIL presentaban mancha solar en los frutos, a pesar de que los parentales no presentaban el carácter. Este hecho permitió que tras varias evaluaciones se seleccionaran dos plantas dentro de una misma RIL en construcción, en la generación  $F_6$ , porque presentaban diferencias para el carácter de mancha solar, a pesar de ser plantas hermanas. Desde entonces se realizaron 4 sucesos de siembra, autofecundación, evaluación y selección para definir y obtener dos líneas que comparten gran parte de su fondo genético, pero que son diferentes para el carácter mancha solar.

En los capítulos 2 y 3 de esta Memoria se detallará cómo estas líneas contrastantes para mancha solar se han empleado para analizar el efecto de la

radiación solar en la aparición de la mancha y para generar el primer modelo que explicaría las bases genéticas de esta fisiopatía, mediante análisis genéticos y proteómicos.



## Objetivos

- Caracterizar fenotípicamente la población RIL para caracteres de calidad interna y externa y estimar parámetros genéticos útiles para su mejora.
- Localizar Quantitative Trait Loci (QTLs) de dichos caracteres en un mapa genético de la población.
- Estudiar el efecto de la radiación solar y el estado fenológico en la aparición de la fisiopatía de la mancha solar del fruto.
- Plantear un modelo genético que explique la aparición de mancha solar en el fruto de tomate.



## Bibliografía

- Bai, Y. & Lindhout, P., 2007. Domestication and breeding of tomatoes: what have we gained and what can we gain in the future? *Annals of botany*, 100(5), pp.1085–94. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2759208&tool=pmc&rendertype=abstract> [Accessed March 3, 2013].
- Baldwin, E. et al., 1998. Relationship between sensory and instrumental analysis for tomato flavor. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 123(5), pp.906–915.
- Beecher, G.R., 1998. Nutrient content of tomatoes and tomato products. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 218(2), pp.98–100. Available at: ISI:000073729900003.
- Blanca, J. et al., 2012. Variation revealed by SNP genotyping and morphology provides insight into the origin of the tomato. *PLoS one*, 7(10), p.e48198. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3485194&tool=pmc&rendertype=abstract> [Accessed November 30, 2014].
- Bruhn, C.M. et al., 1991. Consumer perceptions of quality: apricots, cantaloupes, peaches, pears, strawberries, and tomatoes. *Journal of Food Quality*, 14(3), pp.187–195. Available at: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4557.1991.tb00060.x>.
- Causse, M. et al., 2010. Consumer preferences for fresh tomato at the European scale: a common segmentation on taste and firmness. *Journal of food science*, 75(9), pp.S531–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21535628> [Accessed March 11, 2013].
- Causse, M. et al., 2001. Genetic analysis of organoleptic quality in fresh market tomato. 2. Mapping QTLs for sensory attributes. *Theoretical and Applied Genetics*, 102(2-3), pp.273–283. Available at: ISI:000167232800012.
- Causse, M. et al., 2007. *Genetic Improvement of Solanaceous Crops. Vol 2: Tomato* 2007th ed. M. K. Razdan & A. K. Mattoo, eds., Enfield, NH, USA: Science Publishers.

- Causse, M. et al., 2003. Inheritance of nutritional and sensory quality traits in fresh market tomato and relation to consumer preferences. *Journal of Food Science*, 68(7), pp.2342–2350. Available at: ISI:000185523900035.
- Causse, M. et al., 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), pp.2089–2098. Available at: ISI:000178254300009.
- Chaib, J. et al., 2006. Stability over genetic backgrounds, generations and years of quantitative trait locus (QTLs) for organoleptic quality in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 112(5), pp.934–944. Available at: ISI:000235751700016.
- Chaïb, J. et al., 2007. Physiological relationships among physical, sensory, and morphological attributes of texture in tomato fruits. *Journal of experimental botany*, 58(8), pp.1915–25. Available at:  
<http://jxb.oxfordjournals.org/cgi/content/long/58/8/1915> [Accessed February 9, 2015].
- Chen, F.Q. et al., 1999. Mapping of QTLs for lycopene and other fruit traits in a *Lycopersicon esculentum* x *L-pimpinellifolium* cross and comparison of QTLs across tomato species. *Molecular Breeding*, 5(3), pp.283–299. Available at: ISI:000080358000008.
- Darrigues, A., Schwartz, S.J. & Francis, D.M., 2008. Optimizing sampling of tomato fruit for carotenoid content with application to assessing the impact of ripening disorders. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(2), pp.483–487. Available at: ISI:000252434800028.
- Davies, J.N., Hobson, G.E. & McGlasson, W.B., 1981. The constituents of tomato fruit — the influence of environment, nutrition, and genotype. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 15(3), pp.205–280. Available at: <http://dx.doi.org/10.1080/10408398109527317>.
- Dorais, M., Ehret, D.L. & Papadopoulos, A.P., 2008. Tomato (*Solanum lycopersicum*) health components: From the seed to the consumer. *Phytochemistry Reviews*, 7,

pp.231–250.

Eshed, Y. & Zamir, D., 1995. An introgression line population of *Lycopersicon pennellii* in the cultivated tomato enables the identification and fine mapping of yield-associated QTL. *Genetics*, 141(3), pp.1147–1162. Available at: <http://www.genetics.org/content/141/3/1147.abstract>.

Esquinas-Alcázar, J. & Nuez, F., 1995. Situación taxonómica, domesticación y difusión del tomate. In Mundi-Prensa, ed. *El cultivo del tomate*. Madrid, pp. 15–43.

FAO, 2013. FAO. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Available at: <http://faostat3.fao.org/home/E>.

Fernández-Muñoz, R. et al., 2003. Inheritance of Resistance to Two-spotted Spider Mite and Glandular Leaf Trichomes in Wild Tomato *Lycopersicon pimpinellifolium* (Jusl.) Mill. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 128(2), pp.188–195. Available at: <http://journal.ashspublications.org/content/128/2/188.abstract>.

Fernández-Muñoz, R., Domínguez, E. & Cuartero, J., 2000. A novel source of resistance to the two-spotted spider mite in *Lycopersicon pimpinellifolium* (Jusl.) Mill.: Its genetics as affected by interplot interference. *Euphytica*, 111, pp.169–173.

Fernie, A.R., Tadmor, Y. & Zamir, D., 2006. Natural genetic variation for improving crop quality. *Current opinion in plant biology*, 9(2), pp.196–202. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369526606000112> [Accessed February 9, 2015].

Foolad, M.R., 2007. Genome mapping and molecular breeding of tomato. *International Journal of Plant Genomics*, 2007, pp.1–52. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2267253&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> [Accessed March 6, 2013].

Francis, D.M., Barringer, S.A. & Whitmoyer, R.E., 2000. Ultrastructural characterization of yellow shoulder disorder in a uniform ripening tomato genotype. *Hortscience*, 35(6), pp.1114–1117. Available at: ISI:000089964200030.

- Fridman, E. et al., 2004. Zooming in on a quantitative trait for tomato yield using interspecific introgressions. *Science*, 305(5691), pp.1786–1789. Available at: ISI:000224039500045.
- Fridman, E., Pleban, T. & Zamir, D., 2000. A recombination hotspot delimits a wild-species quantitative trait locus for tomato sugar content to 484 bp within an invertase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(9), pp.4718–4723. Available at: <http://www.pnas.org/cgi/content/long/97/9/4718> [Accessed February 14, 2015].
- Fulton, T.M. et al., 2000. Advanced backcross QTL analysis of a *Lycopersicon esculentum* × *Lycopersicon parviflorum* cross. *Theoretical and Applied Genetics*, 100(7), pp.1025–1042. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s001220051384>.
- Fulton, T.M. et al., 2002. Quantitative trait loci (QTL) affecting sugars, organic acids and other biochemical properties possibly contributing to flavor, identified in four advanced backcross populations of tomato. *Euphytica*, 127(2), pp.163–177. Available at: <http://dx.doi.org/10.1023/A%3A1020209930031>.
- Galiana-Balaguer, L., Roselló, S. & Nuez, F., 2006. Characterization and selection of balanced sources of variability for breeding tomato (*Lycopersicon*) internal quality. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53(5), pp.907–923. Available at: ISI:000238270600006.
- Gerster, H., 1997. The potential role of lycopene for human health. *Journal of the American College of Nutrition*, 16(2), pp.109–126. Available at: ISI:A1997WQ60400004.
- Giovannucci, E., 2002. A review of epidemiologic studies of tomatoes, lycopene, and prostate cancer. *Experimental Biology and Medicine*, 227(10), pp.852–859. Available at: ISI:000179078600003.
- Giovannucci, E., 1999. Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature. *Journal of the National Cancer Institute*, 91(4), pp.317–331.
- Goldman, I., Paran, I. & Zamir, D., 1995. Quantitative trait locus analysis of a

- recombinant inbred line population derived from a *Lycopersicon esculentum* x *Lycopersicon cheesmanii* cross. *Theoretical and Applied Genetics*, 90(7), pp.925–932. Available at: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/BF00222905>.
- González-Fernández, J., Fernández-Muñoz, R. & Cuartero, J., 1995. *Report of the Tomato Genetics Cooperative*, Ithaca, NY.
- Hanson, P.M. et al., 2004. Variation for antioxidant activity and antioxidants in tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 129(5), pp.704–711. Available at: ISI:000223836100013.
- Hartz, K., 2005. Processing tomato yield and fruit quality improved with potassium fertigation. *Hortscience*, 40(6), pp.1862–1867.
- Hartz, T.K. et al., 1999. Potassium requirements for maximum yield and fruit quality of processing tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 124(2), pp.199–204. Available at: ISI:000078681600016.
- Hobson, G.E., 1988. How the tomato lost its taste. , pp.46–50.
- Hovav, R. et al., 2007. The identification of a gene (Cwp1), silenced during *Solanum* evolution, which causes cuticle microfissuring and dehydration when expressed in tomato fruit. *The Plant Journal*, 52(4), pp.627–639. Available at: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03265.x>.
- Lecomte, L. et al., 2004. Marker-assisted introgression of five QTLs controlling fruit quality traits into three tomato lines revealed interactions between QTLs and genetic backgrounds. *Theoretical and Applied Genetics*, 109(3), pp.658–668. Available at: ISI:000223097700023.
- Lincoln, R.E. et al., 1943. Provitamin A and vitamin C in the genus *Lycopersicon*. *Botanical Gazette*, 105(1), pp.113–115.
- Llácer, G. et al., 2006. *Mejora genética de la calidad en plantas* 1st ed. Universidad Politécnica de Valencia, ed., Valencia.
- Di Mascio, P. et al., 1990. Carotenoids, tocopherols and thiols as biological singlet molecular oxygen quenchers. *Biochemical Society transactions*, 18(6), pp.1054–

1056.

Maul, F. et al., 1997. Non-destructive quality screening of tomato fruit using “Electronic Nose” technology. *Postharvest Biology and Technology*, 110, pp.188–194.

Miller, J. & Tanksley, S.D., 1990. RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. *Theoretical and Applied Genetics*, 80, pp.437–448.

Nesbitt, T. & Tanksley, S.D., 2002. Comparative sequencing in the genus *Lycopersicon*: Implications for the evolution of fruit size in the domestication of cultivated tomatoes. *Genetics*, 162(1), pp.365–379. Available at: ISI:000178363400030.

Pan, Q. et al., 2000. Comparative Genetics of Nucleotide Binding Site-Leucine Rich Repeat Resistance Gene Homologues in the Genomes of Two Dicotyledons: Tomato and *Arabidopsis*. *Genetics*, 155(1), pp.309–322. Available at: <http://www.genetics.org/content/155/1/309.abstract>.

Pascual, L., Albert, E., et al., 2015. Dissecting quantitative trait variation in the resequencing era: complementarity of bi-parental, multi-parental and association panels. *Plant Science*. Available at:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168945215001831>

[Accessed September 26, 2015].

Pascual, L., Desplat, N., et al., 2015. Potential of a tomato MAGIC population to decipher the genetic control of quantitative traits and detect causal variants in the resequencing era. *Plant Biotechnology Journal*, 13(4), pp.565–577. Available at: <http://dx.doi.org/10.1111/pbi.12282>.

Peralta, I.E., Knapp, S. & Spooner, D.M., 2005. New Species of Wild Tomatoes (*Solanum* Section *Lycopersicon*: Solanaceae) from Northern Peru. *Systematic Botany*, 30(2), pp.424–434. Available at:

<http://www.ingentaconnect.com/content/aspt/sb/2005/00000030/00000002/art00015>.

Peralta, I.E. & Spooner, D.M., 2001. Granule-bound starch synthase (GBSSI) gene

- phylogeny of wild tomatoes (*Solanum* L. section *Lycopersicon* [Mill.] Wettst. subsection *Lycopersicon*). *American Journal of Botany*, 88(1-12), pp.1888–1902.
- Picha, D., 1987. Physiological factors associated with yellow shoulder expression in tomato fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 112(5), pp.798–801. Available at: ISI:A1987J853100015.
- Picha, D. & Hall, C., 1981. Influences of potassium, cultivar, and season on tomato graywall and blotchy ripening. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 106(6), pp.704–708. Available at: ISI:A1981MZ03400003.
- Pratta, G.R. et al., 2011. Phenotypic and molecular characterization of selected tomato recombinant inbred lines derived from the cross *Solanum lycopersicum* x *S. pimpinellifolium*. *Journal of Genetics*, 90(2), pp.229–237. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21869471>.
- Ranc, N. et al., 2008. A clarified position for *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* in the evolutionary history of tomatoes (*solanaceae*). *BMC plant biology*, 8, pp.130–145. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2657798&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> [Accessed January 11, 2015].
- Ratanachinakorn, B., Klieber, A. & Simons, D.H., 1997. Effect of short-term controlled atmospheres and maturity on ripening and eating quality of tomatoes. *Postharvest Biology and Technology*, 11, pp.149–154.
- Rick, C., Fobes, J. & Tanksley, S., 1979. Evolution of mating systems in *Lycopersicon hirsutum* as deduced from genetic variation in electrophoretic and morphological characters. *Plant Systematics and Evolution*, 132(4), pp.279–298. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00982390>.
- Rick, C.M. et al., 1976. Genetic and biosystematic studies on two new sibling species of *Lycopersicon* from interandean Perú. *Theoretical and Applied Genetics*, 47(2), pp.55–68. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00281917>.
- Rick, C.M., 1983. Genetic variability in tomato species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1(2), pp.81–87. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/BF02680303>.

- Rick, C.M., 1978. The Tomato. *Scientific American*, 239(8), pp.76–87.
- Rodríguez, G.R. et al., 2006. Recombinant Lines Obtained from an Interspecific Cross between *Lycopersicon* Species Selected by Fruit Weight and Fruit Shelf Life. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 131(5), pp.651–656. Available at: <http://journal.ashspublications.org/content/131/5/651.abstract>.
- Ronen, G. et al., 2000. An alternative pathway to beta -carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of beta and old-gold color mutations in tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(20), pp.11102–7. Available at: <http://www.pnas.org/cgi/content/long/97/20/11102> [Accessed February 14, 2015].
- Saliba-Colombani, V. et al., 2001. Genetic analysis of organoleptic quality in fresh market tomato. 1. Mapping QTLs for physical and chemical traits. *Theoretical and Applied Genetics*, 102(2-3), pp.259–272. Available at: ISI:000167232800011.
- Schauer, N. et al., 2006. Comprehensive metabolic profiling and phenotyping of interspecific introgression lines for tomato improvement. *Nature biotechnology*, 24(4), pp.447–454.
- Schauer, N. et al., 2008. Mode of inheritance of primary metabolic traits in tomato. *Plant cell*, 20(3), pp.509–23. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2329927&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> [Accessed March 4, 2013].
- Schauer, N., Zamir, D. & Fernie, A.R., 2005. Metabolic profiling of leaves and fruit of wild species tomato: a survey of the *Solanum lycopersicum* complex. *Journal of Experimental Botany*, 56(410), pp.297–307. Available at: ISI:000226308900008.
- Scott, J., 2002. A Breeder's Perspective on the Use of Molecular Techniques for Improving Fruit Quality. *HortScience*, 37(3), pp.464–467.
- Sinesio, F. et al., 2010. Sensory quality of fresh French and Dutch market tomatoes: a preference mapping study with Italian consumers. *Journal of food science*, 75(1), pp.S55–67. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20492203>

[Accessed March 11, 2013].

Spencer, J.P.E. et al., 2005. The genotypic variation of the antioxidant potential of different tomato varieties. *Free Radical Research*, 39(9), pp.1005–1016. Available at: <http://dx.doi.org/10.1080/10715760400022293>.

Spooner, D.M., Anderson, G.J. & Jansen, R.K., 1993. Chloroplast DNA evidence for the interrelationships of tomatoes, potatoes, and pepinos (Solanaceae). *American Journal of Botany*, 80(6), pp.676–688.

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), p.43. Available at: <http://www.jstor.org/stable/10.2307/25065301?origin=crossref>.

Stevens, M.A., 1986. Inheritance of Tomato Fruit Quality Components. In J. Janick, ed. *Plant Breeding Reviews*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 273–311. Available at: <http://dx.doi.org/10.1002/9781118061015.ch9>.

Tanksley, S.D. et al., 1996. Advanced backcross QTL analysis in a cross between an elite processing line of tomato and its wild relative *L. pimpinellifolium*. *Theoretical and Applied Genetics*, 92(2), pp.213–224. Available at: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/BF00223378>.

Tieman, D. et al., 2006. Tomato aromatic amino acid decarboxylases participate in synthesis of the flavor volatiles 2-phenylethanol and 2-phenylacetaldehyde. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(21), pp.8287–92. Available at:

<http://www.pnas.org/cgi/content/long/103/21/8287> [Accessed February 9, 2015].

Tikunov, Y. et al., 2005. A Novel Approach for Nontargeted Data Analysis for Metabolomics. Large-Scale Profiling of Tomato Fruit Volatiles. *Plant Physiology*, 139(3), pp.1125–1137. Available at:

<http://www.plantphysiol.org/content/139/3/1125.abstract>.

- Trudel, M. & Ozbun, J., 1971. Influence of potassium on carotenoid content of tomato fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 96(6), pp.763–765. Available at: ISI:A1971K922000019.
- Willcox, J.K., Catignani, G.L. & Lazarus, S., 2003. Tomatoes and cardiovascular health. *Critical reviews in food science and nutrition*, 43(1), pp.1–18.
- Young, T.E., Juvik, J.A. & Sullivan, J.G., 1993. Accumulation of the Components of Total Solids in Ripening Fruits of Tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 118(2), pp.286–292.
- Zanor, M.I. et al., 2009. Metabolic characterization of loci affecting sensory attributes in tomato allows an assessment of the influence of the levels of primary metabolites and volatile organic contents. *Journal of experimental botany*, 60(7), pp.2139–54. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2682503&tool=pmc&rendertype=abstract> [Accessed February 28, 2013].
- Zorzoli, R., Pratta, G.R. & Picardi, L.A., 2000. Variabilidad genética para la vida postcosecha y el peso de los frutos en tomate para familias F3 de un híbrido interespecífico. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 35, pp.2423–2427.

# CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE CARACTERES RELACIONADOS CON LA CALIDAD DEL FRUTO. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LA CALIDAD DEL FRUTO. OBTENCIÓN DE LÍNEAS CONTRASTANTES

---

### 1.1. ANTECEDENTES

El primer paso para caracterizar los factores genéticos que afectan a caracteres cuantitativos es mapearlos cuidadosamente. Taylor (1976) fue pionero en emplear el uso de las Líneas Recombinantes Consanguíneas (*Recombinant Inbred Lines*, RIL) para cartografiar *loci* de caracteres cuantitativos, llamados QTLs (*Quantitative Trait Loci*), y son poblaciones atractivas para esta tarea porque cada genotipo está representado por una línea consanguínea, en la que ya están fijados los genes en homocigosis, en vez de por un solo individuo, lo que permite obtener medidas de la variabilidad fenotípica más precisas, así como la posibilidad de que cada genotipo se pueda evaluar repetidamente en diferentes condiciones, ambientes o tiempos, permitiendo estimar las interacciones genotipo x ambiente tan frecuentes para los caracteres cuantitativos; por otro lado, la resolución del mapa de ligamiento que se obtiene será mayor dadas las múltiples rondas de meiosis que se producen hasta que se obtiene la homocigosis en la población (Burr & Burr 1991). Además en el conjunto de las líneas RIL se

encuentra representado en igual proporción el genoma de los dos parentales de partida, siendo cada una de las líneas una combinación única de los genes de los parentales, lo que permite el estudio de caracteres en cuya genética interviene la epistasia (Paran et al. 1995).

Existen múltiples estudios que han analizado QTLs para calidad de fruto y algunos caracteres vegetativos, empleando poblaciones  $F_2$  (Paterson et al. 1991) o bien poblaciones obtenidas con diferentes grados de retrocruzamientos (Paterson et al. 1988; Grandillo & Tanksley 1996; Tanksley et al. 1996; Chen et al. 1999). Otros han empleado líneas RIL para detectar QTLs, ya que una población RIL es más eficiente que una población  $F_2$  porque se necesitan menos individuos para detectar ligamientos de la misma magnitud entre un marcador y un QTL (Simpson 1989). Se han generado poblaciones RIL desde cruces entre el tomate cultivado y varias especies de *Solanum* para analizar las bases genéticas de caracteres cuantitativos. Entre otros, Goldman (1995) empleó *S. cheesmaniae* para detectar QTLs para peso del fruto (FW), sólidos solubles (SSC) y peso de la semilla; Causse y Saliba-Colombani (Saliba-Colombani et al. 2001; Causse et al. 2001) recurrieron a una variedad *cerasiforme* de tomate para detectar QTLs de varios caracteres de calidad de fruto y sensorial; y Rodríguez y Pratta (Rodríguez et al. 2006; Pratta et al. 2011) utilizaron una entrada silvestre de *S. pimpinellifolium* para detectar QTLs relacionados con el peso y la vida post-cosecha del fruto.

Como se ha comentado en la introducción general, la población empleada en este trabajo son líneas RIL que provienen del cruzamiento de una variedad de tomate cultivado *S. lycopersicum* "MoneyMaker", con la entrada de *S. pimpinellifolium* TO-937, parentales que presentan valores muy dispares para caracteres externos del fruto, así como para el contenido de compuestos relacionados con la calidad interna del fruto. Debido a estas diferencias, se espera que los caracteres estudiados presenten un rango amplio de variabilidad en las líneas RIL, lo que nos permitirá la caracterización genética de esos caracteres.

Los objetivos del capítulo 1 son fenotipar la población RIL, los parentales y el híbrido para una serie de caracteres seleccionados y desarrollar un mapa de ligamiento saturado, con el fin de determinar el tipo de herencia que presentan esos caracteres, valorar el grado de afectación por los factores ambientales, desvelar las correlaciones fenotípicas y genéticas que se establecen entre ellos, estimar la heredabilidad asociada a cada carácter y, finalmente, con esta información ser capaces de detectar QTLs asociados a los caracteres analizados en este trabajo.

## 1.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.2.1. Material vegetal

El trabajo se inició con el material vegetal de los pasos finales de la obtención de una población de 169 líneas RIL desarrollada por el método del *single seed descent* (SSD) hasta llegar a la generación  $F_8$ , a partir del cruzamiento interespecífico de una variedad de tomate cultivado *Solanum lycopersicum* cv. “Moneymaker”, con una entrada de *S. pimpinellifolium*, TO-937, del banco de germoplasma de la entonces Estación Experimental La Mayora – CSIC, hoy IHSM UMA-CSIC.

### 1.2.2. Diseño experimental

La organización del cultivo de las plantas se inicia a finales de febrero con la preparación de los semilleros y la siembra de las semillas del conjunto de las líneas RILs. También se realiza la siembra de semillas de otro conjunto de las líneas RIL llamadas R, que se han generado en paralelo a las principales para tener posibilidad de reposición en el caso de pérdida de alguna línea, por fallo en la germinación o fructificación, de forma que la línea perdida se reponga con la línea R descendiente de la misma planta  $F_2$  de la que provenía la perdida. Al llegar a la generación  $F_8$  se evaluaron las líneas principales y se hizo necesario tomar 8 líneas R para completar el juego completo de RILs. Desde la generación  $F_8$  sólo se trabaja con el conjunto principal de semillas, incluyendo esas 8 líneas R, que desde ese momento se consideran también principales. Como norma general en el proceso de SSD, para

obtener las semillas de la siguiente generación se usaba la planta 1 de la línea de cultivo de cada familia, o en casos de pérdida o clara desviación del tipo, se empleaba la siguiente planta en el orden de la línea de goteros. En todo el proceso se tenía cuidado en no realizar selección de plantas por mejor apariencia o cualquier otro carácter, de forma que las 3 plantas que iban al invernadero también habían sido las 3 plantas primeras en el orden la bandeja de semillero.

Para los experimentos de este capítulo, se germinaron semillas de cada familia o línea en un invernadero de vidrio en febrero y a los 40 días se trasplantaron las plántulas de cada línea en un invernadero de polietileno, en suelo enarenado, con fertirrigación por líneas de goteros como en la práctica de cultivo comercial. Dentro del invernadero la radiación fotosintéticamente activa (PAR), la temperatura y la humedad relativa fueron registradas en continuo con una estación meteorológica (*Meteodata-256, Geónica, Madrid, España*).

El diseño experimental para llevar a cabo el análisis de los caracteres, que están detallados en profundidad en el siguiente apartado, se planificó en 2 temporadas estivales consecutivas, cada una con un objetivo diferente. Los caracteres de calidad interna del fruto se midieron en las dos temporadas siguiendo el siguiente esquema:

Temporada 1: Se sembraron semillas de cada una de 169 familias  $F_{6:7}$  de las que se trasplantaron 3 plantas al invernadero. De ellas, se seleccionó como planta fundadora de las RILs, siempre que fue posible, la primera planta de las 3 cultivadas, salvo pérdida, en cuyo caso se seleccionó la segunda o, si no, la tercera planta. En esta planta  $F_7$  elegida se tomaron frutos de 3 racimos diferentes por separado, en principio los racimos 3, 5 y 7, cuando la producción de la planta así lo permitió, en estado de rojo maduro. De esta forma se podrá realizar una primera caracterización de la línea respecto a los caracteres de calidad interna con la planta fundadora; y en los casos en que se pudo tomar muestras de diferentes racimos, se podrá analizar si existen diferencias en los caracteres debidas a las diferencias ambientales en las que se desarrollan los

racimos. De los frutos analizados de la planta F<sub>7</sub> elegida se extrajeron las semillas de familias F<sub>7:8</sub> que constituyen ya la población RIL final.

Temporada 2: Se trasplantaron un máximo de 7 plantas por familia F<sub>7:8</sub> de las que se seleccionaron las 5 primeras que hubiera en la fila para prealizar un estudio de la variabilidad intralínea y poder estimar parámetros genéticos. En cada planta por separado se tomaron frutos para una muestra representativa de la planta, siendo estos frutos de los racimos 3 al 5, salvo contadas excepciones. Los caracteres vegetativos, de la inflorescencia y del exterior del fruto al completo, se midieron sólo en esta segunda temporada.

El diseño experimental mostrado arriba contempla que se obtengan 3 muestras por racimo estudiado. Estas 3 muestras se corresponden con 3 viales, cada uno conteniendo el pericarpo de un fruto diferente. Este diseño se pudo mantener en las líneas con un tamaño de fruto intermedio, en las que el pericarpo de un solo fruto pesaba mínimo 4-5 g. En los casos de frutos más pequeños se unificó el pericarpo de varios frutillos en un vial hasta que alcanzó el peso mínimo. Para frutos muy grandes, como el del parental “Moneymaker”, que no pueden ir enteros en el vial, se cortaron también por el ecuador y se vaciaron, pero la muestra se tomó cortando en uno y otro hemisferio un meridiano que pasó por el tabique central y que era representativo del fruto completo. El protocolo para preparar cada muestra siguió los siguientes pasos:

- a. Lavado y secado de los frutos seleccionados.
- b. Medida de caracteres externos cuantificables (color, peso...)
- c. Anotación del resto de caracteres externos.
- d. Corte por plano ecuatorial y anotación de los caracteres correspondientes.
- e. Retirada de mucílago y columela, dejando el tabique interocular.
- f. Medida del peso del pericarpo.
- g. Distribución de los pericarpos en los viales para su congelación y su análisis posterior.

### 1.2.3. Medida de los caracteres de calidad de fruto y planta

Dada la singularidad de la población RIL descrita, en la que se puede observar a simple vista gran variabilidad a nivel de planta y exterior del fruto entre las 169 líneas (Figura 1.1), en este trabajo se han evaluado no sólo los caracteres que afectan directamente a la calidad del fruto, sino que se ha tenido en cuenta además una serie de caracteres de otro tipo que han permitido conocer y evaluar la población RIL en varios aspectos. Además se ha evaluado la presencia de mancha solar u hombro amarillo de los frutos (YSD, *Yellow Shoulder Disorder*) (Picha 1987), fisiopatía para la que la población presenta gran variabilidad. Esta fisiopatía no aparece en ninguno de los dos parentales ni en el híbrido  $F_1$ , pero sí en varias de las líneas RIL, por lo que se le dedica mayor atención en los siguientes capítulos. A continuación se detallan los caracteres seleccionados para su análisis en la población.



**Figura 1.1.** Representación de la variabilidad encontrada en las líneas RILs. **A:** Variabilidad externa de los frutos de las RILs. Frutos de los parentales (arriba izquierda y derecha), el híbrido (arriba centro) y varias líneas RILs (debajo). **B y C:** Variabilidad en el grado de ejercer del estilo. Detalle de una flor con estilo muy exerto, grado 4 (**B**). Detalle de una flor con estilo poco exerto, grado 3 (**C**).

#### 1.2.3.1. Caracteres Vegetativos

La observación y cuantificación de los caracteres morfológicos de la parte vegetativa de las plantas RIL se realiza cuando los frutos de los racimos 2 y 3 están maduros. Los caracteres se observan en 3 plantas por RIL y se calcula el valor medio. A

continuación se presenta una tabla resumen; los detalles de los caracteres observados se explican en el anexo 1.1.

Caracteres Vegetativos
Color del hipocótilo
Tipo de crecimiento
Longitud de la planta
Diámetro del tallo
Pubescencia de tallos y hojas
Distancia entre racimos
Número de hojas entre racimos
Distancia entre hojas
Número de hojas hasta primer racimo
Densidad del follaje
Inclinación de la hoja
Grado de división de la hoja
Borde del foliolo
Posición de los foliolos en los 2 extremos de la hoja
Giro del follaje
Tamaño de foliolo diferente
Inserción del foliolo
Rizado del foliolo

#### 1.2.3.2. Caracteres de la inflorescencia

La observación y cuantificación de los caracteres morfológicos de la inflorescencia de las plantas RIL se realiza cuando el tercer fruto de los racimos 2 y 3 está maduro. Los caracteres se observan en 3 plantas por RIL. A continuación se presenta una tabla resumen; los detalles de los caracteres observados se explican en el anexo 1.2.

Caracteres de la inflorescencia
Tipo de inflorescencia
Número de flores por inflorescencia
Presencia de tallo tras el racimo
Color de la corola
Fusión de la corola
Ángulo de apertura-exposición de la flor
Tamaño relativo de la flor
Posición del estilo
Dehiscencia de la antera

### 1.2.3.3. Caracteres del fruto

La observación y cuantificación de los caracteres morfológicos del fruto de las plantas RIL se realiza cuando el tercer fruto de los racimos 2 y 3 está maduro. Los caracteres se observan en 5-6 plantas por RIL. Los caracteres de fruto verde se miden en un fruto por cada planta. El resto de los caracteres, de fruto rojo maduro, se observan **en los mismos frutos recogidos para el estudio de los caracteres de calidad interna**. A continuación se presenta una tabla resumen; los detalles de los caracteres observados se explican en el anexo 1.3.

Caracteres del fruto
Color del fruto verde
Rayas verdes en el fruto
Intensidad de hombros verdes
Pubescencia del fruto verde
Peso
Peso pericarpo
% Peso pericarpo
Diámetro ecuatorial

Diámetro polar
Forma
Color del fruto rojo
Mancha solar
Brillo
Forma del hombro
Forma de la sección polar
Forma de la zona apical
Agrietado
Pilosidad
Grosor del pericarpo en sección ecuatorial
Color interno del pericarpo
Forma de la sección ecuatorial
Número de lóculos y simetría

#### 1.2.3.4. Caracteres de calidad interna del fruto

El análisis de los caracteres de calidad interna del fruto de las plantas RIL se realiza en frutos rojo maduro. A continuación se presenta una tabla resumen; los detalles de los caracteres analizados se explican en el anexo 1.4.

Caracteres de calidad interna
Sólidos Solubles
Acidez Titulable
Licopeno
$\beta$ -caroteno
% Licopeno
Glucosa
Fructosa
Sacarosa

#### 1.2.4. Análisis de los datos

Para realizar los análisis estadísticos de los datos obtenidos se han empleado varios métodos que se detallan a continuación en el apartado de Resultados. Se ha utilizado el paquete estadístico SPSS 22.0 (IBM Corp. 2013) para los diferentes análisis basados en el análisis de la varianza. Cuando la naturaleza de los datos lo requería, algunas variables fueron transformadas previamente al análisis con el objetivo de normalizar los datos para homogeneizar las varianzas de los diferentes caracteres evaluados. Algunas variables fueron Log-transformadas ( $\log(x+1)$ ) y a las variables de tipo porcentual se les aplicó el arcoseno de la raíz del % dividido entre 100.

##### 1.2.4.1. Evaluación del efecto ambiental durante la misma temporada

Con el objetivo de determinar si existen diferencias entre los frutos recogidos en diferentes cosechas durante la misma temporada, que serían debidas a la diferencia de condiciones ambientales que se suceden durante toda una temporada de cultivo, se realizó un Análisis de la Varianza (ANOVA) entre los datos de los caracteres de fruto que se recogieron en dos momentos de la campaña.

##### 1.2.4.2. Estima de las heredabilidades de los caracteres analizados en la población RIL

La variación observada entre los individuos se puede deber a factores genéticos y/o ambientales. La heredabilidad de un carácter es la proporción de la variación fenotípica en una población que se atribuye a la variación genotípica entre individuos. Los análisis de heredabilidad estiman las contribuciones relativas de los factores genéticos y no genéticos a la varianza fenotípica total en una población. La **heredabilidad en sentido amplio** ( $H$ ) se define como el cociente entre la varianza genética aditiva (o alélica) y la varianza fenotípica, siguiendo la fórmula:

$$H = \frac{V_G}{(V_G + V_E)}$$

donde  $V_G$  es la varianza genotípica y  $V_E$  es la varianza ambiental.

La *heredabilidad en sentido amplio* ( $H$ ) refleja todas las contribuciones genéticas posibles a la varianza fenotípica de una población. Se incluyen los efectos debidos a la variación alélica (varianza aditiva), variación por dominancia y de acción epistática (interacciones multi-génicas), así como efectos materno y paterno.

La **heredabilidad en sentido estricto** ( $h^2$ ) sólo tiene en cuenta, de entre los factores genéticos, la varianza aditiva (Falconer & Mackay 2001). Para el caso particular de las poblaciones RIL, en las que únicamente hay genotipos homocigotos, su estima se puede calcular con la siguiente fórmula (Strom 1999), basada en que en las RILs en cada locus hay dos copias del mismo alelo en homocigosis:

$$h^2 = \frac{1/2 V_G}{(1/2 V_G + V_E)}$$

y cuantifica sólo la porción de la variación fenotípica que es “aditiva” (alélica) por naturaleza (Falconer & Mackay 2001).

El valor de la heredabilidad de un carácter determinado se refiere a una población y unas condiciones ambientales concretas. Los valores que pudieran calcularse en otras poblaciones o estructura poblacional serán más o menos parecidos, dependiendo del grado de semejanza de la estructura poblacional y de las características del medio (Falconer & Mackay 2001).

#### 1.2.4.3. Relación entre los caracteres analizados en la población RIL

Para conocer las relaciones que se establecen entre los diferentes caracteres evaluados en la población RIL es necesario observar si existe correlación entre ellos, y distinguir las causas de correlación entre caracteres, que pueden ser genéticas y ambientales. La causa genética de la correlación es principalmente la pleiotropía, aunque el ligamiento también causa correlaciones transitorias, particularmente en

poblaciones derivadas de cruces entre líneas divergentes. La pleiotropía es la propiedad de un gen de afectar a dos o más caracteres, de forma que si el gen está segregando provoca que los caracteres afectados varíen simultáneamente. La magnitud de la correlación inducida por la pleiotropía expresa en qué medida los dos caracteres están influidos por los mismos genes, pero la correlación que resulta de la pleiotropía indica el efecto conjunto o neto de todos los genes segregantes que afectan a ambos caracteres. El ambiente es también una causa de correlación (por colinealidad) en tanto que los dos caracteres estén influenciados por las mismas diferencias en las condiciones ambientales.

La asociación entre dos caracteres que puede observarse directamente es la correlación de los valores fenotípicos o **correlación fenotípica**, que se determina por las medidas de los caracteres en la población de individuos (Falconer & Mackay 2001). Para establecer una relación existente entre los caracteres evaluados en la población RIL se estimaron los coeficientes de correlación fenotípica ( $r_p$ ) a partir del cálculo del coeficiente de correlación Rho de Spearman que es adecuado no sólo para variables paramétricas (como el coeficiente producto-momento  $r$  de Pearson), sino también para variables no paramétricas como muchas de las aquí estudiadas..

La **correlación genética** es una estima del control genético que comparten dos caracteres, es decir, se estima si existe y cuánto mide el efecto pleiotrópico entre ellos. La correlación genética ( $r_G$ ) entre dos caracteres  $x$  e  $y$  se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$r_G = \frac{Cov_{xy}}{\sqrt{(\sigma_x^2 \cdot \sigma_y^2)}}$$

siendo  $Cov_{xy}$  la covarianza entre los dos caracteres, y  $\sigma^2$  la varianza genotípica de cada uno de los caracteres  $x$  e  $y$ . Para realizar el análisis de la covarianza es necesario descomponer las covarianzas debidas a los efectos genéticos y las debidas al error (Falconer & Mackay 2001).

La **correlación ambiental** entre dos caracteres no es estrictamente la correlación entre las desviaciones ambientales, sino la correlación de éstas junto con las desviaciones genéticas no aditivas. La correlación ambiental ( $r_E$ ) entre dos caracteres  $x$  e  $y$  se calculó a partir de la siguiente fórmula, tras haber calculado las heredabilidades, la correlación fenotípica ( $r_P$ ) y la correlación genética ( $r_G$ ):

$$r_P = h_x h_y r_G + \sqrt{(1 - h_x^2)} \cdot \sqrt{(1 - h_y^2)} \cdot r_E$$

#### 1.2.4.4. Análisis de QTLs

El análisis de localización de QTLs se llevó a cabo en la población RIL con los datos cuantitativos correspondientes a todos los caracteres analizados. Los marcadores moleculares cartografiados en esta población, necesarios para el análisis e identificación de QTLs, formaban un mapa de ligamiento de la población RIL compuesto por 4885 marcadores con, lógicamente, una gran saturación en cada uno de los 12 cromosomas de la especie. En el mapa las distancias genéticas están expresadas según la función de Kosambi. El mapa estaba formado en su mayoría por marcadores SNP, genotipados por medio del array Infinium 7600 tomato SNP desarrollado a partir del proyecto SolCap, USDA (<http://solcap.msu.edu/>), cartografiado que se realizó mediante un proyecto de investigación conjunto entre nuestro grupo del IHSM la Mayora y el grupo de los Drs Granell y Monforte del IBMCP UPV-CSIC de Valencia. Los valores medios de los caracteres de calidad de fruto obtenidos de la población RIL se emplearon para el análisis de localización de QTLs en el mapa de ligamiento, aplicando el programa MapQTL v5.0 (Van Ooijen 2004), empleando dos métodos paramétricos: el método de mapeo de intervalos o *Interval Mapping* (IM) y el modelo de múltiples QTLs o *Multiple QTL Mapping* (MQM). En primer lugar, se realizó un análisis de los datos según el método IM para determinar los QTLs de mayor efecto y su LOD asociado (del inglés *Log of the odds*, Logaritmo decimal del cociente de verosimilitudes). El valor umbral de significación de LOD se calculó mediante el Test de Permutación en el que los datos de la variable cuantitativa se permutan entre todos los individuos de la progenie y se determina la distribución de

frecuencias de valores LOD de forma aleatoria. Se utilizó un nivel de significación de 0.001 y un número de 1000 permutaciones. Posteriormente se realizó un segundo análisis según el método MQM escogiendo como cofactor el marcador más próximo cercano a la región del QTL y que presentó un valor de LOD más alto en los mapeos anteriores. Cuando había duda de qué marcador elegir como cofactor para el QTL, se empleó el comando *Automatic Cofactor Selection* de MapQTL. Con este proceso de análisis se consigue estimar, además de la localización del QTL en el mapa de ligamiento de la población, el efecto aditivo y el porcentaje de varianza explicada por cada QTL, así como el total de la varianza explicada por todos los QTLs significativos asociados al carácter.

### **1.3. RESULTADOS**

#### **1.3.1. Herencia de los caracteres analizados**

Los datos obtenidos del análisis de los caracteres en las RILs se expresaron gráficamente en histogramas, de manera que la distribución de frecuencias de los valores medios obtenidos en las RILs respecto a cada carácter nos ayude a determinar el comportamiento y la forma de herencia de dicho carácter. La distribución de los valores de la población RIL se denomina normal cuando presenta forma de campana de Gauss; en algunos caracteres se debe modificar la expresión aplicando logaritmo en base 10 para poder representarlos y que la variable se distribuya normalmente. La distribución no siempre es normal, sino que en algunos casos puede estar sesgada hacia uno de los dos extremos, representados por los parentales. En el caso en el que existan RILs que superen los valores establecidos por los parentales se habla de herencia transgresiva. Este fenómeno está bien descrito y se explica por la aparición de combinaciones genéticas en la descendencia que no se encontraban en los parentales, pero que durante el proceso de obtención de las RILs se han creado debido a los eventos de recombinación de los genomas de los parentales en la descendencia. Estas RILs suponen un material de partida muy interesante para la obtención de líneas contrastantes para el estudio de ciertos caracteres. Por ejemplo, se han seleccionado parejas de líneas hermanas contrastantes para el carácter mancha solar, como

material vegetal de estudio de esta fisiopatía, cuyo proceso de obtención se detalla en el capítulo 2.

En los histogramas se ha situado de manera gráfica los valores de ambos parentales y del híbrido  $F_1$  mediante flechas (Figura 1.2). La posición del valor del híbrido respecto a los valores de ambos parentales también nos permite conocer el tipo de herencia de los caracteres. La herencia intermedia se caracteriza porque el valor del híbrido se sitúa en valores intermedios entre los valores de los parentales. En otros casos el valor del híbrido puede encontrarse más cerca del valor de un parental que del otro, por lo que se denomina dominancia parcial hacia uno de los parentales. Como ocurría con la población RIL, si el valor del híbrido se sitúa por encima del valor del parental que presenta el valor más alto para ese carácter o bien por debajo del valor del parental que presenta el valor más bajo para ese carácter, estamos en presencia de sobredominancia. La observación de los histogramas muestra que los caracteres analizados presentan herencia de diferentes tipos, como se detalla en la Tabla 1.1:

**Tabla 1.1.** Tipo de herencia encontrada en los caracteres analizados. La columna central describe la herencia del híbrido respecto a los parentales. La columna a la derecha describe el comportamiento de la población RIL en su conjunto respecto a los parentales. lyc: *S. lycopersicum* cv. "MoneyMaker"; pim: *S. pimpinellifolium* acc. TO-937.

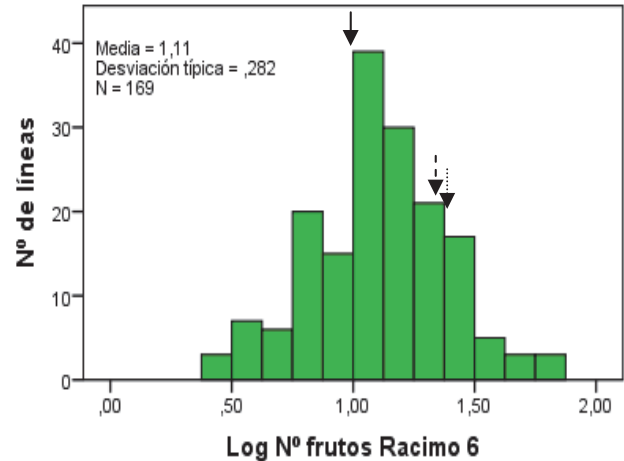
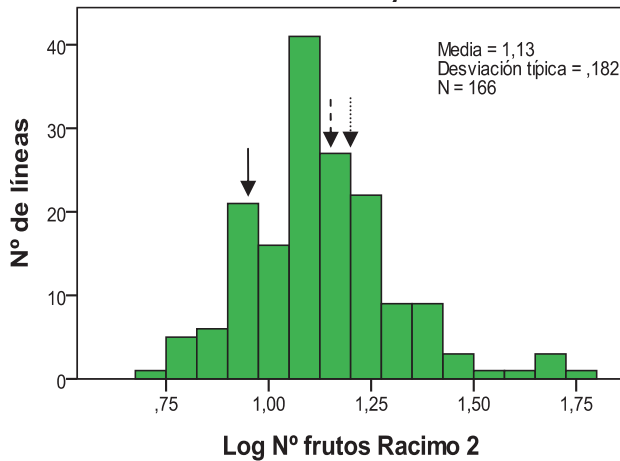
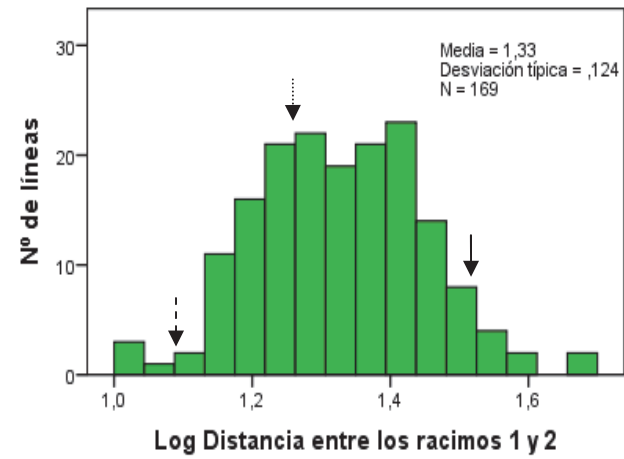
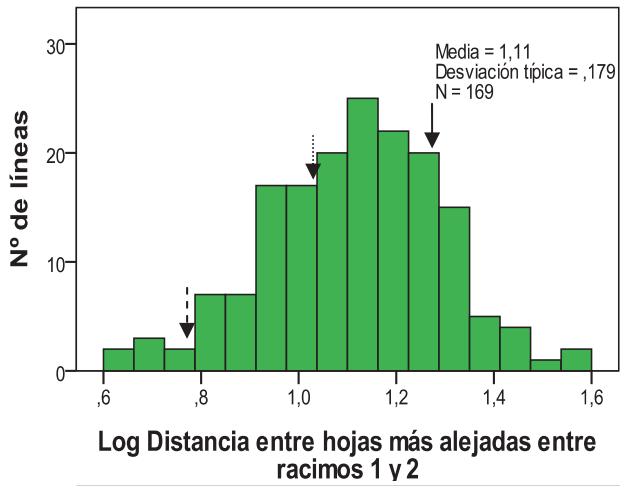
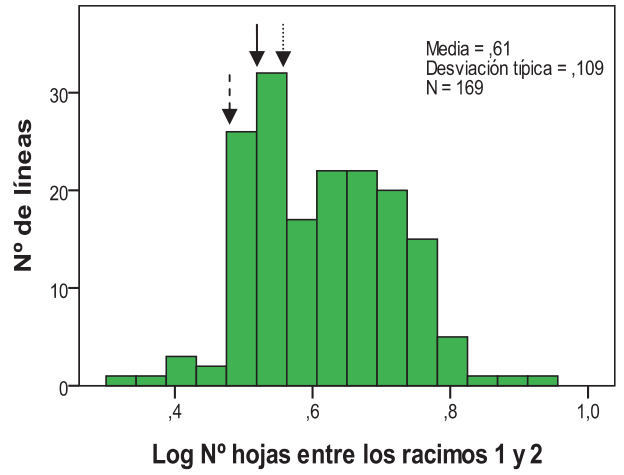
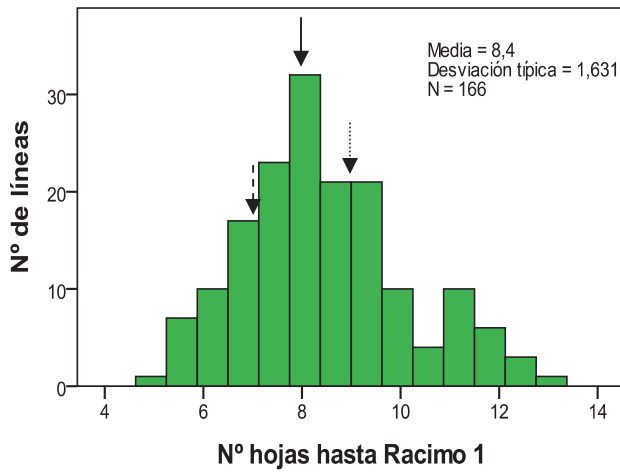
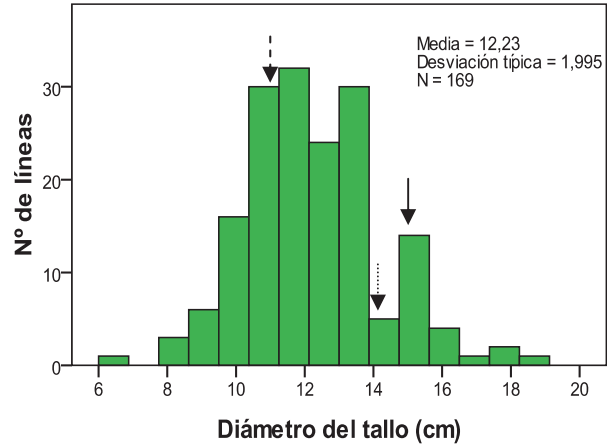
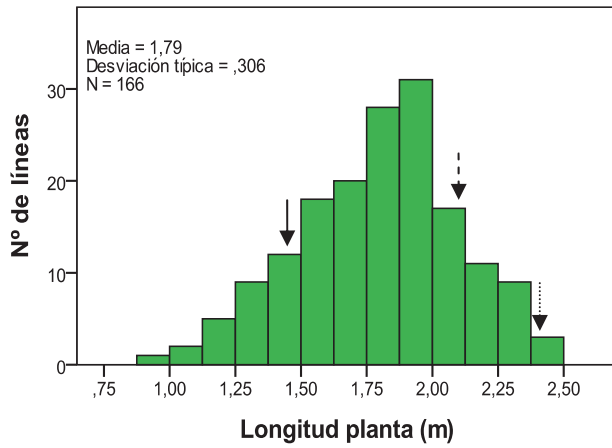
Caracteres analizados	Relación parentales-híbrido	Distribución en la población RIL
Longitud de la planta	Sobredominancia hacia el parental de mayor valor (pim)	Normal, algo sesgada hacia el parental de menor valor (lyc)
Diámetro del tallo	Dominancia parcial hacia el parental de mayor valor (lyc)	Normal y transgresiva en ambos sentidos
Número de hojas hasta racimo 1	Sobredominancia hacia el parental de mayor valor (lyc)	Sesgada hacia el parental de mayor valor (lyc), pero transgresiva en ambos sentidos
Número de hojas entre los racimos 1 y 2*	Sobredominancia hacia el parental de mayor valor (lyc)	Sesgada hacia el parental de mayor valor (lyc), pero transgresiva en ambos sentidos
Distancia entre hojas*	Herencia intermedia	Normal y transgresiva en ambos sentidos

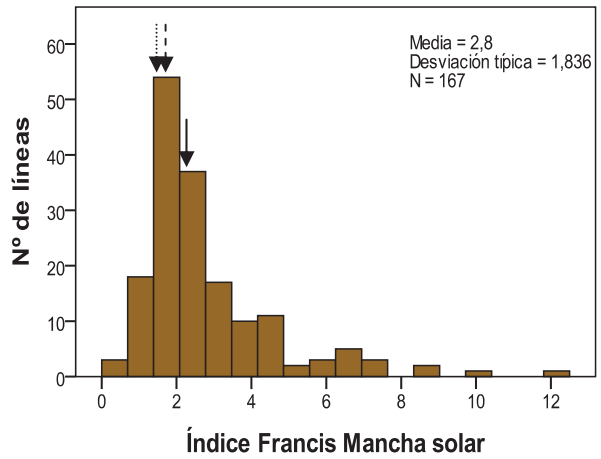
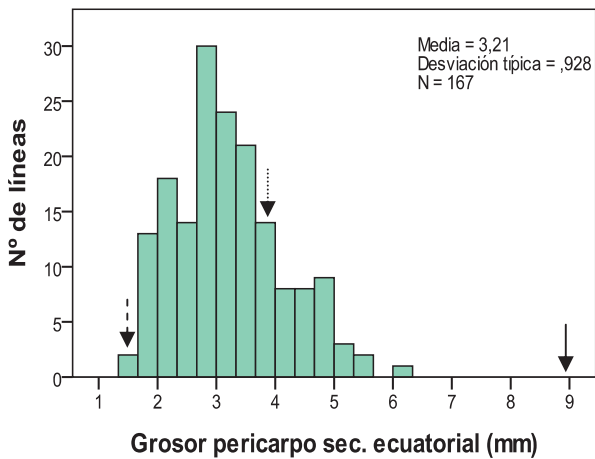
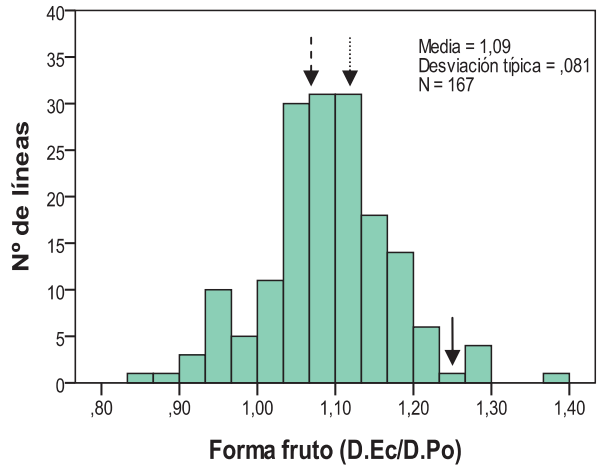
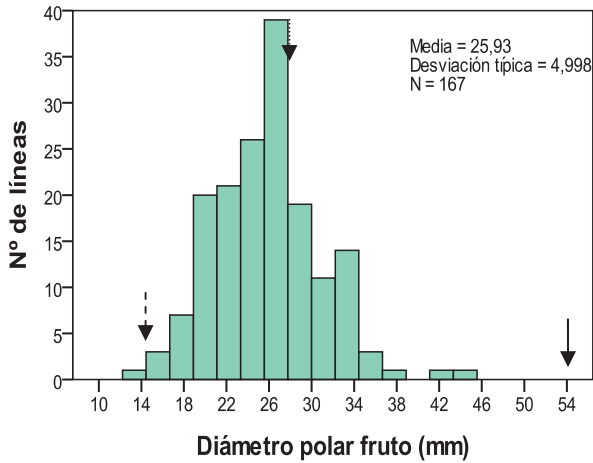
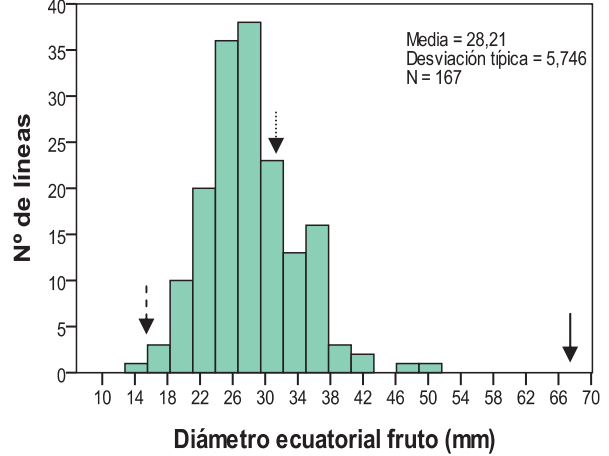
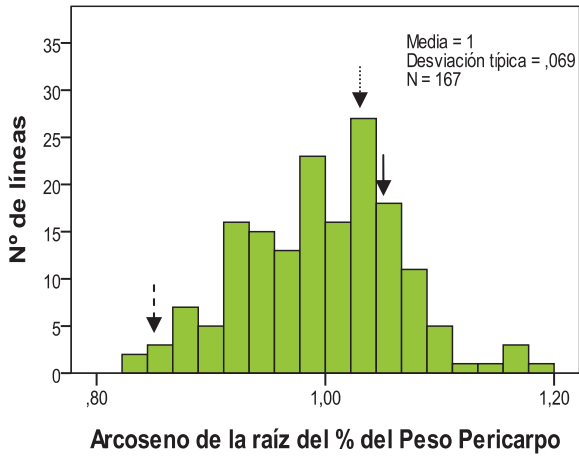
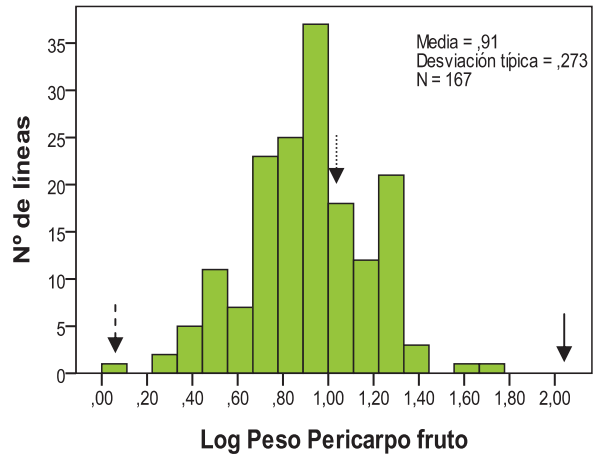
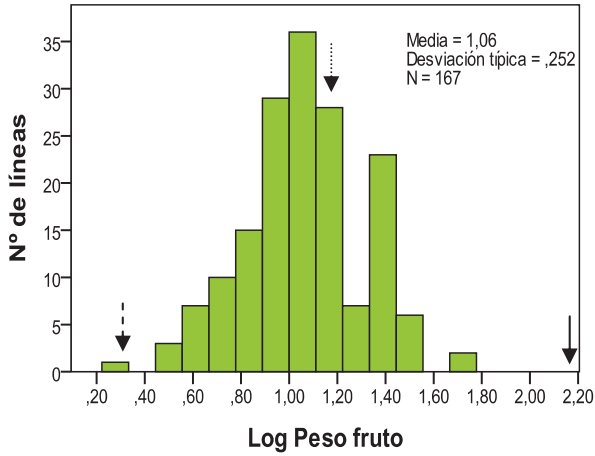
<b>Caracteres analizados</b>	<b>Relación parentales-híbrido</b>	<b>Distribución en la población RIL</b>
Distancia entre racimos 1 y 2*	Herencia intermedia	Normal y transgresiva en ambos sentidos
Número de flores en racimo 2*	Sobredominancia hacia el parental de mayor valor (pim)	Sesgada hacia el parental de mayor valor (pim) , pero transgresiva en ambos sentidos
Número de flores en racimo 6*	Sobredominancia hacia el parental de mayor valor (pim)	Normal y transgresiva en ambos sentidos
Peso*	Herencia intermedia	Normal, algo sesgada hacia el parental de menor valor (pim)
Peso pericarpo*	Herencia intermedia	Normal, algo sesgada hacia el parental de menor valor (pim)
% Peso Pericarpo**	Dominancia parcial hacia el parental de mayor valor (lyc)	Normal, pero transgresiva, mayor que el parental de mayor valor (lyc)
Diámetro ecuatorial (D.Ec.)	Dominancia parcial hacia el parental de menor valor (pim)	Normal, algo sesgada hacia el parental de menor valor (pim)
Diámetro polar (D.Po.)	Dominancia parcial hacia el parental de menor valor (pim)	Normal, algo sesgada hacia el parental de menor valor (pim)
Forma (D.Ec./D.Po.)	Dominancia parcial hacia el parental de menor valor (pim)	Normal, pero transgresiva, menor que el parental de menor valor (pim)
Grosor del pericarpo en sección ecuatorial	Dominancia parcial hacia el parental de menor valor (pim)	Normal, algo sesgada hacia el parental de menor valor (pim)
Índice de Mancha solar (YSD index)	Sobredominancia hacia el parental de menor valor (pim)	Sesgada hacia el parental de menor valor (pim) , pero transgresiva, mayor que el parental de mayor valor (lyc)
Parámetro L* del color del fruto rojo, zonas 1 a 4.	Dominancia parcial hacia el parental de menor valor (pim), siendo algo transgresiva en la zona 1	Sesgada hacia el parental de menor valor (pim) , pero transgresiva en ambos sentidos
Parámetro H* del color del fruto rojo, zonas 1 a 4.	Herencia intermedia	Sesgada hacia el parental de menor valor (pim) , pero transgresiva en ambos sentidos
Sólidos Solubles	Herencia intermedia	Normal, algo transgresiva en ambos sentidos
Acidez Titulable*	Herencia intermedia	Sesgada y transgresiva hacia el parental de menor valor (lyc)

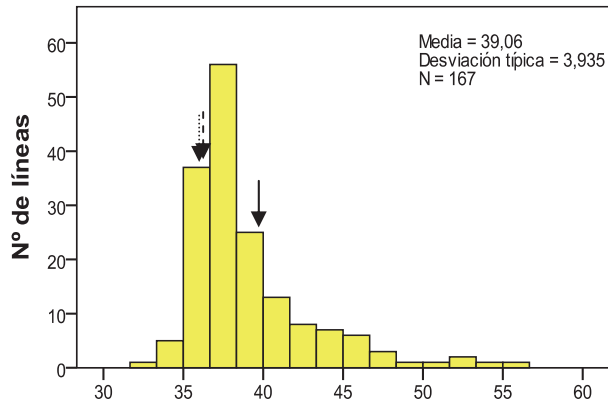
Caracteres analizados	Relación parentales-híbrido	Distribución en la población RIL
Licopeno*	Herencia intermedia	Sesgada y transgresiva hacia el parental de menor valor (lyc)
$\beta$ -caroteno*	Herencia intermedia	Sesgada y transgresiva hacia el parental de menor valor (lyc)
% Licopeno**	No hay diferencia entre parentales ni F <sub>1</sub>	Sesgada hacia valores más altos
Glucosa*	Sobredominancia hacia el parental de mayor valor (pim)	Sesgada y transgresiva hacia el parental de menor valor (lyc)
Fructosa*	Sobredominancia hacia el parental de mayor valor (pim)	Sesgada y transgresiva hacia el parental de menor valor (lyc)
Ratio Fructosa/Glucosa	Sobredominancia hacia el parental de menor valor (pim)	Sesgada y transgresiva hacia el parental de mayor valor (lyc)

\*Representado como logaritmo en base 10.

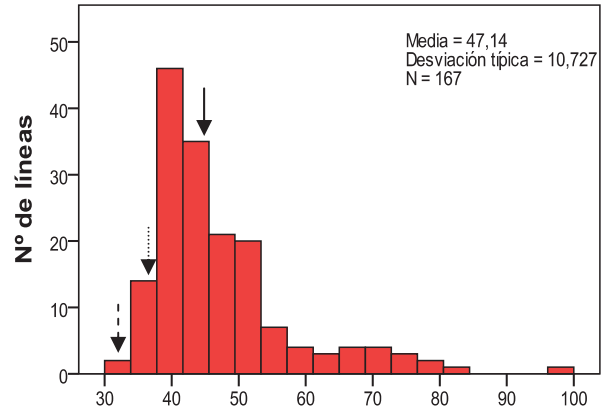
\*\* Representado como el arco seno de la raíz del % dividido entre 100.



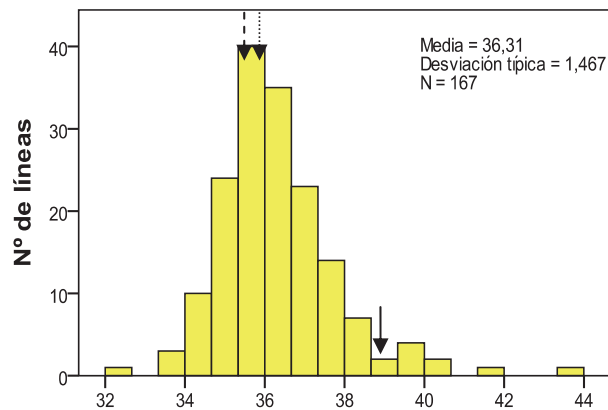




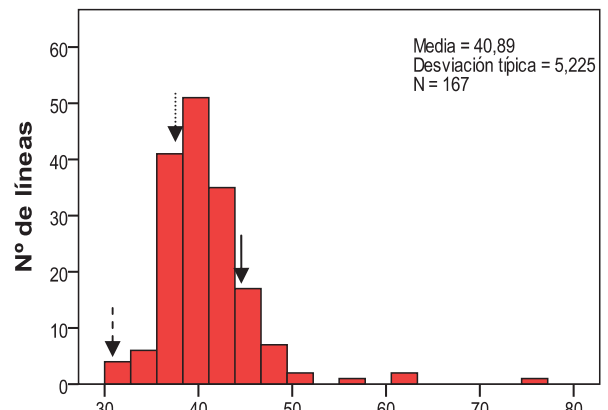
L\* zona 1 (Peduncular)



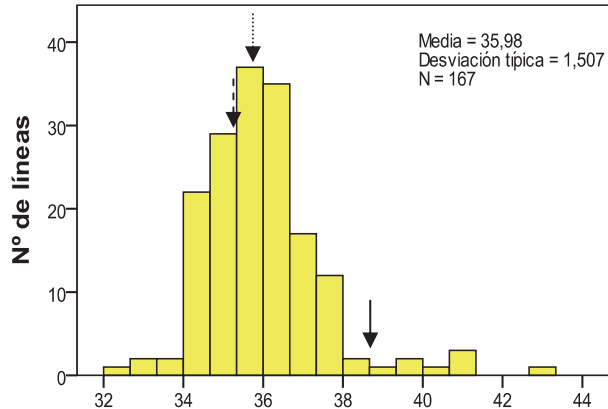
H\* zona 1 (Peduncular)



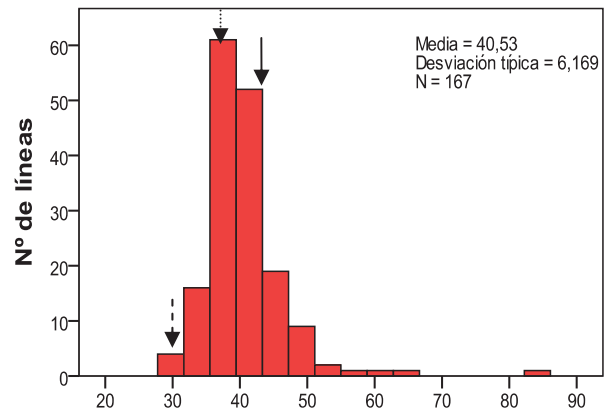
L\* zona 2 (Ecuat-Peduncular)



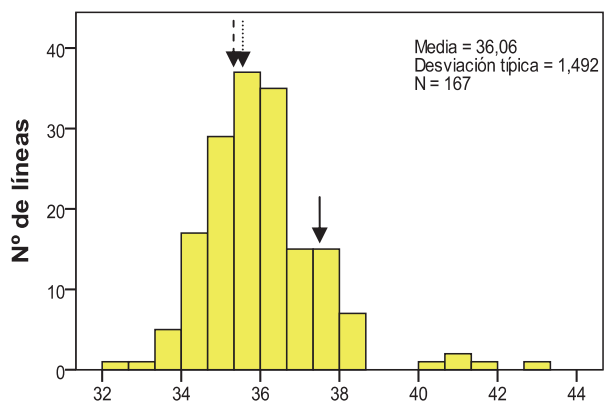
H\* zona 2 (Ecuat-Peduncular)



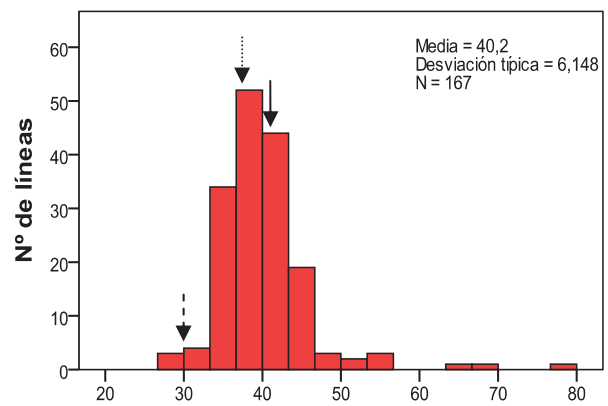
L\* zona 3 (Ecuatorial-Apical)



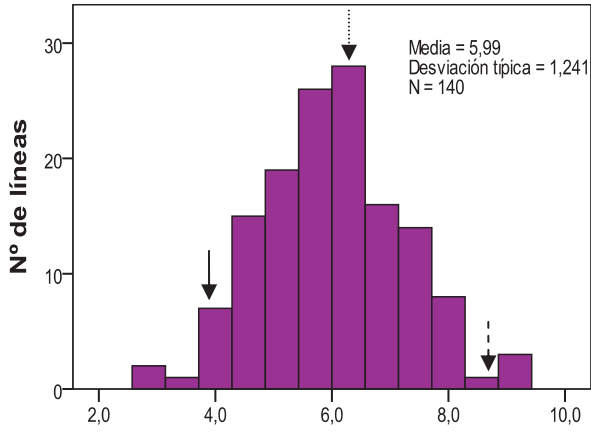
H\* zona 3 (Ecuatorial-Apical)



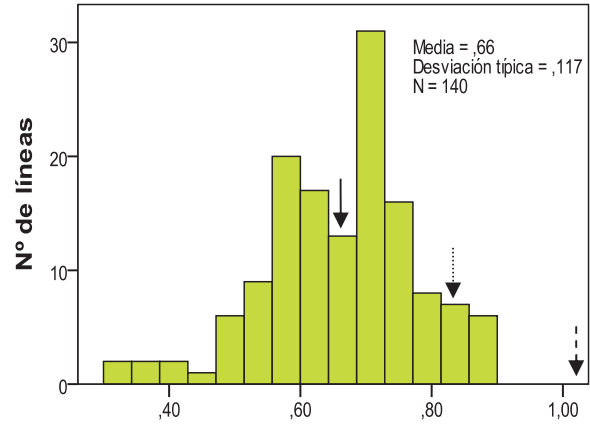
L\* zona 4 (Apical)



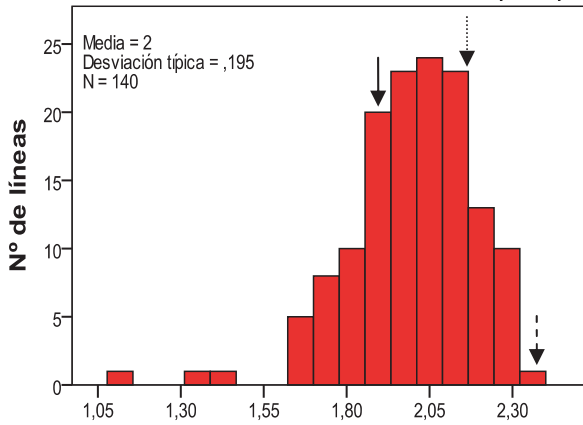
H\* zona 4 (Apical)



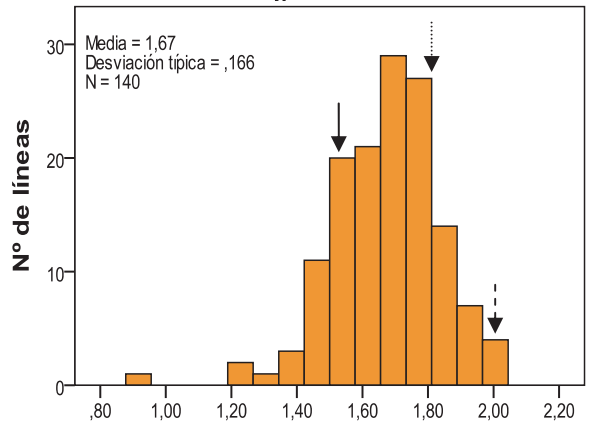
Contenido en sólidos solubles fruto (°Brix)



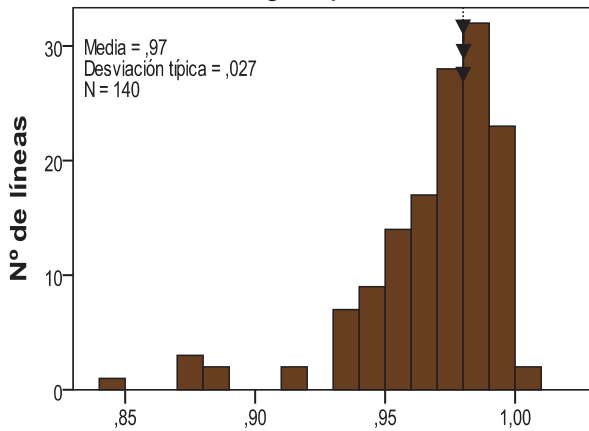
Log Acidez fruto



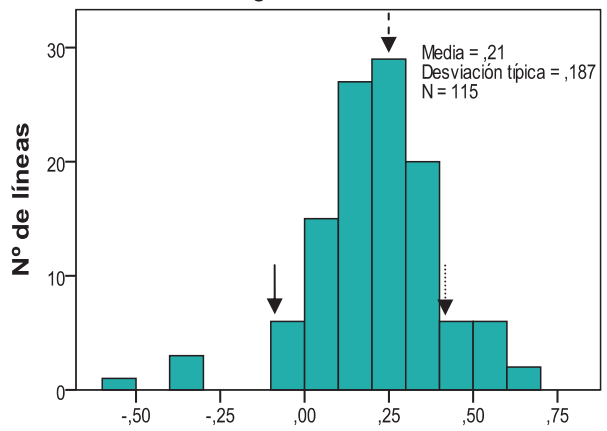
Log Licopeno fruto



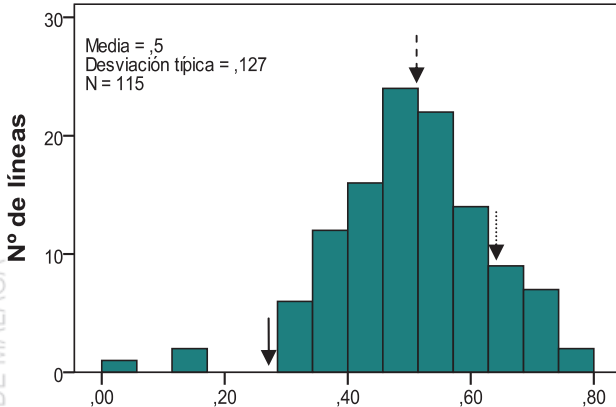
Log betacaroteno fruto



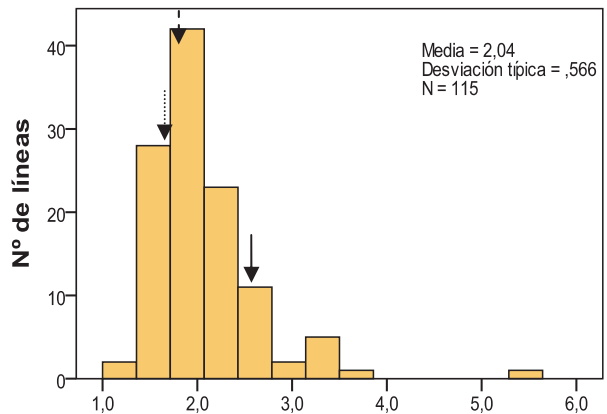
Arcoseno de la raíz del % de Licopeno en fruto



Log Glucosa fruto



Log Fructosa fruto

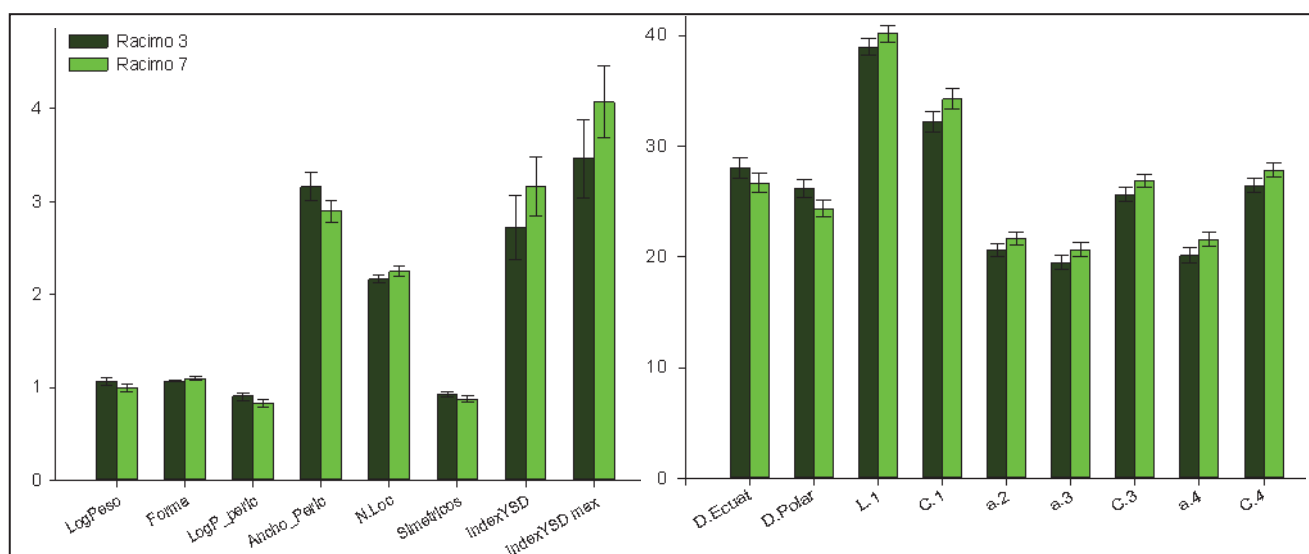


Fructosa/Glucosa fruto

← **Figura 1.2.** Distribución de frecuencias de valores medios de los caracteres analizados en las RILs derivadas de *S. lycopersicum* cv. "MoneyMaker" x *S. pimpinellifolium* acc. TO-937. Se muestran los valores de media y desviación típica de la distribución. Las flechas indican los valores medios de los parentales y el híbrido (línea continua: *S. lycopersicum* cv. "MoneyMaker"; línea discontinua *S. pimpinellifolium* acc. TO-937; línea de puntos: *S. lycopersicum* cv. "MoneyMaker" x *S. pimpinellifolium* acc. TO-937).

### 1.3.2. Evaluación del efecto ambiental durante la misma temporada.

La primera cosecha se realiza del racimo 3 y se compara con los datos de los frutos del racimo 7, cosechados de media 18.5 días más tarde, en 53 de las RILs que así lo permitieron por su producción de frutos. Se encontraron diferencias significativas según la época de cosecha en varios de los caracteres analizados con un nivel de significación del 95%. Los caracteres afectados son parámetros de calidad externa diferentes como peso, diámetros, variables de color de fruto en espacio de color CIELab entre otros, pero en ningún caso se encontraron diferencias significativas entre racimos en parámetros de calidad interna (Figura 1.3).



**Figura 1.3.** Valores medios de los caracteres de fruto que presentaron diferencias significativas al 95% entre el racimo 3 y el racimo 7 en las 53 RILs analizadas para ambos racimos. LogPeso: Peso del fruto log-transformado. Forma: D.Ec/D.Po. LogP\_Peric: Peso del pericarpio log-transformado. Simétricos: Grado de simetría entre los lóculos. L, C, a: Parámetros de color (anexo 1.5.).

### 1.3.3. Heredabilidad de los caracteres analizados en la población RIL

La heredabilidad de los caracteres evaluados en la población RIL, estimada mediante los componentes de la varianza, se muestran en la Tabla 1.2. Los valores de heredabilidad en sentido estricto ( $h^2$ ) estimados han sido variables debido a la

diversidad de caracteres analizados, pero la mayoría han sido de moderados a altos. Estos datos evidencian el componente genético de la mayoría de los caracteres analizados (algunos de ellos son caracteres empleados en caracterización primaria de germoplasma) y confirman la aptitud del diseño experimental para estos cálculos, en los que se emplearon de 3 a 5 plantas por RIL para su estimación.

**Tabla 1.2.** Estimación de la heredabilidad en sentido amplio ( $H$ ) y debida a efectos aditivos ( $h^2$ ). Se muestran además los valores para la varianza genotípica ( $V_G$ ) y la varianza debida al error ( $V_E$ ).

Carácter	$V_G$	$V_E$	$H$	$h^2$
Color del hipocótilo	0.130	0.000	1.00	1.00
Tipo de crecimiento	0.031	0.002	0.94	0.89
Longitud de la planta	0.081	0.034	0.70	0.54
Diámetro del tallo	3.502	1.434	0.71	0.55
Pubescencia de tallos y hojas	0.522	0.059	0.90	0.82
Distancia entre racimos*	0.011	0.012	0.49	0.32
Número de hojas entre racimos*	0.008	0.012	0.39	0.24
Distancia entre hojas*	0.023	0.026	0.48	0.31
Número de hojas hasta primer racimo	2.243	1.375	0.62	0.45
Densidad del follaje	0.341	0.036	0.91	0.83
Inclinación de la hoja	0.782	0.010	0.99	0.98
Grado de división de la hoja	0.169	0.000	1.00	1.00
Borde del foliolo	0.549	0.002	1.00	0.99
Giro del primer foliolo	0.407	0.000	1.00	1.00
Giro del último foliolo	0.361	0.008	0.98	0.96
Giro del follaje	0.067	0.039	0.63	0.46
Inserción del foliolo	0.026	0.030	0.47	0.31
Rizado del foliolo	0.056	0.002	0.97	0.93
Hoja convoluta	0.085	0.000	1.00	1.00
Tipo de inflorescencia	0.058	0.129	0.31	0.18
Número de flores en racimo 2*	0.020	0.027	0.43	0.27
Número de flores en racimo 6*	0.061	0.056	0.52	0.35
Presencia de tallo tras el racimo	0.102	0.104	0.50	0.33
Color de la corola	0.428	0.000	1.00	1.00
Fusión de la corola	0.176	0.008	0.96	0.92
Ángulo de apertura-exposición de la flor	0.531	0.008	0.99	0.97
Tamaño relativo de la flor	0.300	0.008	0.97	0.95
Posición del estilo	0.488	0.036	0.93	0.87
Rayas verdes en el fruto	0.249	0.025	0.91	0.83
Intensidad de hombros verdes	0.623	0.033	0.95	0.90
Pubescencia del fruto verde	0.217	0.028	0.89	0.80
Peso*	0.060	0.007	0.90	0.81
Peso pericarpo*	0.070	0.008	0.90	0.82

Carácter	$V_G$	$V_E$	$H$	$h^2$
% Peso Pericarpio**	0.004	0.001	0.74	0.58
Diámetro ecuatorial	31.340	4.027	0.89	0.80
Diámetro polar	24.187	3.016	0.89	0.80
Forma	0.006	0.002	0.74	0.59
L. zona 1 (Hombro)	13.061	8.481	0.61	0.44
C. zona 1 (Hombro)	19.935	12.467	0.62	0.44
H. zona 1 (Hombro)	97.443	61.724	0.61	0.44
L. zona 2 (Ecuat-Hombro)	1.554	2.020	0.43	0.28
C. zona 2 (Ecuat-Hombro)	6.118	6.191	0.50	0.33
H. zona 2 (Ecuat-Hombro)	17.556	14.251	0.55	0.38
L. zona 3 (Ecuat-Apical)	1.681	1.474	0.53	0.36
C. zona 3 (Ecuat-Apical)	7.096	6.084	0.54	0.37
H. zona 3 (Ecuat-Apical)	27.215	10.733	0.72	0.56
L. zona 4 (Apical)	1.603	1.419	0.53	0.36
C. zona 4 (Apical)	7.387	6.301	0.54	0.37
H. zona 4 (Apical)	28.029	10.544	0.73	0.57
Índice de mancha solar observada	0.714	0.418	0.63	0.46
YSD index	3.093	1.698	0.65	0.48
Brillo	0.404	0.397	0.50	0.34
Forma del hombro	0.156	0.131	0.54	0.37
Forma de la sección polar	0.002	0.002	0.45	0.29
Marcado de hombros	0.223	0.259	0.46	0.30
Forma de la zona apical	0.013	0.010	0.56	0.39
Agrietado	0.552	0.778	0.41	0.26
Russeting	0.114	0.103	0.52	0.35
Densidad pilosidad	0.834	0.410	0.67	0.50
Longitud pilosidad	0.295	0.218	0.58	0.40
Grosor del pericarpio en sección ecuatorial	0.800	0.128	0.86	0.76
Color interno del pericarpio	0.176	0.293	0.37	0.23
Color interno variado	0.268	0.367	0.42	0.27
Forma de la sección ecuatorial	0.003	0.010	0.22	0.13
Nº Lóculos	0.053	0.073	0.42	0.27
Simetría en lóculos	0.016	0.047	0.25	0.14
Sólidos Solubles	1.292	0.632	0.67	0.51
Acidez Titulable*	0.011	0.004	0.74	0.59
Licopeno*	0.031	0.017	0.64	0.47
$\beta$ -caroteno*	0.022	0.013	0.63	0.46
% Licopeno**	0.001	0.000	0.76	0.61
Glucosa*	0.028	0.017	0.62	0.45
Fructosa*	0.014	0.008	0.65	0.49
Ratio Fructosa/Glucosa	0.157	0.210	0.43	0.27

\*Heredabilidad calculada con los datos transformados en logaritmo en base 10.

\*\* Heredabilidad calculada con los datos transformados en arcoseno de la raíz del % dividido entre 100.

#### 1.3.4. Relación entre los caracteres analizados en la población RIL

Debido al alto número de caracteres estudiados se han seleccionado para su inclusión en este apartado de resultados con el fin de detectar pleiotropía entre caracteres, únicamente las parejas de caracteres que presentan un valor alto para la correlación fenotípica ( $r_p$  mayor de 0,6-0,7) y además presentan una alta correlación genética, organizados según el tipo de caracteres. Los valores de coeficientes de correlación de Rho de Spearman ( $r_p$ ), correlaciones genéticas ( $r_G$ ) y correlaciones ambientales ( $r_E$ ) obtenidos para los caracteres evaluados en la población RIL se presentan en la Tabla 1.3.

**1.3.4.1. Correlación entre caracteres vegetativos.** Hay 3 caracteres que correlacionan entre ellos: La distancia entre los racimos 1 y 2, el número de hojas entre los racimos 1 y 2, y la distancia entre las hojas más alejadas de dicho espacio entre los racimos 1 y 2.

**1.3.4.2. Correlación entre caracteres de tamaño y aspecto del fruto.** El peso del fruto correlaciona con el diámetro ecuatorial y el diámetro polar del fruto, con valores altos tanto de  $r_p$  como de  $r_G$ . Lo mismo ocurre entre el peso del pericarpio del fruto y los diámetros del fruto, ya que el peso del fruto y el peso del pericarpio están muy correlacionados, también genéticamente. Existen otros caracteres en los que un valor alto de  $r_p$  no se acompaña de un valor de  $r_G$  de similar magnitud, como ocurre entre los diámetros ecuatorial y polar del fruto, entre el peso del pericarpio y el grosor del pericarpio, y en menor medida entre el peso del fruto y el grosor del pericarpio (no mostrado en la Tabla 1.3). La densidad de la pilosidad del fruto correlaciona positivamente con la longitud de la misma, con valores altos de  $r_p$  como de  $r_G$ .

**1.3.4.3. Correlación entre caracteres de color del fruto verde observados.**

La presencia de rayas en el fruto verde correlaciona con la presencia de hombro verde oscuro, y aunque son valores moderados, hay que resaltar que el valor de la correlación genética es mayor que el valor de la correlación fenotípica, y la correlación ambiental tiene un valor negativo.

**1.3.4.4. Correlación entre caracteres de color del fruto rojo medidos con colorímetro (CIELab).**

Los datos de  $r_P$  y  $r_G$  entre las variables  $L$ ,  $C$ ,  $H$  y  $a$ , que se obtienen de la medida de color del fruto rojo con el colorímetro, muestran correlaciones diversas entre ellas. Si se analiza dentro de cada parámetro, las diferentes zonas, los valores de  $L$  entre las 4 zonas del fruto correlacionan entre ellos; y los valores de  $C$  en las 4 zonas presentan un comportamiento similar. En cambio los valores de  $H$  sólo presentan correlación entre las zonas 3 y 4, zona donde no aparece mancha solar. Al analizar los resultados por zona es en la zona 1, la zona del hombro, la única donde correlacionan los 3 parámetros  $L$ ,  $C$  y  $H$ , mostrando la zona 2 un comportamiento similar pero en menor grado. Por último se observa correlación entre los valores  $C$  de saturación y  $a$  en el eje del rojo.

**1.3.4.5. Correlación entre caracteres relacionados con la mancha solar.**

El YSD index presenta una alta correlación con la diferencia de  $H$  (diffH) y el valor de  $H$  en la zona 1. Además como hemos visto antes en la zona 1 las variables  $L$ ,  $C$  y  $H$  estaban correlacionadas en mayor o menor medida, por eso correlacionan también con el YSD index. Por otro lado la valoración  $a$  *visu* de la mancha solar en los frutos (índice de mancha solar observada) correlaciona con el índice de mancha solar calculado (YSD index), así como con las variables  $L$  y  $H$  de la zona 1 y la diferencia de  $H$ .

**1.3.4.6. Correlación entre caracteres del contenido en azúcares reductores en fruto rojo.**

El contenido en glucosa correlaciona con el contenido en fructosa del fruto pero el valor de la correlación genética es menor. El

contenido en glucosa correlaciona con el ratio Fructosa/Glucosa porque va implícita en la fórmula, pero la fructosa no correlaciona.

**1.3.4.7. Correlación entre caracteres del contenido en carotenoides en fruto rojo.** El contenido en licopeno correlaciona con el contenido en  $\beta$ -caroteno del fruto, y también con el porcentaje de licopeno en el fruto, respecto al total de licopeno y  $\beta$ -caroteno, pero no con valores altos.

**Tabla 1.3.** Coeficientes de correlación de Rho de Spearman ( $r_p$ ), correlaciones genéticas ( $r_G$ ) y correlaciones ambientales ( $r_E$ ) entre los distintos caracteres evaluados.

$V_x$	$V_y$	$r_p$	$r_G$	$r_E$
Distancia entre racimos*	Número de hojas entre racimos*	0.771	0.662	0.818
Distancia entre racimos*	Distancia entre hojas*	0.905	0.778	0.964
Número de hojas entre racimos*	Distancia entre hojas*	0.794	0.767	0.807
Peso*	Peso pericarpo*	0.958	0.972	0.894
Peso*	Diámetro ecuatorial	0.979	0.929	1.184
Peso*	Diámetro polar	0.951	0.839	1.417
Peso pericarpo*	Diámetro ecuatorial	0.934	0.896	1.098
Peso pericarpo*	Diámetro polar	0.927	0.842	1.299
Peso pericarpo*	Grosor del pericarpo	0.847	0.645	1.635
Diámetro ecuatorial	Diámetro polar	0.926	0.720	1.740
Densidad pilosidad	Longitud pilosidad	0.917	0.819	1.006
Rayas verdes en el fruto	Hombro fruto verde	0.535	0.641	-0.163
L. zona 1 (Hombro)	C. zona 1 (Hombro)	0.836	0.779	0.881
L. zona 1 (Hombro)	H. zona 1 (Hombro)	0.907	0.893	0.918
C. zona 1 (Hombro)	H. zona 1 (Hombro)	0.622	0.570	0.663
C. zona 1 (Hombro)	C. zona 2 (Ecuat-Hombro)	0.629	0.600	0.654
L. zona 2 (Ecuat-Hombro)	H. zona 2 (Ecuat-Hombro)	0.567	0.610	0.551
L. zona 2 (Ecuat-Hombro)	L. zona 3 (Ecuat-Apical)	0.870	0.644	0.981
C. zona 2 (Ecuat-Hombro)	C. zona 3 (Ecuat-Apical)	0.892	0.775	0.956
C. zona 2 (Ecuat-Hombro)	C. zona 4 (Apical)	0.779	0.720	0.812

$V_x$	$V_y$	$r_P$	$r_G$	$r_E$
L. zona 3 (Ecuat-Apical)	L. zona 4 (Apical)	0.920	0.860	0.954
C. zona 3 (Ecuat-Apical)	C. zona 4 (Apical)	0.921	0.890	0.939
H. zona 3 (Ecuat-Apical)	H. zona 4 (Apical)	0.964	0.843	1.122
YSD index	L.1 (Hombro)	0.910	0.906	0.915
YSD index	C.1 (Hombro)	0.701	0.607	0.782
YSD index	H.1 (Hombro)	0.885	0.980	0.805
YSD index	DiffH	0.997	0.999	1.004
Índice de mancha solar observada	YSD index	0.892	0.661	1.096
Índice de mancha solar observada	L.1 (Hombro)	0.878	0.631	1.079
Índice de mancha solar observada	H.1 (Hombro)	0.841	0.656	0.993
Índice de mancha solar observada	DiffH	0.881	0.660	1.129
L. zona 1 (Hombro)	DiffH	0.887	0.902	0.889
C. zona 1 (Hombro)	DiffH	0.696	0.608	0.799
H. zona 1 (Hombro)	DiffH	0.845	0.973	0.728
Glucosa*	Fructosa*	0.859	0.693	1.005
Glucosa*	Ratio Fructosa/Glucosa	-0.774	-0.705	-0.833
Licopeno*	$\beta$ -caroteno*	0.975	0.988	0.964
Licopeno*	% Licopeno**	0.666	0.636	0.716

\*Calculado con los datos transformados en logaritmo en base 10.

\*\* Calculado con los datos transformados en arcoseno de la raíz del % dividido entre 100.

### 1.3.5. Análisis e identificación de QTLs

Con el fin de detectar regiones del genoma de tomate involucradas en la calidad del fruto se realizó un análisis de QTLs utilizando los valores obtenidos en la evaluación de la población RIL para todos los caracteres. Los métodos paramétricos de detección de QTLs asumen que los datos analizados se distribuyen de manera normal en la población y que las varianzas en las distintas clases genotípicas son similares. Por esta razón, los datos de los caracteres cuantitativos evaluados en la población RIL se normalizaron mediante la transformación correspondiente (logarítmica en la mayoría

de los casos) y, para localizar QTLs asociados a estos caracteres, se aplicó el método de Interval Mapping (IM) para la primera detección de QTLs y, con los así detectados, el método de Multiple QTL Mapping (MQM) para aquilatarlos mejor. El valor umbral de LOD obtenido mediante el Test de Permutación para cada carácter se calculó con un total de 1000 permutaciones para una  $p < 0.001$ . Sólo aquellos valores de LOD superiores al valor umbral de significación fueron considerados para la identificación de posibles QTLs responsables de la variación fenotípica del carácter. En la Tabla 1.4 se recogen los QTLs significativos detectados en la población para los caracteres evaluados y su localización cromosómica. Hay que hacer notar que un 16.6% de los QTLs detectados presentaron efectos alélicos contrarios a los esperados según el fenotipo de los parentales.

**Tabla 1.4.** Relación de QTLs detectados para cada carácter por el método de *Interval Mapping* (IM). Los QTLs se han nombrado según la abreviatura del carácter en inglés, seguida del número del cromosoma en el que se localizan. Se ha usado un segundo número para distinguir los QTLs situados en el mismo cromosoma asociados al mismo carácter. Para el IM se detalla el marcador más cercano asociado al QTL (columna Locus) y su posición en cM. Los paréntesis en la columna QTL indican los QTLs con efectos opuestos a aquellos esperados según los valores medios de los parentales.

QTL	cM	Locus	LOD	$\mu A$	$\mu H$	$\mu B$	PVE	Ad <sup>a</sup>
Longitud de la planta								
<i>Ht2</i>	110.9	sol_67034	3.76	1.68	1.79	1.89	9.9*	-0.10
Diámetro del tallo								
<i>SW4</i>	72.4	sol_43302	4.09	13.32	12.55	11.78	10.6**	0.77
<i>SW11</i>	97.2	SNP_698a	8.81	13.34	12.33	11.33	21.4**	1.00
Pubescencia de la planta								
<i>(HdP7)</i>	67.0	sol_53378	5.19	2.36	2.07	1.77	13.2**	0.29
<i>HdP10</i>	55.8	SL10701_495	30.45	1.50	2.10	2.70	56.7**	-0.60
Distancia entre racimos <sup>b</sup>								
<i>(TrD1.1)</i>	39.3	sol_60008	4.21	1.38	1.34	1.29	9.4**	0.04
<i>TrD1.2</i>	91.6	SNP_038a	6.00	1.28	1.34	1.39	13.8**	-0.05
<i>(TrD4)</i>	74.1	sol_11545	3.51	1.39	1.34	1.30	9.1*	0.04
Número de hojas entre racimos <sup>b</sup>								
<i>LfbT1</i>	90.7	sol_9756	3.74	0.58	0.62	0.65	9.7*	-0.04
<i>(LfbT11)</i>	102.7	sol_2713	4.20	0.65	0.61	0.57	10.8**	0.04
Distancia entre hojas <sup>b</sup>								
<i>(Lfd1.2)</i>	40.6	sol_59975	4.12	1.18	1.12	1.06	9.3**	0.06
<i>Lfd1.1</i>	114.5	sol_40199	5.18	1.06	1.12	1.19	11.9**	-0.07
<i>(Lfd2)</i>	13.5	sol_25974	4.25	1.19	1.12	1.06	11**	0.06

QTL	cM	Locus	LOD	$\mu A$	$\mu H$	$\mu B$	PVE	Ad <sup>a</sup>
Número de hojas hasta primer racimo								
<i>LfN1</i>	95.6	SNP_045a	3.69	7.93	8.51	9.08	9.9*	-0.57
Grado de división de la hoja								
<i>LfDv4</i>	90.8	sol_47629	7.05	1.99	1.60	1.21	16**	0.39
Tipo de inflorescencia								
<i>Br2</i>	70.3	sol_13616	5.03	1.31	1.19	1.07	12.8**	0.12
Número de flores por inflorescencia <sup>b</sup>								
<i>Nflt2</i>	122.3	SNP_194a	7.52	0.97	1.10	1.23	18.5**	-0.13
<i>(Nflt6)</i>	63.9	sol_39157	5.82	1.20	1.12	1.04	14.9**	0.08
<i>(Nflt10)</i>	71.9	sol_61229	5.32	1.23	1.12	1.00	13.5**	0.11
Presencia de tallo tras el racimo								
<i>(TrEnd10)</i>	54.7	sol_32954	5.16	0.81	0.67	0.52	13.3**	0.15
Fusión de la corola								
<i>CoFu11.1</i>	9.1	sol_66431	3.70	0.39	0.53	0.66	8.3*	-0.14
<i>CoFu11.2</i>	36.2	sol_21018	5.21	0.28	0.53	0.78	12**	-0.25
Ángulo de apertura de la flor								
<i>CoAng12</i>	22.9	sol_12656	5.55	1.81	2.28	2.74	14.2**	-0.47
Tamaño de la flor								
<i>CoSz2</i>	108.1	sol_67183	3.59	1.90	2.08	2.26	9.3**	-0.18
Exerción del estilo								
<i>Style2</i>	100.3	sol_42346	13.71	2.33	2.76	3.18	31.2**	-0.43
Rayas verdes en el fruto								
<i>GSh10</i>	25.9	sol_17859	14.45	0.01	0.33	0.64	33.6**	-0.32
Intensidad de hombros verdes								
<i>GSh10</i>	25.9	sol_17859	25.25	0.09	0.70	1.32	51.7**	-0.61
Diferencia de L* entre zona apical y peduncular en fruto verde								
<i>GSh10</i>	25.9	sol_17859	38.43	-0.78	2.69	6.16	65.1**	-3.47
L* zona peduncular fruto verde								
<i>GSh9</i>	40.9	sol_39533	4.45	60.85	58.96	57.08	11.4**	1.88
<i>GSh10</i>	25.9	sol_17859	31.87	62.42	58.28	54.14	58.5**	4.14
a* zona peduncular fruto verde								
<i>GSh3</i>	45.9	SNP_252a	5.96	-10.40	-11.22	-12.03	15.1**	0.82
<i>GSh10</i>	25.9	sol_17859	21.89	-10.14	-11.51	-12.89	45.1**	1.37
<i>GSh11</i>	86.8	sol_56278	3.63	-12.05	-11.42	-10.78	9.4*	-0.63
b* zona peduncular fruto verde								
<i>GSh1</i>	109.2	sol_44451	3.67	28.27	29.33	30.38	9.6*	-1.05
<i>GSh11</i>	81.8	sol_5925	4.69	30.76	29.59	28.42	12**	1.17

QTL	cM	Locus	LOD	$\mu A$	$\mu H$	$\mu B$	PVE	Ad <sup>a</sup>
C* zona peduncular fruto verde								
<i>GSh11</i>	86.8	sol_56278	5.84	32.98	31.70	30.42	14.7**	1.28
H* zona peduncular fruto verde								
<i>GSh1</i>	101.0	sol_43796	3.72	112.2	111.0	109.88	9.7**	1.14
<i>GSh9</i>	42.0	sol_16579	3.54	109.9	111.1	112.19	9.2*	-1.11
<i>GSh10</i>	25.9	sol_17859	36.51	108.7	111.6	114.39	63.5**	-2.83
L* zona apical fruto verde								
<i>GSh1</i>	115.4	Sol_100299	4.54	60.05	61.08	62.12	11.6**	-1.03
<i>GSh9</i>	60.4	sol_43182	4.56	62.25	61.20	60.16	11.7**	1.04
a* zona apical fruto verde								
<i>GSh3</i>	45.9	SNP_252a	4.76	-9.29	-9.87	-10.44	12.2**	0.57
<i>GSh11</i>	84.5	sol_32030	4.93	-10.6	-10.1	-9.47	12.6**	-0.58
b* zona apical fruto verde								
<i>GSh11</i>	84.2	sol_56324	5.42	25.52	24.27	23.01	13.7**	1.25
C* zona apical fruto verde								
<i>GSh11</i>	84.5	sol_32030	5.53	27.66	26.28	24.90	14**	1.38
H* zona apical fruto verde								
<i>GSh6</i>	1.3	sol_26791	3.54	112.9	112.4	111.94	9.2*	0.47
Peso del fruto <sup>b</sup>								
<i>FW2</i>	110.3	sol_67052	8.82	1.19	1.06	0.94	21.6**	0.13
<i>FW3</i>	76.2	sol_62300	7.44	1.19	1.07	0.95	18.6**	0.12
<i>FW11</i>	101.3	sol_17549	4.87	1.16	1.06	0.97	12.7**	0.10
<i>FW12</i>	51.9	sol_63520	3.94	1.14	1.05	0.96	10.3*	0.09
Peso del pericarpo <sup>b</sup>								
<i>PW2</i>	108.4	SNP_180a	9.19	1.05	0.91	0.77	22.6**	0.14
<i>PW3</i>	76.2	sol_62300	8.14	1.05	0.91	0.78	20.2**	0.13
<i>PW11</i>	101.3	sol_17549	4.41	1.01	0.91	0.81	11.6**	0.10
<i>PW12</i>	51.9	sol_63520	3.61	0.99	0.90	0.80	9.5*	0.09
% Peso del pericarpo <sup>c</sup>								
<i>PP2.1</i>	25.8	SNP_108a	5.25	1.03	1.00	0.98	13.5**	0.03
<i>PP2.2</i>	108.4	SNP_180a	3.54	1.02	1.00	0.98	9.4*	0.02
<i>PP3</i>	78.3	sol_9260	5.23	1.02	1.00	0.97	13.4**	0.03
<i>PP7</i>	36.3	sol_67965	4.28	1.02	1.00	0.97	11.2**	0.02
Diámetro ecuatorial								
<i>ED2</i>	108.1	sol_67183	8.84	31.21	28.33	25.45	21.6**	2.88
<i>ED3</i>	76.2	sol_62300	6.73	30.90	28.31	25.72	17**	2.59

QTL	cM	Locus	LOD	$\mu A$	$\mu H$	$\mu B$	PVE	Ad <sup>a</sup>
<i>ED11</i>	101.3	sol_17549	5.25	30.52	28.23	25.94	13.7**	2.29
<i>ED12</i>	51.9	sol_63520	4.53	30.10	27.92	25.73	11.8**	2.18
Diámetro polar								
<i>PD2</i>	108.1	sol_67183	8.28	28.45	26.02	23.59	20.4**	2.43
<i>PD3</i>	76.2	sol_62300	7.76	28.41	26.01	23.61	19.3**	2.40
<i>PD7</i>	36.3	sol_67965	5.21	28.00	26.01	24.03	13.5**	1.99
<i>PD11</i>	101.3	sol_17549	3.72	27.63	25.94	24.25	9.9*	1.69
Forma								
<i>FS2.1</i>	70.3	sol_13618	3.65	1.12	1.09	1.07	9.6*	0.03
( <i>FS2.2</i> )	44.2	sol_10563	4.08	1.06	1.09	1.13	9.6**	-0.03
( <i>FS7</i> )	55.8	sol_66782	3.90	1.06	1.09	1.12	10.4*	-0.03
Forma del hombro								
<i>ShS3</i>	85.4	sol_20714	5.17	0.44	0.26	0.09	13.3 ns	0.17
Marcado del hombro								
<i>BkS2.1</i>	25.8	SNP_108a	4.97	0.67	0.45	0.24	13*	0.22
<i>BkS2.2</i>	110.3	sol_67052	4.72	0.63	0.42	0.21	12.2**	0.21
Pilosidad (densidad)								
( <i>HdF3</i> )	91.0	sol_61634	3.49	0.71	0.39	0.08	9.5 ns	0.32
<i>HdF10</i>	56.1	sol_33007	5.75	0.06	0.44	0.83	14.8 ns	-0.38
Pilosidad (longitud)								
( <i>HIF3</i> )	93.7	sol_34027	3.77	0.47	0.27	0.08	10.1*	0.20
<i>HIF10</i>	57.4	SNP_110a	9.60	0.00	0.30	0.60	23.6**	-0.30
Grosor del pericarpo								
<i>Pth2</i>	108.1	sol_67183	6.72	3.64	3.23	2.81	16.9**	0.41
<i>Pth3</i>	76.2	sol_62300	6.95	3.65	3.22	2.80	17.5**	0.42
<i>Pth7</i>	45.8	SNP_459b	4.06	3.55	3.22	2.89	11.2*	0.33
Grosor de la columela								
<i>CW3</i>	78.2	sol_62133	4.12	2.00	1.76	1.52	11.5**	0.24
L* zona peduncular fruto rojo								
( <i>Li10</i> )	25.9	sol_17859	2.83	38.08	39.22	40.36	7.5 ns	-1.14
( <i>Li12</i> )	92.0	SNP_763a	2.97	37.74	38.95	40.16	7.9 ns	-1.21
C* zona peduncular fruto rojo								
<i>Sat10.1</i>	25.9	sol_17859	2.39	31.23	32.52	33.82	6.4 ns	-1.30
<i>Sat10.2</i>	52.7	SNP_642a	3.33	30.92	32.50	34.07	8.9 ns	-1.58

QTL	cM	Locus	LOD	$\mu A$	$\mu H$	$\mu B$	PVE	Ad <sup>a</sup>
H* zona peduncular fruto rojo								
<i>Co5</i>	71.6	sol_37200	2.56	50.13	47.17	44.20	6.8 ns	2.96
( <i>Co10</i> )	25.9	sol_17859	2.38	44.66	47.53	50.39	6.4 ns	-2.86
( <i>Co12</i> )	92.0	SNP_763a	2.38	43.89	46.85	49.82	6.4 ns	-2.96
L* zona apical fruto rojo								
<i>Li4</i>	62.2	sol_43589	4.14	36.77	36.21	35.65	10.9**	0.56
<i>Li8</i>	82.3	sol_65114	3.54	36.52	36.02	35.52	9.3*	0.50
C* zona subapical-apical fruto rojo								
<i>Sat3</i>	68.5	sol_7919	3.16	25.55	26.50	27.45	8.3 ns	-0.95
H* zona subapical-apical fruto rojo								
<i>Co1</i>	86.0	sol_16390	3.59	42.32	40.23	38.14	9.4 ns	2.09
<i>Co4</i>	64.5	sol_43581	4.68	43.32	40.88	38.45	12.2 ns	2.43
Diferencia de H* entre zona peduncular y apical en fruto rojo								
<i>YSD1</i>	67.5	sol_25914	2.35	3.91	7.07	10.22	6 ns	-3.15
<i>YSD10</i>	25.9	sol_17859	2.78	4.13	7.38	10.63	7.4 ns	-3.25
<i>YSD12</i>	92.0	sol_31464	3.53	4.62	8.30	11.98	8.8 ns	-3.68
Índice de Mancha solar (YSD index)								
<i>YSD1</i>	67.5	sol_25914	2.17	2.33	2.82	3.31	5.6 ns	-0.49
<i>YSD10</i>	25.9	sol_17859	2.85	2.34	2.87	3.41	7.6 ns	-0.53
<i>YSD12</i>	92.0	sol_31464	3.53	2.41	3.01	3.61	8.9 ns	-0.60
Sólidos Solubles								
<i>SSC2</i>	76.3	sol_29785	3.53	5.55	5.99	6.43	11*	-0.44
<i>SSC3.1</i>	50.8	sol_5722	4.70	5.31	5.81	6.30	12.9**	-0.50
( <i>SSC3.2</i> )	94.6	sol_34013	4.17	6.27	5.81	5.34	11.4**	0.47
Acidez Titulable <sup>b</sup>								
<i>TA6</i>	64.7	sol_39246	3.97	0.62	0.67	0.71	12.4*	-0.04
Licopeno <sup>b</sup>								
<i>Lyc1</i>	85.7	sol_38490	3.80	1.93	2.01	2.08	11.8*	-0.07
$\beta$ -caroteno <sup>b</sup>								
<i>B-c1</i>	85.7	sol_38490	3.81	1.62	1.68	1.74	11.8*	-0.06
<i>B-c2</i>	22.5	SNP_102a	3.34	1.61	1.67	1.72	10.4*	-0.06
<i>B-c7</i>	3.9	SNP_451a	3.37	1.61	1.66	1.72	10.5*	-0.06
%Licopeno <sup>c</sup>								
<i>PLyc4.1</i>	52.2	SNP_321a	6.90	0.95	0.96	0.98	20.3**	-0.01
<i>PLyc4.2</i>	85.0	sol_47079	4.91	0.94	0.96	0.97	12.4*	-0.01

LOD: Log. Del cociente de las probabilidades asociadas.  $\mu A$ : Media estimada de la distribución del carácter para las líneas homocigotas *lyc*.  $\mu H$ : Media estimada de la distribución del carácter

para las líneas heterocigotas.  $\mu B$ : Media estimada de la distribución del carácter para las líneas homocigotas *pim*. PVE: Porcentaje de Varianza Fenotípica Explicada. \*  $P \leq 0.05$ , \*\*  $P \leq 0.01$ , *ns* no significativo. <sup>a</sup> El signo de la aditividad se refiere al efecto del alelo *lyc*. <sup>b</sup> Calculado con los datos transformados en logaritmo en base 10. <sup>c</sup> Calculado con los datos transformados en arcoseno de la raíz del % dividido entre 100. sol: solcap\_snp\_sl.

#### 1.4. DISCUSIÓN

Los caracteres cualitativos típicos son aquellos que permiten su clasificación en categorías fenotípicas bien diferenciadas, y están bajo el control genético de uno o varios genes, los cuales se ven afectados poco o nada por la variabilidad ambiental a la hora de expresarse. Sin embargo los caracteres de mayor importancia agrícola no se suelen ajustar de manera precisa a una determinada clase fenotípica, sino que forman una gama de fenotipos que se combinan imperceptiblemente entre sí, uno con otro y con una variabilidad continua. Estos caracteres que presentan un rango continuo y se pueden medir de una manera u otra son los caracteres cuantitativos. La principal diferencia que existe, además de la forma de observarlos/medirlos, entre los caracteres cualitativos y los cuantitativos se suele basar en el número de genes que contribuyen a la variabilidad fenotípica y el grado de modificación del fenotipo por medio de factores ambientales. Los caracteres cuantitativos suelen estar codificados por varios o, incluso, muchos genes contribuyendo al fenotipo con tan pequeña cantidad cada uno que sus efectos individuales no pueden ser detectados por los métodos de análisis mendeliano. Los genes de esta naturaleza se denominan loci de caracteres cuantitativos o QTLs (*Quantitative Trait Loci*). La variabilidad fenotípica expresada en la mayor parte de los caracteres cuantitativos tiene un componente ambiental relativamente grande en comparación con el genético. La Genética Cuantitativa trata de determinar el grado de influencia que tienen tanto los componentes ambientales como los genéticos sobre el total de la variabilidad fenotípica del carácter cuantitativo en una población.

En el presente trabajo nos propusimos hacer un estudio de la genética cuantitativa de los caracteres que afectaban a la calidad externa e interna del fruto, con especial atención al color y al contenido en componentes saludables; así como

caracterizar a las plantas de la población RIL en aspectos descriptivos abarcando caracteres vegetativos y florales. Entre los caracteres analizados y medidos se encuentran algunos que por la metodología empleada en su medida no generaron datos de carácter cuantitativo sino categórico, por lo que no se pudieron incluir en el estudio de genética cuantitativa.

Se encontraron seis caracteres que presentaban una distribución quasi normal cuando se representaron las frecuencias de los valores obtenidos por medio de histogramas, pero mostraron una tendencia sesgada hacia alguno de los extremos (distribuciones log-lineales en la terminología estadística), incluso cuando debido a la naturaleza de los datos, las variables fueron Log-transformadas previamente al análisis con el objetivo de normalizar los datos y homogeneizar las varianzas. En todos ellos el sesgo fue hacia el parental de menor valor pero no se encontraron valores transgresivos en la población RIL. De estos 6 caracteres, 5 son caracteres de calidad externa del fruto como el peso del fruto y del pericarpio, diámetros ecuatorial y polar y grosor del pericarpio. En el carácter longitud de la planta el híbrido MMxTO-937 mostró sobredominancia hacia el parental de mayor valor (pim), pero no así la población RIL, que como se ha dicho arriba, estaba algo sesgada hacia el otro parental (lyc).

Siete de los caracteres medidos en la población RIL presentaron una distribución claramente normal cuando se representaron las frecuencias de los valores obtenidos por medio de histogramas, y en los siete la población mostraba herencia transgresiva. En el caso del porcentaje del peso del pericarpio respecto al peso total del fruto y la forma del fruto, el híbrido MMxTO-937 mostraba dominancia parcial hacia uno de los parentales, y la dirección de la herencia transgresiva de la población mostró el mismo sentido que tenía el híbrido. En el caso del diámetro del tallo el híbrido también mostraba dominancia parcial hacia uno de los parentales pero la herencia transgresiva que mostró la población RIL fue en ambos sentidos. La distancia entre hojas, la distancia entre racimos y el contenido en sólidos solubles (SSC), éste último un carácter principal en la mejora de la calidad de fruto, presentaron distribución normal pero transgresiva en ambos sentidos, sin embargo el híbrido MMxTO-937 mostró herencia intermedia. El contenido medio de SSC (medido en °Brix) en la

población fue de 5,99 °Brix, cuando se suele aceptar que esta carácter varía en cultivares comerciales de tomate entre 4,6 °Brix (la mayoría para consumo fresco sin contar los de tipo *cherry*) y 6,3°Brix (la mayoría para procesado, y por encima para tomates de tipo *cherry*) del peso fresco (Llácer et al. 2006). Sin embargo, en la bibliografía se han identificado entradas en especies relacionadas con el tomate, incluyendo *S. pimpinellifolium*, *S. chmielewskii* y *S. cheesmanii*, con concentraciones mucho más altas de SSC, en torno a 9-15% (Rick 1974; Hewitt & Garvey 1987). A pesar de esta variabilidad genética en el germoplasma, los mejoradores han tenido un éxito limitado en el incremento del SSC del fruto o en la combinación de alto SSC y alta producción, debido a varias razones, entre ellas la naturaleza cuantitativa muy compleja del carácter (Stoner & Thompson 1966) y la relación negativa entre la producción y el SSC (Georgelis et al. 2004; Stevens & Rudich 1978).

La herencia de tipo transgresivo implica que aparecieron RILs con valores que sobrepasaban el valor de los parentales, lo que indicaría, en principio, la presencia de alelos tanto favorables como desfavorables en cada parental y que estos caracteres evaluados están determinados por varios genes cuyos efectos individuales son equivalentes y pequeños, y cuya expresión fenotípica final para cada carácter considerado es la suma de los efectos individuales, es decir, que existe una interacción aditiva entre los genes provenientes de ambos parentales. Esto señala la complejidad de la genética de estos caracteres. En algunos caracteres fue el híbrido MMxTO-937 el que mostró sobredominancia hacia uno de los dos parentales.

Entre los caracteres de **calidad interna del fruto**, todos excepto el contenido en sólidos solubles, licopeno,  $\beta$ -caroteno, glucosa, fructosa y acidez mostraron un comportamiento sesgado hacia el parental de menor valor (lyc); únicamente el contenido en sólidos solubles mostró distribución normal, incluso sin necesidad de transformar sus valores. En todos ellos la población RIL mostró una herencia transgresiva, siendo en los casos de caracteres sesgados, hacia el mismo sentido que presentaba el histograma de la población RIL, y en el caso del contenido en sólidos solubles, en ambos sentidos. La mejora de la calidad del fruto tiene como uno de sus objetivos conseguir líneas con alto contenido en compuestos saludables como los

carotenoides, o bien con contenidos compensados de azúcares y acidez para obtener sabores agradables para el consumidor. A este respecto, Malundo y col. (1995) encontraron que los niveles de ácidos del fruto de tomate se podían incrementar hasta un nivel óptimo, por encima del cual la aceptación del consumidor decrece; mientras Baldwin y col. (1998) mostraron que la aceptación general estaba relacionada con el ratio azúcares/acidez titulable y la concentración de diferentes compuestos aromáticos (Sinesio et al. 2010). Los resultados obtenidos muestran la dificultad de obtener líneas con mayor contenido en carotenoides, azúcares y acidez que el parental TO-937. Ello no es nuevo, ya que se conoce que, al menos en parte, existe una limitación fisiológica a la obtención de frutos de muy alto contenido en metabolitos que confieren calidad interna en frutos grandes de tomate a partir de las introgresiones de especies silvestres de fruto pequeño (Schauer et al. 2006; 2008). Sin embargo el objetivo de este estudio no es obtener líneas que iguallen o superen los del parental silvestre, sino más bien proporcionar información sobre el comportamiento de los caracteres para ayudar a conseguir líneas con valores algo más elevados en el contenido de estos compuestos relacionados con la calidad del fruto que los de las variedades comerciales actuales y que además presenten otros caracteres agronómicos interesantes que no tiene el parental TO-937, como un mayor tamaño del fruto

En los caracteres de **contenido en glucosa y fructosa del fruto**, a pesar de que el híbrido mostraba sobredominancia hacia el parental de mayor valor (pim), la población RIL presentaba una herencia sesgada y transgresiva hacia el parental de menor valor (lyc). En cambio, algunos caracteres vegetativos como el número de hojas hasta el racimo 1 y entre los racimos 1 y 2, y el número de flores en el racimo 2, mostraron a la población RIL con una herencia sesgada y transgresiva hacia el parental de mayor valor, y además el híbrido mostraba sobredominancia también hacia el parental de mayor valor, es decir, la herencia del híbrido y de la población RIL tenían la misma tendencia, al contrario de lo que ocurría con el contenido en glucosa y fructosa.

Los caracteres relacionados con el **color del fruto, los parámetros L\* y H\***, presentaron una herencia sesgada hacia el parental de menor valor (pim), lo que indica un color más rojo y más oscuro. Esta tendencia es deseable en la mejora de la calidad

de fruto, ya que el consumidor tiende a elegir los frutos más rojos porque los asocia con un producto más saludable y atractivo. Sin embargo la población RIL respecto al contenido en licopeno está sesgada hacia el parental con menor contenido (lyc). Este contrasentido en los resultados demuestra que el color rojo del fruto de tomate no siempre es indicativo de su contenido en licopeno, por varias razones. La primera es que el color interior del fruto no siempre es uniformemente rojo, debido a fisiopatías conocidas como el *Internal White Tissue* (Sadik & Minges 1966), en las que el mesocarpo del fruto maduro queda amarillo-blanquecino, oculto bajo el exocarpo rojo, o bien el tejido alrededor de los haces vasculares del fruto aparecen blanquecinos. La segunda es el color de la cutícula del fruto, carácter medido en esta población RIL aunque no estudiado dentro de este trabajo, que presentó un rango desde incoloro a amarillo-anaranjado y que obviamente afecta al dato de color que se toma con el colorímetro a través de la cutícula al ser esta translúcida. También habría que tener en cuenta, además, las variaciones entre el contenido relativo de licopeno y  $\beta$ -caroteno (que da un color más anaranjado) y que la concentración de metabolitos en realidad no es independiente del tamaño del fruto debido al efecto de concentración/dilución de los mismos según sea el tamaño.

El carácter de **mancha solar** en la población RIL, medido con el YSD index, mostró un comportamiento sesgado hacia el parental de menor valor (pim), pero en muchas de las líneas se observó un comportamiento transgresivo muy notable, apareciendo varias RILs con frutos afectados por mancha solar en más de un tercio del fruto. En total casi  $\frac{1}{3}$  de las RILs presentaron mancha solar en mayor o menor extensión, y en mayor o menor proporción del número de frutos. Según De Vicente y Tanksley (1993) la herencia transgresiva se puede deber a dos motivos: heterosis, el cual es poco probable en este caso dado el alto nivel de homocigosidad que presenta la población RIL en generación  $F_{7:8}$ ; o más bien se debe a la presencia en ambos parentales de alelos que incrementan o disminuyen el valor del carácter, y que recombinan durante los ciclos de autofecundación y selección, de manera que el parental que presenta el valor más bajo para un carácter puede portar alelos que provoquen el aumento del carácter, pero tales alelos sólo se expresarán en un fondo genético concreto y adecuado, cuando se recombina con los alelos del otro parental.

Esto no hace más que corroborar la complejidad del carácter de mancha solar, que demuestra estar gobernado por varios genes, además de verse afectado por factores ambientales, por tanto se le dedicará gran atención en el resto de la Memoria.

Algunos de los caracteres evaluados, fundamentalmente relativos al tamaño y forma del fruto, así como a su color e incidencia del YSD, presentaron diferencias significativas entre las dos cosechas realizadas (ejemplificadas en los racimos 3 y 7). Los datos de las variables ambientales tomados en el interior del invernadero mediante un sistema de monitorización de temperatura, humedad y radiación PAR, mostraron que en los días en los que se realizó la segunda cosecha, la temperatura media fue casi 3°C superior, siendo la máxima de unos 7°C superior, y la humedad relativa media fue un 25% menor, todo respecto a los datos del día de la primera cosecha. Las diferencias significativas encontradas en los parámetros de calidad externa como peso, diámetros y mancha solar, entre otros, en las diferentes épocas de cosecha se pueden atribuir a estas amplias diferencias en condiciones ambientales, con una mayor demanda hídrica por parte de la planta en el estadio fenológico de maduración de los racimos superiores que repercuten en el fruto en desarrollo; así, plantas en situación de estrés hídrico ambiental (que se produce en los invernaderos independientemente de que estén bien regados debido a la alta temperatura y baja humedad relativa del aire) es conocido que provoca la reducción del tamaño del fruto y el aumento de los síntomas de mancha solar. También debe contribuir a esto el estadio fenológico en sí, puesto que el desarrollo de los primeros racimos de las plantas de tomates de hábito de crecimiento indeterminado tiene a su disposición toda la maquinaria fotosintética en forma de hojas jóvenes, mientras que en los racimos superiores hay competencia por los fotoasimilados con los últimos frutos en desarrollo de los racimos inferiores en un momento en que, además, las hojas basales van entrando en senescencia.

Uno de los factores más importantes para la Mejora Vegetal es el conocimiento de la contribución relativa de los genes a la variabilidad del carácter que se está considerando. La variación entre individuos de una población se puede deber a factores genéticos y/o ambientales. La heredabilidad de un carácter es la proporción

de la variación fenotípica en una población atribuible a la variación genotípica entre individuos, y los análisis de heredabilidad permiten estimar las contribuciones relativas de las diferencias en factores genéticos y no-genéticos a la varianza fenotípica total en una población. La heredabilidad no es una propiedad del carácter únicamente, sino que también lo es de la población y de las circunstancias ambientales a las que están sujetos los individuos. De hecho, para lo que es más útil la estima de la heredabilidad es para comparar entre variables en cuanto a la magnitud de sus componentes genéticos y sus, por tanto, posibilidades de respuesta a la selección en la mejora genética. En nuestro estudio los caracteres evaluados en la población RIL mostraron valores de heredabilidad en sentido estricto muy variables según el tipo de carácter. Los caracteres relacionados con el tamaño del fruto rojo maduro, el exterior del fruto verde, la flor, la hoja y los foliolos, así como el tipo de crecimiento mostraron valores altos de  $h^2$ . Los caracteres que evaluaban el color, la mancha solar, la composición interna y otros caracteres de la planta como la longitud, el diámetro del tallo o la arquitectura mostraron una heredabilidad en sentido estricto moderada. El color interno del fruto rojo maduro, la distribución de los racimos y algunos de los caracteres que evaluaban el aspecto externo del fruto mostraron valores bajos de  $h^2$ .

Está ampliamente aceptado que el poder de resolución y la precisión del cartografiado genético se ve afectado significativamente por la magnitud de la heredabilidad del carácter (Flint et al. 2005). Según Moreau y col. (1998) la detección de QTLs es más fácil en caracteres donde el número de *loci* implicados es bajo y la heredabilidad es alta. Más adelante se valorará si esta afirmación se cumple en nuestra población, ya que según los datos obtenidos por Illa-Berenguer y col. (2015), la heredabilidad en sentido amplio ( $H$ ) no fue un parámetro fiable para predecir QTLs putativos, aunque reconoce que la precisión en los cálculos de los valores de heredabilidad se podría haber mejorado con más réplicas de los parentales y la  $F_1$ .

Saber en qué medida dos caracteres están correlacionados es importante por tres razones. Primero, en relación con las causas genéticas de la correlación a través de la acción pleiotrópica de los genes. Segundo, en relación con los cambios inducidos por la selección. En tercer lugar, en relación con la selección natural. Es necesario distinguir

las causas de correlación entre caracteres, entre la genética y la ambiental. Se calcularon tres tipos de correlaciones entre todos los caracteres evaluados: la fenotípica, la genética y la ambiental. La magnitud de la correlación genética, que es inducida por la pleiotropía (o por, no se debe descartar, el ligamiento genético) expresa en qué medida los dos caracteres están influidos por los mismos genes, sin embargo el ambiente es una causa de correlación en tanto que los dos caracteres sujetos a la correlación estén influenciados por las mismas diferencias en las condiciones ambientales (Falconer & Mackay 2001). Debido al alto número de caracteres evaluados en este trabajo no podemos ser exhaustivos, y se seleccionaron para su presentación unas pocas de ellas. En primer lugar, se tuvo en cuenta las que presentaban valores de correlación fenotípica significativos al 99% (calculada según el método *Rho* de Spearman) que presentaran un valor absoluto mayor de 0,5, y entre ellas, se prestó atención a aquellas correlaciones que además mostraban valores absolutos de correlación genética mayores de 0,6 (positivo o negativo).

Las **correlaciones** observadas entre **caracteres vegetativos** presentaron valores altos pero se han de considerar triviales, ya que son claramente debidas a efectos pleiotrópicos entre caracteres muy relacionados en el crecimiento vegetativo y la estructura de la planta. Se detectó un QTL en el cromosoma 2 asociado la **longitud de la planta** (*Ht2*) que explicaba el 9.9% de la varianza fenotípica, siendo los alelos de *S. pimpinellifolium* los responsables del incremento en la longitud de la planta. De Vicente y Tanksley (1993) detectaron hasta 9 QTLs asociados a este carácter en una población  $F_2$  derivada de un cruce con *S. pennellii*, pero ninguno en el cromosoma 2. Posteriores estudios de Grandillo y Tanksley (1996) y Paran y colaboradores (1997) sí que detectaron este QTL situado en el cromosoma 2, en poblaciones  $BC_1$  y RIL derivadas de cruces con especies silvestres más emparentadas con la cultivada, concretamente *S. pimpinellifolium* y *S. cheesmaniae* respectivamente. En el primer estudio, el QTL *pvh2.1* está asociado al marcador TG492 que se encuentra en el mapa físico de la secuencia de referencia del tomate en 51.2 MB del cromosoma 2 (versión SL5.0 del genoma de tomate accesible en <http://solgenomics.net>), la misma región genómica que el marcador asociado al QTL *Ht2* detectado en este trabajo, sin embargo la dirección del efecto del QTL es contraria ya que en el estudio el alelo *S.*

*pimpinellifolium* provocó una disminución del carácter, aunque hay que reseñar que la entrada silvestre parental de la población empleada era distinta a TO-937 y que es bien conocido que *S. pimpinellifolium* posee una enorme variabilidad intraespecífica. En el último estudio (Paran et al. 1997) se han detectado 2 QTLs dentro del cromosoma 2, de los cuales el QTL situado al final del cromosoma (marcador asociado TG188, 54 MB) también coincide en la región genómica con el *Ht2*.

Se detectaron dos QTLs asociados al **diámetro del tallo** (*SW4* y *SW11*) que entre ambos explicaban el 32% de la varianza fenotípica, siendo los alelos de *S. lycopersicum* los que provocan el incremento del diámetro. De Vicente y Tanksley (1993) detectaron hasta 7 QTLs para este carácter en la población F<sub>2</sub> derivada de un cruce con *S. pennellii*, pero ninguno situado en los cromosomas 4 y 11. El QTL *SW11* se sitúa en 54.2 MB en el mapa físico, en esa zona se encuentran dos genes relacionados con la división celular. El gen más cercano al QTL codifica una serin/treonin protein-kinasa. Las protein-kinasa juegan un papel en multitud de procesos celulares, incluyendo la división, proliferación, apoptosis y diferenciación. El otro gen, situado a 110 kB cadena abajo del primero, codifica una proteasa también involucrada en división celular, con un dominio ATPasa tipo AAA. Las proteasas AAA son metalopeptidasas ATP-dependientes, también conocidas como FtsH en referencia a la enzima de *Escherichia coli* (Filamentous temperature sensitive H). Se han encontrado hasta 12 ortólogos en el genoma de las plantas. Este tipo de ATPasas forman una gran familia de proteínas y juegan varios papeles en la célula, incluyendo la regulación de los ciclos celulares, la proteólisis y disgregación de proteínas, la biogénesis de orgánulos y el transporte intracelular. Estos dos genes descritos se pueden establecer como posibles genes candidatos para explicar el mecanismo del QTL asociado al diámetro del tallo, dado que un incremento en el número de divisiones celulares, y por tanto en el número de células, en el plano axial del tallo, provocaría el incremento del diámetro del tallo.

Se detectó un QTL en el cromosoma 2 para la **exerción del estilo** (*Style2*) que explicaba el 31.2% de la varianza fenotípica, siendo los alelos de *S. pimpinellifolium* los responsables de la exerción del estilo. Este QTL ya es bien conocido, pues fue

detectado en una población BC<sub>1</sub> derivada de un cruce con *Lycopersicon hirsutum* (actualmente *S. habrochaites*) (Bernacchi & Tanksley 1997) y posteriormente detectado (Chen & Tanksley 2004) y clonado en una población de líneas de introgresión de *S. pennellii*, descubriéndose que era un gen que codificaba un posible factor de transcripción que regulaba la elongación celular en los estilos en desarrollo. De esta manera la transición de la polinización cruzada a la autopolinización fue acompañada, no de un cambio en la proteína sino en la regulación a la baja de la expresión del gen durante el desarrollo de la flor (Chen et al. 2007).

Se detectaron 3 QTLs asociados al **número de flores por inflorescencia** en los cromosomas 2 (*Nflt2*), 6 (*Nflt6*) y 10 (*Nflt10*), que explicaban entre el 9.2 y el 18.5% del total de la varianza fenotípica. *Nflt2* se encuentra en la parte final del cromosoma 2, en 54 MB en el mapa físico, y el incremento en el número de flores por inflorescencia es atribuido a los alelos de *S. pimpinellifolium*. Coincide en la misma región genómica con el QTL *nfl2.1* asociado al marcador TG537 (51 MB) detectado por van der Knaap (2003), en una población F<sub>2</sub> proveniente de un cruce con *S. pimpinellifolium*. En los QTLs *Nflt6* y *Nflt10* son los alelos de *S. lycopersicum* los que provocaron el incremento en el número de flores por inflorescencia, efecto contrario al esperado según el fenotipo de los parentales. Se ha descrito previamente por Grandillo (1996) un QTL para el número de frutos por racimo en el cromosoma 6 cercano al marcador morfológico *sp*, en una población BC<sub>1</sub> también proveniente de un cruce con *S. pimpinellifolium*. Este QTL y el *Nflt6* detectado en este trabajo se sitúan en la misma región cromosómica, en 42.5 MB, por lo que podrían ser el mismo QTL. De cualquier forma, sería un QTL bastante coherente puesto que el gen *SP* (self-pruning) es miembro, como *Terminal flower* y *Single flower truss*, de la familia de genes *CET* (McGarry & Ayre 2012) relacionados con el equilibrio Florigen/Antioflorigen y, por tanto, con la inducción/terminación del desarrollo de flores en los meristemas. Respecto al cromosoma 10, Doganlar (2002) detectó en una población BC<sub>2</sub>F<sub>6</sub> proveniente de *S. pimpinellifolium* el QTL para el número de frutos por racimo *nof10.1*, en 2-3 MB en el mapa físico, asociado al marcador morfológico *u*, de maduración uniforme. El QTL *Nflt10* detectado en este trabajo está situado en 61-63 MB, por lo

que no parece que sean el mismo QTL estando tan alejados. No hemos observado ningún posible gen candidato para este QTL.

Los caracteres relacionados con el **peso del fruto frente a los diámetros del fruto** presentaron una alta correlación fenotípica, resultado esperado debido a que al aumentar los diámetros aumenta el tamaño del fruto. Además presentaron una alta correlación genética, lo que se explica porque sus efectos provienen de genes pleiotrópicos que tienen efectos en estos caracteres a la vez. Se han detectado 4 QTLs en los cromosomas 2, 3, 11 y 12, que son comunes para los caracteres **peso del fruto**, **peso del pericarpio** y **diámetro ecuatorial**. Entre los 4 explican el 63-64% de la varianza fenotípica encontrada en cada uno de esos caracteres, siendo en todos los alelos de *lycopersicum* los que provocan el incremento de cada carácter. En el caso del **diámetro polar** también se encontraron 3 de esos 4 QTLs (*PD2*, *PD3* y *PD11*), que explicaban entre ellos el 49.6% de la varianza fenotípica. Estos caracteres presentan QTLs comunes porque representan genes pleiotrópicos, como se ha comentado antes. El control del tamaño del fruto de tomate se ha venido estudiando desde hace décadas, y tras los primeros estudios de QTLs, ya se conocen varios genes, algunos incluso han sido clonados y se ha descubierto el mecanismo molecular por el que actúan. Entre ellos *fw2.2*, detectado continuamente en varias especies silvestres de fruto verde y rojo (Paterson et al. 1991; Lindhout et al. 1994; Alpert et al. 1995; Grandillo & Tanksley 1996; Lippman & Tanksley 2001; Doganlar et al. 2002; Saliba-Colombani et al. 2001; Lecomte et al. 2004) fue el primer QTL clonado para peso del fruto, y resultó del proceso de domesticación y selección sufrido por el cultivo (Frary et al. 2000; Nesbitt & Tanksley 2002). Este gen codifica una proteína de la familia de reguladores del número celular (CNR) y se piensa que está localizada en la membrana plasmática (Cong & Tanksley 2006; Libault et al. 2010). Recientemente se ha clonado el segundo QTL de peso del fruto, *FW3.2* (Chakrabarti et al. 2013) en el que subyace un gen que codifica un citocromo P450 y es un ortólogo de *KLUH*, que se ha demostrado que regula el tamaño de los órganos en *Arabidopsis* (Anastasiou et al. 2007).

En nuestra población el QTL detectado en el cromosoma 2 en 52.2 MB en el mapa físico tiene la misma localización que *fw2.2* (Frary et al. 2000), y se detectó su

asociación en varios caracteres relacionados como el peso del fruto (*FW2*), el peso del pericarpo (*PW2*), el porcentaje del peso del pericarpo (*PP2.2*), el diámetro ecuatorial (*ED2*), el diámetro polar (*PD2*) y el grosor del pericarpo (*Pth2*), además del marcado de los hombros (*Bks2.2*) y el tamaño de la flor (*CoSz2*). Todo lo expuesto parece indicar que nuestro QTL se correspondería con *fw2.2*. De igual manera ocurre en el cromosoma 3 con el segundo QTL más influyente para esos caracteres, detectado en 64.2 MB en el mapa físico, para peso del fruto (*FW3*), peso del pericarpo (*PW3*), porcentaje del peso del pericarpo (*PP3*), diámetro ecuatorial (*ED3*), diámetro polar (*PD3*) y grosor del pericarpo (*Pth3*), que por su localización y caracteres a los que está asociado podría corresponderse con *FW3.2*, situado en 58.8 MB (Chakrabarti et al. 2013).

Los coeficientes de correlación ambiental entre la mayoría de los caracteres de tamaño del fruto resultaron ser similares a los obtenidos en la correlación genética, hecho que señala que el ambiente junto con los efectos genéticos no aditivos son la principal causa de variación fenotípica. Sin embargo, en las relaciones en las que estaba implicado el carácter diámetro polar, la correlación ambiental era superior o muy superior a la correlación genética. También el peso del pericarpo frente al grosor del pericarpo mostró una correlación ambiental mayor que la genética. Estos resultados muestran que en estos últimos caracteres en concreto, el ambiente (en el que hay que implicar no sólo a las variables ambientales sino a factores fisiológicos tales como, por ejemplo, posición del fruto en el racimo, es el mayor factor de variación fenotípica.

Se detectaron 3 QTLs asociados a la **forma del fruto**, calculada como el cociente entre el diámetro ecuatorial y el diámetro polar, en los cromosomas 2 (*FS2.1* y *FS2.2*) y 7 (*FS7*). Respecto a la forma del fruto tal como la medimos nosotros se conocen al menos 3 genes que modulan la forma del fruto y que sin embargo tienen un efecto mínimo sobre su tamaño, éstos son *ovate*, *sun* y *fs8.1* (Tanksley 2004). Al presentar los parentales de la población, MM y TO-937, los frutos redondeados, ninguno de los 3 genes estaría *a priori* presente en los parentales de nuestra población RIL. Este hecho ha permitido que en este estudio se hayan podido descubrir otros QTLs para el

carácter de forma del fruto que en otras poblaciones con alguno de los 3 genes no habrían llegado a ejercer efecto suficiente para ser detectados. El QTL *FS7* explicó el 10.4% de la varianza fenotípica y el marcador al que está asociado lo sitúa en 55.8 MB en el mapa físico. En la misma región genómica se encuentra el marcador TG143 (59.4 MB) asociado a otros QTLs para el carácter forma detectados en una población BC<sub>2</sub>/BC<sub>3</sub> a partir de cruzamientos con *S. parviflorum* (Fulton et al. 2000) y en una población BC<sub>2</sub>/BC<sub>4</sub> obtenida de cruzamientos con *S. peruvianum* (Fulton et al. 1997), por lo que *FS7* podría corresponderse con ellos. También se han descrito QTLs para la forma del fruto en el cromosoma 2 cercanos a *fw2.2* (Tanksley et al. 1996; Grandillo & Tanksley 1996), pero ninguno se sitúa cerca de la región genómica de los QTLs descritos en esta Memoria, ya que *fw2.2* está en 52.2 MB en el mapa físico y *FS2.1* y *FS2.2* están en 42.5 y 40.1 MB respectivamente. Al analizar los QTLs del cromosoma 2 por el método de Multiple QTL Mapping (MQM) se observó que *FS2.2* sólo se detectaba cuando el marcador asociado a *FS2.1* se utilizaba como cofactor. Estos dos QTLs se sitúan a 26 cM por lo que están ligados, sin embargo muestran efectos contrarios, ya que en *FS2.1* son los alelos de *S. lycopersicum* los que provocan el incremento del carácter, efecto esperado según el fenotipo de los parentales, generando un fruto más achatado; y en *FS2.2* son los alelos de *S. pimpinellifolium* los que se asocian a un fruto más achatado. Será necesario, por tanto, obtener nuevo material vegetal, por ejemplo líneas de introgresión, que separen estos dos QTLs ligados y de efectos contrarios para poder estudiar con mayor precisión sus efectos.

Se ha detectado un QTL común para dos caracteres, **porcentaje del peso del pericarpio y marcado del hombro**. Se sitúa en el cromosoma 2, explicando el 13.5% (*PP2.1*) y el 13% (*BKS2.1*) de la varianza fenotípica, y no parece estar relacionado con el peso o tamaño del fruto, dado que no se ha detectado para esos caracteres, sino para el porcentaje del peso del pericarpio. Este carácter muestra qué proporción del peso del fruto se debe al peso del pericarpio y qué proporción al conjunto de la placenta, mucílago y semillas, que han sido retirados para los análisis. Se han valorado varias hipótesis que expliquen el mecanismo que subyace bajo este QTL: que afecte al peso de las semillas, al tamaño de la columela, o a la proporción del lóculo que queda vacío. Se han encontrado en la bibliografía varios QTLs que controlan el peso y/o número de

las semillas en varios cromosomas (Tanksley et al. 1982; Goldman et al. 1995; Grandillo & Tanksley 1996; Lippman & Tanksley 2001; Doganlar et al. 2002; van der Knaap & Tanksley 2003; Foolad 2007). Los QTLs encontrados en la bibliografía que se sitúan en el cromosoma 2 se localizan en el mapa físico entre 5.3 MB (*nsf2.1* asociado al marcador TG14 en van der Knaap & Tanksley 2003) y 16.2 MB (*sw2.5* asociado al marcador TG167 en Lippman & Tanksley 2001) más abajo de nuestro QTL *PP2.1/BkS2.1*. Para establecer si *PP2.1/BkS2.1* tiene efecto sobre el peso y/o número de las semillas, y determinar si en nuestra población se puede detectar un QTL asociado a ese carácter se necesitan análisis adicionales a este trabajo; sin embargo habría que tener en cuenta que probablemente el peso de la semilla puede no ser suficiente para generar las diferencias en el porcentaje del peso del pericarpio. Para determinar si *PP2.1/BkS2.1* ejerce alguna acción sobre el tamaño de la columela se midió *a visu* sobre fotografía asignando valores de 1 a 3 a cada RIL, y se aplicó a los datos el método de Interval Mapping (IM) y el método de Multiple QTL Mapping (MQM) con los que se detectó un QTL que explicaba el 11,5% de la varianza fenotípica del tamaño de la columela, pero no en el cromosoma 2 sino en el cromosoma 3 (*CW3*), por lo que es un resultado novedoso pero no nos sirve como hipótesis para explicar el mecanismo de *PP2.1/BkS2.1*.

Por último, para determinar si *PP2.1/BkS2.1* tiene algún efecto en la proporción del lóculo que queda vacío, y así afectar al porcentaje de peso del pericarpio, se ha consultado la bibliografía disponible y se ha examinado un estudio de van der Knaap y Tanksley (2003), ya que la población empleada tiene como uno de sus parentales la variedad *Yellow Stuffer*. Esta variedad de *S. lycopersicum* presenta un fruto que recuerda en la forma a un pimiento morrón amarillo, ya que presenta hombros marcados, lóculos marcados en todo el eje longitudinal del fruto y, lo más importante, en su interior el conjunto de placenta, mucílago y semillas ocupan muy poco espacio en relación a todo el volumen del lóculo, como suele ocurrir en los pimientos (Figura 1.4). En el estudio se analizan diferentes caracteres que además del peso del fruto definen la forma típica del pimiento (tipo *bell*), midiendo el marcado de lóculos en ambos extremos distales del fruto (*sblk* y *bblk*), entre otros, pero no así la proporción del lóculo que queda vacío. Aún así se comparó la posición de los QTLs detectados en

el cromosoma 2 para la forma de pimiento (*bell2.1* en 48.5 MB, asociado al marcador TG645), para la forma y el marcado de los hombros (*bell2.2* y *sblk2.1* en 51.04 MB asociado al marcador TG537) y para el marcado de los lóculos en la parte apical (*bblk2.1* en 49.5 MB asociado al marcador CT244) y se observó que se encontraban al menos a 12 MB de nuestro QTL *PP2.1/BkS2.1*. En cambio el QTL para marcado de hombros (*sblk2.1* en 51.04 MB asociado al marcador TG537) sí se encuentra en la misma región genómica del mapa físico que el segundo QTL para marcado de hombros (*BkS2.2* en 52.2 MB) descrito en nuestra población.

Tras este análisis de las hipótesis no se puede afirmar que el mecanismo de acción del QTL *PP2.1/BkS2.1* se base en el control del llenado del lóculo, ya que es necesario primero profundizar en el conocimiento de las bases de este carácter. Para ello lo más conveniente sería emplear poblaciones como las desarrolladas por el grupo de la Dra. van der Knaap, en las que los parentales ofrecen un rango amplio de variabilidad para el carácter.



**Figura 1.4.** Corte longitudinal (izquierda) y corte transversal (derecha) de un fruto de la variedad *Yellow Stuffer*, donde se observa que el conjunto de mucílago, semillas y placenta no ocupa todo el espacio interior de los lóculos. Imagen tomada de la web [www.oardc.osu.edu](http://www.oardc.osu.edu).

La **densidad y longitud de la pilosidad del fruto** mostraron valores altos de correlación fenotípica y genética. Esta relación se confirma por la detección de un QTL asociado a la **densidad y longitud de la pilosidad del fruto** (*HdF10/HIF10*) que explica el 14.8 y el 23.6% de la varianza fenotípica, respectivamente, situado en 60.7 MB en el mapa físico, siendo los alelos de *S. pimpinellifolium* los responsables del incremento de ambos caracteres. En relación con estos caracteres se detectaron además dos QTLs

asociados no al fruto sino a la **pubescencia de las partes vegetativas** (*HdP7* y *HdP10*) que entre ambos explicaban el 69.9% de la varianza fenotípica, y se ha de señalar que *HdP10* se situó en la misma región genómica que *HdF10/HIF10*. La detección de un QTL en el cromosoma 10 para la pubescencia de la planta se ha publicado en varias ocasiones. Tanksley y colaboradores (1992), en su estudio sobre los mapas de ligamiento de tomate y patata, recogen en el cromosoma 10 el marcador morfológico *h* (*hairs absent*) (Rick 1980), que determinaba ausencia de pelos (tricomas), asociado al marcador CT203, localizado en 60.4 MB en el mapa físico, la misma región genómica que *HdF10/HIF10/HdP10*. En este estudio se recoge que el cromosoma 10 es uno de los 5 cromosomas afectados por las inversiones cromosómicas que diferencian los genomas de tomate y patata. Más reciente es el estudio de Frary y colaboradores (2014), que muestra la sintenia entre los genomas de berenjena, tomate, patata y pimiento, identificando ortólogos putativos en un 35% de los QTLs encontrados. En el caso de la pubescencia, encontraron varios QTLs según la parte vegetativa estudiada (ápice, tallo y hojas), situándose los más influyentes en los cromosomas 3 y 10 de berenjena. Uno de los QTLs detectados en el cromosoma 10 de berenjena (*sh10.1*) estaba asociado al marcador TG280, que en el mapa físico de tomate (SL2.50) se situó en 59.5 MB, por lo que podría ser ortólogo de los encontrados en este estudio (*HdF10/HIF10/HdP10*), situados en 60.7 MB. Además en la berenjena se encontraron QTLs adicionales en los cromosomas 2, 3, 7 y 9, indicando que hay QTLs menores asociados al carácter. El QTL detectado en el cromosoma 7 (*ah7.1*) estaba asociado al marcador TG143, que en el mapa físico de tomate (SL2.50) se situó en 59.5 MB, por lo que podría ser ortólogo del encontrado en este estudio (*HdP7*) en 62.3 MB, en el cual se observó que son los alelos de *S. lycopersicum* los que provocan el incremento en la pubescencia.

La presencia de **hombro verde oscuro en el fruto verde** se conoce desde hace tiempo como el gen *u* (*uniform-ripening*) cuya mutación en algunas variedades de tomate cultivado provoca una maduración uniforme del fruto, mientras que el alelo silvestre genera un hombro verde oscuro en el fruto verde. En esta población es el parental TO-937 el que aporta este carácter de hombros verdes. En el estudio se observó una correlación genética entre la presencia de **hombro verde oscuro y rayas**

**longitudinales en el fruto verde**, lo que indicaría pleiotropía del gen subyacente. Se detectó un QTL mayor (*GSh10*) en el brazo corto del cromosoma 10, asociado a los parámetros *L*, *a* y *H* de la zona peduncular (hombro), así como a la presencia de rayas verdes y hombro más oscuro en la zona peduncular. Este QTL mayor explicó entre un 33% y un 65% de la varianza fenotípica y por su localización en 2.3 MB en el mapa físico se corresponde, como era de esperar, con el gen *GLK2* (Powell et al. 2012; estudio en el que, entre otras, se utilizó nuestra misma población RIL en su localización), ya conocido por ser el gen que codifica un factor de transcripción responsable del fenotipo del marcador morfológico *u* (*uniform ripening*), responsable de generar hombro verde oscuro en los frutos verdes en las especies silvestres, y que en esta población lo aporta el parental *S. pimpinellifolium*. El valor de la correlación ambiental es muy bajo, lo que indica que este carácter estaría muy poco influenciado por el ambiente. En los siguientes capítulos de esta Memoria se profundizará en el comportamiento de este carácter respecto a los factores ambientales y su relación con la fisiopatía de la mancha solar.

La correlación observada entre los **caracteres relacionados con la mancha solar** se debe a que el índice de mancha solar (YSD index) se calcula mediante una fórmula que emplea el valor de la diferencia de *H* (DiffH) entre la zona del hombro (1) y la zona apical (4) del fruto. Además de esta diferencia de *H*, también emplea los valores de *H* y *L* de la zona apical (4). Es por esta razón que existe una alta correlación entre este índice, la diferencia de *H* y el valor de *H* en la zona 1. Por otro lado, el índice de mancha solar observada correlaciona con el YSD index, (así como con las variables *L* y *H* de la zona 1 y la diferencia de *H*, por las razones arriba descritas). Esto puede indicar la calidad del índice de mancha solar, sin embargo sólo en estas correlaciones donde está este carácter implicado, el valor de la correlación genética es sensiblemente menor que el de la ambiental, hecho que señala que el ambiente es el mayor factor de variación fenotípica cuando se emplea la valoración de la mancha solar *a visu*. Al analizar los parámetros de **color del fruto rojo maduro, en la zona del hombro**, se detectó el mismo QTL *GSh10* en los parámetros *L* (*Li10*), *C* (*Sat10.1*) y *H* (*Co10*) de la zona peduncular, la diferencia de *H* entre las zonas peduncular y apical y el índice de mancha solar (*YSD10*). Este QTL común asociado a la mancha solar no llegó a ser

significativo en estos caracteres de color. El motivo es que, a pesar de haber casi la mitad de las RILs afectadas por la mancha solar, en muchas de ellas las plantas no mostraban el carácter en todos los frutos, y algunas lo mostraban con poca severidad. Es posible que al tomar los frutos para los ensayos de calidad, siguiendo el apartado 1.2.2, no se tomara el número suficiente de frutos y no reflejara bien el valor real del carácter mancha solar para la línea por una cuestión de muestreo insuficiente para un carácter tan variable en su expresión. Es por ello quizás que la detección del QTL no llegue al valor umbral para ser significativa. Por todo ello, nos planteamos realizar un nuevo fenotipado de la población RIL y estudio de localización de QTLs específico para la fisiopatía de la mancha solar, que se detalla en el capítulo 3 de esta memoria.

Los coeficientes de correlación entre los **parámetros de color  $L$ ,  $C$ ,  $H$  y  $a$  para el fruto rojo maduro** muestran que los valores de  $C$  entre las 4 zonas del fruto correlacionan entre ellos. Se observa que entre las zonas 1 (Peduncular) y 2 (Subpeduncular) las correlaciones no son tan altas (en torno a 0,6) debido a la mancha solar de algunos frutos. Así mismo, la zona 1 correlaciona con la 3 y 4 significativamente pero con valores menores no mostrados en la Tabla 1.3. Los valores de  $L$  entre las 4 zonas del fruto presentan un comportamiento parecido al de la variable  $C$ , ya que correlacionan bien las zonas 2, 3 y 4, entre ellas pero no la zona 1 con las otras zonas debido también a la mancha solar de algunos frutos. Los valores de  $H$  entre las 4 zonas del fruto presentan un comportamiento diferente al de las variables  $L$  y  $C$ . Sólo correlacionan las zonas 3 y 4 entre ellas porque  $H$  es una variable con mayor rango de variabilidad en los frutos, representando el color tal y como lo conocemos, desde 27° (rojo) a 95°-100° (amarillo) de manera aproximada. Dado que el color rojo es más uniforme en las zonas 3 y 4 la correlación es mayor. Al contrario, en las zonas 1 y 2, donde se puede desarrollar la mancha solar, los valores de  $r_p$  y  $r_G$  son sensiblemente menores. En la zona del hombro (zona 1) correlacionan  $L$  con  $C$  y  $L$  con  $H$  (entre  $C$  y  $H$  también hay correlación pero de menor valor). Sin embargo esto no ocurre en el resto de zonas. Puesto que la diferencia entre la zona del hombro y el resto del fruto es la presencia de la mancha solar en frutos de algunas RILs cabe pensar que la presencia de mancha provoca que se incremente el valor de  $H$  de rojo (27°) hacia amarillo (95°-100°), a la vez que el valor  $L$  de luminosidad y el valor de  $C$  de

saturación del color aumentan. En la zona entre el hombro y el ecuador del fruto (zona 2) correlaciona  $L$  con  $H$ . Esto es un reflejo de lo que se ha explicado para la zona 1 respecto al efecto de la mancha solar, ya que en algunos frutos la mancha es tan grande que puede llegar hasta el eje ecuatorial del fruto, si bien como se ve en la Tabla 1.3 los valores son menores que para la zona 1. Entre los valores  $C$  de saturación y  $a$  en el eje del rojo existe correlación. Esto se observa en las zonas 2, 3 y 4, y los valores son mayores conforme se van acercando a la zona apical del fruto (desde zona 2 a zona 4). No existe correlación en la zona 1 que es donde se desarrolla la mancha solar del fruto cuando aparece.

Se detectaron 3 QTLs asociados al **contenido de sólidos solubles del fruto** (SSC), en los cromosomas 2 y 3 ( $SSC2$ ,  $SSC3.1$  y  $SSC3.2$ ) que entre todos explicaban el 35.3% de la varianza fenotípica. El contenido en sólidos solubles es de los primeros caracteres estudiados por los mejoradores por su importancia tanto en el mercado de tomate fresco como en el de procesado, ya que afecta a la calidad organoléptica y al rendimiento del producto final (pasta deshidratada), respectivamente. Se han detectado varios QTLs asociados al SSC en varias poblaciones provenientes de cruzamientos con *S. chmielewskii* (Paterson et al. 1988), *S. cheesmaniae* (Goldman et al. 1995), *S. peruvianum* (antiguo *L. peruvianum*) (Fulton et al. 1997), *S. pimpinellifolium* (Tanksley et al. 1996; Grandillo & Tanksley 1996; Chen et al. 1999; Capel et al. 2015) y con *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (Saliba-Colombani et al. 2001; Lecomte et al. 2004). También se ha aprovechado el conocimiento de estos QTLs para realizar estudios de introgresión de las zonas genómicas que portaban QTLs conocidos para SSC de especies silvestres en el genoma de tomate cultivado, con el fin de estudiar sus efectos (Eshed & Zamir 1995; Fridman et al. 2000; Yousef & Juvik 2001; Yates et al. 2004; Fridman et al. 2004; Baxter et al. 2005). Varios QTLs detectados en los estudios señalados se encuentran en la misma región genómica que los QTLs detectados en esta Memoria, en concreto el QTL detectado en el cromosoma 2 ( $SSC2$ ) se localiza en 43.6 MB, y en varios estudios se han detectado QTLs asociados a SSC en la misma región genómica (Goldman et al. 1995; Tanksley et al. 1996; Fulton et al. 1997; Chen et al. 1999; Saliba-Colombani et al. 2001; Lecomte et al. 2004; Capel et al. 2015; este último estudio, realizado con la misma población RIL que esta memoria).

Respecto a los dos QTLs del cromosoma 3, se sitúan en 54.7 MB (*SSC3.1*) y 68.4 MB (*SSC3.2*). Se ha encontrado en la bibliografía que en la zona genómica de *SSC3.1* han sido detectados QTLs para SSC en el estudio de Goldman y col. (1995). En cambio, varios trabajos han detectado QTLs para SSC en la zona genómica de *SSC3.2* (Paterson et al. 1988; Goldman et al. 1995; Tanksley et al. 1996; Chen et al. 1999; Capel et al. 2015), y además en todos coincide que son los alelos de *S. lycopersicum* los responsables del incremento del carácter.

El contenido en **glucosa correlaciona con el contenido en fructosa** porque son los azúcares predominantes en el fruto, sin embargo están implicados en múltiples rutas diferentes de síntesis y degradación, por lo que el valor de la correlación genética es menor que el de la correlación fenotípica. El coeficiente de correlación ambiental entre la glucosa y la fructosa es mayor que el de la correlación genética, lo que permite afirmar que el ambiente es el mayor factor de variación fenotípica en la relación entre los contenidos de los dos azúcares reductores. En este estudio no se detectaron QTLs significativos para el contenido en glucosa y fructosa del fruto.

Se detectó un QTL para la **acidez del fruto** en el cromosoma 6 (*TA6*) en 42.8 MB en el mapa físico que explicaba el 12.4% de la varianza fenotípica. En la bibliografía existen estudios que han detectado QTLs asociados a la acidez del fruto en otros cromosomas (Saliba-Colombani et al. 2001; Lecomte et al. 2004; Capel et al. 2015), pero no en el cromosoma 6, donde se localiza el QTL *TA6* detectado en este trabajo.

El contenido en **licopeno correlaciona con el contenido en  $\beta$ -caroteno** del fruto ya que comparten la misma ruta biosintética (Goodwin 1994; Armstrong & Hearst 1996; Hirschberg et al. 1997; Hirschberg 2001). Por otro lado la correlación del licopeno con el porcentaje de licopeno en el fruto (respecto al total de licopeno y  $\beta$ -caroteno), presenta valores más bajos, lo que se puede explicar por qué el rango de valores de contenido de licopeno entre las RILs es muy amplio (desde 12 a 240  $\mu\text{g/g}$ ) pero los porcentajes de licopeno en el fruto, respecto al total de licopeno y  $\beta$ -caroteno no es un carácter con un rango tan amplio, del 54 al 71%. Se detectó un QTL común para el **contenido en licopeno y  $\beta$ -caroteno del fruto** en el cromosoma 1 (*Lyc1/B-c1*),

que explicaban cada uno el 11.8% de la varianza fenotípica. Además se detectaron dos QTLs para el contenido en  **$\beta$ -caroteno del fruto** en los cromosomas 2 (*B-c2*), y 7 (*B-c7*), cada uno explicando algo más del 10% de la varianza fenotípica. Por último se detectaron dos QTLs para el **porcentaje de licopeno respecto al  $\beta$ -caroteno del fruto** en el cromosoma 4 (*PLyc4.1* y *PLyc4.2*), que explicaban entre ambos más del 32% de la varianza fenotípica. En todos los QTLs presentados fueron los alelos de *S. pimpinellifolium* los responsables del incremento del contenido de los carotenoides medidos. Ya ha sido detectado un QTL en el cromosoma 1 en nuestra población, asociado al marcador SSR75, que se sitúa en la misma región genómica que nuestro QTL *Lyc1/B-c1* localizado en 83.7 MB (Capel et al. 2015); sin embargo en dicho estudio el QTL sólo estaba asociado al contenido en  $\beta$ -caroteno, no al del licopeno. Existe otro estudio anterior, de Chen y col. (1999), que detecta un QTL en el cromosoma 1 para contenido en licopeno pero la región genómica no es la misma. En el cromosoma 2 Capel y col. (2015) han detectado un QTL asociado al marcador SSR66 para el contenido en  $\beta$ -caroteno, que se sitúa en 38.6 MB, muy cerca de la región genómica de *B-c2*, detectado en 35.2 Mb en nuestra población. En el estudio de Chen y col. (1999) se ha detectado también un QTL en el cromosoma 7, asociado al marcador TG113, para el contenido en licopeno en 1.7 MB. Este QTL se sitúa muy cerca de la región genómica de *B-c7*, detectado en 0.6 Mb en nuestra población, aunque no para el contenido en licopeno sino en  $\beta$ -caroteno. No se ha encontrado en la bibliografía ningún estudio de QTLs del carácter medido en nuestra población como **porcentaje de licopeno respecto al  $\beta$ -caroteno del fruto**, pero sí se han encontrado estudios que muestran QTLs para el contenido en licopeno en el cromosoma 4, donde se sitúan los dos QTLs *PLyc4.1* y *PLyc4.4*. El QTL detectado a 53.2 MB (*PLyc4.1*) se encuentra en la misma región genómica que los QTLs detectados para el contenido en licopeno asociados a los marcadores TG287 (Saliba-Colombani et al. 2001) y SSR94 (Capel et al. 2015); mientras que el QTL detectado a 62.7 MB (*PLyc4.2*) se encuentra en la misma región genómica que el QTL detectado por Chen y col. (1999) para el contenido en licopeno asociado al marcador CT50. Este hecho se debe a que la medida del porcentaje de licopeno es una medida indirecta del contenido en licopeno. Los resultados muestran que es útil para el estudio de QTLs asociados al contenido en licopeno, ya que parece que al relacionar el contenido en licopeno con el contenido en

$\beta$ -caroteno se soslaya el error experimental que está asociado al protocolo de extracción de carotenoides.

Los caracteres medidos en la población que mostraron heredabilidad en sentido amplio ( $H$ ) alta o moderada fueron, entre otros, los relacionados con tamaño del fruto, exterior del fruto verde, mancha solar, SSC, acidez, longitud de la planta, diámetro del tallo y flor. Ha sido en estos caracteres en los que se detectaron la mayoría de los QTLs, por lo que en nuestro estudio se corrobora efectivamente lo establecido por Moreau y col. (1998), que la detección de QTLs es más fácil en caracteres donde el número de *loci* implicados es bajo y la heredabilidad es alta.

Existen caracteres de calidad de fruto que por su interés agronómico y comercial han sido ampliamente estudiados, como puede ser el tamaño del fruto o el contenido en sólidos solubles. Ya se han mencionado los QTLs detectados con anterioridad a este trabajo, e incluso algunos de ellos han sido clonados y se conoce el gen último responsable del carácter. Varios de los QTLs detectados en este trabajo, y que han sido presentados en la Tabla 1.4 coinciden en la misma región genómica que QTLs detectados para los mismos caracteres en diferentes trabajos anteriores, aun habiendo sido realizados en diferentes tipos de población y con diferentes parentales silvestres. Estas coincidencias en la detección de QTLs confirman que el estudio realizado en esta Memoria es coherente y fiable para la caracterización genética de caracteres relacionados con la calidad del fruto. Esto nos permite confiar en que los QTLs detectados que no han sido descritos antes en otros estudios, como *SW11* asociado al diámetro del tallo, *FS2.1* y *FS2.2* asociados a la forma del fruto, *PP2.1/BkS2.1* asociados al porcentaje del peso del pericarpio y marcado del hombro y *TA6* asociado a la acidez del fruto, entre otros, son consistentes y se pueden emplear como punto de partida en nuevos estudios que profundicen en el conocimiento del mecanismo que subyace en esos QTLs, como el estudio de genes candidatos. De igual manera, el estudio de localización de QTLs descrito en este capítulo se puede considerar como una prueba de concepto de su validez para la detección de QTLs para el carácter principal estudiado en este trabajo de tesis, la fisiopatía de la mancha solar

cuando se emplee una caracterización de la población (detallada en el capítulo 3) que obvie la gran variabilidad entre frutos para su expresión fenotípica.

## Bibliografía

- Alpert, K.B., Grandillo, S. & Tanksley, S.D., 1995. FW-2.2 - A MAJOR QTL CONTROLLING FRUIT WEIGHT IS COMMON TO BOTH RED-FRUITED AND GREEN-FRUITED TOMATO SPECIES. *Theoretical and Applied Genetics*, 91(6-7), pp.994–1000. Available at: ISI:A1995TH31900025.
- Anastasiou, E. et al., 2007. Control of Plant Organ Size by KLUH/CYP78A5-Dependent Intercellular Signaling. *Developmental Cell*, 13(6), pp.843–856.
- Armstrong, G.A. & Hearst, J.E., 1996. Carotenoids .2. Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *Faseb Journal*, 10(2), pp.228–237. Available at: ISI:A1996TY96200007.
- Baldwin, E. et al., 1998. Relationship between sensory and instrumental analysis for tomato flavor. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 123(5), pp.906–915.
- Baxter, C.J. et al., 2005. Fruit carbohydrate metabolism in an introgression line of tomato with increased fruit soluble solids. *Plant & Cell Physiology*, 46(3), pp.425–437. Available at: ISI:000227974400005.
- Bernacchi, D. & Tanksley, S.D., 1997. An interspecific backcross of *Lycopersicon esculentum* x *L. hirsutum*: linkage analysis and a QTL study of sexual compatibility factors and floral traits. *Genetics*, 147(2), pp.861–877. Available at: <http://www.genetics.org/cgi/content/abstract/147/2/861>.
- Burr, B. & Burr, F., 1991. RECOMBINANT INBREDS FOR MOLECULAR MAPPING IN MAIZE - THEORETICAL AND PRACTICAL CONSIDERATIONS. *Trends in Genetics*, 7(2), pp.55–60. Available at: ISI:A1991ET66800008.
- Capel, C. et al., 2015. Wide-genome QTL mapping of fruit quality traits in a tomato RIL population derived from the wild-relative species *Solanum pimpinellifolium* L. *Theoretical and Applied Genetics*. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00122-015-2563-4>.
- Causse, M. et al., 2001. Genetic analysis of organoleptic quality in fresh market tomato. 2. Mapping QTLs for sensory attributes. *Theoretical and Applied Genetics*,

102(2-3), pp.273–283. Available at: ISI:000167232800012.

Chakrabarti, M. et al., 2013. A cytochrome P450 regulates a domestication trait in cultivated tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(42), pp.17125–17130. Available at:  
<http://www.pnas.org/content/110/42/17125.abstract>.

Chen, F.Q. et al., 1999. Mapping of QTLs for lycopene and other fruit traits in a *Lycopersicon esculentum* x *L-pimpinellifolium* cross and comparison of QTLs across tomato species. *Molecular Breeding*, 5(3), pp.283–299. Available at: ISI:000080358000008.

Chen, K.-Y. et al., 2007. Changes in regulation of a transcription factor lead to autogamy in cultivated tomatoes. *Science*, 318(5850), pp.643–5. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17962563> [Accessed March 13, 2012].

Chen, K.-Y. & Tanksley, S.D., 2004. High-resolution mapping and functional analysis of se2.1: a major stigma exertion quantitative trait locus associated with the evolution from allogamy to autogamy in the genus *Lycopersicon*. *Genetics*, 168(3), pp.1563–73. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1448767&tool=pmc&rendertype=abstract> [Accessed June 5, 2012].

Cong, B. & Tanksley, S., 2006. FW2.2 and cell cycle control in developing tomato fruit: a possible example of gene co-option in the evolution of a novel organ. *Plant Molecular Biology*, 62(6), pp.867–880. Available at:  
<http://dx.doi.org/10.1007/s11103-006-9062-6>.

DeVicente, M.C. & Tanksley, S.D., 1993. QTL analysis of transgressive segregation in an interspecific tomato cross. *Genetics*, 134(2), pp.585–596. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1205500&tool=pmc&rendertype=abstract>.

Doganlar, S. et al., 2002. Mapping quantitative trait loci in inbred backcross lines of *Lycopersicon pimpinellifolium* (LA1589). *Genome*, 45(6), pp.1189–1202. Available at: <http://dx.doi.org/10.1139/g02-091>.

- Eshed, Y. & Zamir, D., 1995. An introgression line population of *Lycopersicon pennellii* in the cultivated tomato enables the identification and fine mapping of yield-associated QTL. *Genetics*, 141(3), pp.1147–1162. Available at: <http://www.genetics.org/content/141/3/1147.abstract>.
- Falconer, D.S. & Mackay, T.F.C., 2001. *Introducción a la genética cuantitativa* 1st ed. Editorial Acribia S.A., ed., Zaragoza.
- Flint, J. et al., 2005. Strategies for mapping and cloning quantitative trait genes in rodents. *Nat Rev Genet*, 6(4), pp.271–286. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrg1576>.
- Foolad, M.R., 2007. Genome mapping and molecular breeding of tomato. *International Journal of Plant Genomics*, 2007, pp.1–52. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2267253&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> [Accessed March 6, 2013].
- Frary, A. et al., 2000. fw2.2: A quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science*, 289(5476), pp.85–88. Available at: ISI:000088090400035.
- Frary, A. et al., 2014. QTL hotspots in eggplant (*Solanum melongena*) detected with a high resolution map and CIM analysis. *Euphytica*, 197(2), pp.211–228. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s10681-013-1060-6>.
- Fridman, E. et al., 2004. Zooming in on a quantitative trait for tomato yield using interspecific introgressions. *Science*, 305(5691), pp.1786–1789. Available at: ISI:000224039500045.
- Fridman, E., Pleban, T. & Zamir, D., 2000. A recombination hotspot delimits a wild-species quantitative trait locus for tomato sugar content to 484 bp within an invertase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(9), pp.4718–4723. Available at: <http://www.pnas.org/cgi/content/long/97/9/4718> [Accessed February 14, 2015].
- Fulton, T.M. et al., 2000. Advanced backcross QTL analysis of a *Lycopersicon esculentum* × *Lycopersicon parviflorum* cross. *Theoretical and Applied Genetics*, 100(7), pp.1025–1042. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s001220051384>.

- Fulton, T.M. et al., 1997. QTL analysis of an advanced backcross of *Lycopersicon peruvianum* to the cultivated tomato and comparisons with QTLs found in other wild species. *Theoretical and Applied Genetics*, 95(5-6), pp.881–894. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s001220050639>.
- Georgelis, N., Scott, J.W. & Baldwin, E. a, 2004. Relationship of tomato fruit sugar concentration with physical and chemical traits and linkage of RAPD markers. *Journal of the ...*, 129(6), pp.839–845. Available at: <http://journal.ashspublications.org/content/129/6/839.short>.
- Goldman, I., Paran, I. & Zamir, D., 1995. Quantitative trait locus analysis of a recombinant inbred line population derived from a *Lycopersicon esculentum* x *Lycopersicon cheesmanii* cross. *Theoretical and Applied Genetics*, 90(7), pp.925–932. Available at: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/BF00222905>.
- Goodwin, T., 1994. PLANT CAROTENOID RESEARCH 1945 - 1985. *Journal of Plant Physiology*, 143(4-5), pp.440–443. Available at: ISI:A1994NN32400007.
- Grandillo, S. & Tanksley, S.D., 1996. QTL analysis of horticultural traits differentiating the cultivated tomato from the closely related species *Lycopersicon pimpinellifolium*. *Theoretical and Applied Genetics*, 92(8), pp.935–951. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00224033>.
- Hewitt, J.D. & Garvey, T.C., 1987. Wild sources of high soluble solids in tomato. *Plant biology (USA)*, 4, pp.45–54.
- Hirschberg, J., 2001. Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 4(3), pp.210–218. Available at: ISI:000168499500007.
- Hirschberg, J. et al., 1997. Molecular genetics of the carotenoid biosynthesis pathway in plants and algae. *Pure and Applied Chemistry*, 69(10), pp.2151–2158. Available at: ISI:A1997YB87700019.
- IBM Corp., 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0.
- Illa-Berenguer, E. et al., 2015. Rapid and reliable identification of tomato fruit weight and locule number loci by QTL-seq. *Theoretical and Applied Genetics*, 128(7), pp.1329–1342. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00122-015-2509->

x.

van der Knaap, E. & Tanksley, S.D., 2003. The making of a bell pepper-shaped tomato fruit: identification of loci controlling fruit morphology in Yellow Stuffer tomato.

*Theoretical and Applied Genetics*, 107(1), pp.139–147. Available at:

ISI:000183831800018.

Lecomte, L. et al., 2004. Fine mapping of QTLs of chromosome 2 affecting the fruit architecture and composition of tomato. *Molecular Breeding*, 13(1), pp.1–14.

Available at: ISI:000188281100001.

Libault, M. et al., 2010. A member of the highly conserved FWL (tomato FW2.2-like) gene family is essential for soybean nodule organogenesis. *The Plant Journal*,

62(5), pp.852–864. Available at: [http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-](http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-313X.2010.04201.x)

313X.2010.04201.x.

Lindhout, P. et al., 1994. Perspectives of molecular marker assisted breeding for

earliness in tomato. *Euphytica*, 79(3), pp.279–286. Available at:

<http://dx.doi.org/10.1007/BF00022528>.

Lippman, Z. & 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(1), pp.413–

22. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1461635&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.

Llácer, G. et al., 2006. *Mejora genética de la calidad en plantas* 1st ed. Universidad

Politécnica de Valencia, ed., Valencia.

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(1-2), pp.103–110. Available at:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/092552149400052T> [Accessed February 7, 2015].

McGarry, R.C. & Ayre, B.G., 2012. Manipulating plant architecture with members of the

- CETS gene family. *Plant Science*, 188-189, pp.71–81. Available at:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168945212000568> [Accessed January 10, 2016].
- Moreau, L. et al., 1998. Marker-Assisted Selection Efficiency in Populations of Finite Size. *Genetics*, 148(3), pp.1353–1365. Available at:  
<http://www.genetics.org/content/148/3/1353.abstract>.
- Nesbitt, T. & Tanksley, S.D., 2002. Comparative sequencing in the genus *Lycopersicon*: Implications for the evolution of fruit size in the domestication of cultivated tomatoes. *Genetics*, 162(1), pp.365–379. Available at: ISI:000178363400030.
- Van Ooijen, J., 2004. MapQTL 5, Software for the Mapping of quantitative trait loci in experimental populations.
- Paran, I. et al., 1995. Recombinant Inbred Lines for Genetic-Mapping in Tomato. *Theoretical And Applied Genetics*, 90(3-4), pp.542–548.
- Paran, I., Goldman, I. & Zamir, D., 1997. QTL analysis of morphological traits in a tomato recombinant inbred line population. *Genome*, 40(2), pp.242–248.
- Paterson, A.H. et al., 1991. Mendelian factors underlying quantitative traits in tomato: comparison across species, generations, and environments. *Genetics*, 127(1), pp.181–197. Available at: <http://www.genetics.org/content/127/1/181.abstract>.
- Paterson, A.H. et al., 1988. Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Nature*, 335(6192), pp.721–726. Available at:  
<http://dx.doi.org/10.1038/335721a0>.
- Picha, D., 1987. Physiological factors associated with yellow shoulder expression in tomato fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 112(5), pp.798–801. Available at: ISI:A1987J853100015.
- Powell, A. et al., 2012. Uniform ripening Encodes a Golden 2-like Transcription Factor Regulating Tomato Fruit Chloroplast Development. *Science*, 336(June), pp.1711–1715.
- Pratta, G.R. et al., 2011. Phenotypic and molecular characterization of selected tomato

- recombinant inbred lines derived from the cross *Solanum lycopersicum* x *S. pimpinellifolium*. *Journal of Genetics*, 90(2), pp.229–237. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21869471>.
- Rick, C.M., 1974. High soluble-solids content in large-fruited tomato lines derived from a wild green-fruited species. *Hilgardia*, 42(15), pp.493–510.
- Rick, C.M., 1980. Tomato. In W. H. Fehr & H. H. Hadley, eds. *Hybridization of Crop Plants*. Wisconsin: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, pp. 669–680. Available at: <https://dl.sciencesocieties.org/publications/books/abstracts/acesspublicati/hybridizationof/669>.
- Rodríguez, G.R. et al., 2006. Recombinant Lines Obtained from an Interspecific Cross between *Lycopersicon* Species Selected by Fruit Weight and Fruit Shelf Life. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 131(5), pp.651–656. Available at: <http://journal.ashspublications.org/content/131/5/651.abstract>.
- Sadik, S. & Minges, P., 1966. Symptoms and histology of tomato fruits affected by blotchy ripening. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, 88(JUN), pp.532–543. Available at: ISI:A19668125400080.
- Saliba-Colombani, V. et al., 2001. Genetic analysis of organoleptic quality in fresh market tomato. 1. Mapping QTLs for physical and chemical traits. *Theoretical and Applied Genetics*, 102(2-3), pp.259–272. Available at: ISI:000167232800011.
- Schauer, N. et al., 2006. Comprehensive metabolic profiling and phenotyping of interspecific introgression lines for tomato improvement. *Nature biotechnology*, 24(4), pp.447–454.
- Schauer, N. et al., 2008. Mode of inheritance of primary metabolic traits in tomato. *Plant cell*, 20(3), pp.509–23. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2329927&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> [Accessed March 4, 2013].
- Simpson, S.P., 1989. Detection of linkage between quantitative trait loci and restriction fragment length polymorphisms using inbred lines. *Theoretical and Applied*

- Genetics*, 77(6), pp.815–819. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00268332>.
- Sinesio, F. et al., 2010. Sensory quality of fresh French and Dutch market tomatoes: a preference mapping study with Italian consumers. *Journal of food science*, 75(1), pp.S55–67. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20492203> [Accessed March 11, 2013].
- Stevens, M.A. & Rudich, J., 1978. Genetic potential for overcoming physiological limitations on adaptability, yield, and quality in the tomato. *HortScience*, 13, pp.673–678.
- Stoner, A.K. & Thompson, A.E., 1966. Potential for selecting and breeding for solids content of tomatoes. In *PROCEEDINGS OF THE AMERICAN SOCIETY FOR HORTICULTURAL SCIENCE*. AMER SOC HORTICULTURAL SCIENCE 701 NORTH SAINT ASAPH STREET, ALEXANDRIA, VA 22314-1998, p. 505.
- Strom, R.C., 1999. *Genetic Analysis of Variation in Neuron Number*. University of Tennessee, Memphis. Available at: <http://etd.uthsc.edu/WORLD-ACCESS/strom/Thesis.html>.
- Tanksley, S.D. et al., 1996. Advanced backcross QTL analysis in a cross between an elite processing line of tomato and its wild relative *L. pimpinellifolium*. *Theoretical and Applied Genetics*, 92(2), pp.213–224. Available at: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/BF00223378>.
- Tanksley, S.D. et al., 1992. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics*, 132(4), pp.1141–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1360934>.
- Tanksley, S.D., 2004. The genetic, developmental, and molecular bases of fruit size and shape variation in tomato. *Plant Cell*, 16, pp.S181–S189. Available at: ISI:000222210600016.
- Tanksley, S.D., Medina-filhot, H. & Rick, C.M., 1982. USE OF NATURALLY-OCCURRING ENZYME VARIATION TO DETECT AND MAP GENES CONTROLLING QUANTITATIVE TRAITS IN AN INTERSPECIFIC BACKCROSS OF TOMATO. *Heredity*, 49(1), pp.11–25.
- Taylor, B.A., 1976. GENETIC ANALYSIS OF SUSCEPTIBILITY TO ISONIAZID-INDUCED

SEIZURES IN MICE. *Genetics*, 83, pp.373–377.

Yates, H.E. et al., 2004. Comparative fine mapping of fruit quality QTLs on chromosome 4 introgressions derived from two wild tomato species. *Euphytica*, 135(3), pp.283–296. Available at: ISI:000188422900004.

Yousef, G.G. & Juvik, J.A., 2001. Evaluation of breeding utility of a chromosomal segment from *Lycopersicon chmielewskii* that enhances cultivated tomato soluble solids. *Theoretical and Applied Genetics*, 103(6-7), pp.1022–1027. Available at: ISI:000172530400024.

# APROXIMACIÓN A LA FISIOPATÍA DE LA MANCHA SOLAR. OBTENCIÓN DE MATERIAL VEGETAL PARA EL ESTUDIO DE LA MANCHA SOLAR.

---

### 2.1. ANTECEDENTES

El primer paso para estudiar la fisiopatía de la mancha solar, conocida por las siglas en inglés como YSD (*Yellow Shoulder Disorder*), es encontrar una descripción apropiada de ella. Varios estudios, entre ellos el de Sadik y Minges (1966) han tratado de describirla según su apariencia externa como un *blotchy ripening disorder*, término que describe las fisiopatías que provocan una maduración del fruto sin uniformidad en el color. Dicho estudio describe la mancha solar como la presencia de *Internal White Tissue* (IWT) bajo la piel del fruto y localizada alrededor de la cicatriz peduncular. En ese mismo trabajo se realiza un estudio detallado del origen y el desarrollo del IWT, y también se describen otras alteraciones del color como debidas a la presencia de IWT, pero situado en diferentes localizaciones en todo el fruto, por lo que tendrían causas diferentes. Estas alteraciones son denominadas en el estudio como *subsurface yellowing*, *blotches* o *anillo amarillo*. Esta clasificación de la mancha solar como un *blotchy ripening disorder* es anterior al descubrimiento del gen *u* (Ayers & Tomes 1966)

cuya mutación determina un color verde claro uniforme en los frutos inmaduros, sin presencia de hombro verde oscuro alrededor de la cicatriz peduncular, como ocurre en las especies silvestres y variedades de tomates tradicionales. Un año antes Venter (1965), en sus investigaciones sobre el hombro verde, antes del conocimiento del gen *u*, ya describía que en los frutos que presentaban hombro verde oscuro el color de esta zona normalmente evolucionaba, pero no a rojo, sino a amarillento, y que el tejido no se ablandaba como el resto del fruto maduro. Con posterioridad, Picha (1987) concluía que en la mancha solar encontrada en frutos de variedades de maduración no uniforme, la zona amarilla que aparece en el hombro del fruto podía ser de tamaño variable, se continuaba algunos milímetros en el interior del pericarpio y se mostraba más o menos endurecida, por lo que contrastaba con el resto del fruto que presentaba una apariencia de rojo maduro normal. Por otro lado, Hartz (1999), en un estudio en variedades de tomate para procesado de maduración uniforme (no mostraban hombro verde oscuro), describía la presencia de un anillo amarillo alrededor de la zona de abscisión, y lo llamaba *yellow shoulder*. Este contraste entre los dos desórdenes del desarrollo normal del fruto, anillo amarillo y mancha solar, fue estudiado por Francis y col. (2000), que postulaban que podría deberse a diferencias en el genotipo y el ambiente, o simplemente ser el reflejo de diferentes grados de severidad y localización del IWT.

Los estudios histológicos de la zona del fruto con YSD (Francis et al. 2000) revelan que presenta características de frutos verde maduro, por la presencia de laminilla media y por el estadio de desarrollo de los cromoplastos, pero a su vez presenta diferencias con el tejido verde, ya que el tejido de YSD tiene células más pequeñas y desorganizadas. En relación con los pigmentos, Darrigues y col. (2008) comprobaron que el tejido amarillo presentaba bajo contenido en licopeno y  $\beta$ -caroteno. Picha (1987) investigó sobre las diferencias en la composición entre el tejido con mancha solar y el tejido rojo maduro de la zona apical. En el tejido amarillo los niveles de ácido cítrico y la acidez titulable fueron más bajos, y el contenido en materia seca, ácido málico, el ratio entre los ácidos málico/cítrico y el pH fueron más altos. Además el equilibrio catión-anión estaba afectado en el tejido amarillo, ya que los niveles de los iones P y K aparecían más bajos que en el tejido rojo, y el nivel de calcio

fue más alto. Según Picha (1987), los bajos niveles de K en el tejido amarillo pueden deberse a la disminución de la capacidad de incorporación y acumulación de K por parte de las células del tejido, debido en parte al detrimento del contenido ácido. En cambio no asoció el YSD con desequilibrios en el contenido de iones N o Mg. Respecto a los azúcares, los niveles de sacarosa fueron más altos y el contenido en sólidos solubles (SSC) más bajo en el tejido amarillo, mientras que los azúcares reductores no mostraron cambios. Al comparar los datos de composición del tejido afectado con YSD con los estudios sobre *blotchy ripening*, se comprobó que las diferencias en la acidez titulable, el ácido cítrico, el SSC y el pH entre los tejidos amarillo y rojo fueron consistentes con lo establecido previamente por Davies (1966b; 1966a), entre el tejido *blotchy* y el tejido rojo. Sin embargo, el contenido en materia seca y el de azúcares reductores fueron menores en el tejido *blotchy* respecto al rojo. Como conclusión del conocimiento generado por estos estudios, se ha definido el YSD como una alteración en el desarrollo y maduración del fruto pero nunca como un retraso del desarrollo (Trudel & Ozbun 1970; Francis et al. 2000).

Las causas por las que aparece la mancha solar no están claras, pudiendo ser nutricionales, ambientales y genéticas (Picha & Hall 1981; Francis et al. 2000). Numerosos estudios establecen un factor nutricional en la aparición de la mancha solar, observándose una correlación negativa entre el nivel de potasio en el suelo y el número de frutos afectados y su severidad, ya sea en invernadero o en campo (Trudel & Ozbun 1971; Picha & Hall 1981; Hartz et al. 1999; Hartz 2005). La misma correlación negativa se ha descrito para los frutos con *blotchy ripening* (Jones & Alexander 1962; Ozbun et al. 1967). El problema aparece en los suelos con alta capacidad de fijación de K, pero Hartz (1999) también encontró en esos suelos con bajo nivel de K que los frutos con bajo contenido en K no mostraban YSD, por lo que debe haber otros factores. Trudel y Ozbun (1971) detectaron una correlación positiva entre los niveles de K de la solución nutritiva que se añadía a las plantas y los carotenoides del fruto, específicamente con el licopeno, mientras que el  $\beta$ -caroteno seguía un patrón inverso.

Entre los factores ambientales se ha sugerido que una combinación de radiación de corta y larga longitud de onda es una posible causa (Lipton 1970; Picha

1987; Hartz et al. 1999; Romero-Aranda et al. 2004). Entre los ensayos realizados por Venter (1965) acerca de los factores que afectaban a la aparición del hombro verde, demostró que el sombreado de los frutos con lámina de aluminio disminuía significativamente la presencia del hombro comparado con los frutos no sombreados. Sin embargo, Venter no especifica en qué momento del desarrollo del fruto inició el tratamiento, cuánto duró o de qué manera se colocó la lámina de aluminio, pero lo que parece claro es que la radiación solar sobre el fruto está implicada en la aparición de la mancha solar. Picha (1987) determinó que la incidencia de la mancha solar en los frutos prácticamente desaparecía al recolectarlos en estado verde maduro, y dejarlos madurar en condiciones ambientales de sala (23°C, 75% de humedad relativa), en vez de dejarlos madurar en la planta. Este hecho le llevó a concluir que la mancha solar estaba mediada por las condiciones ambientales durante la maduración del fruto y que la predisposición del fruto a mostrar mancha solar podría iniciarse durante los estadios de desarrollo y maduración. Sin embargo, argumentó que la expresión del carácter sólo se hace presente bajo ciertas condiciones ambientales desfavorables durante el desarrollo del fruto mientras madura en la planta. Sugirió entre otras condiciones desfavorables, que la asociación de la mancha solar con la presencia de hombro verde durante la maduración se puede deber a la acumulación de calor en el hombro verde oscuro. El efecto de la temperatura no está demostrado, aunque se sabe que la producción de etileno se inhibe en condiciones de alta temperatura en muchas plantas (Lipton 1970; Yang 1980), así como la síntesis de licopeno (Cheng et al. 1988). Por tanto no se conoce con exactitud si la influencia de las condiciones ambientales adversas se produce en cualquier momento del desarrollo del fruto o en uno o varios periodos sensibles concretos. También se desconoce si la mancha solar se debe a la radiación solar como el espectro completo o al efecto de la radiación con determinada longitud de onda, como la luz ultravioleta, que recibe el fruto. En este capítulo se tratará de dar respuesta a este aspecto.

Un aspecto a tener en cuenta para la evaluación de la presencia de mancha solar es la subjetividad con la que se realiza en algunos estudios, basándose sólo en índices visuales. Una manera de soslayarlo es utilizar medidas de color objetivas con un colorímetro de tipo Hunter, que trabaja en el espacio de color CIE Lab (Anexo 1.5).

De esta manera los parámetros que conforman el espacio CIELab aportan información de diferentes aspectos del color. Se han desarrollado otras maneras de medir el color de manera objetiva, una de ellas es el TACT (*Tomato Analyzer-color Test*), desarrollada por Darrigues y col. (2008). Emplea un escáner para tomar datos de color de los frutos en el espacio CIELab, a los que se les corta una parte de la zona peduncular para dejar al descubierto el pericarpo, que es la zona que se escanea. En este trabajo Darrigues y col. compararon los resultados de emplear el TACT frente a un colorímetro en la caracterización del color de varios frutos, en algunos casos afectados de mancha solar. Encontraron una alta correlación y linealidad de los valores de  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  obtenidos con ambos métodos. Una de las ventajas de emplear el TACT que salta a la vista es que la zona de medida del color es mayor en el TACT que empleando el colorímetro. En el caso de frutos con mancha solar, en los que la zona amarilla no sea muy extensa, como por ejemplo el anillo amarillo, el colorímetro puede falsear la medida si en el área del disparo de medición del color entra alguna zona roja. Este problema se podría evitar con el TACT, que te permite seleccionar el área a medir. No obstante, tanto en los estudios de caracterización de la población RIL, mostrados en el capítulo 1, como en los realizados en este capítulo para el estudio sobre la mancha solar, no se ha empleado el TACT, por varios motivos. Las medidas con el TACT necesitan de un tiempo extra en la toma de datos, que no puede permitirse en el diseño de ensayos tan complejos como los empleados en nuestro estudio. Además la principal desventaja del TACT reside en que es destructivo con la muestra, por la necesidad de cortar el fruto, por lo que la muestra sólo se puede tomar una vez. En cambio el colorímetro permite realizar un seguimiento de la muestra, ya que se pueden tomar datos de campo del mismo fruto en la planta, durante todo su desarrollo, desde verde inmaduro hasta rojo maduro.

Acerca de los factores genéticos que afectan a la aparición del YSD se ha encontrado poca información en la bibliografía consultada. Como se ha comentado en la introducción general, por observaciones anteriores en el IHSM La Mayora, se calculó que la mancha solar podría tener un carácter poligénico, pero será en el capítulo 3 donde se profundizará en este aspecto de la mancha solar. Debido a este carácter poligénico se hacía necesario conseguir un material vegetal consistente en una pareja

de líneas con pocas diferencias en su fondo genético, pero a su vez contrastante para el carácter, de manera que las diferencias entre esas líneas contrastantes deben responder a diferencias genéticas directamente relacionadas con la mancha solar.

Los objetivos específicos del capítulo 2 son la obtención de material vegetal contrastante para el estudio de la fisiopatía de la mancha solar, la evaluación del efecto de factores ambientales como la luz sobre la aparición de la mancha, así como la determinación del momento clave en el desarrollo del fruto en el cual se puede evitar su aparición.

## **2.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.2.1. Material vegetal**

En el proceso de obtención de la población de las líneas recombinantes analizadas en el capítulo 1, procedentes del cruce de *Solanum lycopersicum* “Moneymaker” con la entrada de *S. pimpinellifolium* TO-937, se observó que varias líneas RIL presentaban mancha solar en los frutos, a pesar de que ninguno de los dos parentales presentaba el carácter. En la generación RIL F<sub>5</sub> se observaron varias líneas cuyas progenies presentaban segregación para mancha solar, de manera que unas plantas mostraban frutos con mancha solar y otras no. Se seleccionaron varias plantas de tres de estas líneas RIL (116, 143 y 177R) en F<sub>5</sub> con objeto de fijar mediante autofecundación y selección la presencia / ausencia de mancha solar, hasta la generación F<sub>8</sub> donde se consideran líneas homocigotas y quasi-isogénicas. De esta forma para cada una de estas progenies de F<sub>5</sub> se obtuvo finalmente una pareja de sub-RILs en F<sub>8</sub> contrastantes para el carácter.

Se emplearon 10 líneas sub-RILs en F<sub>7</sub>, con diferente expresión del carácter mancha solar (Tabla 2.1). Se germinaron semillas de cada línea en un invernadero de vidrio en febrero y a los 40 días se sembraron las plántulas de cada línea en el invernadero de polietileno correspondiente. Estas líneas se evaluaron y se seleccionaron las plantas F<sub>8</sub> para formar las parejas finales. Tras los ensayos, en cada

una de las 3 sub-RIL (116, 143 y 177R) se eligieron las 2 plantas que formaban la pareja más contrastante para el carácter.

**Tabla 2.1.** Desglose de las 10 líneas sub-RILs seleccionadas en F<sub>7</sub> para el estudio de mancha solar, ordenadas según presencia (izquierda) o ausencia (derecha) de mancha.

Presencia de mancha solar	No presencia de mancha solar o segrega para el carácter
116-3-1-12	116-R1-10-1
143-2-9-3 / 143-3-7-2	143-R1-6-1 / 143-R2-11-1
177-R1-4-7	177-R1-6-11/ 177-R2-4-5 / 177-R3-2-6

### 2.2.2. Valoración de los parámetros de color L\* y H\*

Se cultivaron de 5 a 15 plantas de cada una de las 10 líneas sub-RILs en F<sub>7</sub> en un invernadero tipo parral con cubierta de polietileno. Se seleccionaron frutos en estadio verde maduro de cada una de las líneas para observar la aparición de hombros verdes y la evolución del color del fruto para detectar la aparición de mancha solar. Para ello se le realizaba a cada fruto un seguimiento que conllevaba la toma de datos de color con el colorímetro, tal y como se explica en el apartado 2.2.7, espaciadas cada 3 días, durante todo el desarrollo y maduración del fruto hasta su recogida.

### 2.2.3. Efecto de la calidad de la luz sobre el mismo genotipo

Este ensayo trató de evaluar el efecto de la calidad de luz recibida por el fruto, empleando un solo genotipo. La línea seleccionada fue la 116-3-1 que presentó en prácticamente el 100% de los frutos una mancha que ocupaba de un tercio a casi la mitad del fruto. Las plantas se cultivaron en un invernadero multitúnel de polietileno (48 x 24 m, con una altura de 4 a 6 m), regadas con una solución estándar (Cánovas 1995). Se realizaron 2 tratamientos diferentes con 5 plantas de la línea 116-3-1 por cada tratamiento, que consistió en cubrir los 5 primeros frutos del tercer racimo de cada planta, en estado verde inmaduro. La diferencia entre los tratamientos fue el material con el que se cubrieron los frutos, que está detallado en el apartado 2.2.6. En un tratamiento se empleó una malla que ofrecía una tramitancia de un 32% de la radiación aproximadamente, independientemente de su longitud de onda (Figura 2.4).

En el otro tratamiento se cubrieron los frutos por completo con papel de aluminio, que provoca un sombreado total (Figura 2.1). Se contó como control con otras 5 plantas de la misma línea, en la que no se cubrieron los frutos. Al final del experimento se tomaron los datos de color con el colorímetro a todos los frutos según lo detallado en el apartado 2.2.7.



**Figura 2.1.** Detalle de plantas de la línea 116-3-1 con los racimos 3 cubiertos. (A) Racimos 3 cubiertos con malla. (B) Racimos 3 cubiertos con aluminio (flecha roja) y con malla (flecha azul).

#### 2.2.4. Efecto de la calidad de la luz sobre diferentes genotipos

Este ensayo trató de evaluar el efecto de la calidad de luz recibida por el fruto, empleando otros materiales detallados en el apartado 2.2.6, aplicados a diferentes genotipos. Se emplearon 15 plantas de cada una de las líneas sub-RIL (Tabla 2.1). En cada una de ellas se escogieron 2 frutos, procurando que se encontraran a alturas o posiciones diferentes dentro de la planta. Esas 15 plantas de cada genotipo se distribuyeron en el invernadero repartidas de 5 en 5 para poder aplicar cada tratamiento.

El tratamiento 1 provocaba una reducción drástica de la radiación ultravioleta sobre la planta, mediante el uso de un plástico de polietileno fotoselectivo que contiene aditivos que absorben específicamente la radiación ultravioleta (UV). Estaba colocado a una altura de 2,10 metros sobre las plantas dentro del invernadero (Figura 2.2). En el momento de colocarlo, este plástico reducía en un 95% la radiación

ultravioleta y en un 42% la radiación fotosintéticamente activa (PAR), comparado con la radiación que llegaba dentro del invernadero bajo la cubierta de plástico estándar (Figura 2.4).

El tratamiento 2 generaba una disminución de la radiación sobre la planta, con el uso de un plástico de polietileno normal, sin aditivos especiales para filtrar UV, también colocado a 2,10 metros sobre las plantas (Figura 2.2). Este plástico reducía cerca del 33% de la radiación PAR y un 86% la luz ultravioleta, en comparación con la luz que llegaba al interior del invernadero (Figura 2.4).

El tratamiento 3 consistió en el ensayo control, sin modificación alguna de la radiación recibida por los frutos dentro del invernadero. Para evitar el efecto borde en las plantas perimetrales de la parcela experimental se sembraron alrededor veras de plantas de la variedad comercial 'Josefina'. Al final del experimento se tomaron los datos de color con el colorímetro a todos los frutos según lo detallado en el apartado 2.2.7.



**Figura 2.2.** Posición de los plásticos en el interior del invernadero para el ensayo sobre el efecto de la calidad de la luz sobre diferentes genotipos. (A y B) El plástico fotoselectivo que impide la entrada de luz UV es el situado a la izquierda. (A) Plántulas sembradas. (B) Plantas adultas.

### 2.2.5. Determinación del momento sensible a la inducción de la mancha solar

Con el objetivo de determinar el momento clave en el desarrollo del fruto en el que se provoca la aparición de la mancha solar se diseñó un experimento en 3 fases, de manera que con los ensayos de cada fase la concreción del período de tiempo en el

que el fruto es sensible a la aparición de mancha iba aumentando, ya que los resultados obtenidos en cada fase se aplicaban en el diseño experimental de la siguiente fase. El experimento se basó en cubrir frutos con papel de aluminio para evitar la radiación solar en períodos concretos, descubrirlos tras un tiempo determinado y medir la evolución del color del fruto con el colorímetro, para detectar objetivamente la aparición o no de mancha solar.

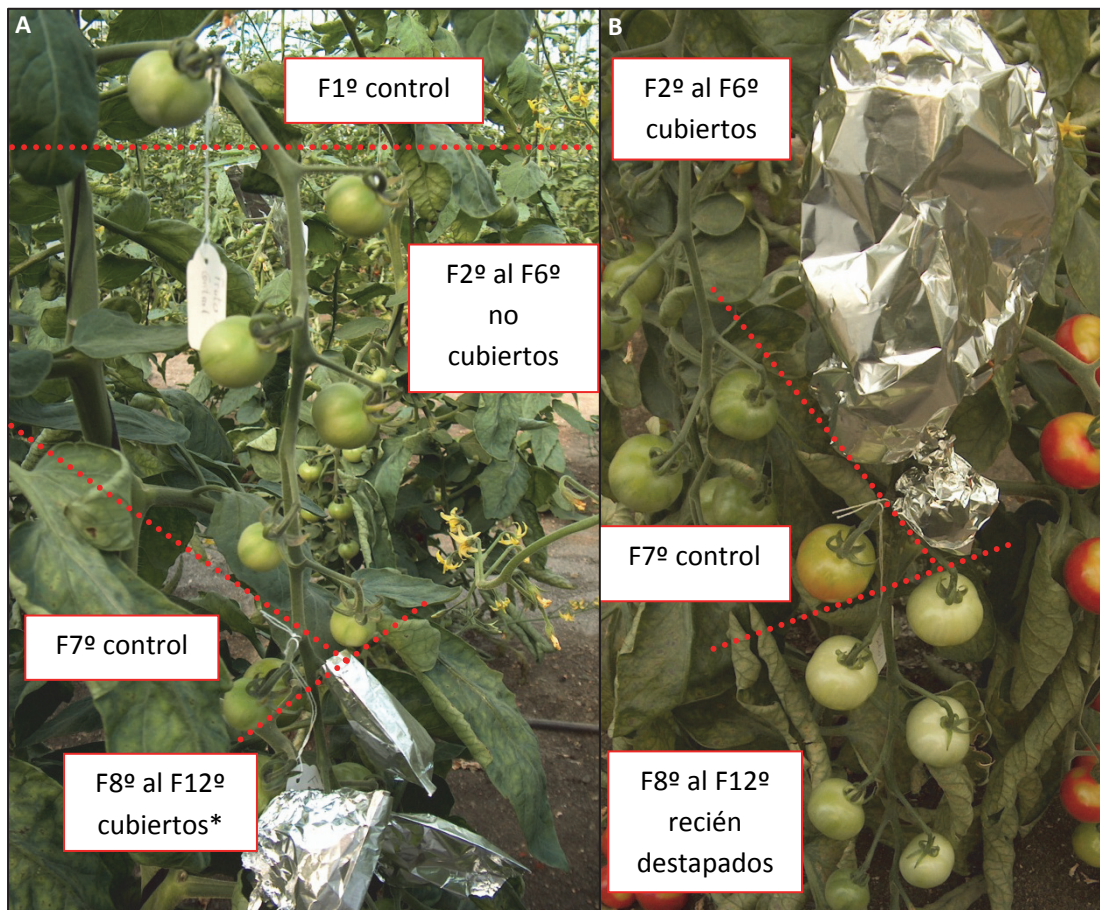
La fase 1 se diseñó para determinar, en una primera aproximación, si la inducción de aparición de la mancha ocurría durante el estado verde del fruto o después del virado de color de verde al rojo del fruto (estado *breaker* o pintón). Una vez establecido el período, la fase 2 trató de acotar el momento de inducción de la mancha solar a un tramo corto de días concretos durante su desarrollo. Los resultados de la fase 2 obligaron a evaluar tramos más largos de días en la fase 3 final. Para las 3 fases se emplearon plantas de la línea 116-3-1 que ha presentado siempre mancha solar en los frutos y no segrega para el carácter; además posee racimos muy largos, con más de 15 frutos, que resultaron muy útiles.

### **Fase 1**

Para la **Fase 1** se emplearon 5 plantas de la línea 116-3-1. Se seleccionó el racimo 3 de cada planta para hacer dos tratamientos diferentes pero sincrónicos. Los dos tratamientos se realizan a la vez sobre diferentes grupos de frutos dentro del mismo racimo 3, de manera que el primer tratamiento emplea los frutos del 1 al 6 y el segundo tratamiento emplea los frutos del 7 al 12. En la Figura 2.3 se detalla en imágenes ambos tratamientos en el inicio del ensayo (figura 2.3.A) y en un estadio más avanzado en el tiempo (figura 2.3.B). En el primero de los tratamientos el fruto 1º del racimo 3 se empleó como control y se fueron tomando datos con el colorímetro de los frutos 2º al 6º en estado verde inmaduro y verde maduro, según lo detallado en el apartado 2.2.7 (Figura 2.3.A). En el momento en el que el fruto 1º control viró a rojo, esto es, cuando comienza a tomar color rojo en la zona apical (estado *breaker*), se taparon los frutos del 2º al 6º con papel aluminio. Aun tapados se realizó la medida de color en los estadios verde inmaduro y verde maduro, retirando momentáneamente el aluminio cuando era necesario. Tras la completa maduración de cada fruto, se midió el

color del fruto en rojo maduro con el colorímetro. Con este diseño experimental contamos con frutos que han sido cubiertos desde distintos estados de desarrollo hasta el final de la maduración.

El segundo tratamiento de la Fase 1 se realizó con el resto del racimo, utilizando el fruto 7º como control. Se taparon los frutos del 8º al 12º en el momento en que cada uno comenzó a desarrollarse, tras la caída de la corola (Figura 2.3.A). De la misma manera que en el anterior tratamiento se tomaron datos del color de cada fruto, en verde inmaduro, verde maduro y rojo maduro. La diferencia con el primer tratamiento es que a los frutos 8º al 12º se les retiró el sombreado con papel de aluminio a todos a la vez, cuando el fruto 7º control viró al rojo (Figura 2.3.B).



**Figura 2.3.** Disposición de los frutos para la fase 1 de la determinación del momento sensible a la inducción de la mancha solar. (A) Inicios del ensayo. (B) Ensayo en un estadio más avanzado. F: Fruto. \*Indica que los frutos 11º y 12º se cubrieron pero no aparecen en la imagen.

Con el segundo diseño experimental conseguimos tener frutos en distintos estados que habían estado cubiertos durante tiempos diferentes, pero siempre desde

el principio de su desarrollo. Por último se analizaron los datos con el fin de determinar si la inducción de aparición de la mancha ocurría durante el estado verde del fruto o después del estado *breaker*.

### Fase 2

Una vez completados los tratamientos y obtenidos los resultados de la Fase 1, se determinó que el momento de inducción de la mancha solar ocurría en el estado verde del fruto, como se relatará con más detalles en el apartado de resultados 2.3.4. Para la **Fase 2** se emplearon frutos de los racimos 1 al 3 de plantas de la línea 116-3-1. Se establecieron 9 categorías de frutos que iban a estar cubiertos durante 6 días seguidos pero en diferentes ventanas de tiempo a lo largo del estadio verde durante su desarrollo. En cada categoría el período de los días en los que se cubrieron los frutos con papel de aluminio se muestran en la Tabla 2.2.

### Fase 3

Los resultados de la Fase 2 mostraron que el tratamiento de cubrir los frutos durante tramos de 6 días no evitó la aparición de mancha solar, como se relatará con más detalle en el apartado de resultados 2.3.4. Para la **Fase 3** se emplearon frutos de los racimos 1 al 3 de plantas de la línea 116-3-1. Igualmente se establecieron varias categorías de frutos, que iban a estar cubiertos desde antesis hasta un número determinado de días según el fruto, a lo largo del estadio verde durante su desarrollo. En cada categoría el período de los días en los que se cubrieron los frutos con papel de aluminio se muestran en la Tabla 2.2.

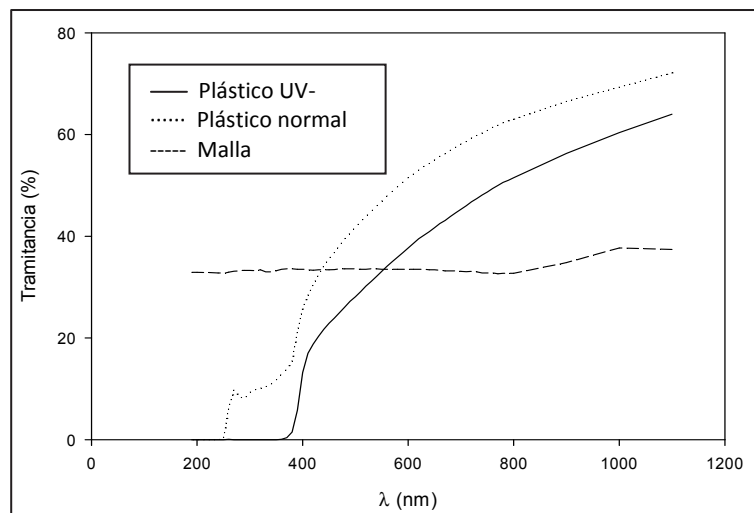
**Tabla 2.2.** Categorías de los frutos de la fase 2 y 3 del ensayo según el número de días cubiertos y la ventana de tiempo (expresados como dpa, días post antesis).

Categoría Fase 2	Días cubiertos (dpa)	Categoría Fase 3	Días cubiertos (dpa)
1	0-6	1	0-5
2	3-9	2	0-8
3	5-11	3	0-13
4	8-14	4	0-16
5	10-16	5	0-20
6	13-19	6	0-23
7	15-21		
8	18-24		
9	20-26		

En las fases 2 y 3 cada fruto se etiquetó con la fecha de antesis y su categoría asignada, para poder controlar el momento de cubrir y descubrir cada uno. Se fueron tomando datos con el colorímetro de cada fruto, en estado verde maduro y rojo maduro, según lo detallado en el apartado 2.2.7. En cada racimo empleado se establecieron frutos control que no fueron cubiertos y se desarrollaron de manera normal.

### 2.2.6. Evaluación de la tramitancia del material empleado

Con el objetivo de conocer qué cantidad de luz dejaban pasar los materiales empleados para cubrir los frutos se realizó una evaluación de la tramitancia. Para ello se empleó un espectrofotómetro en el que se midió cada material, haciendo un



**Figura 2.4.** Representación de la tramitancia del material empleado para cubrir los frutos, medida como el porcentaje de luz que atraviesa el material, frente a la longitud de onda.

barrido desde 200 nm a 1100 nm. En la Figura 2.4 se representan las tramitancias de la malla y de los dos plásticos utilizados. La tramitancia del aluminio se consideró nula.

### 2.2.7. Medida objetiva de color

La medida del color se realizó de manera objetiva con un colorímetro Minolta CR-400 en el espacio de color CIE Lab, ver anexo 1.5 para más detalle. Por cada fruto estudiado y en cada estadio determinado para todos los experimentos se realizaron dos medidas: la primera en la zona del hombro o parte basal o peduncular del fruto, que llamamos zona 1. En el caso de presencia de mancha solar no uniforme se tomaba la medida en la zona del hombro de color amarillo. La segunda medida se realiza en la

zona apical-subapical del fruto, que llamamos zona 2. El análisis posterior de los datos conlleva el cálculo de la diferencia que pueda existir entre ambas zonas en los valores de varios parámetros del color, fundamentalmente  $H^*$ , o bien aplicar el YSD index, según anexo 1.3. En el capítulo 1 se observó una correlación significativa entre la diferencia de  $H$  (diffH) y el YSD index, y también se detectaron los mismos QTLs, para ambos caracteres, a pesar de no llegar a ser significativos. Estos datos apoyan que se pueden emplear ambos parámetros para la medida objetiva de mancha solar.

#### **2.2.8. Medidas de radiación, temperatura y humedad relativa**

Se realizaron medidas de la radiación incidente en la localización de las plantas para conocer el nivel de radiación ultravioleta y radiación fotosintéticamente activa (PAR) que recibían las plantas. Para medir las radiaciones incidentes ultravioleta B y PAR bajo los plásticos se emplearon radiómetros específicos: En el rango de 250-400 nm se utilizó un *Ultraviolet meter UVM-SS* de *Apogee Instruments*, y en el rango de 400-700 nm se utilizó un *Basic Quantum Meter BQM* de *Spectrum Technologies, Inc.* La radiación incidente se expresó en  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . A su vez dentro del invernadero la radiación fotosintéticamente activa (PAR), la temperatura y la humedad relativa fueron registradas en continuo con una estación meteorológica (*Meteodata-256, Geónica, Madrid, España*).

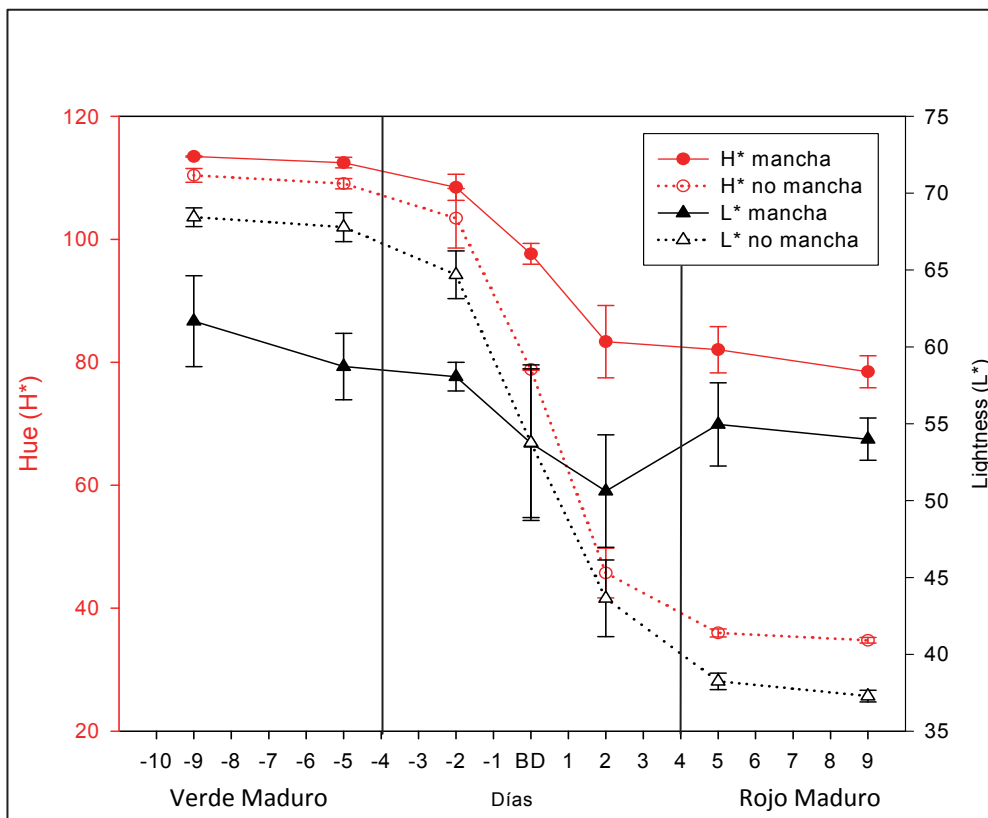
#### **2.2.9. Análisis de los datos**

Para los cálculos estadísticos y la realización de algunos gráficos se empleó el programa SPSS 22.0 (IBM Corp. 2013) . El programa SigmaPlot 8.0 se empleó ocasionalmente para la realización de algún gráfico.

## 2.3. RESULTADOS

### 2.3.1. Valoración de los parámetros de color L\* y H\*

Los datos de color obtenidos del seguimiento de los frutos de las sub-RILs se han representado gráficamente (Figura 2.5), para poder observar la evolución de los diferentes parámetros del color en la zona del hombro a lo largo del desarrollo y maduración del fruto. Los frutos rojo maduro que presentaron mancha solar mostraron valores de H\* en la zona del hombro mayores de 80°. Estos valores de H\* fueron significativamente más altos que los mostrados por los frutos que no presentaron mancha solar, cuyos valores de H\* se situaron entre 35° y 37°. En el caso del fruto verde los valores de H\* en el hombro fueron muy similares en los frutos que desarrollaron mancha y los que no la desarrollaron, entre 115° y 117°. Los valores de L\* se comportaron de manera diferente, ya que los frutos que presentaron al final mancha solar mostraron valores más bajos de L\* en el hombro en el estadio verde maduro y valores más altos de L\* en el hombro en los frutos rojo maduro, respecto a los frutos que no presentaron mancha solar.



**Figura 2.5.** Evolución del color del hombro del fruto durante su desarrollo y maduración. El color rojo se refiere al parámetro H\* (hue) y el color negro al parámetro L\* (Lightness). BD: breaker day (estadio pintón).

### 2.3.2. Efecto de la calidad de la luz sobre el mismo genotipo

En este ensayo se evitó la radiación sobre los frutos, de manera total o parcial, utilizando aluminio o malla respectivamente. Se calculó la diferencia de  $H^*$  entre las zonas 1 y 2, en los datos tomados en el estadio rojo maduro, para cada fruto estudiado en el experimento. Se realizó un análisis de la varianza para observar si las diferencias entre las medias eran significativas. Posteriormente se aplicó un test de Tukey-b ( $P=0,05$ ) a los resultados, que se exponen en la Tabla 2.3.

El tratamiento de cubrir los frutos con aluminio provocó que los frutos presentaran menor diferencia de  $H^*$  entre las zonas respecto a los frutos control y a los frutos cubiertos con malla. Los frutos cubiertos con malla no mostraron valores significativamente diferentes de los frutos control.

**Tabla 2.3.** Medias de las diferencias del parámetro  $H^*$  entre las zonas 1 y 2 del fruto rojo maduro. Las medias con la misma letra no son significativamente distintas.

Tratamiento	N	Medias diff $H^*$	Error típico
Aluminio	25	16,88 a	2,67
Malla	25	37,26 b	3,70
Control	24	39,85 b	3,52

### 2.3.3. Efecto de la calidad de la luz sobre diferentes genotipos

Se comparan los resultados obtenidos de los frutos rojo maduro desarrollados bajo los dos plásticos, y frente al control (Tabla 2.4). Se calcula la diferencia de  $H^*$  entre la zona 1 y la zona 2 de los frutos estudiados, en total 300. Se realizaron análisis de varianza para cada tratamiento y cada genotipo sembrado, para observar si las diferencias entre las medias eran significativas. Seguidamente se les aplicó un test de Tukey-b ( $P=0,05$ ) a los resultados. El efecto de los tratamientos sobre la aparición de la mancha solar fue diferente según el genotipo.

**Tabla 2.4.** Medias de las diferencias del parámetro H\* entre las zonas 1 y 2 del fruto rojo. Las medias con la misma letra no son significativamente distintas. Las letras minúsculas se refieren a diferencias entre tratamientos, dentro del mismo genotipo y las letras mayúsculas a diferencias entre los distintos genotipos, según el tratamiento. \*Líneas cuyos frutos presentan mancha solar.

Genotipo	Control diffH*			No UV diffH*			Normal diffH*		
116-3-1-12*	41,15	ab	A	32,06	b	A	50,22	a	A
177-R1-4-7*	36,99	a	A	31,93	a	A	45,61	a	AB
143-2-9-31*	33,21	a	A	36,60	a	A	23,25	a	CD
143-3-7-2*	33,99	a	A	43,21	a	A	22,62	a	CDE
116-R1-10-1	14,44	a	B	27,41	a	A	29,34	a	BC
177-R1-6-11	6,20	b	B	11,75	a	B	-0,44	b	F
177-R2-4-5	5,55	a	B	5,36	a	B	2,41	a	F
177-R3-2-6	10,23	a	B	3,71	b	B	6,96	ab	DEF
143-R1-6-1	3,36	a	B	1,83	a	B	3,56	a	EF
143-R2-11-1	12,33	a	B	9,91	a	B	16,45	a	CDEF

### 2.3.4. Determinación del momento sensible a la inducción de la mancha solar

#### Fase 1

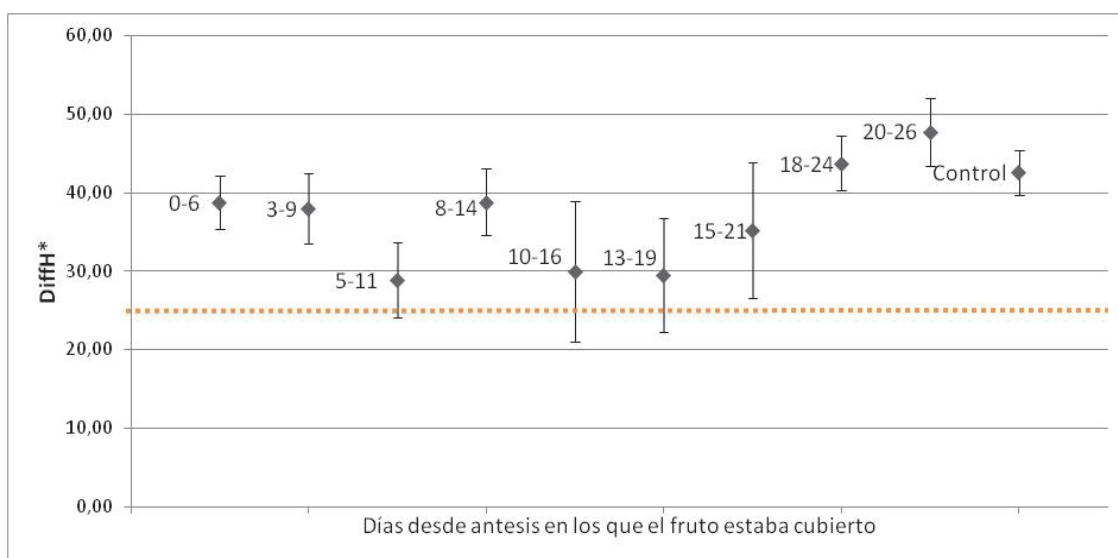
Se calculó para cada fruto estudiado en el experimento, la diferencia de H\* entre la zona 1 y la zona 2, en el estadio rojo maduro. Se realizó un análisis de la varianza para observar si había diferencias significativas entre los valores de diferencia de H\* entre zonas, entre los frutos cubiertos o no con aluminio antes del estadio *breaker* (Tabla 2.5). Los resultados muestran que los frutos cubiertos antes del estadio *breaker* mostraron una diffH\* entre zonas significativamente menor que los frutos que no estuvieron cubiertos antes de *breaker*.

**Tabla 2.5.** Medias de las diferencias del parámetro H\* entre las zonas 1 y 2 del fruto rojo. Las medias con la misma letra no son significativamente distintas.

Cubierto antes de Breaker	N	Medias diffH*		Error típico
No	12	41,75	a	7,44
Sí	36	26,78	b	3,06

## Fase 2

Se calculó para cada fruto estudiado en el experimento, la diferencia de  $H^*$  entre la zona 1 y la zona 2, en el estadio rojo maduro. Se representó de manera gráfica la media de la diferencia de  $H^*$  ( $\text{diff}H^*$ ) para cada categoría de fruto, acompañada de las barras de error. En el eje horizontal se representan los tramos cortos de días desde antesis en los que el fruto ha estado cubierto con papel de aluminio, durante el tiempo de desarrollo y maduración del fruto (Figura 2.6).



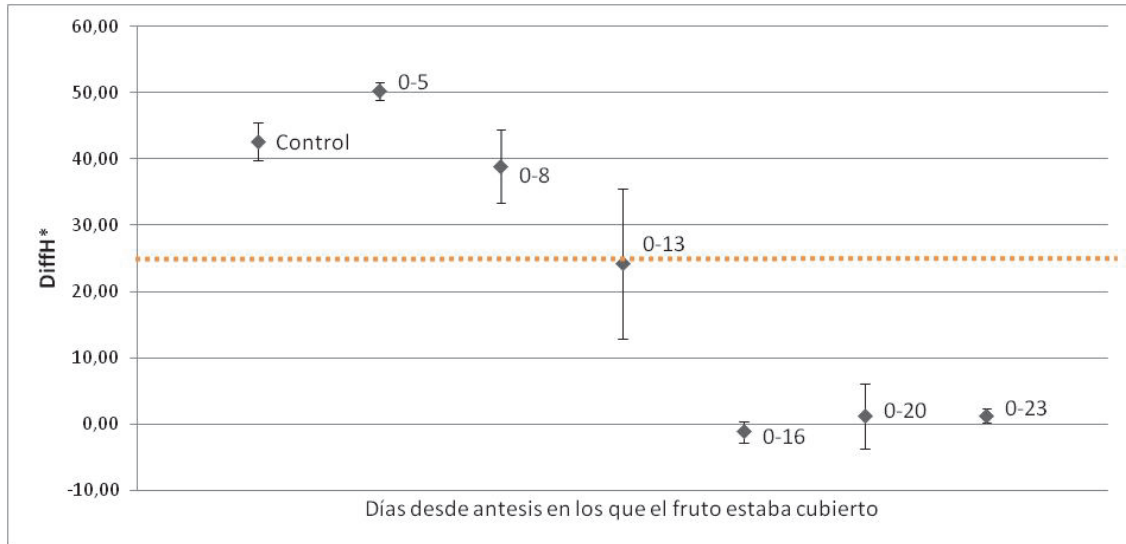
**Figura 2.6.** Medias de las diferencias del parámetro  $H^*$  entre las zonas 1 y 2 del fruto rojo. En el eje horizontal se representan los tramos cortos de días desde antesis en los que el fruto ha estado cubierto con papel de aluminio. El fruto marcado como control no estuvo nunca cubierto. La línea horizontal punteada delimita el valor de  $\text{diff}H^*$  por encima del cual se considera que el fruto presenta mancha solar. Las barras indican el error típico.

Los resultados obtenidos mostraron que todos los frutos presentaron valores de diferencia de  $H^*$  que indican presencia de mancha solar, que además se observó de manera visual. Los frutos cubiertos de 5-11 dpa (días post-antesis), 10-16 dpa y 13-19 dpa mostraron valores algo más reducidos de  $\text{diff}H^*$  que el resto de los frutos de otras categorías.

## Fase 3

Se calculó para cada fruto estudiado en el experimento, la diferencia de  $H^*$  entre la zona 1 y la zona 2, en el estadio rojo maduro. Se representó de manera gráfica la media de la diferencia de  $H^*$  ( $\text{diff}H^*$ ) para cada categoría de fruto, acompañada de

las barras de error. En el eje horizontal se representan los tramos largos de días desde antesis en los que el fruto ha estado cubierto con papel de aluminio, durante el tiempo de desarrollo y maduración del fruto (Figura 2.7).



**Figura 2.7.** Medias de las diferencias del parámetro  $H^*$  entre las zonas 1 y 2 del fruto rojo. En el eje horizontal se representan los tramos largos de días desde antesis en los que el fruto ha estado cubierto con papel de aluminio. El fruto marcado como control no estuvo nunca cubierto. La línea horizontal punteada delimita el valor de  $\text{diff}H^*$  por encima del cual se considera que el fruto presenta mancha solar. Las barras indican el error típico.

Los resultados obtenidos mostraron claramente que los frutos que habían permanecido cubiertos desde antesis hasta un máximo de 13 días presentaron valores de diferencia de  $H^*$  que indican presencia de mancha solar, que además se observó de manera visual. Los frutos cubiertos desde antesis hasta al menos 16 dpa en adelante presentaron valores de diferencia de  $H^*$  que indican ausencia de mancha solar. Los frutos de la categoría de 0 a 13 dpa mostraron un rango amplio de variabilidad en los valores de  $\text{diff}H^*$  indicando que algunos mostraron mancha solar y otros no. El valor medio de los frutos de la categoría de 0 a 13 dpa se situó cercano al valor de  $\text{diff}H^*$  establecido como umbral para determinar presencia o ausencia de mancha.

### 2.3.5. Obtención de las parejas de sub-RILs contrastantes

Se seleccionaron las plantas  $F_8$  para formar las parejas. En cada una de las 3 sub-RIL se eligieron las 2 plantas que formaban la pareja más contrastante para el carácter. La selección se basó previamente en los datos de color de los frutos elegidos,

y se completó con la observación directa en el campo (Figura 2.8), para evitar la selección de líneas que mantuviesen una cierta segregación. Las plantas finalmente seleccionadas (Tabla 2.6) se autofecundaron y las semillas recogidas corresponden a las líneas ya fijadas.



**Figura 2.8.** Muestra de algunos frutos representativos de cada línea. Las imágenes superiores son las 3 líneas seleccionadas por la aparición del carácter. Las imágenes inferiores son las seleccionadas por no presentar la fisiopatía.

**Tabla 2.6.** Parejas de líneas sub-RILs ya seleccionadas y algunas características.

Línea con mancha solar	Observaciones de campo	Línea sin mancha solar	Observaciones de campo
116-3-1-12-1	Mancha en el 95% de los frutos, ocupando de $\frac{1}{4}$ a $\frac{1}{2}$ del fruto	116-R1-10-1-4	Segregación entre plantas, mancha solar muy reducida o nula
143-2-9-3-4	Mancha en el 85% de los frutos, ocupando de $\frac{1}{4}$ a $\frac{1}{3}$ del fruto	143-R1-6-1-4	No presencia de mancha
177-R1-4-7-4	Mancha en el 90% de los frutos, ocupando de $\frac{1}{4}$ a $\frac{1}{3}$ del fruto	177-R1-6-11-5	No presencia de mancha

### 2.3.6. Medidas de radiación, temperatura y humedad relativa

Se midieron en continuo algunas variables ambientales dentro del invernadero durante los meses en los que las plantas se emplearon en los ensayos. Los resultados obtenidos de estas variables se presentan en la Tabla 2.7.

**Tabla 2.7.** Media y desviación típica de las variables ambientales durante el período del ensayo en el interior del invernadero.

VARIABLES	Medias	Desv.tip.
<b>Temperatura (°C)</b>		
Temperatura mínima	16,6	3,3
Temperatura máxima	35,1	4,5
Temperatura media	24,1	3,6
<b>Humedad (%)</b>		
Humedad relativa mínima	29,2	7,8
Humedad relativa máxima	86,6	6,7
Humedad relativa media	60,4	8,9
<b>Radiación (mol m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>)</b>		
Radiación PAR acumulada	26,4	4,8

## 2.4. DISCUSIÓN

Los parámetros del espacio de color CIELab resultan muy útiles en cuanto a lo que representan, esto es, una medida objetiva del color y susceptible de ser analizada estadísticamente y representada gráficamente. De todos, el parámetro  $H^*$  es el que se concibe de manera más fácil, puesto que representa una escala numérica para lo que conocemos por "color". Según la calibración realizada al colorímetro, en tomate hemos observado que valores de  $H^*$  entre  $120^\circ$  y  $100^\circ$  equivalen al color verde, entre  $100^\circ$  y  $70^\circ$  equivalen a amarillo, entre  $70^\circ$  y  $45^\circ$  a naranja y de  $45^\circ$  a  $27^\circ$  a rojo, no habiéndose hallado valores más bajos en nuestros resultados. El valor de la diferencia de  $H^*$  entre las zonas del hombro y apical de los frutos es una medida objetiva del grado de mancha solar que estos presentaban. Hemos considerado que valores de  $\text{diff}H^*$  de hasta  $25^\circ$ , incluso  $30^\circ$ , se pueden asumir como un fruto que no presenta mancha solar. El parámetro  $L^*$  se debe entender como la claridad u oscuridad del color. A la vista de los resultados se podría utilizar el valor de  $L^*$  para predecir desde un fruto verde la posible aparición de la mancha solar, ya que como se observa en la Figura 2.5 su valor es menor en la zona del hombro de frutos que posteriormente presentan la fisiopatía. Los datos de seguimiento del color con el colorímetro han demostrado que los frutos que presentan en estadio verde los hombros oscuros, esto es, un valor de  $L^*$  en el hombro más bajo que en la zona apical, son más propensos a la aparición de mancha solar. Esto podría deberse a que los colores más oscuros absorben mayor cantidad de radiación solar, y por tanto acumulan más calor, potencialmente causante de la fisiopatía. Esta acumulación de energía por la radiación solar en la zona podría provocar un daño tisular que altera el desarrollo normal del tejido, impidiendo su evolución hacia tejido rojo maduro. La aplicación del parámetro  $C^*$  se hace más ardua, debido a la dificultad de asumir la función práctica de  $C^*$  en el color; se puede pensar como la pureza del color, y acercarlo al contenido de pigmentos en el fruto y sus porcentajes, pero parece un parámetro menos interesante puesto que no hemos observado diferencias en la descripción objetiva del color de los frutos afectados por la fisiopatía.

La mancha solar es un daño a nivel tisular que se produce en la zona del hombro del fruto, posiblemente debida a una combinación de varios factores ya comentados. Varias observaciones han llevado a pensar que la radiación solar incidente en el fruto es responsable en parte de su aparición. Se quiso evaluar el efecto de la calidad de la luz que incide sobre el fruto en la aparición de la mancha. Teniendo en cuenta que la luz UV al tener más energía podría provocar daños en el fruto, se ensayó evitar su incidencia sobre los frutos para tratar de conseguir disminuir la mancha solar. Los resultados de este ensayo mostraron que la evitación de la luz UV sobre los frutos en todo su desarrollo no impidió que apareciera la mancha solar en los 4 genotipos que presentan el carácter (marcados con \* en la Tabla 2.4). Sí se observaron algunas diferencias significativas en 2 de los 6 genotipos que no presentaban mancha solar (177-R1-6-11 y 177-R3-2-6), con sentidos opuestos, pero al evaluar cada uno de los valores de las medias se confirma que ninguno alcanzó un valor de  $\text{diffH}^*$  mayor de  $25^\circ$ , establecido como umbral para la asignación de mancha solar. Sólo en el caso de la línea 116-R1-10-1 las medias de  $\text{diffH}^*$ , aunque no fueron significativamente diferentes, superaron el valor de  $25^\circ$ , pero se debe a que en esta línea el carácter estaba segregando y no se consiguió fijarlo, de manera que algunos frutos presentaron mancha solar y otros no. El tratamiento en el que se aplicó un plástico no fotoselectivo no generó diferencias significativas en ninguno de los genotipos.

Los resultados obtenidos con diferentes calidades de luz sobre distintos genotipos apuntan a que los tratamientos empleados no tienen efecto sobre la aparición de la mancha. El hecho de limitar la luz UV que recibe la planta completa puede no ser beneficioso, ya que junto con la casi eliminación de la luz UV, se está reduciendo drásticamente la radiación PAR recibida por la planta, un 42% comparado con la radiación que llegaba dentro del invernadero. Habría que comprobar el efecto de esta reducción en la luz recibida, ya que quizá la planta descienda sus niveles de fotoprotección y por ello sea más sensible aún a la luz UV, por muy pequeña que sea la cantidad recibida. Estas hipótesis necesitarían experimentos ulteriores.

Venter (1965) ya demostró que el sombreado de los frutos con papel de aluminio disminuía significativamente la presencia del hombro comparado con los frutos no sombreados. En nuestros ensayos se probaron 2 materiales para sombrear los frutos, papel de aluminio y malla. El resultado fue que los frutos cubiertos con aluminio presentaban una media de la diferencia de  $H^*$  entre zonas de  $17^\circ$ , mientras que los frutos cubiertos con malla o no cubiertos mostraban una media de la diferencia de los valores de  $H^*$  en torno a  $38^\circ$ . Estas diferencias fueron significativas, por lo que los resultados apuntan a que la eliminación total de la radiación solar sobre el fruto, por medio de aluminio en este caso, lleva a la no aparición de la fisiopatía. Los resultados de los frutos cubiertos con la malla hacen pensar en que la simple reducción de la radiación recibida no es suficiente para evitar la fisiopatía, como también apuntaban los resultados del experimento con diferentes genotipos.

Se ha demostrado que es necesario evitar la radiación solar sobre los frutos para evitar la aparición de la mancha solar, y uno de los objetivos de este capítulo es conocer el período clave concreto durante el desarrollo del fruto en el que es más sensible a la inducción de la fisiopatía debido a la radiación solar. Para ello se diseñó un experimento en 3 fases. Los resultados de los ensayos de la fase 1 mostraron que los frutos cubiertos con aluminio antes del momento de virado al rojo, esto es, durante su estadio en verde, presentaron menor o nula incidencia de mancha, respecto a los frutos cubiertos después del estadio *breaker*, siendo estas diferencias significativas. Por tanto el momento más sensible durante el desarrollo del fruto, en el que la radiación recibida provocaría la aparición de mancha solar en el fruto rojo, es el estadio verde. Conociendo este resultado se evaluaron en la fase 2 pequeños tramos de 6 días a lo largo del estadio verde en los que los frutos estaban cubiertos con aluminio, pero el mantener los frutos 6 días cubiertos no fue suficiente para evitar la aparición de mancha solar. Sin embargo, se observaron tres categorías de fruto que parecían más sensibles al tratamiento: 5-11 dpa, 10-16 dpa y 13-19 dpa, en los que el valor de  $\text{diff}H^*$  disminuyó. En la fase 3 los tramos de días de fruto cubierto fueron mayores y todos partieron desde anthesis (0 dpa), para complementar la información obtenida en la fase 2. Los resultados a simple vista muestran que el fruto es sensible al efecto de la radiación solar sobre la aparición de la mancha desde su establecimiento

hasta el día 16 tras la antesis. No obstante se observa un patrón que concuerda con lo observado en la fase 2, y que muestra cómo parece existir dos momentos concretos más sensibles para la inducción de mancha solar por la radiación. El primer momento sensible no se observa hasta los 5-10 dpa, que coincidiría con el momento en el que el frutillo asoma y deja de estar cubierto por el cáliz. Esos son los primeros días en los que la luz incide directamente sobre el fruto y quizás debe de estimular la generación de mayor número de cloroplastos, la síntesis de clorofila y los mecanismos de fotoprotección. Un segundo momento más sensible se establecería en torno a los 13-16 dpa, en los que el fruto sigue siendo verde inmaduro. Estos dos momentos no son independientes, de manera que es necesario evitar la radiación durante ambos períodos para evitar la mancha solar. Queda demostrado que el período más sensible para la inducción de la mancha solar en el fruto rojo maduro es el período inicial verde inmaduro, de 5 a 16 dpa, y que no es una fisiopatía cuya etiología se produzca en el momento de la maduración en la que ya nada se podría hacer para evitarla pues el daño se produjo con anterioridad.

Ya obtenidas las parejas contrastantes para el carácter mancha solar, se seleccionó sólo una de ellas para continuar con los ensayos de mancha solar del capítulo 3 que nos llevarán a profundizar en aspectos genéticos y proteómicos, entre otros. La pareja de líneas contrastantes derivada de la línea 116 se descartó porque la mancha solar estaba fijada prácticamente antes de la separación de las líneas hermanas y no se ha podido conseguir una línea resistente a la mancha solar que no presente segregación. Entre las dos parejas restantes se seleccionó la derivada de la línea 177, ya que por un lado la línea hermana que no presentaba mancha no segregaba, como le ocurría a la 116, y por otro lado presentaba mayor proporción de frutos afectados (Tabla 2.6) y mayor tamaño de fruto que las líneas derivadas de la 143 (Figura 2.8).

## Bibliografía

- Ayers, J. & Tomes, M., 1966. The effect of two uniform ripening genes on chlorophyll and carotenoid contents of tomato fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 88, pp.550–556.
- Cánovas, F., 1995. Manejo del cultivo sin suelo. In F. Nuez, ed. *El cultivo del tomate*. Madrid: Mundiprensa, pp. 227–254.
- Cheng, T.-S. et al., 1988. The Effect of High-Temperature Stress on Ripening of Tomatoes (*Lycopersicon esculentum*). *Journal of Plant Physiology*, 132(4), pp.459–464. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0176161788800634> [Accessed October 29, 2015].
- Darrigues, A., Hall, J., et al., 2008. Tomato Analyzer-color Test : A New Tool for Efficient Digital Phenotyping. , 133(4), pp.579–586.
- Darrigues, A., Schwartz, S.J. & Francis, D.M., 2008. Optimizing sampling of tomato fruit for carotenoid content with application to assessing the impact of ripening disorders. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(2), pp.483–487. Available at: ISI:000252434800028.
- Davies, J.N., 1966a. Changes in non-volatile organic acids of tomato fruit during ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 17(9), pp.396–400. Available at: ISI:A19668361400003.
- Davies, J.N., 1966b. Non-volatile organic acids of differently coloured areas of walls of blotchy ripened tomatoes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 17(9), pp.400–403. Available at: ISI:A19668361400004.
- Francis, D.M., Barringer, S.A. & Whitmoyer, R.E., 2000. Ultrastructural characterization of yellow shoulder disorder in a uniform ripening tomato genotype. *Hortscience*, 35(6), pp.1114–1117. Available at: ISI:000089964200030.
- Hartz, K., 2005. Processing tomato yield and fruit quality improved with potassium fertigation. *Hortscience*, 40(6), pp.1862–1867.
- Hartz, T.K. et al., 1999. Potassium requirements for maximum yield and fruit quality of processing tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 124(2), pp.199–204. Available at: ISI:000078681600016.
- IBM Corp., 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0.
- Jones, J.P. & Alexander, L.J., 1962. Relation of certain environmental factors and tobacco mosaic virus to blotchy ripening of tomatoes. *Phytopathology*, 52(6), pp.524–528. Available at: ISI:A19621809C00008.
- Lipton, W.J., 1970. Effects of high humidity and solar radiation on temperature and color of tomato fruits. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 95(6), pp.680–684. Available at: ISI:A1970I033400006.

- Ozbun, J. et al., 1967. Tomato fruit ripening .I. Effect of potassium nutrition on occurrence of white tissue. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, 91(DEC), pp.566–572. Available at: ISI:A1967A566200080.
- Picha, D., 1987. Physiological factors associated with yellow shoulder expression in tomato fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 112(5), pp.798–801. Available at: ISI:A1987J853100015.
- Picha, D. & Hall, C., 1981. Influences of potassium, cultivar, and season on tomato graywall and blotchy ripening. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 106(6), pp.704–708. Available at: ISI:A1981MZ03400003.
- Romero-Aranda, R. et al., 2004. *Yellow shoulder disorder in tomatoes under natural and controlled conditions*,
- Sadik, S. & Minges, P., 1966. Symptoms and histology of tomato fruits affected by blotchy ripening. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, 88(JUN), pp.532–543. Available at: ISI:A19668125400080.
- Trudel, M. & Ozbun, J., 1971. Influence of potassium on carotenoid content of tomato fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 96(6), pp.763–765. Available at: ISI:A1971K922000019.
- Trudel, M. & Ozbun, J., 1970. Relationship between chlorophylls and carotenoids of ripening tomato fruit as influenced by potassium nutrition. *Journal of Experimental Botany*, 21(69), pp.881–886. Available at: ISI:A1970H915500005.
- Venter, F., 1965. Investigation of green-back of tomatoes. In pp. 99–101.
- Yang, S.F., 1980. Regulation of ethylene biosynthesis. *Hortscience*, 15(3), pp.238–243.



### **FISIOPATÍA DE LA MANCHA SOLAR: GENÉTICA Y PROTEÓMICA.**

---

#### **3.1. ANTECEDENTES**

Por observaciones anteriores en el IHSM La Mayora, se puede afirmar que los parentales *S. lycopersicum* “MoneyMaker” y *S. pimpinellifolium* acc. TO-937, de cuyo cruce han derivado las líneas RILs empleadas en esta Memoria, no presentan mancha solar, así como tampoco la presenta el híbrido F<sub>1</sub> resultante. La mancha solar aparece en casi la mitad de las RILs, en muchas de ellas las plantas no muestran el carácter en todos los frutos, y la severidad varía mucho de una línea a otra. Estas características del carácter llevan a pensar que la herencia del carácter es compleja y no exclusivamente aditiva, ya que aparece en las líneas RILs muy probablemente producida por combinaciones genéticas causadas por la recombinación genética al realizar el cruce entre parentales tan diferentes.

De los genes putativos a provocar la aparición de la mancha solar, el gen *U* es un candidato ya demostrado con los resultados expuestos en el capítulo 2. Venter (1965) fue el primero en tratar de seleccionar plantas que no presentaran hombro verde, pero debido al desconocimiento del gen *U* y al hecho de estar trabajando con

una variedad fijada, el intento no tuvo éxito. Los genotipos con maduración uniforme (*u/u*) tienden a mostrar anillo amarillo, pero la mancha solar tal y como se ha descrito, como la parte peduncular del fruto amarilla separada por una línea clara de la parte roja apical, se encuentra en los genotipos de maduración no uniforme (*U/U*) (Picha & Hall 1981; Francis et al. 2000). Los parentales de las líneas RIL empleadas en los ensayos que se describen en esta Memoria son *u/u* (*S. lycopersicum* cv. “MoneyMaker”, sin hombros verdes por tanto) y *U/U* (entrada TO-937 de *S. pimpinellifolium*), pero ninguno muestra mancha solar, sólo el parental “MoneyMaker” presenta en ocasiones anillo amarillo. En el caso del híbrido F<sub>1</sub> se observó que muestra hombro verde oscuro pero no mancha solar en el fruto maduro, y sólo en muy contadas ocasiones anillo amarillo, por lo que debe haber otros genes implicados en la mancha solar además de *U*, o más bien, debe haber genes en TO-937 que contrarresten la propensión a la aparición de la mancha solar que produce el gen *U*.

Otros genes que pueden estar relacionados con la aparición o no de la mancha solar son genes relacionados con el tamaño del fruto. En el estudio de Venter (1965), que abarcó diferentes factores, indicaba que los frutos sin semillas, mucho más pequeños que los frutos normales, no mostraban el hombro verde; pero sin embargo los frutos tratados con 2,4-D, agente que provoca que los frutos sin semillas aumenten de tamaño, sí llegaban a mostrar hombro verde. En nuestro trabajo los pequeños frutos del parental *S. pimpinellifolium*, que pesan entre 0.9-1.4 g, sí muestran hombro verde, y además rayas verdes longitudinales frente a cada lóculo, por lo que es necesario determinar qué otros *loci* están afectando a la aparición de la mancha solar para poder proponer un modelo genético acorde con nuestros resultados.

Para abordar el carácter poligénico de la mancha solar, además de la población RIL estudiada, se han obtenido parejas de líneas hermanas contrastantes para el carácter, que comparten entre ellas gran parte de sus genomas. Las diferencias que existen entre ellas deben estar relacionadas en parte con la mancha solar. De ellas se ha elegido la pareja más apropiada para el estudio, de manera que tenemos sólo dos genomas que estudiar. Sin embargo, la mancha solar provoca dos zonas claramente diferenciadas en el fruto rojo, el hombro amarillo y la parte restante del fruto hasta la

zona apical que presenta el aspecto del fruto rojo maduro con desarrollo normal. Por tanto, en el mismo fruto de la línea sensible tenemos dos zonas con el mismo genoma pero que están expresando diferentes genes y, presumiblemente, mostrando diferente proteoma. Este hecho plantea la necesidad de emplear la aproximación proteómica en este material vegetal para obtener más información sobre qué está ocurriendo en la zona de la mancha solar en los distintos estadios de desarrollo.

Por otro lado, los estudios de genética cuantitativa del Capítulo 1 no lograron detectar QTLs asociados a mancha solar, muy probablemente porque el diseño experimental (con fenotipado para multitud de caracteres del fruto) y el número de frutos ensayados no fue suficiente. Por ello se hizo necesario realizar en la población RIL una nueva caracterización fenotípica centrada en este único carácter con objeto de localizar QTLs asociados a la mancha solar.

Nuestra hipótesis previa de las causas genético-fisiológicas de aparición de la mancha solar del fruto de tomate se va a explicar a continuación. La presencia de hombro verde oscuro en los frutos inmaduros de las especies silvestres de tomate y de las variedades más antiguas de tomate doméstico se considera lógicamente como la condición ancestral. La ausencia del hombro verde en muchos tomates modernos es provocada por la mutación *uniform-ripening* (*u*). Recientemente se ha encontrado que el gen *U* se corresponde con el gen anotado en el genoma del tomate como *Golden 2-like* (*GLK2*) (Powell et al. 2012). Este gen codifica un factor de transcripción que determina la organización del cloroplasto y, por tanto, la acumulación y distribución de clorofila en el fruto verde en desarrollo, gen que necesita la presencia de luz para expresarse. La mutación *u* provoca que la proteína esté truncada y no sea funcional, de ahí que el color del fruto inmaduro sea uniformemente verde claro. En tomate se expresan dos *GLKs* en hoja (*SIGLK1* y *SIGLK2*), pero sólo *SIGLK2* se expresa en el fruto y, en éste, mayoritariamente en la zona de los hombros. El mucho mayor número de cloroplastos y mayor cantidad de clorofila en la zona concreta del hombro genera una mayor tasa de fotosíntesis muy localizada y, por tanto, mayor demanda de un sistema amortiguador o *quenching* que pueda gestionar los electrones liberados por los fotosistemas en condiciones de exceso de iluminación o situaciones de estrés que

limiten el flujo en la cadena transportadora de electrones de la fotosíntesis. Se puede postular, además, que al presentar un color oscuro el hombro pueda acumular más calor que el resto del fruto por la incidencia de la radiación solar, motivo que puede añadir aún un mayor estrés oxidativo que el tejido de la zona debe gestionar. Si ese tejido no es capaz de reparar los daños debidos al calor acumulado y las especies reactivas generadas, se producirían daños tisulares que impedirían el desarrollo morfogenético normal de la zona. A la vista de los resultados del capítulo 2, el estrés resultante impediría que ese tejido llegara en su momento a formar un tejido rojo maduro, sino que presentará aspecto de un tejido, ya no inmaduro, sino afectado en su desarrollo, tal y como se ha descrito siempre la mancha solar (Francis et al. 2000). En los ensayos descritos en el capítulo 2 se ha observado que al cubrir los frutos con papel de aluminio en el período de verde inmaduro, se evitó casi por completo la presencia de hombro verde oscuro, y posterior mancha solar en el fruto maduro. Por tanto para el estudio de proteómica se aplicará un tratamiento diferencial de cobertura de los frutos al material vegetal seleccionado.

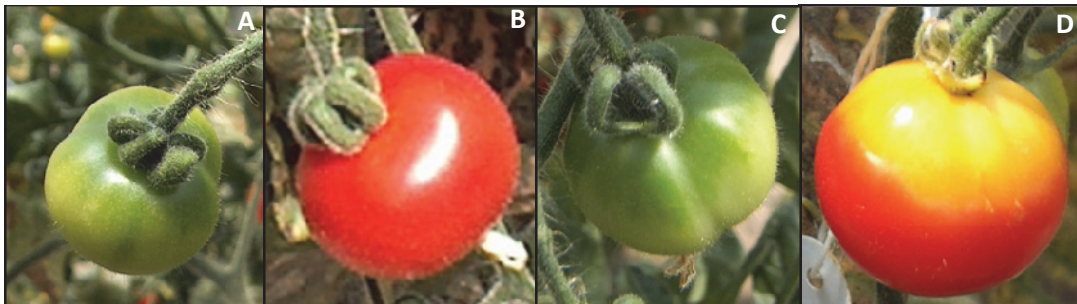
Por todo ello, los objetivos específicos del capítulo 3 son: detectar QTLs asociados a la mancha solar, encontrar las diferencias en dos líneas hermanas contrastantes que provocan la resistencia o sensibilidad a la mancha solar, identificar los efectos causados por el tratamiento de cubrir los frutos, entendiéndose como los efectos de la luz en la mancha solar; y conocer qué ocurre en las zonas amarilla y roja para generar una línea tan bien definida entre las dos partes del mismo fruto. Con estos resultados se tratará de proponer un modelo genético que explique la fisiopatía.

## **3.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.2.1. Material vegetal**

Para los estudios de proteómica se utilizó la pareja de líneas contrastantes provenientes de la RIL 177, como se describe en el capítulo 2, apartado 2.3.5., a las que se denominó 177R4 (se corresponde con la 177-R1-4-7, que presenta mancha solar) y 177R6 (se corresponde con la 177-R1-6-11, que no presenta mancha solar). Estas

líneas comparten un fondo genético común desde una misma planta F<sub>5</sub>. Se germinaron semillas de cada línea en un invernadero de vidrio en febrero y a los 40 días se sembraron 21 plántulas de cada línea en un invernadero multitúnel de polietileno. En ambas líneas se realizaron observaciones de algunos caracteres de la planta, de los racimos y de los frutos para detectar las diferencias existentes, además del hecho de ser contrastantes para el carácter mancha solar (Figura 3.1). Para la detección de QTLs se empleó la población de 169 líneas RIL descrita en el capítulo 1, apartado 1.2.1, empleando 5-6 plantas por línea.



**Figura 3.1.** Frutos de las líneas contrastantes seleccionadas. (A y C) Estadío verde maduro. (B y D) Estadío rojo maduro. Frutos de la línea resistente a mancha solar 177R6 (A y B). Frutos de la línea sensible a mancha solar 177R4 (C y D).

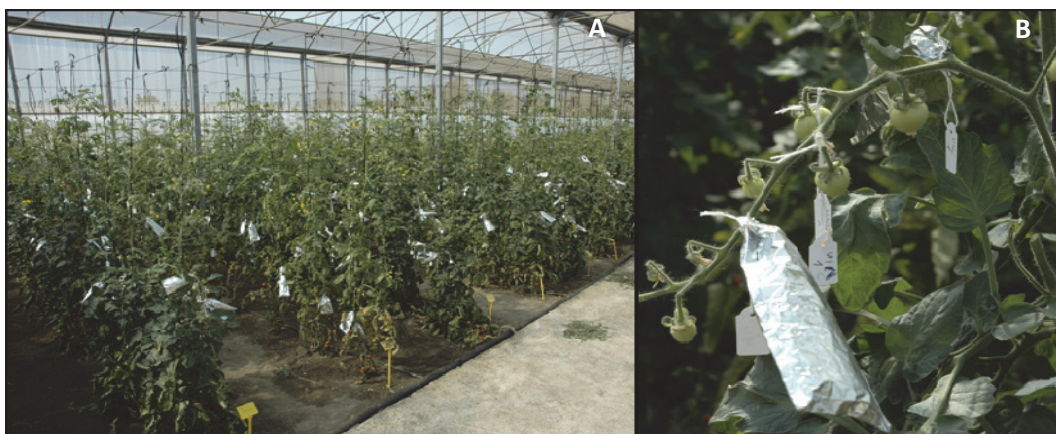
### 3.2.2. Detección de QTLs asociados a mancha solar

Se recogieron todos los frutos producidos de cada planta de cada RIL hasta el racimo 7-8 y se les asignó un valor a cada uno según el índice de mancha solar observada (Anexo 1.3). Usando el valor medio de este índice para cada RIL se realizó el estudio de localización de QTLs siguiendo la metodología explicada en el apartado 1.2.4.4 del Capítulo 1.

### 3.2.3. Diseño experimental

Se diseñó el ensayo para poder tomar muestras suficientes de frutos en cada uno de los estados de maduración, entiéndase verde maduro (VM) y rojo maduro (RM), en las plantas de cada una de las dos líneas contrastantes para los estudios del proteoma. Para cada uno de esos estados de maduración se aplicó un tratamiento que fue cubrir unos frutos con papel de aluminio desde la caída de la corola hasta su

recogida y dejar otros sin cubrir. Para cumplir con este diseño en cada planta sembrada se etiquetaron 8 frutos, evitando siempre usar el primer fruto del racimo, distribuidos en los racimos 3 y 4. En el tercer racimo se etiquetaron 2 frutos para recogerlos en rojo maduro (RM), de los que un fruto había sido cubierto y otro no. Además se etiquetaron dos frutos intercalados, sin cubrir, que se dejarían madurar en la planta como control para evaluar la aparición de la mancha solar y su extensión en fruto rojo maduro. En el cuarto racimo se etiquetaron 2 frutos para recogerlos en verde maduro (VM), de los que un fruto había sido cubierto y otro no. De la misma manera que se ha explicado para el racimo 3, se etiquetaron además dos frutos controles intercalados. El planteamiento del diseño permitió que la recogida de los frutos se concentrara en un período de tiempo más corto. En cada racimo de cada planta se alternó el orden de los frutos para evitar efectos posicionales. El etiquetado de los frutos se realizó a principios de mayo (Figura 3.2).



**Figura 3.2.** Diseño experimental. (A) Plantas sembradas para el ensayo con frutos cubiertos con papel de aluminio. (B) Detalle de un racimo con algunos frutos cubiertos y no cubiertos, en estado verde inmaduro.

#### 3.2.4. Toma de muestras

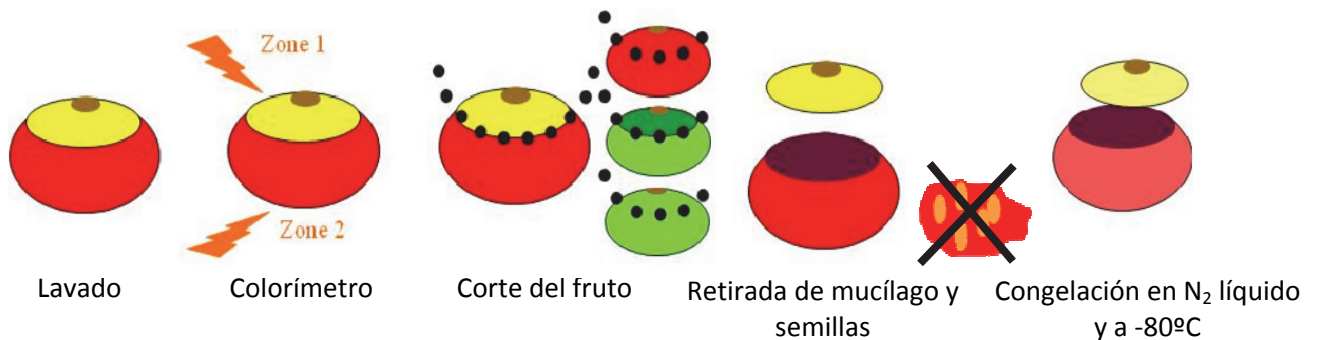
Durante el tiempo del ensayo se realizó un seguimiento a los frutos cada día para comprobar si le correspondía su recogida según su asignación, siguiendo el diseño experimental descrito en el apartado 3.2.2. Los frutos VM se recogieron a 28-30 dpa, mostrando más brillo pero nunca presentando cambio de color a amarillo. Los frutos RM se recogieron a 46-47 dpa, apareciendo rojo intenso y con dureza intermedia. Los frutos se recogían y procesaban dentro del invernadero (Figura 3.3), siempre entre las

12.30 y las 15.00 horas, cuando la temperatura y la radiación eran máximas. El procesamiento de cada fruto conlleva el lavado, secado, medida con el colorímetro (ver anexo 1.5) en la zona peduncular y estilar, y numeración del fruto. Con los frutos cubiertos se realizó el mismo proceso, pero manteniéndolos el mínimo tiempo expuestos a la luz.



**Figura 3.3.** Detalle de la recogida, numeración, medición del color y toma de muestras de frutos en el invernadero.

Luego se cortó cada fruto transversalmente separando las zonas peduncular (un tercio del fruto) y estilar. En los casos en los que presentaban mancha solar u hombro verde se cortó por la línea que delimita esta zona con la zona del fruto de color normal. Se descartó el mucílago con las semillas y la columela en ambas partes del fruto y se metió cada fruto partido y vaciado en bolsas individuales de cierre zip perforadas, para inmediatamente después congelarlas en nitrógeno líquido *in situ* en el invernadero, y almacenarlas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior utilización (Figura 3.4).



**Figura 3.4.** Diagrama del proceso de la toma de muestras y preparación hasta su conservación a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.5. Evaluación, selección y procesado de las muestras tomadas

Entre todos los frutos recogidos se seleccionaron los que se emplearían para los análisis, según los datos tomados con el colorímetro. Se calculó la diferencia de los valores de  $H^*$  entre la zona peduncular (zona 1) y estilar (zona 2) y también el YSD index (descrito en el anexo 1.3). Según los resultados, para la línea 177R4 se seleccionó solamente los frutos cuyos controles presentaron mancha. Los frutos control se quedaron en la planta hasta su maduración, cuando fueron medidos con el colorímetro en su parte peduncular y estilar, y se les dio un valor siguiendo el índice de mancha solar observada descrito en el anexo 1.3.

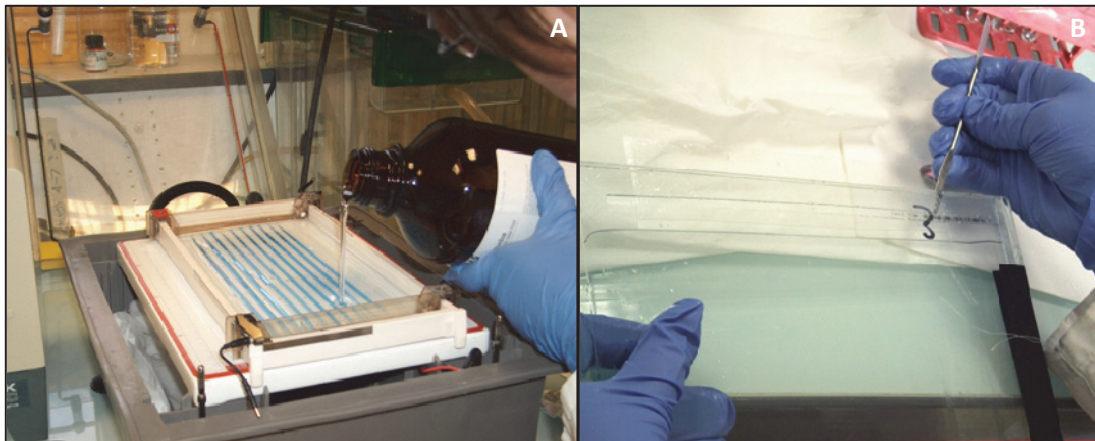
Ya en el laboratorio se prepararon 16 muestras en total, procedentes del pericarpo de frutos de las dos líneas hermanas (177R4 y 177R6), de los dos tratamientos aplicados (cubierto y no cubierto), en dos estadios diferentes de maduración [verde maduro (28-30 dpa) y rojo maduro (46-47 dpa)], y de las dos zonas del fruto concretas (peduncular y estilar). En cada una de las 16 muestras los medios frutos seleccionados se trocearon con nitrógeno líquido en un mortero de porcelana, luego se trituraron en un molinillo de café enfriado siempre con nitrógeno líquido, se pasaron de nuevo al mortero enfriado para dejar la muestra bien triturada y se repartió en viales enfriados con nitrógeno para inmediatamente almacenar a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.6. Extracción de proteínas. Electroforesis bidimensional

La extracción de proteínas en las 16 muestras se realizó siguiendo el protocolo de Faurobert (2007), extrayendo de cada muestra 3 réplicas de aproximadamente 2.5 g cada una. Esta extracción fenólica de proteínas es una alternativa al método clásico de Tricloroacético-acetona y permite una recuperación eficiente de proteínas, retirando los componentes no proteicos en el caso de tejidos vegetales ricos en polisacáridos, lípidos y compuestos fenólicos. Tras la extracción fenólica las proteínas se precipitan con acetato amónico en metanol. A partir de este punto del protocolo los análisis se realizaron en los laboratorios del centro INRA Provence-Alpes-Côte d'Azur, situado en Avignon (Francia), dentro de la Unidad *Génétique et Amélioration des Fruits*

*et Légumes*. El precipitado se resuspende en el tampón IEF (Isoelectric Focusing) y se mide la concentración de proteínas con un método Bradford modificado (Biorad®) antes de la electroforesis.

Cada uno de los 48 extractos fue sometido a una electroforesis de dos dimensiones en geles de poliacrilamida (Wang et al. 2006; Faurobert, Pelpoir, et al. 2007). En este tipo de electroforesis las proteínas quedan separadas en el gel según su punto isoeléctrico en el eje horizontal, y según el peso molecular en el eje vertical del gel (Figura 3.5). Los geles de proteínas se visualizan con una tinción con azul de Coomassie CBB G-250 coloidal, quedando las proteínas separadas como puntos en el gel.



**Figura 3.5.** Detalle del protocolo de la electroforesis bidimensional. (A) Primera electroforesis que separa las proteínas por su punto isoeléctrico a lo largo de unas tiras de gel diseñadas para un rango de pH de 4 a 7. (B). Colocación de esas tiras en un gel de poliacrilamida polimerizada para realizar la segunda electroforesis, que separa a las proteínas por el peso molecular.

### 3.2.7. Análisis de resultados

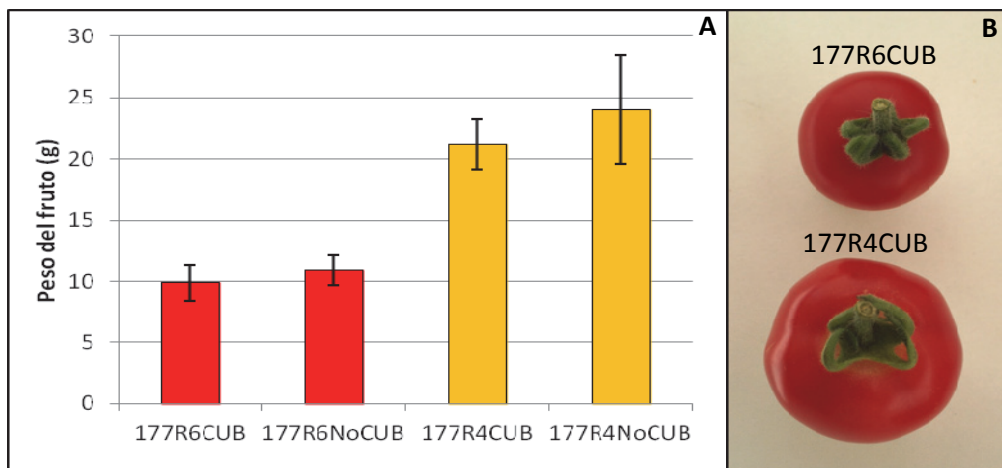
Las imágenes de los geles se obtuvieron con un escáner de imágenes (Amersham Biosciences). Se empleó el paquete Progenesis Stats integrado en el programa Progenesis SameSpot v 2.0 (Nonlinear Dynamics), para explorar la expresión diferencial de puntos (spots) en las imágenes con extensión *.mel* obtenidas de los 48 geles. Este programa permite realizar análisis univariante y multivariante, incluido ANOVA de una vía, y distingue spots con diferencias de 1.5 o mayores en la intensidad, entre los grupos experimentales. Los spots variables equivalen a proteínas con diferentes niveles de expresión entre las diferentes muestras, encontrando spots presentes en las réplicas de un mismo tipo de muestra pero ausentes en otras. Estas proteínas diferenciales se recortan del gel y se analizan por espectrometría de masas (MALDI/TOF, LC MS/MS) siguiendo Faurobert y col. (Faurobert, Mihr, et al. 2007) para identificar su secuencia de aminoácidos. Una vez obtenida la secuencia se realizan BLAST frente a las bases de datos de proteínas (SwissProt, ESTs) para encontrar homologías y conocer la función putativa del péptido detectado. Los datos obtenidos se volcaron en la base de datos PROTIcDb (Ferry-Dumazet et al. 2005), diseñada principalmente para poder almacenar y analizar datos proteómicos de plantas generados por electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D PAGE).

Dada la complejidad del diseño muestral, con 4 variables dicotómicas a tener en cuenta, se empleó un software desarrollado por el TIGR (The Institute for Genomic Research) llamado MultiExperiment Viewer (TMEV) para mostrar los resultados (Saeed et al. 2003). Este software se emplea para manejar datos experimentales obtenidos de microarrays, de manera que convierte imágenes en datos numéricos, normalizando los datos y analizando finalmente los datos normalizados. El TMEV es una aplicación que genera tonos de verde para los spots ausentes en la muestra y rojo para los spots con presencia, generando toda una escala intermedia de colores para los valores no extremos. Al aplicar TMEV en nuestros datos proteómicos nos permite una visión que facilita la identificación de patrones de expresión, en este caso de proteínas, en las diferentes muestras.

### 3.3. RESULTADOS

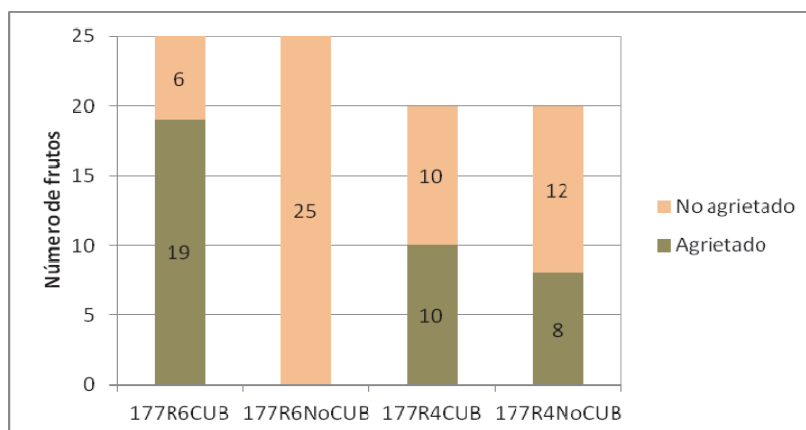
#### 3.3.1. Diferencias observadas entre las líneas hermanas

A mitad del período de cultivo se observó si existían diferencias llamativas entre las dos líneas contrastantes 177R4 y 177R6, además de recoger documentación fotográfica de varios caracteres observados. No se encontraron diferencias en la altura de la planta, en el tipo de racimo (que en ambos casos son de tipo múltiple), ni en la pilosidad. Sí se han observado diferencias en la longitud de los racimos y en el tamaño de los frutos en rojo maduro, siendo las plantas de la línea 177R4 las que presentan racimos más largos y frutos más grandes (Figura 3.6). A la vista de los datos obtenidos se extrae que el tratamiento de cubrir los frutos provoca una pequeña disminución en el tamaño final de los mismos, que afecta por igual a los frutos de las dos líneas, pero que no llega a ser significativa en ninguno de los casos.



**Figura 3.6.** Diferencias en el tamaño del fruto entre las líneas 177R4 y 177R6. (A) Tamaño medio del fruto de cada línea bajo los tratamientos aplicados de cubrir y no cubrir frutos. CUB: Cubierto. (B) Vista del extremo peduncular de los frutos en rojo maduro, del tratamiento cubierto, de las líneas 177R6 (arriba) y 177R4 (abajo).

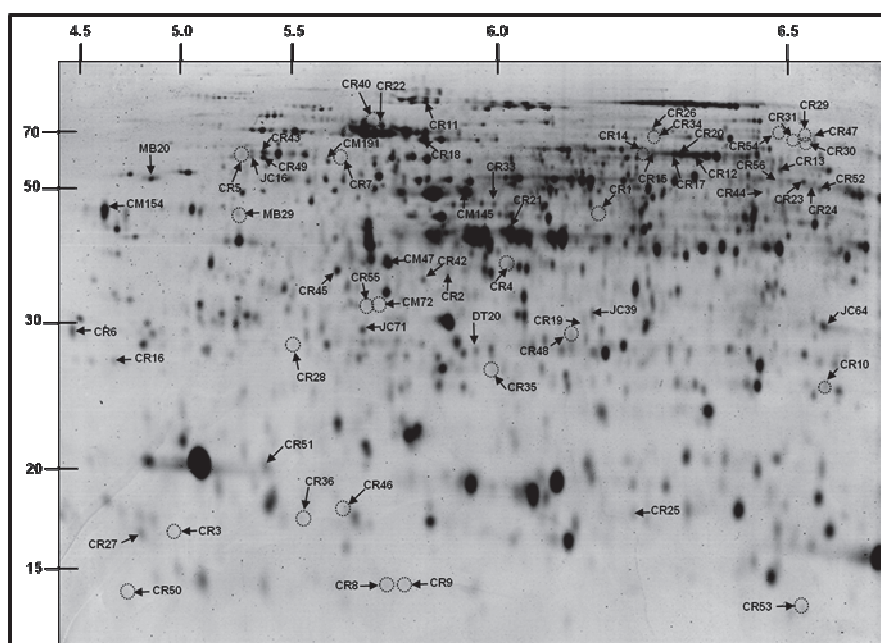
Respecto al carácter del agrietado del fruto, se evaluaron 25 frutos en condiciones normales y 25 cubiertos con aluminio, en la línea 177R6. Para la línea 177R4 fueron 20 y 20 para cada tratamiento. Los resultados muestran que en condiciones normales los frutos de la línea 177R6 no presentan agrietado, pero tras el tratamiento 19 de los 25 frutos evaluados (76%) sí mostraban agrietado. En el caso de la línea sensible, presentó el 40% de los frutos agrietados en condiciones normales, y el 50% bajo el tratamiento cubierto (Figura 3.7).



**Figura 3.7.** Número de frutos agrietados y no agrietados respecto al número total de frutos, en las líneas 177R6 y 177R4, bajo los tratamientos cubierto (CUB) y no cubierto (NoCUB).

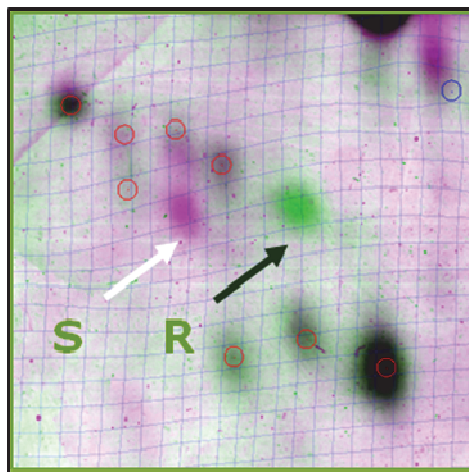
### 3.3.2. Detección de diferencias proteómicas

El rendimiento medio de la extracción de proteínas en las muestras fue de 3.67  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de peso fresco empleado, llegando algunas muestras a más de 6  $\mu\text{g}/\text{mg}$ . Estos valores se situaron por encima de los valores medios obtenidos normalmente por el laboratorio del centro INRA Avignon en las extracciones de proteínas de fruto de tomate, lo que muestra la buena adaptación del protocolo de Faurobert y col. (2007) en el laboratorio del IHSM La Mayora.



**Figura 3.8.** Gel bidimensional teñido con azul de Coomassie coloidal que recopila todos los spots encontrados en los diferentes ensayos. En el eje horizontal se relacionan los valores de punto isoeléctrico. En el eje vertical el peso molecular en kDa.

El análisis de imagen de los gels con el software Progenesis SameSpot detectó una media de 1700 spots/gel (Figura 3.8). Entre ellos se encontraron un total de 71 spots significativamente variables entre las condiciones del ensayo (Figura 3.9). De los 71 spots, 26 fueron detectados en el estado verde, aunque sólo 25 fueron significativos en el ANOVA, y 45 fueron detectados en el estado rojo, de los que 43 fueron significativos en el ANOVA.

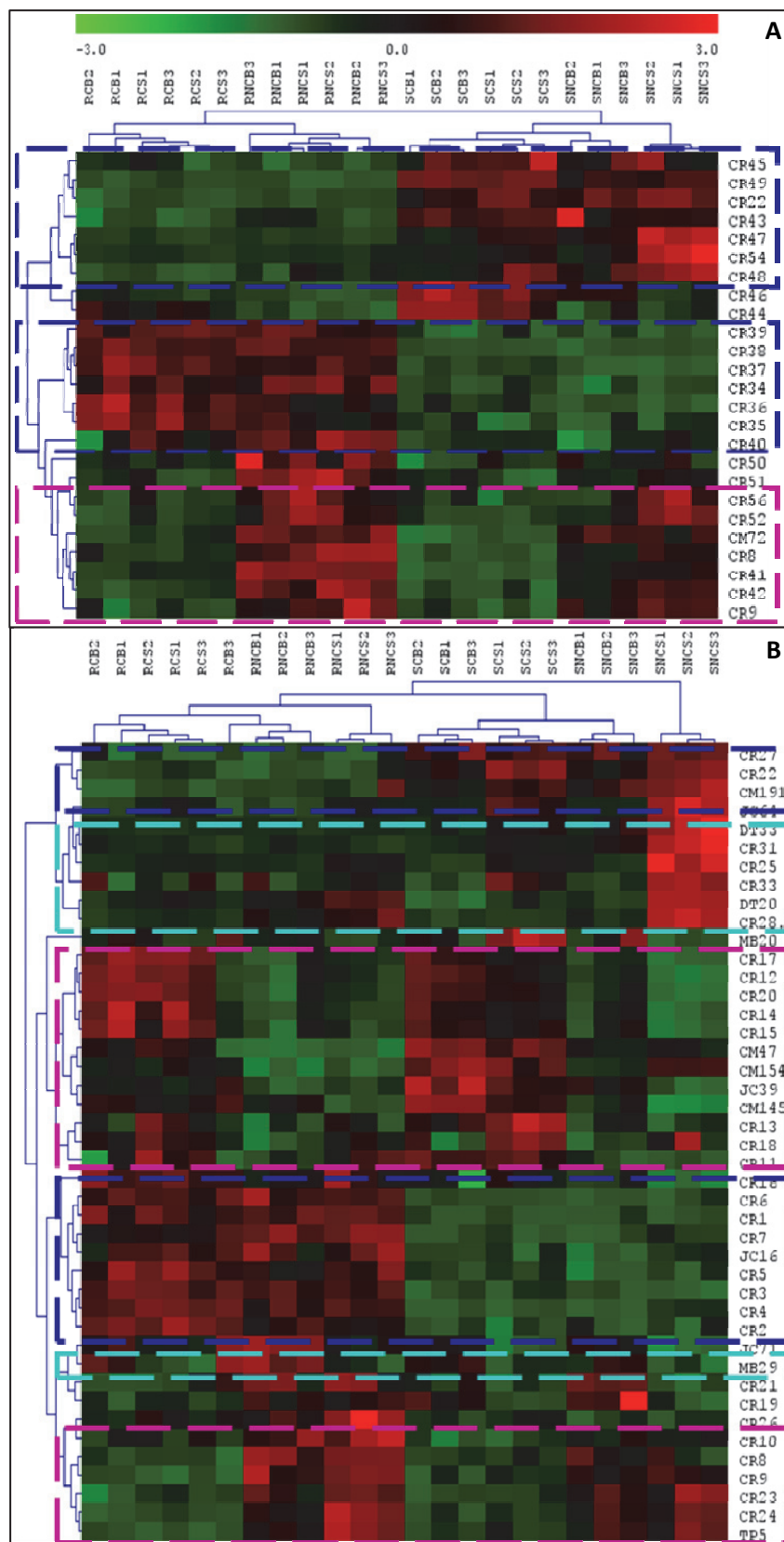


**Figura 3.9.** Detalle de un gel bidimensional analizado con el software SameSpot en el que se observa un spot diferencial entre los genotipos resistente (R) y sensible (S). Ambos spots parecen tener el mismo peso molecular, pero diferente punto isoeléctrico. El programa emplea un código de color para facilitar el análisis, en este caso asignó verde al del resistente y morado al del sensible.

**Figura 3.10.** Diagrama de color que representa los niveles de expresión de los spots significativamente variables, detectados en las muestras en el estadio verde maduro (A) y rojo maduro (B), representado por el software TMEV. Tonos de rojo: mayor expresión del spot. Tonos de verde: menor expresión y ausencia del spot. En el eje horizontal aparece la identificación de las muestras. R: Resistente vs. S: Sensible. C: Cubierto vs. NC: No cubierto. B: Bottom (zona apical) vs. S: Shoulder (zona peduncular). Los números del 1 al 3 indican la réplica de la muestra. En el eje vertical se detallan los códigos de cada spot detectado. Encuadrado en azul oscuro los spots con diferencia de expresión debidas al genotipo. Encuadrado en azul claro los spots con diferencia de expresión según la zona del fruto. Encuadrado en morado los spots con diferencia de expresión debidas al tratamiento.

### 3.3.3. Agrupación jerárquica de los spots variables

Se aplicó el software TMEV a los resultados obtenidos en el programa SameSpot y se obtuvieron los diagramas de color para los dos estadios verde maduro y rojo maduro (Figura 3.10).



### 3.3.4. Identificación de los spots variables

Tras la obtención de las secuencias peptídicas por espectrometría de masas (MALDI/TOF, LC MS/MS), se realizó la comparación frente a las bases de datos para obtener la función putativa de los péptidos. Algunos spots resultaron redundantes en su asignación, por lo que el número final de spots significativamente diferenciales en los ensayos fue de 25 en el estado verde maduro y 35 en el estado rojo maduro. Los spots diferenciales se catalogaron según su regulación al alza (estimulados) en cada tratamiento del ensayo, como se muestra en la Tabla 3.1.

**Tabla 3.1.** Número de spots que resultaron estimulados en cada tratamiento, separados según el estado de maduración del fruto.

Expresión del spot	Verde Maduro	Rojo Maduro
Estimulado en el Resistente	7	10
Estimulado en el Sensible	4	3
Estimulado por el tratamiento Cubierto	2	10
Estimulado por el tratamiento No Cubierto	7	6
Estimulado por el tratamiento No Cubierto (excepto en el hombro amarillo)	-	1
Estimulado en el Resistente no Cubierto	2	-
Estimulado en el hombro no cubierto del genotipo sensible	3	5
Total	25	35

Entre las diferencias más notables debidas al genotipo se encontró el enzima monodehidroascorbato reductasa (spot CR37 en Figura 3.10.A y CR1 en Figura 3.10.B), cuya expresión estaba suprimida en las muestras del genotipo sensible, en ambos estadios. Las diferencias más notables debidas al efecto del tratamiento se observaron en las muestras de ambos estadios, donde los frutos no cubiertos tenían alta expresión de varias proteínas relacionadas con la fotosíntesis, entre ellas el precursor de la cadena larga de la ribulosa bifosfato carboxilasa (spot CR52 en Figura 3.10.A) y el precursor de la proteína de unión 3C de la clorofila a-b (spot CR8 en Figura 3.10.B). Los frutos cubiertos no presentan expresión de este grupo de proteínas. En el estadio rojo los frutos cubiertos mostraron altos niveles de proteínas relacionadas con respuesta al estrés, como las lipoxigenasas (spot CR12 en Figura 3.10.B); y relacionadas con la maduración como el precursor de la poligalacturonasa-2 (spot CR13 en Figura 3.10.B).

Los efectos debidos a la zona del fruto sólo se detectaron en el estadio rojo maduro. En el tejido amarillo de la mancha solar se encontraron altos niveles de expresión de proteínas relacionadas con la proteólisis (spots DT33 y CR31 en Figura 3.10.B), el estrés y la respuesta a estrés oxidativo (spots DT20, CR25 y CR28 en Figura 3.10.B). En la zona apical de los frutos resistentes no cubiertos estaba expresándose la proteína DIP-1, responsable de la respuesta a estrés hídrico (spot MB29 en Figura 3.10.B).

### 3.3.5. QTLs asociados a mancha solar

Se han detectado hasta 5 QTLs asociados a mancha solar, situados en los cromosomas 3, 4, 8, 10 y 11. De ellos sólo el QTL situado en el cromosoma 4 es significativo al 99% (Tabla 3.2).

**Tabla 3.2.** Relación de QTLs detectados para mancha solar. Los QTLs se han nombrado según la abreviatura del carácter en inglés, seguida del número del cromosoma. Para el Interval Mapping se detalla el marcador más cercano asociado al QTL (columna Locus) y su posición en cM.

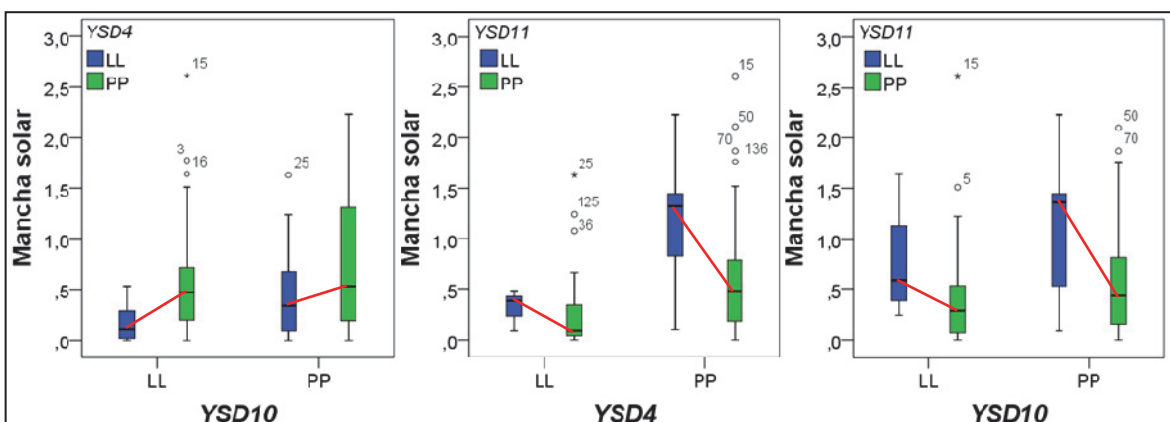
QTL	cM	Locus	LOD	$\mu A$	$\mu H$	$\mu B$	PVE	Ad <sup>a</sup>
YSD3	74,7	sol_62348	2,78	0,68	0,53	0,38	7,3 ns	0,15
YSD4	51,2	SNP_322a	4,62	0,26	0,46	0,66	11,8**	-0,20
YSD8	52,7	sol_4431	2,75	0,39	0,54	0,69	7,2 ns	-0,15
YSD10	25,9	sol_17859	2,10	0,42	0,54	0,67	5,6 ns	-0,13
YSD11	36,0	sol_62658	2,77	0,94	0,71	0,48	7,3 ns	0,23

LOD: Log del cociente entre las probabilidades asociadas.  $\mu A$ : Media estimada de la distribución del carácter para las líneas homocigotas *lyc*.  $\mu H$ : Media estimada de la distribución del carácter para las líneas heterocigotas.  $\mu B$ : Media estimada de la distribución del carácter para las líneas homocigotas *pim*. PVE: Porcentaje de Varianza Fenotípica Explicada. \*\*  $P \leq 0.01$ , ns no significativo. <sup>a</sup> El signo de la aditividad se refiere al efecto del alelo *lyc*. sol: solcap\_snp\_sl.

El QTL YSD4 asociado a **mancha solar** se localiza en 52.6 MB en el mapa físico. El QTL YSD11 asociado a **mancha solar** se localiza en 3.9 MB en el mapa físico y es uno de los dos QTLs en los que los alelos *S. lycopersicum* favorecen la aparición de la mancha. El QTL YSD10 asociado a **mancha solar** se localiza en 2.3 MB en el mapa físico, y coincide con el QTL *GSh10* detectado en el capítulo 1, que se corresponde con el gen

*GLK2* (Powell et al. 2012), conocido como el marcador morfológico *u* (*uniform ripening*), responsable de generar hombro verde oscuro en los frutos verdes en las especies silvestres, y que en esta población lo aporta el parental *S. pimpinellifolium*. El QTL *YSD8* asociado a **mancha solar** se sitúa en 53.2 MB en el mapa físico, coincide justo en la misma zona del gen *Green ripe-like 1 (GRL1)*. Este gen, que es un parálogo del gen *GR* cuya mutación causa que se mantengan cloroplastos y clorofila en el fruto de tomate maduro (Ma et al. 2012), codifica una proteína transmembrana implicada en la señalización mediada por etileno. El QTL *YSD3* asociado a **mancha solar** provocada por los alelos de la especie cultivada, se localiza en 63.8 MB en el mapa físico, y coincide en la misma región genómica con el QTL asociado al tamaño del fruto *FW3* detectado en el capítulo 1, situado en 64.2 MB.

Se intentó analizar la relación entre los 5 QTLs asociados a mancha solar, representando los valores fenotípicos asociados a cada genotipo, mediante diagramas de cajas agrupados que enfrentan los QTLs de dos en dos. Los QTLs *YSD4*, *YSD10* e *YSD11* mostraron pautas diferentes según fueran los alelos (manifestadas por las diferentes pendientes de las rectas que unen sus valores medianos) que indican la existencia de interacciones epistáticas entre ellos, cuando fueron analizados dos a dos, como se puede observar en la Figura 3.11. El resto de relaciones entre los QTLs mostraron un carácter no epistático sino aditivo (no mostradas). En cualquier caso, la dispersión de los valores de las RILs para cada genotipo de dichos QTLs enfatiza la gran complejidad genética del carácter.



**Figura 3.11.** Representación gráfica de las interacciones epistáticas entre los QTLs *YSD4*, *YSD10* e *YSD11*. LL y PP representan los homocigotos de los parentales *lyc* y *pim* respectivamente. Las líneas rojas unen los valores de la mediana de cada genotipo del QTL en ordenadas, para mostrar la tendencia del cambio según el genotipo en el eje de abscisas.

Los valores de aditividad de cada QTL muestran que la combinación alélica que provocaría mayor propensión a tener mancha es la presencia de los alelos LL/PP/PP/PP/LL para los QTLs *YSD* de los cromosomas 3/4/8/10/11 respectivamente. Se han encontrado 3 RILs con dicha combinación alélica, que mostraron mancha solar notoria. Se comparó el valor medio de la mancha solar de cada RIL con el peso medio del fruto y se observó una asociación positiva entre ambos caracteres (Tabla 3.3), pero que no es posible analizar estadísticamente sólo con 3 RILs. Para tener más datos de la relación entre mancha solar y tamaño del fruto se presentan en la misma Tabla 3.3 los alelos presentes en los 4 QTLs de tamaño de fruto detectados en la población (*FW2*, *FW3*, *FW11* y *FW12*)

**Tabla 3.3.** Valores medios de peso del fruto y mancha solar observada de las 3 RILs que presentaron la combinación alélica de mayor propensión a mancha solar en los 5 QTLs encontrados asociados a mancha solar.

RIL	Peso fruto (g)	Mancha solar	<i>FW2</i>	<i>FW3</i>	<i>FW11</i>	<i>FW12</i>
62	20,5	1,38	PP	LL	LL	LL
116	30,4	2,32	LL	LL	LL	LL
121	26,5	2,00	LL	LL	PP	PP

### 3.4. DISCUSIÓN

El tratamiento aplicado de cubrir los frutos para evitar la radiación solar sobre ellos, y con ello la aparición de la mancha solar, ha mostrado además que tiene efectos en otros aspectos del desarrollo del fruto. Un primer aspecto sería el carácter agrietado del fruto, que se ve afectado según el genotipo, ya que provoca agrietado en la línea resistente a mancha solar 177R6, pero no provoca diferencias significativas en el número de frutos afectados por agrietado en la línea sensible 177R4. La cutícula del fruto, que es la estructura determinante en el agrietado del mismo, ve alteradas sus propiedades biomecánicas en condiciones de alta humedad relativa, lo que las hace más propensas a la ruptura (Matas et al. 2005; Domínguez et al. 2012). Según Domínguez y col. (2012), una alta humedad relativa y baja radiación provocan un detrimento en la cantidad de cutícula y los componentes que acumula. En el mismo estudio se determinó que la humedad relativa no afecta a las características biomecánicas de la cutícula, pero sí se ha constatado que una alta humedad relativa

provoca un incremento en la tasa de crecimiento del fruto cuando madura en la planta, hecho que favorece el agrietado. Por tanto el hecho de encerrar al fruto en un envoltorio de aluminio que permite muy poca transpiración podría provocar un ambiente de humedad alrededor del fruto que facilitaría la aparición del agrietado, al menos en algunos genotipos.

Este tratamiento, lógicamente, también afectó al sistema fotosintético del fruto dado que se suprimió la expresión de proteínas clave para la fotosíntesis, ejemplificadas en la ribulosa bifosfato carboxilasa (Spreitzer & Salvucci 2002). La variación de proteínas en frutos fue parcialmente la misma que la observada por Hattrup y col. (2007) en las hojas de plantas sombreadas. La disminución de la fotosíntesis en el fruto conlleva una disminución de los azúcares sintetizados y finalmente de los sólidos solubles del fruto, hecho que irá en detrimento del sabor y la calidad del fruto (Powell et al. 2012; Cocaliadis et al. 2014). Estos resultados hacen pensar que el método de cubrir los frutos con aluminio es un tratamiento muy útil para poder estudiar la fisiopatía y diseccionar los factores que le afectan. Sin embargo no resulta una opción para evitar la mancha solar que pueda ser aplicable a nivel comercial, ya que el proceso de cubrir los frutos no se puede plantear para grandes producciones, y hay que tener en cuenta las desventajas que pueden venir asociadas, como el agrietado y la disminución del contenido en sólidos solubles.

Los resultados de altos niveles de expresión de proteínas relacionadas con la proteólisis, el estrés y la respuesta a estrés oxidativo en el tejido de la mancha solar confirman la hipótesis de que en esa zona del fruto se sufre estrés oxidativo. Como se ha comentado en la introducción, los frutos que presentan color oscuro en el hombro verde deben de acumular más calor que el resto del fruto, por lo que en esa zona se genera un estrés térmico que el tejido de la zona debe gestionar. También debe ser importante el estrés causado por la mayor fotosíntesis en dicha zona, máxime cuando el fruto no tiene prácticamente estomas ni el mecanismo compensatorio correspondiente de la transpiración para disminuir la temperatura. La mayor diferencia encontrada entre los dos genotipos hermanos contrastantes reside en el enzima monodehidroascorbato reductasa (MDHAR) cuya expresión no se detectó en el

genotipo sensible en ambos estadios. Esta situación indicaría que el mecanismo de protección del ácido ascórbico frente al estrés oxidativo podría estar afectado muy negativamente en el genotipo sensible. MDHAR es una enzima FAD que actúa en el ciclo ascorbato-glutatión, reduciendo el monodehidroascorbato, un radical libre intermediario, y convirtiéndolo en ácido ascórbico. Este ciclo forma parte del sistema enzimático antioxidante que opera en los cloroplastos y en el citosol (Anjum et al. 2010; Gest et al. 2013). Se conoce que la actividad de las enzimas del ciclo ascorbato-glutatión se incrementa en situaciones de sequía y bajas temperaturas (Andrews et al. 2004; Gest et al. 2010). En el caso del genotipo sensible, al no expresar niveles suficientes de MDHAR, estaría en una situación de desventaja a la hora de lidiar con el daño por la radiación solar en el pericarpio del hombro del fruto. Si ese tejido no puede reparar los daños debidos al calor acumulado y las especies reactivas generadas, se producirán daños tisulares que probablemente impedirán el desarrollo normal futuro de la zona, por lo que esa zona no llegará a formar un tejido rojo maduro, sino que presentará aspecto de un tejido, ya no inmaduro, sino afectado en su desarrollo, como es la mancha solar.

La combinación alélica de los 5 QTLs detectados para el carácter que es más propensa a que aparezca la mancha solar es de alelos *lyc* (LL) para los QTLs *YSD3* e *YSD11*, y alelos *pim* (PP) para los QTLs *YSD4*, *YSD8* e *YSD10*. Tras las consultas realizadas en la web dedicada a la información genómica de la familia Solanáceas, *The Sol Genomics Network* (Fernandez-Pozo et al. 2015), no se ha encontrado ningún gen candidato que permita hacer hipótesis sobre el efecto que llevan asociado los QTLs *YSD4* e *YSD11*, pero sí para los tres QTLs restantes. *YSD10* se corresponde con el gen *GLK2* responsable del hombro verde oscuro cuando presenta los alelos PP. *YSD3* coincide con el QTL *FW3* detectado en la población y ambos incrementan el tamaño del fruto cuando presentan los alelos LL. Este QTL colocaliza, como ya es bien conocido en la bibliografía, con un gen *P450* que condiciona, en el alelo de la especie cultivada, un mayor tamaño celular y del fruto. Por último *YSD8* coincide en su localización con el gen *GRL1*, y potencia la mancha cuando presenta los alelos PP. Según Ma y col. (2012) la sobreexpresión de *GRL1* debería inducir una reducción de la respuesta a etileno, pero las plantas transformantes maduran de manera normal y no muestran el fenotipo

mutante *Gr* que se esperaría, lo que sugiere divergencias funcionales entre ambos genes *GR* y *GRL1*, así como vías diferentes de señalización por etileno. No obstante, puesto que este gen debe estar implicado en respuestas a etileno y que la fisiopatía de la mancha solar no es más que una alteración del programa normal del proceso de maduración (que es bien conocido que se dispara por esta hormona vegetal), no es descabellado en absoluto pensar que el gen *GRL1* esté implicado en la señalización del inicio del proceso de maduración, y que las posibles diferencias alélicas o de expresión entre las dos líneas parentales determinen distintos programas de maduración del fruto y, por tanto, distinta manifestación de la fisiopatía.

Por los resultados conjuntos de los estudios de QTLs y proteómica se puede establecer un modelo genético que explique la aparición de mancha solar en el fruto de tomate. En primer lugar, el gen *GLK2* que provoca una acumulación de cloroplastos funcionales en la zona peduncular del fruto, dando el fenotipo de hombro verde oscuro. Este hombro oscuro absorbe mayor radiación solar, y es posible que genere un estrés térmico en esa zona, además de generar estrés oxidativo asociado a la propia fotosíntesis aumentada en la zona. El producto del gen *MDHAR* se encarga de mantener el mecanismo de protección en el ciclo ascorbato-glutatión, que emplea el ácido ascórbico generado por la MDHAR como molécula antioxidante. Si el enzima MDHAR se expresa y está operativa, el estrés oxidativo generado en la zona del hombro verde se podrá gestionar y el tejido no sufrirá daños. En cambio si la MDHAR no se expresa, el tejido de la zona del hombro no podrá combatir adecuadamente las especies oxidantes generadas y sufrirá daños irreversibles que impedirán que evolucione a un fruto con desarrollo normal, y presentará el aspecto amarillo y de maduración aberrante característico de la mancha solar.

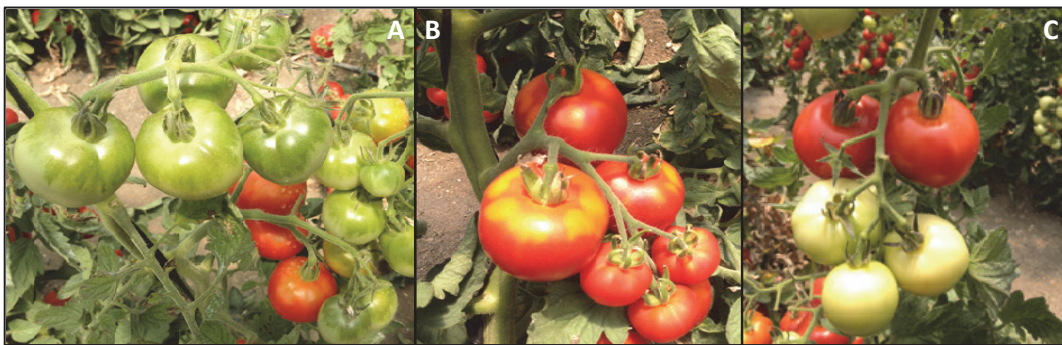
En este escenario se ha de tener en cuenta que son varios QTLs menores los que participan. Se ha observado como las 3 RILs con la combinación alélica más propensa a tener mancha, (alelos LL/PP/PP/PP/LL para los QTLs de los cromosomas 3/4/8/10/11 respectivamente) mostraron mancha solar notoria, cuyo grado de intensidad aumenta conforme aumenta el tamaño medio del fruto. Las diferencias de tamaño de fruto entre estas RILs están mediadas por otros QTLs de tamaño distintos a

*FW3* (Tabla 3.3), como por ejemplo *FW2*, ya que las 3 RILs son LL para *YSD3/FW3*. Además se observa un efecto aditivo de los QTLs de tamaño de fruto, de manera que la RIL 62, que es la que presenta menor tamaño medio del fruto, no tiene los alelos LL en *FW2*, el QTL con mayor efecto, en cambio la RIL 116 tiene los cuatro QTLs para tamaño de fruto con alelos LL; y la RIL 121, de tamaño intermedio, presenta alelos LL en *FW2* y *FW3*, los de mayor efecto, pero alelos PP en *FW11* y *FW12*. Resulta curioso el hecho de que sea el *FW3* el que aparezca relacionado con la mancha solar, y no el *FW2*, que ha mostrado ejercer un mayor efecto en el tamaño del fruto en la población RIL analizada. Esto puede deberse quizá a que *FW2* actúe mediante un mecanismo diferente del de *FW3* a la hora de promover el tamaño del fruto.

La complejidad del carácter también se muestra con la existencia de algunas RIL que sin presentar hombro verde oscuro, es decir, alelos LL en *YSD10*, presentaron mancha solar. Estas líneas presentan una combinación alélica diferente a la combinación de mayor propensión de mancha comentada antes. En esta combinación se podría postular que el QTL *YSD8* por medio del gen *GRL-1* estuviera ejerciendo un efecto parecido al gen *GLK-2*, respecto al hecho de promover mayor acumulación de clorofila en el fruto, si bien no tan localizada como ocurre en el caso del hombro verde. El efecto final del aumento de clorofila en el fruto sería una mayor generación de especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo, que volvería a conducirnos a nuestra hipótesis inicial; alternativamente, el alelo *S. pimpinellifolium* del gen candidato *GRL-1* bien podría aportar una mayor propensión a sufrir alteración del programa de la maduración aún en presencia de menor daño tisular. En cualquier caso, estas hipótesis necesitarían experimentos adicionales para su corroboración.

Para apoyar nuestra hipótesis vamos a emplear las observaciones realizadas en una nueva población de cartografiado genético obtenida a partir del cruce "Moneymaker" x TO-937 (Barrantes et al. 2014), concretamente un conjunto de líneas de introgresión (ILs) en las que, en el fondo genético del cv. "Moneymaker" se encuentra representado el genoma del *S. pimpinellifolium* TO-937 de forma que cada línea IL contiene una única introgresión conocida de *S. pimpinellifolium*. Pues bien, en observaciones realizadas en el conjunto de estas ILs, únicamente presentan mancha

solar muy notoria las líneas que contienen la introgresión de la región genómica del cromosoma 10 en la que se sitúa el gen *GLK-2* (que lógicamente presentan hombros verdes en los frutos inmaduros frente al color uniforme en “Moneymaker” y el resto de las líneas IL) (Figura 3.12). Estas líneas de introgresión contienen los alelos favorables para aparición de la mancha solar *YSD10* (hombro verde por alelos PP), *YSD3* (mayor tamaño del fruto por alelos LL) e *YSD11* (por alelos LL), y a pesar de no contener los otros QTLs favorables provenientes de *S. pimpinellifolium* (*YSD4* e *YSD8*) ya manifiestan mancha solar muy notoria.



**Figura 3.12.** (A y B) Detalle de los frutos de la línea IL-10.1, línea que porta la introgresión de parte del brazo corto del cromosoma 10 de *S. pimpinellifolium* TO-937 en el fondo genético del cv. “Moneymaker”, incluyendo la zona donde se sitúa el gen *GLK-2*. (A) Frutos verde maduro en los que se observa hombro verde oscuro. (B) Frutos rojo maduro que presentan mancha solar. (C) Detalle de los frutos del cv. “Moneymaker”, donde se observa la maduración uniforme en verde maduro (ausencia de hombro verde oscuro) y la ausencia de mancha solar en los frutos rojo maduro.

Actualmente se están realizando en el IHSM La Mayora los cruzamientos entre determinadas ILs y posterior selección de genotipos que combinen *YSD10* e *YSD11* de *S. pimpinellifolium* para observar si *YSD11* del silvestre es capaz de revertir la aparición de mancha en un contexto genético de fruto grande con hombros verdes. Si así fuese, y la línea resultante no manifestase la fisiopatía, ello daría pie para plantear la hipótesis de que *YSD11* sería la región genómica candidata para explicar el patrón de expresión de MHDAR observado en el estudio del proteoma, puesto que ni la región del cromosoma 4 ni la del cromosoma 8 cumplirían los requerimientos para ello al ser los alelos *S. pimpinellifolium* de estas dos regiones los que dan mayor propensión a la mancha.

Todas estas observaciones pensamos que son aplicables en la práctica para la mejora genética de variedades de tomate que no sean sensibles a la fisiopatía de la mancha solar, muy especialmente para tomates de tipo *cherry* que contienen en su genoma numerosas introgresiones de *S. pimpinellifolium* (Tomato Genome Consortium 2012). En estas variedades sería recomendable evitar las combinaciones génicas desfavorables mediante la selección por marcadores moleculares ligados a los QTLs aquí descritos, con especial atención a *YSD4*, ya que prácticamente todas las variedades de *cherry* comerciales tienen hombro verde, y esa combinación es propensa a generar mancha solar, como se ha demostrado en esta Memoria. El hombro verde es la condición ancestral en tomate, y además las variedades *cherry* necesitan ser *U* para mantener su sabor dulce, que es el carácter principal por el que se cultivan y seleccionan. Así por tanto, la aplicación del conocimiento de estos QTLs asociados a mancha solar, detectados en una población proveniente de *S. pimpinellifolium*, ayudará a evitar sorpresas desagradables en la calidad del fruto en el proceso de obtención vía mejora genética de nuevas variedades de tomate.

## Bibliografía

- Andrews, P.K., Fahy, D.A. & Foyer, C.H., 2004. Relationships between fruit exocarp antioxidants in the tomato (*Lycopersicon esculentum*) high pigment-1 mutant during development. *Physiologia Plantarum*, 120(4), pp.519–528. Available at: ISI:000220135100001.
- Anjum, N.A., Umar, S. & Chan, M.T., 2010. *Ascorbate-Glutathione Pathway and Stress Tolerance in Plants*, Springer Netherlands. Available at: [https://books.google.es/books?id=HUgvF\\_9EwHcC](https://books.google.es/books?id=HUgvF_9EwHcC).
- Barrantes, W. et al., 2014. Highly efficient genomics-assisted development of a library of introgression lines of *Solanum pimpinellifolium*. *Molecular Breeding*, 34, pp.1817–1831.
- Cocaliadis, M.F. et al., 2014. Increasing tomato fruit quality by enhancing fruit chloroplast function. A double-edged sword? *Journal of Experimental Botany*, 65(16), pp.4589–4598. Available at: <http://jxb.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/jxb/eru165>.
- Domínguez, E. et al., 2012. Tomato fruit continues growing while ripening, affecting cuticle properties and cracking. *Physiologia Plantarum*, 146(4), pp.473–486. Available at: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01647.x>.
- Faurobert, M., Mihr, C., et al., 2007. Major proteome variations associated with cherry tomato pericarp development and ripening. *Plant Physiology*, 143(3), pp.1327–1346. Available at: ISI:000244757700023.
- Faurobert, M., Pelpoir, E. & Chaïb, J., 2007. Phenol Extraction of Proteins for Proteomic Studies of Recalcitrant Plant Tissues. In H. Thiellement et al., eds. *Plant Proteomics SE - 2. Methods in Molecular Biology*. Humana Press, pp. 9–14. Available at: <http://dx.doi.org/10.1385/1-59745-227-0%3A9>.
- Fernandez-Pozo, N. et al., 2015. The Sol Genomics Network (SGN)--from genotype to phenotype to breeding. *Nucleic acids research*, 43(Database issue), pp.D1036–41. Available at: <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/long/43/D1/D1036> [Accessed December 3, 2015].

- Ferry-Dumazet, H. et al., 2005. PROTICdb: A web-based application to store, track, query, and compare plant proteome data. *PROTEOMICS*, 5(8), pp.2069–2081. Available at: <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.200401111>.
- Francis, D.M., Barringer, S.A. & Whitmoyer, R.E., 2000. Ultrastructural characterization of yellow shoulder disorder in a uniform ripening tomato genotype. *Hortscience*, 35(6), pp.1114–1117. Available at: ISI:000089964200030.
- Gest, N. et al., 2010. Response of the Fruit Antioxidant System to the Post-Chilling Period in Two Different Tomato Lines. *Functional Plant Science and Biotechnology*, 4(1), pp.76–83.
- Gest, N., Gautier, H. & Stevens, R., 2013. Ascorbate as seen through plant evolution: the rise of a successful molecule? *Journal of Experimental Botany*, 64(1), pp.33–53.
- Hattrup, E. et al., 2007. Proteomic Analysis of Shade-Avoidance Response in Tomato Leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, pp.8310–8318.
- Ma, Q. et al., 2012. Differential control of ethylene responses by GREEN-RIPE and GREEN-RIPE LIKE1 provides evidence for distinct ethylene signaling modules in tomato. *Plant Physiology*, 160(December), pp.1968–1984.
- Matas, A.J. et al., 2005. Relative humidity and temperature modify the mechanical properties of isolated tomato fruit cuticles. *American journal of botany*, 92(3), pp.462–8. Available at: <http://www.amjbot.org/content/92/3/462>.
- Picha, D. & Hall, C., 1981. Influences of potassium, cultivar, and season on tomato graywall and blotchy ripening. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 106(6), pp.704–708. Available at: ISI:A1981MZ03400003.
- Powell, A. et al., 2012. Uniform ripening Encodes a Golden 2-like Transcription Factor Regulating Tomato Fruit Chloroplast Development. *Science*, 336(June), pp.1711–1715.
- Saeed, A.I. et al., 2003. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *BioTechniques*, 34(2), pp.374–378.
- Spreitzer, R.J. & Salvucci, M.E., 2002. Rubisco: structure, regulatory interactions, and

possibilities for a better enzyme. *Annual review of plant biology*, 53, pp.449–475.

Tomato Genome Consortium, 2012. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, 485(7400), pp.635–41. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3378239&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> [Accessed August 7, 2013].

Venter, F., 1965. Investigation of green-back of tomatoes. In pp. 99–101.

Wang, W. et al., 2006. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. *Electrophoresis*, 27(13), pp.2782–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16732618> [Accessed March 24, 2013].



## Conclusiones

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten establecer las siguientes conclusiones:

1. En el análisis de genética cuantitativa de los numerosos caracteres vegetativos y de calidad externa e interna de fruto acometidos en este trabajo, mediante la utilización de una población de líneas recombinantes consanguíneas derivadas de un cruce *Solanum lycopersicum* x *Solanum pimpinellifolium* y un mapa de ligamiento muy saturado, se han detectado QTLs que no habían sido descritos previamente en otros estudios, como son *SW11* asociado al diámetro del tallo, *FS2.1* y *FS2.2* asociados a la forma del fruto, *PP2.1/BkS2.1* asociados al porcentaje del peso del pericarpo y marcado del hombro y *TA6* asociado a la acidez del fruto, entre otros.
2. Se ha obtenido una pareja de líneas recombinantes hermanas, contrastantes para el carácter mancha solar que comparten gran parte de su fondo genético y que son un material muy valioso para los estudios fisiológico y genético de esta fisiopatía.
3. La etiología de la mancha solar no se encuentra, como se había creído previamente, en la incidencia de un exceso de radiación solar en el momento de la maduración del fruto sino en la fase de verde inmaduro y que se manifiesta posteriormente en la fase de maduración, al haberse constatado que evitar la radiación solar por completo desde el inicio del desarrollo del fruto hasta 16 días post anthesis disminuye sustancialmente su incidencia, llegando incluso a impedirla. Por otra parte, limitar la incidencia de radiación UV sobre el fruto no evita la incidencia de la mancha solar.
4. La presencia de hombro verde oscuro en el fruto verde, aunque es una de las condiciones que la favorecen, no implica necesariamente la aparición de mancha solar. Como hipótesis general más plausible para la aparición de la

mancha solar, se plantea que la generación de estrés oxidativo en el tejido en condiciones ambientales propicias debido a la presencia de hombros verde oscuro, y que no puede ser adecuadamente corregido debido a los bajos niveles de expresión del enzima monodehidroascorbato reductasa (MDHAR) en el fruto de la especie de tomate cultivada, como se ha constatado en el análisis proteómico de este trabajo, provoque daño tisular en la zona peduncular del fruto inmaduro que se refleja posteriormente en una maduración alterada limitada a la zona afectada.

5. Una evaluación muy exhaustiva de la incidencia de mancha solar en la población RIL permitió la detección de un QTL mayor en el cromosoma 4 y hasta cuatro QTLs menores en los cromosomas 3, 8, 10 y 11, asociados al carácter. Ambos parentales poseen a la vez alelos favorables y desfavorables para la aparición de la mancha solar y, por tanto, la sensibilidad o resistencia a esta fisiopatía de una línea concreta dependerá en gran medida de la combinación alélica de algunos de los QTLs mencionados.

## Anexos y Protocolos



**Anexo 1.1. Caracteres vegetativos observados en la población RIL.**

Se han estudiado caracteres del desarrollo vegetativo de las plantas, incluyendo algunos del tipo de inflorescencia, muchos de ellos son los habitualmente empleados en la caracterización primaria del germoplasma de tomate según las directrices del *International Plant Genetic Resources Institute* (IPGRI, 1996).

**Color del hipocótilo:** Se observó el color del hipocótilo en las plántulas con 18 días, dándoles los siguientes valores relativos:

- Valor 1: Verde.
- Valor 2:  $\frac{1}{4}$  morado desde la base.
- Valor 3:  $\frac{1}{2}$  morado desde la base.
- Valor 4: Morado.

**Tipo de crecimiento:** Se da el valor 0 cuando las plantas son determinadas y el valor 1 cuando son indeterminadas. En las RILs las plantas determinadas se podían definir como pseudodeterminadas porque seguían creciendo por los brotes laterales.

**Longitud de la planta:** La altura se midió en las plantas RILs cuando habían pasado 103 días desde la siembra de semillas.

**Diámetro del tallo:** El diámetro del tallo se midió por encima de la segunda hoja, cuando habían pasado 147 días desde la siembra de semillas.

**Pubescencia:** Se realiza observando tallos y hojas. Se le da valor relativo desde 1 (pubescencia escasa) a 3 (pubescencia abundante).

**Distancia entre los racimos:** Se mide la distancia entre los racimos 1 y 2.

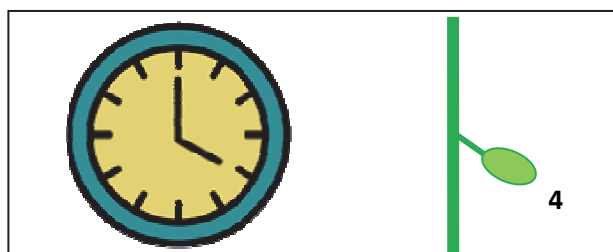
**Número de hojas entre racimos:** Se mide el número de hojas entre los racimos 1 y 2.

**Distancia entre hojas:** Se mide la distancia entre las hojas más alejadas situadas entre los racimos 1 y 2.

**Número de hojas hasta primer racimo:** Se contó el número de hojas desde la base de la planta hasta el racimo 1.

**Densidad del follaje:** Se estimó la densidad del follaje de las plantas. Se dieron valores relativos desde 1 (follaje escaso) a 3 (follaje abundante).

**Inclinación de la hoja:** Se observó el grado de inclinación de la hoja respecto al tallo principal de la planta. Se observaron 3 hojas entre los racimos 2 y 3. Se dieron valores entre 0 y 6, siguiendo un modelo guiado por la posición de las agujas del reloj entre las 0 y las 6 horas (Figura A.1).



**Figura A.1.** Representación de un ejemplo de valoración de la inclinación de la hoja según un modelo que sigue las agujas del reloj. Valor 4 en inclinación de hoja respecto al tallo.

**Grado de división de la hoja:** Se observó el grado de división de la hoja, anotando el número de veces que se dividía la hoja, teniendo el valor 1 la planta con hojas divididas una vez (pinnada) y valor 2 la planta con hojas divididas dos veces (bipinnada).

**Borde del foliolo:** Se observó el grado de división de los bordes de la hoja. Se valoró de 0 a 2, siendo el valor 0 el de los bordes más suavizados; hasta el valor 2, como el valor de los bordes más incisos.

**Posición de los folíolos en los 2 extremos de la hoja:** Se observó la posición de los folíolos primero y último de las hojas. Se dieron valores entre 0 y 6, siguiendo un modelo guiado por la posición de las agujas del reloj entre las 0 y las 6 horas, teniendo como punto de referencia el tallo (Figura A.1).

**Giro del follaje:** Se observó el sentido de giro del follaje en toda la planta. Se dieron valores de 1 cuando fue dextrógiro y -1 cuando fue levógiro. En algunas RIL se le dio el valor 2 cuando había plantas con 1 y -1.

**Tamaño de foliolo diferente:** Se observó si en la misma hoja los foliolos presentaban el mismo o diferente tamaño, asignándole 0 ó 1 respectivamente. Para este carácter todas las RIL, los parentales y la F1 tuvieron valor 1.

**Inserción del foliolo:** Se observó en las plantas si el foliolo se insertaba en la hoja a través de un peciolo (valor 0) o si por el contrario estaba sentado en la hoja (valor 1). De encontrarse ambas situaciones en la misma hoja/planta se le dio el valor 0.5.

**Rizado del foliolo:** Se observó en las plantas si los foliolos presentaban un aspecto plano o semiplano (valor 0, normal), o si por el contrario los foliolos se rizaban sobre sí mismos (valor 1). También se anotó la presencia de hojas convolutas en la planta.

## **Anexo 1.2. Caracteres de la inflorescencia observados en la población RIL.**

**Tipo de inflorescencia:** Se observan los racimos del 1 a 10 de cada planta y se anota el número de racimos que se ramifican (multíparos) respecto a esos 10. Se calcula el porcentaje de racimos múltiparos, dándoles los siguientes valores relativos:

- Valor 1: Porcentajes menores del 35%.
- Valor 2: Porcentajes entre el 35% y el 65%.
- Valor 3: Porcentajes mayores de 65%.

**Número de flores por inflorescencia:** Se anota el número de flores/frutos del racimo 2 y del racimo 6 de cada planta.

**Presencia de tallo tras el racimo:** Se observa la parte final de los racimos. Se le da valor 0 si los racimos finalizan de manera normal en fruto. Si finalizan en una hoja se le da valor 0,5 y si finalizan en un tallo de extensión variable se le da valor 1.

**Color de la corola:** Se observa el color de la corola, distinguiendo 3 intensidades de amarillo valoradas de 1 a 3, desde un amarillo claro a un amarillo fuerte.

**Fusión de la corola:** Se observa el grado de fusión de los pétalos de la corola, valorando como 0 la fusión parcial de los pétalos y 1 la fusión total.

**Ángulo de apertura-exposición de la flor:** Se observa el ángulo de apertura que presentan las flores de las RILs, dándoles los siguientes valores relativos:

- Valor 1: La flor se abre como máximo de manera aproximada a un ángulo de 90°.
- Valor 2: La flor presenta un ángulo intermedio entre 90° y 180°.
- Valor 3: La flor llega a un ángulo de 180° o superior.

**Tamaño relativo de la flor:** Se describió el tamaño relativo de las flores de las RILs, dándole valores entre 1 y 3, desde menor a mayor tamaño.

**Posición del estilo:** Se describió la posición del estilo respecto a la corola, estableciéndose 4 valores:

- Valor 1: el estilo está inserto en la corola y no sobresale.
- Valor 2: el estilo se sitúa justo al borde de la corola.
- Valor 3: el estilo sale 1-2 mm de la corola.
- Valor 4: el estilo es muy exerto y sobresale más de 2 mm de la corola.

**Dehiscencia de la antera:** Se observó la forma de dehiscencia de la antera. Para este carácter todas las RIL, los parentales y la F1 tuvieron siempre dehiscencia de la antera longitudinal, ya que es un carácter taxonómico conocido de ambas especies parentales.

### **Anexo 1.3. Caracteres externos del fruto observados en la población RIL.**

**Color del fruto verde:** Se recogen datos de color del fruto verde, empleando un colorímetro (MINOLTA CHROMA METER CR-400) que mide el color de forma objetiva en el espacio de color CIELab, para más detalles consultar el Anexo 1.5. De cada una de las plantas analizadas se selecciona un fruto del racimo 2-4 y se toman 2 datos por fruto, uno en la zona peduncular (zona 1) y otro en la zona apical (zona 2).

**Rayas verdes en el fruto:** De cada una de las plantas analizadas se selecciona un fruto del racimo 2-4. Se anota si el fruto presenta rayas de color verde oscuro longitudinales, dándoles los siguientes valores relativos:

- Valor 0: Ausencia de rayas.
- Valor 1: Presencia de rayas suaves.
- Valor 2: Presencia de rayas intensas.

**Intensidad de hombros verdes:** De cada una de las plantas analizadas se selecciona un fruto del racimo 2-4. Se anota si el fruto presenta hombro de color verde más oscuro que el resto del fruto, dándoles los siguientes valores relativos:

- Valor 0: Ausencia de hombro verde.
- Valor 1: Presencia de hombro verde suave.
- Valor 2: Presencia de hombro verde intenso.

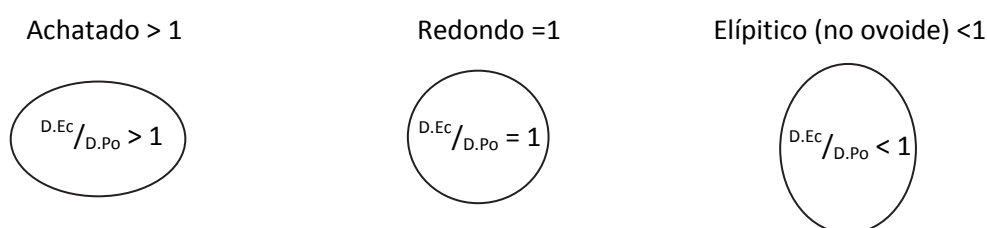
**Pubescencia del fruto verde:** De cada una de las plantas analizadas se selecciona un fruto del racimo 2-4. Se anota el grado de pubescencia que presenta el fruto, dándoles los siguientes valores relativos:

- Valor 0: Ausencia de pubescencia.
- Valor 1: Presencia leve de pubescencia.
- Valor 2: Presencia de pubescencia abundante.

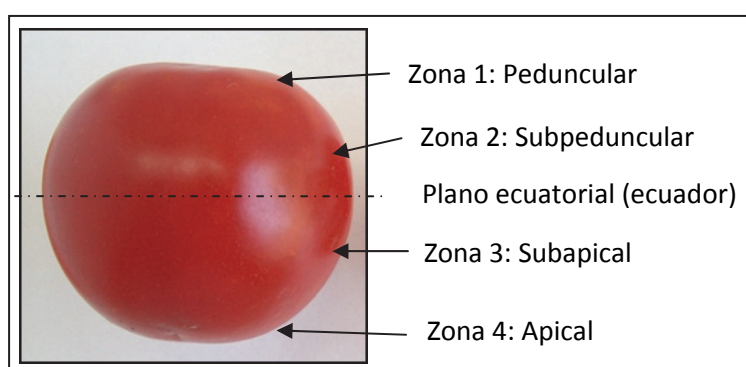
**Peso:** Se anota el **peso** de cada fruto y también se recoge el **peso del pericarpo**, una vez se retira el mucílago y las semillas del fruto, ya que con este dato se puede obtener

el **porcentaje del fruto que se corresponde con el pericarpo**. Los datos de peso se expresan en logaritmo en base 10 del peso en gramos.

**Diámetro ecuatorial y polar:** Se mide el **diámetro ecuatorial** (perímetro del fruto por el plano ecuatorial en su parte más ancha) y el **diámetro polar** (perímetro del fruto que pasa por el centro de la cicatriz peduncular y de la cicatriz estilar) de cada fruto, con un calibre o pie de rey. Al dividir el diámetro ecuatorial entre el polar ( $D.Ec/D.Po$ ) se obtiene un valor numérico de la **forma** que presenta el fruto, que se representa en el siguiente esquema:



**Color del fruto rojo maduro:** Se toman los datos de color del fruto rojo maduro, empleando un colorímetro (MINOLTA CHROMA METER CR-400) que mide el color de forma objetiva en el espacio de color CIE Lab, para más detalle ver Anexo 1.5. Se toman 4 datos por fruto, como se representa en la Figura A.2, uno en la zona peduncular (zona 1), otro entre la zona 1 y el ecuador (zona 2), otro entre el ecuador y la zona apical (zona 3) y otro en la zona apical (zona 4).

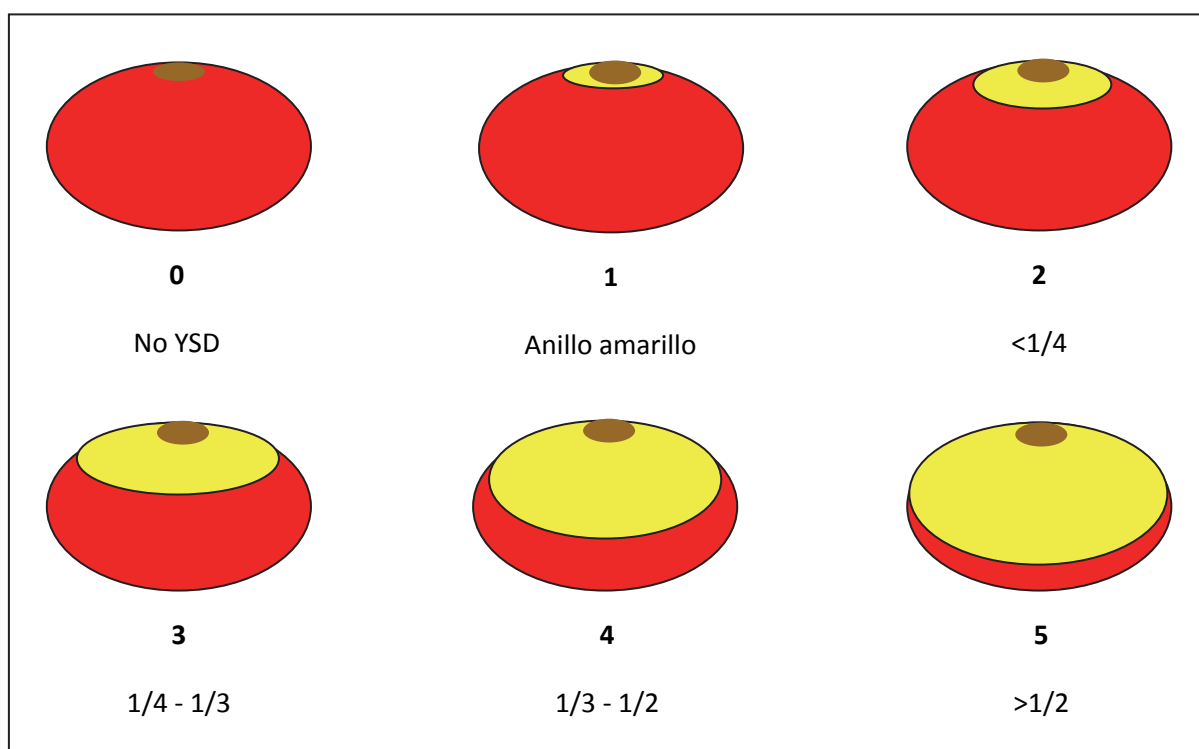


**Figura A.2.** Representación y denominación de las zonas del fruto donde se tomaron los datos de color con el colorímetro.

**Presencia de mancha solar.** Se mide de manera visual y de manera objetiva creando dos índices:

- **Índice de mancha solar observada:** Se anota el grado de mancha solar que presentan los frutos, dándoles diferentes valores relativos ():

- Valor 0: Ausencia de mancha solar.
- Valor 1: Mancha solar muy leve o difusa, de 1-2 mm de radio. Se correspondería con el llamado anillo amarillo, zona muy reducida del pericarpio alrededor de la cicatriz peduncular que presenta color amarillo.
- Valor 2: Mancha solar que abarca menos de  $\frac{1}{4}$  del fruto.
- Valor 3: Mancha solar que abarca entre  $\frac{1}{4}$  y  $\frac{1}{3}$  del fruto.
- Valor 4: Mancha solar que abarca entre un  $\frac{1}{3}$  y  $\frac{1}{2}$  del fruto.
- Valor 5: Mancha solar que afecta a más de  $\frac{1}{2}$  del fruto.
- 



**Figura A.3.** Representación de la asignación del valor del índice visual de mancha solar observada según la extensión de la mancha en el fruto rojo.

- **YSD Index:** Para evaluar la mancha solar de manera objetiva se puede emplear como índice simple la diferencia entre el valor del parámetro de color  $H^*$  de la zona peduncular (hombro) y la zona apical, denominándose diferencia de H (diffH). También se empleó un índice desarrollado por Darrigues, Francis y col. durante la puesta a

punto del sistema TACT (*Tomato Analyzer-color Test*) (2008). Este índice se denomina YSD index, derivado del inglés *Yellow Shoulder Disorder*, en cuya fórmula, obtenida por comunicación personal con el Dr. David Francis, es más compleja, ya que tiene en cuenta los valores de H\* y L\* de las diferentes zonas del fruto.

$$YSD\ Index = \left( \frac{H_{zona\ apical}^*}{45} + \frac{L_{zona\ apical}^*}{48} + \frac{H_{zona\ peduncular}^* - H_{zona\ apical}^*}{6} \right)$$

**Brillo:** Se anota el grado de brillo que presentan los frutos, dándoles diferentes valores relativos:

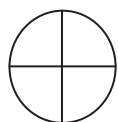
- Valor 0: No brillante, mate.
- Valor 1: Poco brillante.
- Valor 2: Brillante.
- Valor 3: Muy brillante.

**Forma del hombro (zona peduncular):** Se observa la forma del hombro y dependiendo del grado de hundimiento de la cicatriz peduncular se le dan diferentes valores relativos:

- Valor 0: Hombro no hundido.
- Valor 1: Hombro poco hundido.
- Valor 2: Hombro hundido.
- Valor 3: Hombro muy hundido.

**Forma de la sección polar:** Se evalúa la forma del fruto en el plano que va de un polo a otro del fruto (de la cicatriz peduncular a la cicatriz estilar). Como se ha comentado en el apartado anterior de los diámetros, al dividir el diámetro ecuatorial entre el polar (D.Ec/D.Po) nos da un valor numérico de la **forma** del fruto. El dato “forma de la sección polar” viene a complementar el dato de “forma del fruto” (cociente de los diámetros) y se limita a señalar si el valor máximo del diámetro ecuatorial está a la altura del punto medio del diámetro polar, como sería el caso de los 3 ejemplos mostrados en el apartado de los diámetros, a los que se les daría valor 0.5 en la forma de sección polar.

Si por el contrario el valor máximo del diámetro ecuatorial de un fruto está desplazado hacia los hombros y se cruza con el diámetro polar en su mitad superior, dándole al fruto forma de corazón o pimiento, se le daría un valor de 0.25. El caso en el que el diámetro ecuatorial está desplazado hacia la zona apical tendría un valor de 0.75.



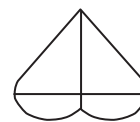
$$\frac{D.Ec}{D.Po} = 1$$

$$\text{Sec.Polar} = 0.5$$



$$\frac{D.Ec}{D.Po} = 1$$

$$\text{Sec.Polar} = 0.25$$



$$\frac{D.Ec}{D.Po} = 1$$

$$\text{Sec.Polar} = 0.75$$

**Forma de la zona apical:** Se observa la forma de la zona apical y dependiendo del grado de hundimiento de la cicatriz estilar se le dan diferentes valores relativos:

- Valor -1: Cicatriz estilar hundida (fruto con ombligo).
- Valor 0: Cicatriz estilar plana.
- Valor 1: Cicatriz estilar elevada (fruto con pezón).
- 

**Agrietado:** Se evalúa la incidencia del agrietado en cada uno de los frutos recogidos para el estudio de QTLs asociados a los caracteres de calidad de fruto. Para el agrietado se establecen 5 categorías:

- Valor 0: Ausencia de agrietado.
- Valor 1: Inicio de agrietado, concéntrico, en la cicatriz peduncular.
- Valor 2: Agrietado inicial en cicatriz que continúa por el fruto unos milímetros.
- Valor 3: Agrietado en cicatriz y radial que abarcan más de  $\frac{1}{3}$  del fruto.
- Valor 4: Agrietado por diferentes zonas que llegan a abarcar más de la mitad del fruto.

En relación con el agrietado también se evalúa la incidencia del russeting o suberización de la cutícula, dando el valor 1 a su aparición leve y el valor 2 cuando se presenta con mayor intensidad o extensión.

**Pilosidad:** Se evalúa la densidad y longitud de la pilosidad en cada uno de los frutos recogidos para el estudio de QTLs asociados a los caracteres de calidad de fruto. Para la densidad se establecen 6 categorías:

- Valor 0: Ausencia de pilosidad.
- Valor 1: Pilosidad muy baja.
- Valor 2: Pilosidad baja.
- Valor 3: Pilosidad media.
- Valor 4: Pilosidad alta.
- Valor 5: Pilosidad muy alta.

Para describir la **longitud de la pilosidad** cuando la hubiere se establecen 4 categorías:

- Valor 0: Ausencia de pilosidad.
- Valor 1: Pilosidad corta.
- Valor 2: Pilosidad media.
- Valor 3: Pilosidad larga.

**Grosor del pericarpio en sección ecuatorial:** Una vez se cortan los frutos por el plano ecuatorial y se retira el mucílago, en el proceso de preparación de la muestra para análisis de calidad interna, se mide el grosor o ancho del pericarpio con un calibre o pie de rey.

**Color interno del pericarpio:** Se observa el color del interior del pericarpio y se asigna a cada fruto 2 valores relativos de color, según la Tabla A.1. El primer valor hace referencia al color general. El segundo valor es igual que el primero si el color es uniforme o diferente si el fruto en su interior tiene algunas zonas de diferente color. De esta manera también se evalúa la uniformidad del color:

**Tabla A.1.** Tabla representativa de la asignación del valor del color para los caracteres de color interno del pericarpo y uniformidad del color interno.

Escala de color	Color interior del pericarpo	Color diferente en alguna zona
Rojo oscuro	5	5
Rojo	4	4
Rojo claro	3	3
Amarillo	2	2
Verde		1

**Forma de la sección ecuatorial:** Se evalúa la forma del fruto en el plano ecuatorial. Se distingue entre frutos redondos o redondeados a los que se les da valor 0, y frutos con los lóculos marcados en mayor o menor medida, a los que se les da el valor 1 (Figura A.4).



**Figura A.4.** Frutos que representan la forma de la sección ecuatorial. Izquierda: Frutos con sección ecuatorial de valor 0. Derecha: frutos con sección ecuatorial de valor 1.

En relación con este carácter se recoge también el nivel de **marcado externo de los hombros**. Se distingue entre frutos con hombros “algo marcados” a los que se les da el valor 1, y el marcado puede afectar sólo a los hombros y no notarse a nivel del plano ecuatorial; y frutos con los hombros “más marcados”, llegando a marcarse también todo el lóculo, a los que se les da el valor 2.

**Número de lóculos y simetría:** Los datos del número de lóculos y su posición simétrica o no, se toman en cada uno de los frutos recogidos para el estudio de QTLs asociados a los caracteres de calidad de fruto.

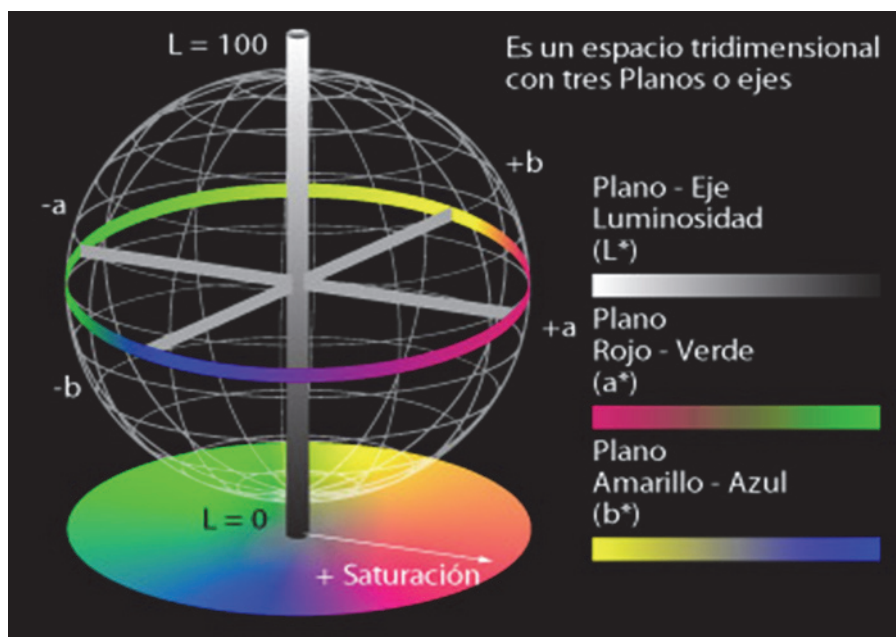
**Anexo 1.4. Caracteres de calidad interna del fruto medidos en la población RIL.**

Para realizar la medida de los caracteres de calidad interna se parte de las muestras de pericarpo conservadas en los viales, preparadas y congeladas, tal y como se ha descrito en el apartado 1.2.2. (Capítulo 1). Los viales se descongelan cerrados, se tritura su contenido con un politrón y al puré obtenido se le aplicó el siguiente protocolo.

- a. Cuantificación de licopeno, empleando 0,25-0,35 g del puré (Protocolo 1.1).
- b. Obtención del sobrenadante del puré mediante centrifugación del vial (6000 rpm durante 18 minutos) para el resto de análisis.
- c. Cuantificación de sólidos solubles, empleando el sobrenadante (Protocolo 1.2).
- d. Cuantificación de glucosa, fructosa y sacarosa, para lo que se realiza una dilución de 20  $\mu\text{L}$  de sobrenadante en 80  $\mu\text{L}$  de agua y se congela para su análisis posterior (Protocolo 1.3).
- e. Medida de la acidez titulable, empleando 1-1,5 mL del sobrenadante (Protocolo 1.4).

### Anexo 1.5. ¿Qué es el Espacio CIELab de medida del color?

La medida física del color se ha realizado de manera histórica con el empleo de 3 valores primarios de luz cuya mezcla da lugar al color resultante, de ahí que se le da el término de *tristimulus*. Estos 3 valores son nombrados como X, Y y Z por la *Commission Internationale de l'Eclairage* (CIE), que es el nombre francés de la comisión internacional de la luz. Sin embargo tras varios años de uso se encontraron dos problemas con el uso del sistema *tristimulus*. El primero era que con esta especificación no se interpreta de manera fácil los términos psicofísicos de la percepción del color, como el brillo, el tono y la saturación. El segundo problema era que el sistema XYZ y los diagramas cromáticos que lleva asociados no resultaban uniformes. Por estos motivos se desarrolló el espacio CIELab (*Commission Internationale de L'Eclairage* 1978), que deriva del sistema *tristimulus* y aplica a los valores XYZ determinadas fórmulas con el objetivo de definir el color empleando un espacio tridimensional compuesto por 3 planos o ejes. Tal y como se muestra en la Figura A.5, de los 3 ejes del espacio CIELab, el eje  $a^*$  va del rojo ( $+a^*$ ) al verde ( $-a^*$ ), el eje  $b^*$  del amarillo ( $+b^*$ ) al azul ( $-b^*$ ) y el eje  $L^*$ , en vertical, define la luminosidad, desde 0 que es la ausencia de color hasta 100 que es blanco. El plano formado por los ejes  $a^*$  y  $b^*$  es un círculo, que se va moviendo perpendicularmente a lo largo del eje  $L^*$ , y según la altura a la que se sitúe, el color presentará mayor o menor luminosidad.

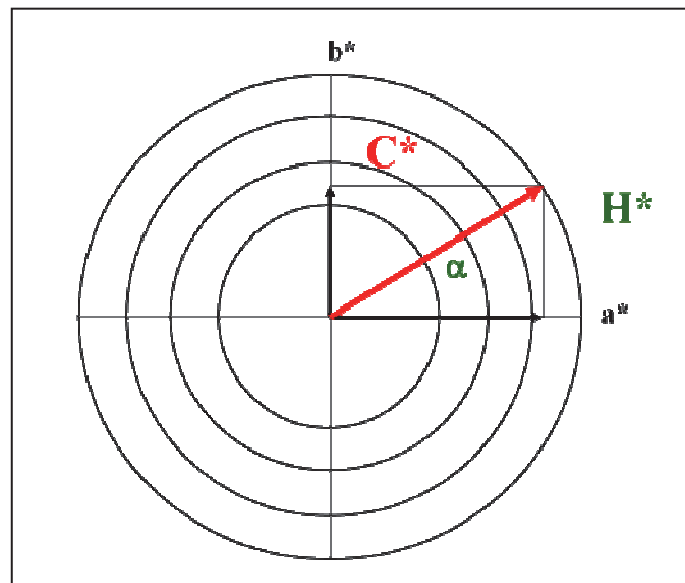


**Figura A.5.** Representación del espacio de color CIELab, donde se muestran los 3 ejes que lo conforman,  $a$ ,  $b$  y  $L$ .

En el plano  $a^*-b^*$  (Figura A.6) se pueden determinar los parámetros  $H^*$  y  $C^*$  que caracterizan el color y que se obtienen a partir de los valores en los ejes  $a^*$  y  $b^*$  para cada color.  $C^*$  (*Chroma*) es una medida de la saturación del color y se define como la hipotenusa del triángulo que se forma usando los valores de  $a$ ,  $b$  y el punto de origen como vértices.  $H^*$  (*Hue-angle*), medido en grados, es una medida del color tal y como lo conocemos y se define como el ángulo ( $\alpha$ ) que se forma entre el eje  $a^*$  y el vector  $C^*$ .

En resumen los 3 parámetros que caracterizan un color son:

- $H^*$  ó *Hue-angle*, lo que entendemos como el color o tono.
- $C^*$  o *Chroma*, que informa del grado de saturación del color.
- $L^*$  o luminosidad, el grado de claro u oscuro que es el color.



**Figura A.6.** Representación del plano  $a^*-b^*$  del espacio CIELab, mostrando el origen de los parámetros  $H^*$  y  $C^*$

Para las medidas objetivas de la superficie externa del fruto de tomate en este estudio se ha utilizado un colorímetro (MINOLTA CHROMA METER CR-400) que proporcionaba los datos de *tristimulus*  $X$ ,  $Y$  y  $Z$  utilizando el iluminante  $C$ . Los datos tomados por el colorímetro se descargaron en una hoja de cálculo de Microsoft Excel programada al efecto en la que mediante las fórmulas introducidas siguiendo las recomendaciones de CIELab, se obtuvieron los valores de  $L^*$ ,  $a$ ,  $b$ ,  $C^*$  y  $H^*$  para cada dato tomado.

Respecto a la aplicación del espacio CIELab en la medida de color del fruto de tomate, en un estudio realizado en diferentes variedades de tomate (Sacks & Francis 2001) midiendo el color del fruto en el espacio CIELab con un colorímetro (CR-100, Minolta) se encontró correspondencia entre los datos objetivos de color y la percepción subjetiva, ya que los frutos más rojos mostraban valores de  $H^*$  más bajos ( $32^\circ$ ), mientras que los valores más altos eran exhibidos por frutos naranjas ( $45^\circ$ ) o amarillos ( $90^\circ$ ). Las diferencias en el valor de  $H^*$  que se detectaron entre los diferentes genotipos se propuso que se podían deber a diferencias en el tipo de pigmentos, en la proporción de esos pigmentos o en ambos factores a la vez. Así como las diferencias en  $L^*$  y  $C^*$  probablemente reflejaran diferentes concentraciones de pigmento. En el estudio también se observó una correlación positiva entre los valores de  $L^*$  y  $H^*$ , lo que conlleva que los frutos más luminosos, con valores altos de  $L^*$ , tienden a ser más anaranjados ( $H^*$  más alto) que los frutos más oscuros, que tienden a ser más rojos.

### Protocolo 1.1. Cuantificación de licopeno y $\beta$ -caroteno

Se realiza mediante una extracción de los carotenoides en una mezcla de disolventes orgánicos y medición de la absorbancia del extracto a determinadas longitudes de onda, aplicando para el cálculo final una fórmula que tiene en cuenta el coeficiente de extinción molar para el licopeno en hexano (Fish et al. 2002):

- En una habitación con luz reducida se pesan 0,25-0,35 g del puré en un matraz de 100 mL tarado y envuelto en papel de aluminio para minimizar la incidencia de la luz.
- Se añade agua destilada para diluir 1:1 (w/w).
- Se añaden los disolventes: 10 mL de hexano, 5 mL de 0,05% (w/v) butilhidroxitolueno (BHT) en acetona y 5 mL de etanol al 95%. El BHT tiene función antioxidante.
- Los matraces se colocan en un contenedor con hielo y se agitan en un agitador orbital a 180 rpm durante 15 minutos.
- Se para la agitación para añadir 3 mL de agua desionizada a cada matraz y se vuelven a agitar durante 5 minutos más.
- Se para la agitación y los matraces se dejan a temperatura ambiente durante 5 min para permitir la separación de fases.
- La absorbancia de la capa de hexano (la superior) se mide en una cubeta de cuarzo de 1 cm a una  $\lambda$  de 487 y 503 nm, frente a un blanco de hexano (Figura A.7).



**Figura A.7.** Detalle de la separación de fases durante el protocolo y de la medida de absorbancia del extracto de carotenoides.

El contenido en licopeno se estimará en  $\mu\text{g/g}$  de tejido, según la fórmula señalada debajo:

$$\text{Licopeno } (\mu\text{g/g tejido}) = \frac{A_{503} \times 31,2}{g \text{ tejido}}$$

La fórmula se obtiene aplicando el coeficiente de extinción molar para el licopeno en hexano, ( $17,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Ese coeficiente de extinción a 503 nm en hexano coincide para otros carotenoides y, según Fish (2002), se calcula que los otros carotenoides aparte del licopeno contribuyen a la absorbancia a 503 nm en menos de un 4% para tomate rojo fresco, estimando que este ensayo para licopeno daría resultados razonables para aquellos alimentos en los que el licopeno sea al menos el 70% de los carotenoides. El contenido en  $\beta$ -caroteno se estimará en  $\mu\text{g/g}$  de tejido, según la fórmula señalada debajo:

$$\beta - \text{caroteno } (\mu\text{g/g tejido}) = \frac{\left(\frac{A_{487}}{85827} - \frac{A_{503}}{172000}\right) \times 536.9 \times 10000}{g \text{ tejido}}$$

### Protocolo 1.2. Cuantificación de sólidos solubles totales.

El contenido en sólidos solubles totales se midió en °Brix, que es una unidad de medida del índice de refracción, empleando un refractómetro. Por definición un grado Brix es el índice de refracción de una disolución de sacarosa en agua al 1%. Los cultivares comerciales actuales suelen oscilar entre 4 y 6 °Brix dependiendo del genotipo y de las condiciones ambientales. Los sólidos solubles en el tomate maduro suponen alrededor del 4% en peso del fruto fresco; de ellos, y de esta fracción, los azúcares reductores (glucosa y fructosa a partes iguales) suponen alrededor del 60%, los ácidos orgánicos (cítrico y en menor medida, málico) alrededor del 20%, otros compuestos orgánicos (vitaminas, pigmentos, proteínas, etc.) alrededor del 10%, y las sales minerales el resto (Buret & Zerbini 1991).

En este trabajo la medida se realizó mediante un refractómetro digital (Atago PR-101), con un rango de medición de 0.0 a 45.0% Brix (Figura A.8). La medida del blanco se realiza con una gota de agua destilada y a continuación, tras secarla, se debe depositar en el lector el sobrenadante obtenido de centrifugar el puré de la muestra (Buret & Zerbini 1991), unos 130  $\mu$ L mínimo, para que cubran la superficie del lector y realizar la medida.



**Figura A.8.** Detalle del refractómetro empleado para la medición del contenido en sólidos solubles del jugo del tomate.

### **Protocolo 1.3. Cuantificación de glucosa, fructosa y sacarosa**

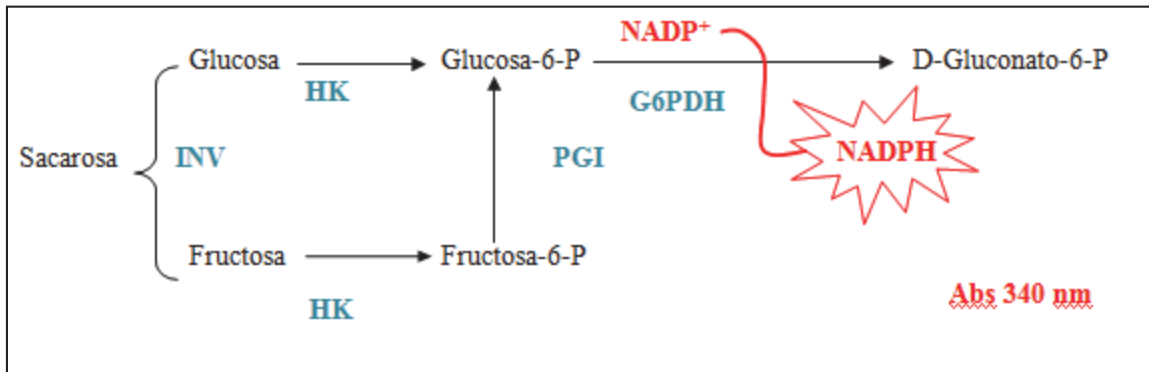
Los azúcares reductores en el fruto de tomate son la glucosa y la fructosa. La medida del contenido en glucosa, fructosa y de las pequeñas cantidades de sacarosa que puedan estar presentes en los frutos maduros se realizó por el método enzimático desarrollado en Velterop y col. (2001). Para medir la glucosa y fructosa presentes en la muestra se utilizan diferentes enzimas que, paso a paso, como se ve en la Figura A.9, van convirtiendo la glucosa y la fructosa de la muestra hasta llegar a D-gluconato-6-P, en cuyo proceso de formación se genera nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) que puede ser medido en un espectrofotómetro a una  $\lambda$  de 340 nm. El protocolo tiene varias fases según las enzimas que se van añadiendo. Antes de cada fase se añaden los sustratos de las reacciones enzimáticas (ATP y NADP+) para que no sean limitantes. La absorbancia base (A1) se mide tras añadir los sustratos y la muestra, antes del paso 1.

El proceso comienza al añadir la Hexokinasa (HK) y la Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), que convierten la glucosa de la muestra en D-Gluconato-6-P y se mide la absorbancia para medir el NADPH generado. Esta es la absorbancia 2 (A2). La diferencia entre la absorbancia después de este paso (A2) y la absorbancia base antes de añadir la enzimas (A1) sirve para calcular la glucosa presente en la muestra. La fructosa presente en la muestra es medida en el paso 2, pero en el paso 1 la fructosa pasa a fructosa-6-P por la acción de la HK.

En la segunda fase al añadir la Fosfoglucoisomerasa (PGI), la fructosa-6-P obtenida en el paso 1 pasa a glucosa-6-P, que reacciona con la G6PDH añadida en el paso 1 y pasa a D-Gluconato-6-P, y se mide la absorbancia para medir el NADPH generado. Esta es la absorbancia 3 (A3). La diferencia entre la absorbancia después de este paso (A3) y la absorbancia después del primer paso (A2) sirve para calcular la fructosa presente en la muestra.

En el caso que se quiera medir la sacarosa hay que realizar un paso inicial con la enzima Invertasa (INV) que hidroliza una molécula de sacarosa en una de glucosa y una

de fructosa. Después se realiza el paso 1 explicado arriba, en el que la HK y la G6PDH convierten la glucosa en D-gluconato-6-P y se mide por la liberación de NADPH.



**Figura A.9.** Esquema del protocolo enzimático diseñado para cuantificar la glucosa, fructosa y sacarosa en el zumo del fruto de tomate. INV Invertasa, HK Hexokinasa, G6PD Glucosa-6-P deshidrogenasa, PGI Fosfoglucoisomerasa. NADP<sup>+</sup> y NADPH Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato.

Para poder trabajar en el rango que ofrece el protocolo las muestras congeladas que habían sido diluidas 1:5, según el anexo 4 paso d, hay que diluirlas previamente al análisis a 1:20, de manera que el factor de dilución que hay que aplicar al resultado final será de 1:100.

#### Protocolo 1.4. Medida de la acidez titulable

Los ácidos más abundantes en el tomate maduro son el cítrico y el málico (Sakiyama 1966). La acidez titulable se midió de una manera directa en el sobrenadante obtenido de centrifugar el puré de la muestra, siguiendo el protocolo publicado por Buret y Zerbini (1991) con una modificación, debido al tamaño de muestra disponible. El protocolo original emplea 10 mL del sobrenadante diluidos en 90 mL de agua, y se realiza la titulación de la muestra manteniéndola en agitación, mientras se va añadiendo una solución de NaOH 0,1 N hasta alcanzar el punto de pH 8,1. El resultado se expresa en meq de ácido cítrico/100 mL. El protocolo permite el uso de un valorador automático que facilita el análisis, ya que va añadiendo la solución de NaOH de manera automática mientras mide el pH de manera continua y se detiene cuando alcanza el punto de pH deseado.

En el caso de las muestras a analizar en este trabajo, era imposible disponer de 10 mL de sobrenadante, por lo que se adaptó el ensayo al empleo de 1 mL de sobrenadante diluidos en 99 mL de agua, y se realizó la titulación de la muestra con una solución de NaOH 0,01 N hasta alcanzar el punto de pH 8,1. Igualmente el resultado se expresa en meq/100 mL, ya que tanto la muestra como la solución de NaOH se emplean diluidas en la misma proporción. Todas las muestras se analizaron con un Valorador Semiautomático (Schott Titroline 96) (Figura A.10).



**Figura A.10.** Detalle del valorador semiautomático empleado para la titulación de la acidez.

## Bibliografía

- Buret, M. & Zerbini, P.E., 1991. *Measurement of the quality of tomatoes: Recommendations of an EEC working group* 1st ed. P. E. Zerbini, F. Gorini, & A. Polesello, eds., Milano: Istituto Sperimentale per la Valorizzazione Tecnologica dei Prodotti Agricoli.
- Commision Internationale de L'Eclairage, 1978. Recommendations on uniform color spaces-color difference equations, psychometric color terms. *Paris: CIE*.
- Fish, W.W., Perkins-Veazie, P. & Collins, J.K., 2002. A quantitative assay for lycopene that utilizes reduced volumes of organic solvents. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15(3), pp.309–317. Available at: ISI:000178070200009.
- IPGRI, 1996. Descriptors for Tomato (*Lycopersicon* spp.). International Plant Genetic Resources Institute, Rome, p 29. Available at: [http://www.biodiversityinternational.org/fileadmin/user\\_upload/online\\_library/publications/pdfs/286.pdf](http://www.biodiversityinternational.org/fileadmin/user_upload/online_library/publications/pdfs/286.pdf).
- Sacks, E.J. & 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*, 126(2), pp.221–226. Available at: ISI:000166998700011.
- Sakiyama, R., 1966. Changes in acid contents of tomato fruits during development. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 35(1), pp.36–42.
- Velterop, J.S. & Vos, F., 2001. A rapid and inexpensive microplate assay for the enzymatic determination of glucose, fructose, sucrose, L-malate and citrate in tomato (*Lycopersicon esculentum*) extracts and in orange juice. *Phytochemical Analysis*, 12(5), pp.299–304. Available at: ISI:000170983500002.

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es uno de los vegetales más importantes en el mundo, formando parte de la alimentación en diferentes culturas. La especie comprende más de 100 tipos diferentes y miles de variedades que presentan entre ellas grandes diferencias, no sólo en el aspecto externo del fruto, siendo el color, la morfología y el tamaño las más llamativas; sino en relación a su calidad organoléptica, atendiendo al sabor y el aroma en la mayoría de los casos. Existen numerosos estudios con el interés obvio por mejorar la resistencia de la planta de tomate a plagas y patógenos que afecten a la producción, sin embargo son menos los estudios que han tratado de mejorar la calidad del fruto, así como de profundizar en el conocimiento de los mecanismos que afectan a los atributos sensoriales, y que pueden tener orígenes complejos que engloban factores genéticos y ambientales. En esta tesis se presentan resultados sobre el aspecto genético de factores que afectan a la calidad del fruto de tomate y se aportan resultados clave para el entendimiento de la fisiopatía de la mancha solar, que provoca una merma de la calidad del fruto.



**Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea La Mayora (IHSM-UMA-CSIC)**

**Dpto. Biología Vegetal. Universidad de Málaga.**

