



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

**IDENTIFICACIÓN DE QTLs QUE CONTROLAN CARACTERES DEL FRUTO EN
TOMATE POR SECUENCIACIÓN DE GRUPOS DISCREPANTES**



Ing. Agr. Dana Valeria Vazquez

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS AGRARIAS

**DIRECTOR: Gustavo Rubén Rodríguez
CO- DIRECTOR: Javier Hernán Pereira da Costa**

AÑO 2022

**IDENTIFICACIÓN DE QTL QUE CONTROLAN CARACTERES DEL FRUTO EN TOMATE
POR SECUENCIACIÓN DE GRUPOS DISCREPANTES**

Dana Valeria Vazquez
Ingeniera Agrónoma– Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Agrarias, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido previamente presentada para la obtención de otro título en ésta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario, durante el período comprendido entre 2016 y 2021, bajo la dirección de los Drs. Gustavo R. Rodríguez y Javier H. Pereira da Costa.

Ing. Agr. (Esp) Vazquez, Dana V.

Ing. Agr. (Dr.) Rodríguez, Gustavo R.

Lic. Bio. (Dr.) Pereira da Costa, Javier H.

Defendida:de 2022

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mis directores, el Dr. Gustavo Rodríguez y el Dr. Javier Pereira da Costa, por enseñarme con paciencia y dedicación, guiarme y acompañarme en cada etapa de este Doctorado. Gracias también por haberme dado libertad para aprender y desarrollarme como profesional en el camino de la Ciencia. Pero sobre todas las cosas, agradezco su gran calidad humana, y los valores que me han transmitido más allá de lo académico. Lo que me han brindado en estos años de trabajo, impactó en mi Carrera, y en mi vida. Su ejemplo me ayudó a intentar ser mejor profesional y hacer algo que me apasiona, a pesar de las dificultades. También, quiero agradecer especialmente a la Dra. Roxana Zorzoli. Su alegría, su amor y pasión por la Genética y su dedicación en la Docencia, sembraron en mí los sentimientos que me llevaron a elegir esta profesión y me guían en cada paso.

También, es mi deseo agradecer a todos los integrantes de la Cátedra de Genética de la Facultad de Ciencias Agrarias (UNR), por su colaboración, por transmitirme con generosidad y humildad sus conocimientos, y por inculcarme el valor de un grupo, que hoy siento como mi familia. Quiero agradecer también por permitirme colaborar y compartir conmigo su experiencia en la Docencia. Cada uno de ustedes, ha dejado una huella muy positiva en mí y me ha enseñado cosas que valoro y guardo siempre.

A mis compañeros de la “Sala de Becarios” por las charlas, los almuerzos, las risas, y también por apoyarme en los momentos de preocupaciones o frustraciones. Gracias por estar presentes y compartir el día a día. Quiero agradecer en especial a Vladi, por todos estos años de trabajo y por compartir su experiencia con generosidad y paciencia. Agradezco además, a esas personas maravillosas con las que coincidí en cursos, trabajo en el laboratorio y en el campo, y que se convirtieron en mis amigas. Gracias Agus, Baby, Cele, Luci, Maga, Mai, Mara, Meli, Pau y Shir, son lo más valioso que me dejó este Doctorado.

A todos los ayudantes de la Cátedra de Genética que colaboraron en mi trabajo de tesis, y al personal no docente de la Sección Horticultura del Campo Experimental les agradezco profundamente su contribución en la realización de los ensayos. Quiero agradecer también al Ing. Agr. David Balaban, por su gran ayuda para mantener mis ensayos, especialmente durante la pandemia de COVID-19 de los últimos años.

A mi familia y amigos, su amor y su apoyo me sostienen y me dieron las herramientas para lograr cada meta en mi vida. A mi hermana Daniela, la primer persona y con la que compartí todo, gracias por tu cariño y tus palabras justas en cada momento. Y a Bruno, gracias por ser mi compañero a cada paso, por tu impulso y cariño siempre.

Finalmente le agradezco a CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas) por haber financiado mi carrera de posgrado.

Dana

PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS

Los datos, resultados y conclusiones descritas en la presente Tesis han formado parte de las siguientes publicaciones en revistas científicas

- **Vazquez, D. V.**, Pereira da Costa, J. H., Godoy, F. N., Cambiaso, V., y Rodríguez, G. R. (2022). Genetic basis of the lobedness degree in tomato fruit morphology. *Plant Science*. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2022.111258>.
- Spetale F, Murillo J, **Vazquez DV**, Cacchiarelli P, Rodríguez GR, Tapia E (2020). LocAnalyzer: a computer vision method to count locules in tomato fruits. *Computers and Electronics in Agriculture* 173: 105382. 10.1016/j.compag.2020.105382

Principales trabajos presentados en Congresos y Reuniones Científicas

Internacionales

- **Vazquez DV**, Pereira da Costa JH, Cambiaso V, Godoy FIN, Rodríguez GR (2021). Impact of LC and FAS alleles on cross-section fruit morphology traits in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) germplasm. XLII Congreso de la Sociedad Española de Genética (online) del 14 al 18 de junio de 2021.
- **Vazquez DV**, Cambiaso V, Pereira da Costa JH, Rodríguez GR (2019). Identificación *in silico* de nuevas regiones genómicas asociadas al carácter tipo de carpelo en frutos de tomate (*Solanum lycopersicum*). XVII Congreso Latinoamericano de Genética. Mendoza, Argentina. Septiembre de 2019. JBAG 30 (Suppl): 277.
- **Vazquez DV**, Cambiaso V, Pereira da Costa JH, Rodríguez GR (2018). Broad and narrow sense heritability for fruit morphology traits in a interespecific tomato cross. International Congress of Genetics. Lugar: Foz do Iguazú, Brasil. Fecha: 10 al 14 de septiembre de 2018.
- **Vazquez DV**, Pereira da Costa JH, Illa-Berenguer E, van der Knaap E, Rodríguez GR (2016). Mapeo del carácter tipo de carpelo en fruto de tomate (*Solanum lycopersicum*) por secuenciación de grupos discrepantes. XVI Congreso Latinoamericano de Genética ALAG y XLV Congreso Argentino de Genética. Lugar: Montevideo, Uruguay. Fecha: 9 al 12 de Octubre de 2016.

Nacionales:

- **Vazquez DV**, Cambiaso V, Pereira da Costa JH, Rodríguez GR (2020). Detección de regiones genómicas que controlan la regularidad externa de los frutos de tomate por análisis de *QTL-seq*. XLVIII Congreso Argentina de Genética Modalidad Virtual. JBAG 31 (Suppl. 1): 34. **Mención al mejor poster: Sesión Genética Vegetal**
- **Vazquez DV**, Cambiaso V, Pereira da Costa JH, Rodríguez GR. Confirmación de la posición genómica del *locus* que controla tipo de carpelo en frutos de tomate y detección de *QTL* de morfología relacionados (2017) XLVI Congreso Argentino de Genética. Lugar: San Fernando del Valle de Catamarca, Catamarca. Fecha: 1 al 4 de Octubre de 2017.
- **Vazquez DV**, Pedemonte E, Pereira da Costa JH, Zorzoli R, Rodríguez GR. Caracteres de fruto en tomate: variabilidad genética y acción génica (2016). XVIII Congreso y XXXVI Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Lugar: Rosario, Santa Fe. Fecha: 5 y 6 de Diciembre de 2016.

ÍNDICE

Abreviaturas y símbolos	2
Resumen	3
Abstract	5
Introducción	6
Hipótesis	14
Objetivo general.....	14
Capítulo I: Diversidad genética para caracteres de forma de frutos en la dirección medio-lateral	15
Objetivos específicos	16
Materiales y métodos	17
Resultados	20
Discusión	28
Conclusiones parciales	30
Capítulo II: Caracterización fenotípica y estimación de parámetros genéticos en genotipos uniformes (progenitores e híbridos) en cruzamientos intraespecíficos	31
Objetivos específicos	32
Materiales y métodos	33
Resultados	38
Discusión	44
Conclusiones parciales	46
Capítulo III: Identificación de loci que controlan el carácter tipo de carpelo en la población F₂ “Voyage” x “Old Brooks”	47
Objetivos específicos	48
Materiales y métodos	49
Resultados	59
Discusión	73
Conclusiones parciales	75
Capítulo IV: Detección de QTL asociados a caracteres cuantitativos en poblaciones segregantes derivadas de cruzamientos intraespecíficos	76
Objetivos específicos	77
Materiales y métodos	78
Resultados	91
Discusión	118
Conclusiones parciales	122
Consideraciones finales.....	123
Conclusión final.....	125
Bibliografía.....	126
Anexo	1369



ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

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

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ANOVA: análisis de la variancia

ARN: ácido ribonucleico

BSA: *Bulked Segregant Analysis* o análisis de grupos segregantes

Cr: cromosoma

CTAB: bromuro de cetil-trimetil-amonio

HCl: ácido clorhídrico

InDel: inserciones/deleciones

L: porcentaje de reflectancia

LOD: Logarithm Of Odds o logaritmo de probabilidades

pb: pares de bases

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

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

SNP: *Single Nucleotide Polymorphism* o polimorfismos de nucleótido simple

TSP: Trisodio fosfato



RESUMEN

La forma del fruto es un rasgo clave en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) que influye en el rendimiento, la calidad y la aceptabilidad del consumidor. Los caracteres de la forma de fruto en la dirección medio-lateral, como el grado de irregularidad, están altamente relacionadas con otros caracteres como el tamaño y el peso de fruto. A pesar de esto, hasta el momento los estudios de la morfología de fruto se han enfocado en caracteres en la dirección próximo-distal. La gran diversidad de formas de frutos que existe en el germoplasma de tomate se explica principalmente por una cantidad relativamente pequeña de genes, entre los cuales *LC* y *FAS* son los principales genes que controlan la morfología en la dirección medio-lateral. El efecto de los mismos difiere según el fondo genético, lo que sugiere la presencia de modificadores desconocidos. Las actuales tecnologías de genotipado de alto rendimiento han permitido la identificación de genes con efecto menor o modificador que interactúan con los principales reguladores de la forma del fruto del tomate, a través de la caracterización de poblaciones intraespecíficas segregantes donde el efecto de los genes principales se encuentra fijo. La metodología *QTL-seq* ha sido útil para descubrir nuevos *QTL* subyacentes a características importantes de las plantas. En base a estos antecedentes, se plantea que es posible identificar regiones genómicas no conocidas que controlan caracteres de morfología del fruto en tomate a partir de la selección de cruzamientos entre cultivares fenotípicamente discrepantes en los que no segregan los genes conocidos de forma, utilizando la metodología de *QTL-seq*. El objetivo de este trabajo fue identificar nuevas regiones en el genoma de tomate que controlan caracteres de morfología del fruto a partir de cruzamientos entre cultivares fenotípicamente discrepantes e idéntica constitución génica en *loci* de morfología conocidos. Se evaluó la diversidad fenotípica y genética para caracteres de forma de frutos en la dirección medio-lateral sobre un total de 183 materiales representativos de la diversidad presente en tomate para forma y tamaño de fruto, clase de germoplasma y origen geográfico. Se demostró que existía variabilidad genética para los caracteres de forma de frutos analizados en la dirección medio-lateral. La combinación de los alelos cultivados de *LC* y *FAS* no fue suficiente para explicar toda la variabilidad presente en el germoplasma de tomate, y la constitución alélica se correlacionó principalmente con los caracteres de tamaño de fruto y número de lóculo y en menor nivel con el grado de irregularidad. A partir de este estudio se seleccionaron cuatro cultivares de tomate: “Voyage” (V), “Old Brooks” (OB), “Yellow Stuffer” (YS) y “Heinz 1439” (H), con la misma composición alélica para los genes principales de forma y divergentes para la morfología de fruto. Dichos cultivares se diferenciaron principalmente para los caracteres de morfología en la dirección medio-lateral, donde el grado de irregularidad mostró el mayor valor de heredabilidad. Remarcablemente, el cultivar “Voyage” presentó flores con gineceos apocárpicos y frutos con carpelos no fusionados en una sutura carpelar normal, siendo un fenotipo exclusivo de este material dentro del germoplasma del tomate. El tipo de carpelo afecta fuertemente la forma externa de fruto. Por su naturaleza cualitativa, dicho carácter presenta elevada heredabilidad. El desarrollo de la sincarpia (fusión de los carpelos en un gineceo compuesto unificado) es un aspecto evolutivo clave en las angiospermas con numerosas ventajas adaptativas, sin embargo el proceso inverso se ha encontrado previamente en distintas especies. El estudio de este carácter en tomate, resulta un enfoque novedoso con relevancia histórica, morfogénica y económica. Se



desarrollaron poblaciones segregantes a partir del cruzamientos entre VxOB. Se determinó que el fenotipo tipo de carpelo normal o fusionado fue dominante sobre el no fusionado, y el tipo de herencia resultó variable, ajustándose a una segregación monogénica y epistasis doble dominante-recesiva en la población F_2 analizada en una campaña agrícola y a una epistasis doble recesiva en las poblaciones F_2 y retrocruzas analizadas en otra campaña. Por medio de un análisis *QTL-seq* se identificaron tres regiones genómicas, en los cromosoma 3, 6 y 10, que presentaron polimorfismos diferenciales entre grupos fenotípicamente extremos para el carácter tipo de carpelos. Se desarrollaron 29 marcadores moleculares de ADN para caracterizar genotípicamente las regiones genómicas identificadas. Los marcadores moleculares cubriendo las regiones de los cromosomas 3 y 10 resultaron independientes del carácter tipo de carpelos, mientras que los marcadores ubicados en la base del cromosoma 6, entre las posiciones 40,98 Mb y 44,17 Mb, se encontraron altamente asociados a dicho rasgo. Esto indica que los determinantes genéticos que controlan el tipo de carpelo se ubican en la región basal de este cromosoma. Se desarrollaron y caracterizaron dos poblaciones segregantes F_2 derivadas del cruzamientos entre VxOB y YSxH, y se caracterizaron para rasgos morfológicos cuantitativos en la dirección medio-lateral. Se observó heredabilidad significativa con valores moderados a altos para la mayoría de los caracteres analizados, y el grado de irregularidad presentó el mayor valor de heredabilidad. Por medio de un enfoque de *QTL-seq* se identificó una región en cromosoma 8 de tomate (*Id8*), asociada al grado de irregularidad en las poblaciones F_2 VxOB y F_2 YSxH. Esta región se caracterizó utilizando un total de 29 marcadores en ambas poblaciones. La región se validó por mapeo de intervalos simple en la población F_2 YSxH y representó ~17 % de la variabilidad presente para el grado de irregularidad. Otros dos *QTL* epistáticos ubicados en la base de los cromosomas 6 (*Id6*) y 11 (*Id11*) se identificaron y validaron en la población F_2 VxOB por análisis de punto único utilizando un total de 24 marcadores. Ambos *QTL* explicaron ~61% de la variabilidad fenotípica para el grado de irregularidad en esta población. El efecto de *Id11* resultó mayor respecto al de *Id6*, lo que sugiere que *Id6* actuaría como un modificador sobre este rasgo. Dado que los alelos cultivados del gen *FAS* están fijos en la población y *Id11* mapeó cerca de dicho gen, se postula que *Id11* es un nuevo alelo de *FAS* o bien un nuevo *QTL* estrechamente ligado. Los resultados obtenidos demuestran que fue posible identificar nuevos *QTL* asociados al carácter grado de irregularidad y una región genómica subyacente al tipo de carpelos, a partir del estudio de poblaciones segregantes derivadas de cruzamientos intraespecíficos entre cultivares fenotípicamente discrepantes para morfología de fruto que tenían fijos los genes de forma conocidos. De este modo, este trabajo aporta nuevas evidencias a las bases genéticas de la forma fruto en dirección medio-lateral en tomate y representa un estudio original donde se mapean los caracteres tipo de carpelos y grado de irregularidad. Investigaciones adicionales sobre estos *QTL*, especialmente en términos de la introgresión de *QTL* en un fondo genético de élite, pueden ser útiles para ayudar al mejoramiento del cultivo de tomate dirigido a la forma del fruto y obtener materiales con frutos de morfologías más uniformes, o en sentido inverso, con formas atípicas destinadas a nichos específicos de mercado.

ABSTRACT

Identification of QTL underlying tomato fruit traits by sequence of segregant bulks

Fruit shape at medio-lateral direction in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is a key trait that influences yield, quality, and consumer acceptability. Nevertheless, most studies have focused on proximal-distal direction. Few genes mainly explain the great diversity for fruit shape in tomato, where *LC* and *FAS* play a key role. In this study, we set out to identify new regions in the tomato genome that control fruit morphology at the medio-lateral direction, from intraspecific crosses between phenotypically discrepant cultivars carrying the same allele constitution for known shape genes. The diversity of fruit shape traits at medio-lateral direction and *LC* and *FAS* genes was evaluated for 183 tomato accessions. It was found that the combination of the mutant alleles of *LC* and *FAS* was not enough to explain all lobedness degree variability. Fruits carrying unfused carpels were only present in cultivar "Voyage". Four tomato cultivars with different fruit shapes at medio-lateral direction, named Voyage (V), Old Brooks (OB), Yellow Stuffer (YS), and Heinz 1439 (H) were selected as initial progenitors. Two intraspecific F_2 populations (F_2 VxOB and F_2 YSxH), where major shape genes were fixed, were developed. A QTL-seq approach was used to identify genomic regions controlling the type of carpel in the F_2 VxOB and lobedness degree in both F_2 . Three genomic regions in chromosomes 3, 6, and 10 were detected for type of carpels, but only the region between 40.98 Mb and 44.17 Mb of chromosome 6 was linked. The fused phenotype was dominant over unfused one, but monogenic or digenic epistasis inheritance was found in two independent experiments. For lobedness degree, a QTL chromosome 8 in both F_2 (*Id8*) was identified, which was validated in F_2 YSxH by interval mapping, and accounting for ~17% of total variability. Other two epistatic QTLs located on chromosomes 6 (*Id6*) and 11 (*Id11*) were found by single-point analysis in the F_2 VxOB, and together accounted for 61% phenotypic variability of lobedness degree. This indicates that different alleles were present in both populations. The effect of *Id11* was more significant than *Id6*, suggesting that the genetic determinants of lobedness degree are found at chromosome 11, and *Id6* acts as a modifier. In conclusion, this study provides valuable information about new genomic regions underlying fruit traits.

INTRODUCCIÓN

Importancia económica y nutricional

El tomate cultivado (*Solanum lycopersicum* L.) es una de las hortalizas más importantes en el mundo y en la Argentina, por su nivel de consumo, el valor económico de la producción y la superficie dedicada a su cultivo. En los últimos 10 años la superficie cultivada alrededor del mundo aumentó un 14,6%, mientras la producción lo hizo un 26,2%, estimándose en más de 174 millones de toneladas cultivadas en 4,84 millones de hectáreas. Hace veinte años Europa y América eran los principales productores, pero en la actualidad lo son China, seguido por India, Estados Unidos, Turquía, Egipto, Irán, Italia, Brasil, España y Uzbekistán. Sin embargo, el mayor rendimiento lo obtienen los países de Europa del Norte con producción bajo invernáculo (FAOSTAT, 2020; <http://faostat.fao.org>). Por su parte en nuestro país, el consumo promedio ronda los 16 kg/habitantes/año, superando ampliamente la media mundial (5,6 kg/hab/año), y dentro las especies hortícolas sólo es superado por la papa. El Ministerio de Agroindustria y Producción de la Nación de nuestro país informó que la estimación de la producción anual en el país es próxima a 1,2 millones de toneladas de tomate y que no llega a cubrir la demanda del mercado interno (Ministerio de Agroindustria y Producción, 2017; <https://www.magyp.gob.ar>). La producción de esta hortaliza con destino a consumo fresco es de unas 700.000 tn (FAOSTAT, 2020; <http://faostat.fao.org>). En la temporada 2020-2021 se produjo un aumento del 20% en la producción destinada a la industria, con una producción de 594.572 tn en 7.331 ha, y el rendimiento a nivel país alcanzó el récord histórico de 81,1 tn.ha⁻¹, lo que representó un incremento del 9,6% respecto al año anterior (Asociación Tomate 2000, 2021). En Argentina la producción de tomate se efectúa tanto a campo como en invernáculo. El mercado de tomate se divide principalmente en mercado fresco (60-70 %) y tomate para industria (30-40%) (Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca, 2020; <https://www.argentina.gob.ar>)

Las principales zonas productoras de tomate en nuestro país son las provincias de Mendoza y San Juan (región cuyana), Salta y Jujuy (región NOA), Corrientes y Formosa (NEA), Río Negro, y Buenos Aires, provincia en la cual se destacan los cinturones hortícolas bonaerense y La Plata, Mar del Plata y Sur de Bs.As. Además, los cinturones hortícolas que se ubican alrededor de las principales ciudades del país también contribuyen al abastecimiento de los centros de consumo que circundan (<https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/produccion-tomate-argentina-diciembre-2020.pdf>). En la Región Centro de nuestro país, conformada por las provincias de Córdoba y Santa Fe, las áreas ocupadas con cultivos hortícolas se estiman en 600.000 hectáreas, generando una producción de 10.500.000 toneladas. Sobre los márgenes del río Paraná y los alrededores de Rosario, zona de influencia de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario, se ubica el Cinturón Hortícola de Rosario, que se destaca no sólo por el volumen de comercialización, sino también por la producción de hortalizas y el área sembrada, que ocupa 5.043 ha. En esta área, todo el tomate producido se destina al consumo en fresco y se lo cultiva principalmente bajo invernadero. A su vez, el Cinturón Hortícola de Rosario, abastece no sólo el mercado local sino que su producción llega a las



ciudades de Santa Fe, Córdoba y Buenos Aires por lo que constituye una zona de relevancia a nivel nacional (Mondino et al., 2012).

El tomate es una especie que se destaca por su valor nutricional. Debido a su alto nivel de consumo, constituye una importante fuente de micronutrientes como el potasio, magnesio o el ácido fólico, y antioxidantes como los flavonoides, la vitamina C y los β -carotenos. A su vez constituye la principal fuente de licopeno, un carotenoide que otorga el color rojo a los frutos maduros de tomate. El licopeno se caracteriza por frenar o disminuir las reacciones de oxidación que se producen en las células de nuestro organismo y originan los radicales libres que están directamente relacionados con el envejecimiento celular, enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer. Por este motivo, diversos estudios señalan que el consumo de tomate confiere un beneficio preventivo ante este tipo de enfermedades (Basu y Imrhan, 2007; Jatoi et al., 2007).

Origen y domesticación del cultivo

El tomate cultivado es una especie perteneciente a la diversa familia Solanaceae, que incluye más de 3.000 especies, ocupando una amplia variedad de hábitats. Las solanáceas contienen muchas especies de uso económico, como alimento (tomates, papas, pimientos y berenjenas), medicinales (belladona, beleño, datura) y ornamentales (petunias) (Causse et al., 2016). Este es un cultivo originario de la región Andina de América del Sur, que abarca desde el sur de Ecuador hasta el norte de Chile, incluidas las islas Galápagos, hasta la parte oriental de los Andes. Se conocen 13 especies de tomate pertenecientes al género *Solanum* sección *Lycopersicon*, 12 de las cuales son silvestres: *Solanum arcanum*, *S. cheesmaniae*, *S. chilense*, *S. chmielewskii*, *S. corneliomulleri*, *S. galapagense*, *S. habrochaites*, *S. huaylasense*, *S. neorickii*, *S. pennellii*, *S. peruvianum* y *S. pimpinellifolium*, y una especie cultivada (Peralta et al., 2008). Actualmente, se acepta que *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* constituye el ancestro más probable a partir del cual evolucionó el actual tomate cultivado, que a su vez habría sido domesticado a partir de la especie silvestre *Solanum pimpinellifolium* (Lin et al., 2014; Ranc et al., 2008). Así, en base a estudios morfológicos y moleculares, la hipótesis más aceptada propone que el proceso de domesticación se produjo por las culturas precolombinas en dos etapas y con dos centros independientes. El primer paso habría consistido en una selección de *S. pimpinellifolium* o *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* primitivo por parte de los primeros agricultores, lo que habría resultado en el *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* ecuatoriano y del norte de Perú. La segunda etapa probablemente habría ocurrido en Mesoamérica, en la región de la península de Yucatán en México, y consistió en una selección adicional de estos *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* pre-domesticados dando lugar a las variedades tradicionales de fruto grande. Este segundo paso completó el proceso de domesticación del tomate (Blanca et al., 2022; Razifard et al., 2020). Después de la llegada de los conquistadores españoles a América, el tomate fue llevado de México a Europa y luego se dispersó al resto del mundo. Dichas etapas en la domesticación y migración del cultivo constituyeron dos cuellos de botella genético o deriva genética, causando grandes pérdidas de variabilidad genética como consecuencia de una selección principalmente orientada a la mejora del fruto.

La obtención de los nuevos cultivares mejorados de tomate, comenzó hace más de 200 años en Europa, y principalmente en Italia. Los esfuerzos realizados para el



mejoramiento del cultivo se han orientado en un principio a aumentar la productividad, y características esenciales como la resistencia a enfermedades y plagas, amplia adaptabilidad, precocidad en la madurez, buen cuajado de fruto, y diversos aspectos de calidad de fruto. Sin embargo, durante el último siglo el foco de la mayoría de los programas de mejoramiento ha cambiado, tomando mayor relevancia la calidad de fruto de tomate. Dentro de la calidad, el tamaño y morfología de fruto son dos aspectos fundamentales, que han sido objeto de búsqueda, a fin de responder a demandas específicas del mercado de procesamiento y mercado en fresco (Blanca et al., 2015; Foolad, 2007). Este proceso de mejoramiento genético puede ir acompañado de la pérdida de variabilidad debido a la desaparición de genotipos completos, de *loci* génicos o de alelos de un gen (Miller y Tanksley, 1990; Park et al., 2004). Dicha erosión genética es provocada principalmente por la alta presión de selección ejercida por el hombre para lograr el fenotipo deseado. El uso de especies silvestres emparentadas con el cultivo puede revertir esta situación (McCouch, 2013).

Descripción botánica

La planta de tomate es una especie dicotiledónea perenne, que se cultiva como anual. Es una planta herbácea de porte erecto o rastrero, según su crecimiento sea determinado o indeterminado, respectivamente. Su sistema radicular presenta una raíz principal y abundantes raíces secundarias y raíces adventicias. El tomate sigue un hábito de crecimiento simpodial, con un tallo principal a partir del cual se desarrollan las hojas, los tallos secundarios (también de ramificación simpodial) en la axila de las hojas y las inflorescencias. Las hojas se disponen en forma alterna y están formadas por 7 a 9 folíolos primarios lobulados. Las inflorescencias son de tipo racimo (dicasio) y pueden ser simples o ramificadas, con un número variable de entre 5 y 15 flores. Las flores son hermafroditas y cuentan con cuatro verticilos. El estilo y estigma normalmente quedan dentro del cono estaminal, favoreciendo de esta manera la autofecundación que generalmente coincide con el momento de anthesis. Por este motivo, el tomate se considera como una especie autógama (Nuez et al., 1995). Tras la fecundación se produce el desarrollo del ovario que se convertirá en un fruto carnoso tipo baya bi o plurilocular, generalmente de color rojo. El fruto está constituido principalmente por el pericarpio, el tejido placentario y las semillas (López Marín, 2016).

El tomate como especie modelo

El tomate posee una constitución genética de naturaleza diploide ($2n = 24$), genoma de tamaño relativamente pequeño (~950 Mb), distribuido en 12 cromosomas (Michaelson et al., 1991), y destaca por su ciclo corto de cultivo, capacidad de adaptación a un amplio rango de condiciones ambientales y su aptitud para la transformación genética (Lozano et al., 2009). Estas características biológicas junto a la disponibilidad de recursos genéticos y bases de datos con información genómica y posgenómica lo convierten en uno de los cultivos modelos más efectivos para el mejoramiento. Entre los recursos fitogenéticos se encuentran el *Tomato Genomics Research Centre*, TGRC (<https://tgrc.ucdavis.edu/>), que posee la mayor colección de accesiones silvestres de tomate, así como materiales mutantes monogénicos, líneas de introgresión y colecciones de mutantes. En 2012 fue publicado por un consorcio internacional formado por más de 300 investigadores, la secuencia genómica



completa en alta calidad del cultivar de tomate Heinz 1706, junto a un borrador de secuencia de su pariente silvestre, *S. pimpinellifolium* accesión LA1589. Un total de 34.727 genes codificantes fueron predichos a partir de la secuencia del genoma de tomate, de los cuales 31.741 presentan una alta similitud con genes de *Arabidopsis* y de ellos 30.855 fueron verificados mediante secuenciación de ARN (The Tomato Genome Consortium, 2012). Otros dos grandes proyectos de re-secuenciación se han llevado a cabo luego de la obtención del genoma de referencia (Lin et al., 2014; The 100 Tomato Genome Sequencing Consortium, 2014), alineándose a la misma referencia más de 700 accesiones de tomate hasta el momento. Recientemente, se ha construido el primer pan-genoma en tomate a partir de la información genómica de 725 accesiones silvestres y cultivadas, seleccionadas por ser filogenética y geográficamente representativas de la diversidad existente en tomate (Gao et al., 2019). La información y datos genómicos, transcriptómicos, proteómicos y epigenómicos del tomate, y de otras especies pertenecientes a la familia de las Solanáceas se encuentra almacenada y disponible públicamente, junto a numerosas herramientas bioinformáticas, en el sitio web de la SOL Genomics Network (<https://solgenomics.net/>). Otras bases de datos públicas disponibles para tomate son el DNA-Banco de datos de Japón (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>), Tomato Functional Genomics Database (<http://ted.bti.cornell.edu/>), o MiBASE (<http://www.pgb.kazusa.or.jp/mibase/>).

Aspectos de la calidad comercial del tomate

La relevancia de los atributos de calidad en tomate depende de los requerimientos específicos de los distintos actores de los mercados de procesamiento y consumo en fresco. En este sentido, para el procesamiento de tomate resulta fundamental el contenido de sólidos solubles, acidez, pH y la viscosidad de las pastas. Según los distribuidores y minoristas, la calidad de la fruta se define esencialmente por la vida útil y la firmeza de los frutos. Mientras que para los consumidores la calidad está determinada por características visuales, y de sabor. Sin embargo la calidad organoléptica del fruto solo puede ser evaluada luego de su consumo, por lo que el tamaño, la forma, el color y la firmeza constituyen los primeros rasgos de calidad que atraen a los consumidores. (Labate et al., 2007). Un estudio de mercado realizado en los Estados Unidos, determinó que el tipo de tomate (redondo, alargado, cherry, o en racimos) fue la variable más importante para la elección en el momento de la compra por los consumidores luego del precio. La mayoría de los encuestados optó por el tomate tipo redondo seguido por el alargado o comúnmente denominado “perita” (Simonne et al., 2006). La forma del fruto no sólo determina la aceptabilidad por parte del consumidor sino que también define el destino del producto de cosecha. Los tomates alargados son preferentemente utilizados en procesados o productos industrializados, mientras que los frutos redondos son destinados al consumo en fresco. De este modo, el tamaño y la morfología de fruto en tomate resultan rasgos de importancia económica, que determinan el rendimiento, el destino de la producción, la calidad y la aceptabilidad del consumidor en el mercado en fresco (Casals et al., 2019; Grandillo et al., 1999).

El tomate cultivado presenta una gran diversidad en las formas y tamaños de los frutos en comparación con su ancestro silvestre (*S. pimpinellifolium* L.) que posee frutos de forma perfectamente esférica, con dos lóculos, y un peso de pocos gramos (Paran y van der Knaap, 2007). Esta diversidad indica que estos caracteres han sido objetivos de selección durante los procesos de domesticación y mejoramiento genético de la especie (Sierra-



Orozco et al., 2021), demostrando el valor histórico de dichos rasgos. Además, estos caracteres presentan relevancia biológica, ya que la morfogénesis es un mecanismo complejo y diverso entre los distintos tipos de órganos y entre las especies, que obedece a un control genético y molecular preciso cuyo estudio constituye actualmente una de las líneas de investigación más relevantes capaz de conectar la genética y fisiología del desarrollo con la producción agraria. Por su parte, las características de forma de fruto en la dirección medio-lateral como el grado de irregularidad, el número de lóculos, área pericarpio están altamente asociados al peso de los frutos (Nankar et al., 2020). Se observó una correlación fenotípica positiva y una superposición de genes que controlan al grado de irregularidad, número de lóculos y el tamaño o peso de fruto (Gonzalo et al., 2009). El desarrollo de un tamaño extremo del fruto está determinado principalmente por el número de carpelos en la flor y, en consecuencia, el número de lóculos en el fruto maduro. En este sentido, se ha visto que un incremento en el número de lóculos da lugar a frutos con forma más aplanada y hasta un 50% más de peso (Fernández-Lozano et al., 2015; Lippman y Tanksley, 2001). También se ha probado, que una mayor cantidad de lóculos está asociada a una forma fasciada de fruto o mayor grado de irregularidad (Chu et al., 2019). De esta forma la morfología, el tamaño de frutos y el número de lóculos son caracteres íntimamente relacionados entre sí (Tanksley, 2004), y el estudio de los atributos de forma en la dirección medio-lateral permitieron la identificación de mecanismos subyacentes al aumento de peso en frutos (por ejemplo, a través del aumento del área de la placenta o número de lóculos) constituyendo buenos indicadores para mapear nuevas regiones genómicas que controlan la variación en la morfología (Gonzalo y van Der Knaap, 2008).

Bases genéticas de la morfología de fruto en tomate

La forma del fruto en tomate, al igual que la mayoría de los caracteres de interés agronómico, constituyen caracteres complejos de herencia cuantitativa, es decir que están controlados por muchos genes, cada uno con un efecto aditivo relativamente pequeño sobre el carácter (Falconer y Mackay, 1996). Sin embargo, la gran diversidad de morfologías de frutos existente en el germoplasma de tomate se explica principalmente por mutaciones en un número relativamente pequeño de genes (Rodríguez et al., 2011). Los principales genes implicados en el control de la morfología son: *FASCIATED (FAS)*, *LOCULE NUMBER (LC)*, *SUN*, *OVATE*, (Cong et al., 2008; Liu et al., 2002; Muños et al., 2011; Rodríguez et al., 2011a; Xiao et al., 2008), el supresor de *OVATE* llamado *SOV1* (Rodríguez et al., 2013; Wu et al., 2018) y *GLOBE* (Sierra-Orozco et al., 2021). Los alelos mutados o cultivados en *SUN*, *OVATE*, *SOV1* y *GLOBE* controlan la forma alargada y forma periforme de los frutos mientras que los alelos *wild type* o salvajes, determinan una forma redonda de fruto, afectando la morfogénesis en la dirección proximal-distal. Por otro lado, los alelos mutados o cultivados en *LC* y *FAS* producen alto número de lóculos, dando lugar a frutos de mayor tamaño, y forma aplanada y fasciada, constituyendo así los principales genes subyacentes a la forma de fruto en el plano medio-lateral. La mutación en *FAS*, ubicada en el cromosoma 11, es causada por una inversión de 294 kb con puntos de ruptura en el primer intrón de un gen del factor de transcripción *YABBY* y 1 kb corriente arriba del codón de inicio *CLAVATA3 (SICLV3)* de tomate, interrumpiendo el promotor *SICLV3*, lo que resulta en un aumento del tamaño del fruto y el número de lóculos (Cong et al., 2008; Huang y van der Knaap, 2011). La mutación en *LC*, ubicada en el cromosoma 2, está relacionada con dos polimorfismos de un solo nucleótido (*SNP*) ubicados a 1.080 pb corriente abajo del codón de terminación del



ortólogo de tomate de *WUSCHEL* (*WUS*) en un elemento regulador putativo de la caja CARG. Esto provoca el mantenimiento de una población de células madre más grande que genera un mayor número de lóculos y, a menudo, conduce a un fruto plano de mayor tamaño (Muños et al., 2011; van der Knaap et al., 2014). Ambos genes muestran un efecto sinérgico sobre el tamaño y peso del fruto (Chu et al., 2019).

El contexto o background genético modula el efecto de los principales genes subyacentes a la forma del fruto (Rodríguez et al., 2011a; Xiao et al., 2008), lo que sugiere la presencia de modificadores genéticos desconocidos. A su vez, el efecto de estos genes sobre los atributos morfológicos del fruto en la dirección medio-lateral no se ha estudiado hasta el momento. Por lo tanto, la investigación de las bases genéticas que controla dichos atributos representa un área de investigación novedosa y relevante.

Enfoques para la detección de QTLs subyacentes a la morfología de fruto

Los polimorfismos constituyen variaciones a nivel de secuencia genómica en una región específica del ADN y generan las distintas alternativas alélicas para un gen en una población. Aquellos polimorfismos que afectan a la secuencia codificante o reguladora y que producen cambios importantes en la estructura de la proteína o en el mecanismo de regulación de la expresión, pueden dar lugar a cambios en el fenotipo o la manifestación de un carácter. Estos polimorfismos pueden constituir una sustitución de una única base nitrogenada, (*SNP*, del inglés *Single Nucleotide Polymorphism*) o bien una inserción o eliminación de una o más bases, denominado Inserción-Delección (*InDel*). Los marcadores moleculares de ADN permiten identificar polimorfismos a nivel de secuencia entre individuos o genotipos. Cuando los marcadores moleculares se encuentran próximos a un gen de interés, existe nula o muy baja recombinación entre ellos, es decir que están estrechamente ligados y por lo tanto siempre se heredan juntos. En consecuencia es posible utilizarlos como un indicador de la presencia de una región bajo estudio (Collard et al., 2005). La región genómica asociada, o con efecto significativo, sobre un carácter cuantitativo se denomina *locus* de carácter cuantitativo (*QTL*, del inglés *Quantitative Trait Locus*).

Tradicionalmente los *QTL* en tomate han sido detectados mediante análisis de ligamiento en poblaciones derivadas de cruzamientos interespecíficos, es decir entre progenitores distantes genéticamente (por ejemplo, ancestro silvestre x tomate cultivado). En este tipo de cruzamientos muchos *loci* están segregando, por lo que ha sido posible detectar el efecto e identificar principalmente genes mayores; mientras que el efecto de *loci* menores no resulta claro o consistente. Una detección más eficiente de los *QTL* menores es posible cuando los *QTL* mayores no están segregando en las poblaciones, es decir cuando su efecto se encuentra fijo, y cuando los progenitores son genéticamente más similares entre sí (Rodríguez et al., 2013). Así en cruzamientos intraespecíficos, o entre cultivares, el efecto de un *QTL* menor puede evidenciarse con un efecto mayor, cuando pocos *loci* están segregando para el carácter bajo estudio (Abe et al., 2012). Por lo tanto, las poblaciones derivadas de progenitores más estrechamente relacionados, en las que el efecto de los *QTL* principales se encuentra fijo, resultan valiosas para la identificación de nuevas regiones genómicas que controlan los rasgos de forma o bien regiones que previamente han sido informadas con un efecto menor sobre el mismo (Rodríguez et al., 2013). Actualmente, con las tecnologías de secuenciación y marcadores moleculares basados en *SNP*, es posible



detectar polimorfismo en poblaciones intraespecíficas o menos divergentes genéticamente. De este modo, para descubrir la totalidad de genes que domina la diversidad de la forma en el tomate cultivado, análisis genéticos y moleculares deben ser conducidos en poblaciones segregantes obtenidas a partir de cruzamientos entre cultivares.

El análisis de grupos segregantes (*BSA*, del inglés *Bulked Segregant Analysis*) constituye un enfoque alternativo para la detección de *QTL* (Giovannoni et al., 1991; Mansur et al., 1993; Michelmore et al., 1991). Este consiste en desarrollar una población segregante, F_2 o líneas recombinantes endocriadas (*RIL*, del inglés *Recombinant inbred lines*), y caracterizarla, para seleccionar individuos con valores extremos para el rasgo de interés. El ADN de estos individuos se mezcla para constituir grupos de ADN perteneciente a fenotipos contrastantes y se efectúa su genotipado. Esta metodología se sustenta en el fundamento teórico de que los individuos presentarán una proporción aproximadamente igual de los genomas parentales en ambos grupos para la mayoría de las regiones genómicas, mientras que aquellas regiones estrechamente asociadas con el carácter de interés, mostrarán una sobre o sub representación del genoma de un parental en un grupo y la situación opuesta en el otro grupo (Rothan et al., 2019). El enfoque de *BSA* se aplicó por primera vez para evaluar el comportamiento en poblaciones F_2 de caracteres discretos como son la abscisión pedicular (*jointless*) y maduración del fruto (*non-ripening*) en tomate (Giovannoni et al., 1991) y la resistencia a enfermedades en lechuga (Michelmore et al., 1991), y posteriormente este concepto se extendió al análisis de caracteres cuantitativos (Chagué et al., 1997; Quarrie et al., 1999; Zhang et al., 2009). En un comienzo el genotipado se realizó mediante el uso de marcadores moleculares (Asnaghi et al., 2004; Giovannoni et al., 1991; Michelmore et al., 1991). Con el desarrollo de la tecnología de secuenciación de última generación (NGS, del inglés *Next-Generation Sequencing*) de ADN, se proporcionaron herramientas efectivas para la detección de *SNP* en todo el genoma (Huang et al., 2009), evitando la necesidad de desarrollar marcadores moleculares para mapear. En la actualidad esta técnica se ha empleado incluso en estudios de RNA-seq (Wang et al., 2013) y técnicas de proteómica (Pereira da Costa et al., 2017).

La principal metodología utilizada para realizar *BSA* basado en la secuenciación de genomas completos, llamada *QTL-seq*, fue propuesta por Takagi et al. (2013) y ha sido ampliamente empleada. Este enfoque permite reconocer regiones genómicas en las que los progenitores difieren y que contribuyen a los mayores o menores valores del carácter de interés en la progenie resultante y detectar así *QTL* asociados al rasgo. Este enfoque consiste en: 1) Desarrollar una población de mapeo a partir de cruzamiento entre cultivares con fenotipos contrastantes para el carácter de interés, 2) Caracterizar fenotípicamente la población para el carácter de interés, 3) Seleccionar individuos con fenotipos extremos y armar dos grupos segregantes para el carácter, 4) Extraer el ADN de cada planta de los grupos y mezclarlas en la misma proporción para conformar una muestra por grupo, 5) Secuenciar los grupos o mezclas de ADN, alinear las secuencias al genoma de referencia de la especie y realizar la comparación genómica entre los grupos. Se espera que los grupos presenten igual proporción de los genomas parentales para la mayoría de las regiones genómicas y una representación desigual en las regiones asociadas a las diferencias fenotípicas entre los grupos. Para determinar la cantidad relativa de genoma derivado de cada parental, se contabiliza la cantidad de lecturas alternativas en relación a la cobertura total para cada *SNP*, lo que se denomina índice-*SNP*. Cuando el índice-*SNP* es



igual a 0, indica que todas las lecturas son como la secuencia del padre de referencia, un índice-*SNP* de 1 indica que todas las lecturas fueron igual al genoma del otro padre, y un índice-*SNP* de 0,5 significa que existe igual contribución de los genomas parentales en la progenie. Los datos de los grupos se combinan obteniendo un nuevo parámetro denominado Δ (índice-*SNP*). Para aquellas regiones que no contribuyen a las diferencias fenotípicas entre ellos, se espera un valor de Δ (índice-*SNP*)= 0, mientras que en las regiones que contienen los *QTL*, el Δ (índice-*SNP*) tendrá un valor absoluto de uno, y en función del parental que aporta los alelos que contribuyen a las diferencias fenotípicas el valor será positivo o negativo.

Por otro lado, Magwene et al. (2011) planteó un enfoque alternativo para evaluar estadísticas significativas y detectar *QTL* utilizando *BSA* a partir de la secuenciación de lecturas cortas de alto rendimiento. Esta metodología calcula el estadístico *G*, que considera las frecuencias alélicas observadas y las esperadas para cada *SNP*, y luego pondera este valor de acuerdo a la distancia a un *SNP* focal en una ventana deslizante, usando una función núcleo de tricubo (Nadaraya, 1964; Watson, 1964). Este nuevo valor se denomina *G'*. Finalmente, por un enfoque de tasa de descubrimiento falso (FDR; *False Discovery Ratio*) se estima un valor umbral de significancia y se identifican las regiones genómicas que se desvían significativamente de la distribución nula de fondo, lo que indicaría la presencia de un *QTL*. El estadístico *G'* permite reducir la varianza a la vez que considera el desequilibrio de ligamiento en los *SNP*. Además, dado que el estadístico *G'* presenta una distribución cercana a una log normal, es posible estimar un valor de significancia o p-valor para cada *SNP* usando una estimación no paramétrica de la distribución nula de *G'* (Mansfeld y Grumet, 2018).

Por lo tanto, la metodología de *QTL-seq*, que integra el enfoque de *BSA* y la secuenciación de genoma completo, constituye una herramienta valiosa que reduce el tiempo y labor requeridos en la identificación de *QTL* al realizar el genotipado solo de aquellos individuos con fenotipos extremos y evitar la necesidad de desarrollar marcadores moleculares específicos para esta tarea. La disponibilidad de los recursos genómicos y bioinformáticos han permitido implementar este enfoque con éxito para mapear *QTL* asociados al peso del fruto, forma alargada, número de lóculos, tolerancia al calor en tomate (Illa-Berenguer et al., 2015; Rodríguez et al., 2013; Wen et al., 2019) y maíz (Chen et al., 2017), resistencia a frío en plántulas de arroz, tolerancia a condiciones de salinidad y peso de grano en arroz (Bommisetty et al., 2020; Takagi et al., 2013; Yang et al., 2013), floración temprana en pepino (Lu et al., 2014), peso de semilla y peso seco de raíz/peso seco de planta en garbanzo (Das et al., 2015; Singh et al., 2016) y color de cotiledón en soja (Song et al., 2017). De este modo el enfoque de *QTL-seq* ha permitido la mejora rápida y eficiente de cultivos y la selección asistida por genómica.

La aplicación de un enfoque de *QTL-seq* sobre poblaciones segregantes para caracteres de morfología de fruto en la dirección medio-lateral constituye un enfoque original que permitirá identificar regiones genómicas asociadas a caracteres de valor económico y biológico y profundizar en el entendimiento de los mecanismos morfogénicos de fruto en tomate.



HIPÓTESIS

Es posible identificar regiones genómicas no conocidas que controlan caracteres de morfología del fruto en tomate a partir de la selección de cruzamientos entre cultivares fenotípicamente discrepantes en los que no segregan los genes conocidos de forma, utilizando la metodología de *QTL-seq*.

OBJETIVO GENERAL

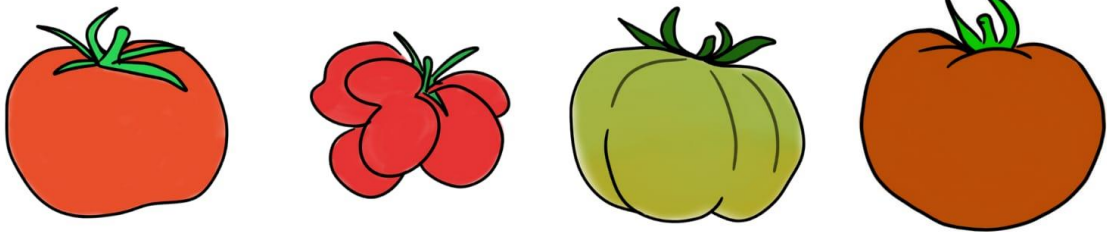
Identificar nuevas regiones en el genoma de tomate que controlan caracteres de morfología del fruto a partir de cruzamientos entre cultivares fenotípicamente discrepantes e idéntica constitución genética en *loci* de morfología conocidos.

A fin de favorecer la fluidez en la lectura, presentación de los resultados, y la comprensión de los mismos, el presente trabajo se estructura en un total de cuatro capítulos donde se desarrollan diferentes objetivos específicos:

- **Capítulo I:** Diversidad genética para caracteres de forma de frutos en la dirección medio-lateral.
- **Capítulo II:** Caracterización fenotípica y estimación de parámetros genéticos en genotipos uniformes (progenitores e híbridos) en dos cruzamientos intraespecíficos.
- **Capítulo III:** Identificación de regiones genómicas o *loci* que controlan el carácter tipo de carpelo en la población F_2 “Voyage” x “Old Brooks”.
- **Capítulo IV:** Detección de *QTL* asociados a caracteres cuantitativos en poblaciones segregantes derivadas de cruzamientos intraespecíficos.

CAPÍTULO I

Diversidad genética para caracteres de forma de frutos en la dirección medio-lateral





OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar la diversidad para caracteres de forma de fruto en la dirección medio-lateral presente en una colección de imágenes de frutos representativa del germoplasma de tomate.
- Identificar atributos morfológicos divergentes entre cultivares que portan una composición alélica idéntica en los *loci fas* y *lc*.
- Seleccionar cultivares de tomate fenotípicamente discrepantes en la morfología de fruto en la dirección medio-lateral, e idéntica constitución alélica para los genes conocidos de forma de fruto.



MATERIALES Y MÉTODOS

Material Experimental

Se utilizaron imágenes de cortes de frutos en dirección medio-lateral que fueron descargadas del sitio web de *Solanaceae Genomics Network* (www.solgenomics.net). La información general y la caracterización de los principales genes de forma se obtuvieron de (Rodríguez et al., 2011a). La colección inicial estaba compuesta por 368 accesiones de tomate, diversas para clase de germoplasma y origen geográfico (variedades *Heirloom*, contemporáneas americanas, contemporáneas italianas, regionales de España, regionales de Latinoamérica, regionales de Italia, variedades cerasiformes y accesiones silvestres). Esta colección fue caracterizada fenotípicamente para rasgos de morfología de fruto en la dirección próximo-distal y molecularmente para los genes principales de forma: *SUN*, *OVATE*, *LC*, *FAS* y *SOV1* (Rodríguez et al., 2011b). Se realizó el curado de la base de datos inicial, considerando como criterio de selección que las imágenes cuenten con al menos cuatro repeticiones de frutos. El análisis se realizó sobre un subconjunto de 183 accesiones de tomate (Tabla Suplementaria S1).

La determinación automática, precisa y objetiva de caracteres de forma se realizó sobre 1.145 imágenes de cortes de frutos de tomate en la dirección medio-lateral con el programa informático *Tomato Analyzer 3.0* (Rodríguez et al., 2010, 2011b). Los caracteres analizados fueron: perímetro, área, espesor y área del pericarpio y grado de irregularidad externa (Figura I-1)

El área del pericarpio se calculó como el área entre el borde interno del pericarpio y el perímetro; mientras que el espesor del pericarpio representa la longitud promedio del pericarpio a lo largo de las líneas horizontales y verticales a través del centro del fruto. Los parámetros calculados automáticamente se ajustaron según las fórmulas:

$$\text{Área de pericarpio} = 1 - PA$$

$$\text{Espesor de pericarpio} = PT * \left(\frac{\text{ancho máximo} + \text{alto máximo}}{2} \right)$$

Donde PA y PT son valores obtenidos por el programa *Tomato Analyzer 3.0* (Rodríguez et al., 2010, 2011b).

El grado de irregularidad externa representa el desvío estándar de las distancias desde el centro del fruto hasta el borde del perímetro, multiplicado por 100. Así, los frutos regulares presentan distancias más similares, desviaciones más pequeñas y valores menores para este carácter, mientras que ocurre lo contrario con los frutos irregulares. El número de lóculos se contó automáticamente con la herramienta *LocAnalyzer* (Spetale et al., 2020)

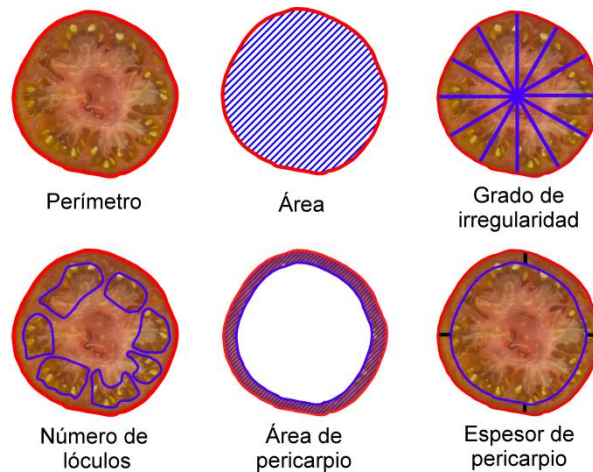


Figura I-1: Análisis de caracteres morfológicos en la dirección medio-lateral con el programa *Tomato Analyzer 3.0*.

Análisis estadísticos

Se analizó la representatividad para forma y tamaño de fruto, origen geográfico y clase de germoplasma en el subconjunto de accesiones seleccionadas, para conocer la diversidad presente en el subconjunto del germoplasma.

Se estimaron parámetros estadísticos descriptivos para todos los caracteres (valores máximos y mínimos, media, mediana y cuartiles). Se calculó el rango intercuartílico como la diferencia entre el primer y el tercer cuartil. Se comprobó la distribución normal de los datos por métodos gráficos (histogramas y gráfico QQ) y mediante la prueba de Shapiro-Wilk (Shapiro y Wilk, 1965). Los rasgos con distribución no normal se transformaron utilizando el logaritmo natural. La heredabilidad en sentido amplio (H^2) y su error estándar, se calcularon mediante ANOVA para todos los caracteres con distribución normal (Mariotti y Collavino, 2014). Las correlaciones fenotípicas entre caracteres se determinaron mediante la prueba de Pearson. El análisis se realizó con el programa informático R, versión 3.6.3 (R Core Team, 2014) utilizando las funciones de estadísticas básicas y los paquetes *ggcorrplot* (Kassambara, 2019), *agricolae* (Mendiburu, 2013) y *heritability* (Kruijer et al., 2014).

Se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA) para resumir y visualizar las múltiples variables cuantitativas interrelacionadas. El PCA y los gráficos se realizaron con el programa informático R, versión 3.6.3 (R Core Team, 2014) utilizando funciones de estadísticas básicas y *corrplot* (Wei y Simko, 2017), *factoextra* (Kassambara y Mundt, 2017), *FactoMineR* (Lê et al., 2008), paquetes *tidyr* (Wickham et al., 2019), *ggplot2* (Wickham, 2009) y *Scatterplot3d* (Ligges et al., 2018). Se consideró la constitución alélica para los genes *LC* y *FAS* en el análisis, pudiendo diferenciar cuatro categorías: combinaciones de alelos silvestres ($lc^{+/+}: fas^{+/+}$) y alelos cultivados ($lc^{-/-}: fas^{-/-}$) en ambos *loci*, y las combinaciones alternadas donde un gen presentó el alelo cultivado mientras que el otro gen portaba el alelo silvestre ($lc^{+/+}: fas^{-/-}$ y $lc^{-/-}: fas^{+/+}$)

CAPÍTULO I- MATERIALES Y MÉTODOS



Se analizó la distribución de frecuencias relativas para las diferentes categorías de composiciones alélicas de los *loci fas* y *lc*, considerando rangos de número de lóculos y grados de irregularidad. Los datos de cinco accesiones (T1078, T1116, T907, T1697 y T985) fueron eliminados del análisis por presentar genes en estado heterocigoto. Se crearon rangos para ambos atributos considerando: cero a valor medio, media \pm un desvío estándar, media \pm dos desviaciones estándar, media \pm tres desviaciones estándar y valores superiores.



RESULTADOS

El subconjunto de accesiones analizado fue diverso y representativo para las categorías de forma de fruto, tamaño, clase de germoplasma y origen geográfico. Estas accesiones representaron todas las posibles categorías de forma de frutos: largos (8,74 %), redondos (10,38 %), planos (21,86 %), elipsoides (22,95 %), con forma de corazón de buey (1,09 %), obovoides (16,39 %), de forma acorazonada (8,20 %) y rectangular (10,38 %). El subconjunto incluyó accesiones con diferente tamaño de fruto: grande (13,11%), mediano (62,30%) y pequeño (24,59%). Según el origen geográfico, la mayoría de las accesiones provinieron de Italia (50,29%) y Latinoamérica (24,86%), dentro de los cuales predominan los materiales peruanos (67,44%), pero también el subconjunto incluyó variedades de EE.UU. (9,83%), España (6,94%), Rusia (2,31%) y China (1,16%), entre otros. Con base en las clases de germoplasma, podemos distinguir a los *Heirloom* o criollos norteamericanos (16,94%), regionales latinoamericanos (9,84%), regionales italianos (38,80%), regionales españoles (6,56%), contemporáneos o modernos (11,48%) y otros (4,37%) (Tabla suplementaria S1). La diversidad para la morfología del fruto en la dirección medio-lateral se representa en la Figura I-2.

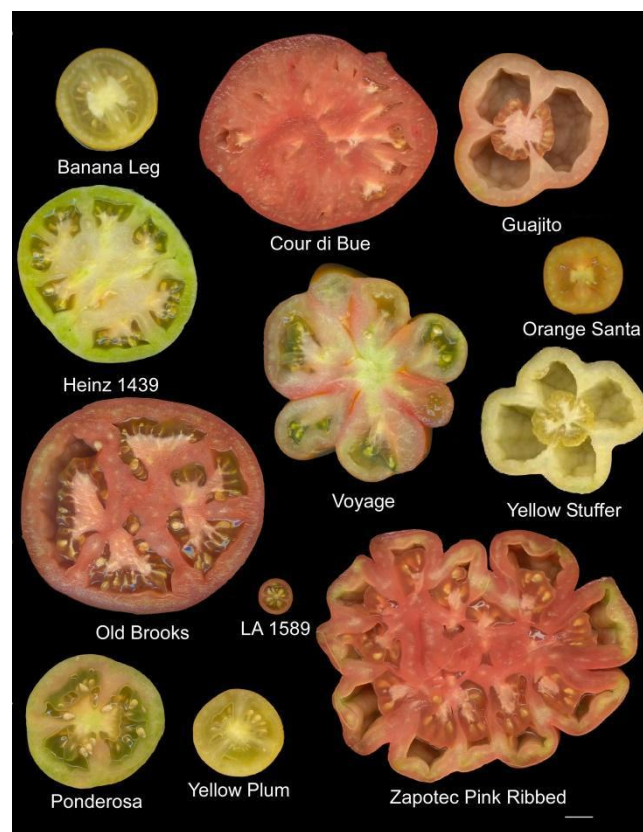


Figura I-2: Diversidad para morfología de fruto en la dirección medio-lateral dentro del subconjunto analizado. Imágenes representativas de cortes de frutos de tomate en la dirección medio-lateral. La línea horizontal blanca es la referencia de escala correspondiente a 1 cm.

Los valores relativamente altos de desvío estándar y el rango intercuartílico para algunos rasgos sugieren un alto nivel de diversidad para la forma. Estos resultados se



describen en la Tabla I-1. Cabe destacar que el 75% de los materiales presentó un número de lóculos entre dos y tres, y un grado de irregularidad menor o igual a 2,2. Sin embargo, algunas accesiones mostraron un alto número de lóculos, con hasta 17 lóculos (Coure di Bue) y formas muy irregulares, con un grado máximo de irregularidad igual a 9,1 (Zapotec Pink Ribbed) (Tabla I-1, Figura I-2, Tabla Suplementaria S1). Los caracteres perímetro y espesor de pericarpio mostraron una distribución normal, mientras que el número de lóculos, el área, el grado de irregularidad y el área del pericarpio presentaron una distribución no normal (Figura I-3).

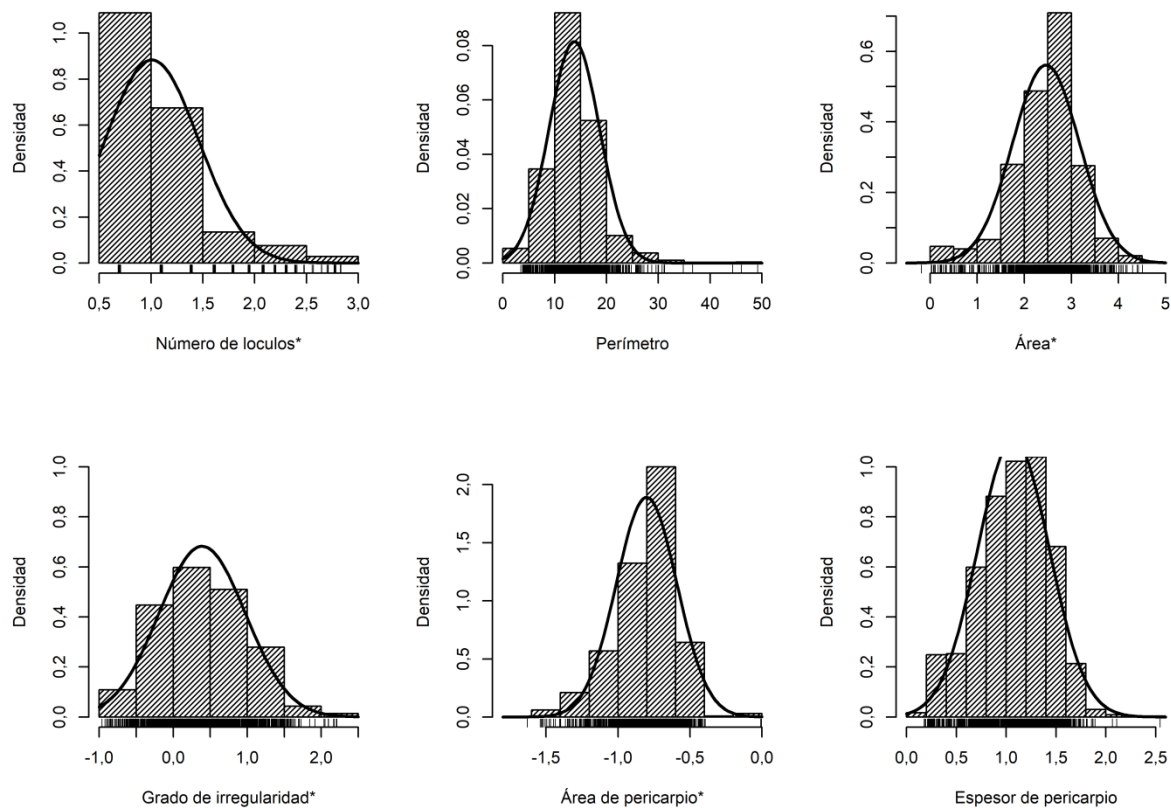


Figura I-3: Histograma de densidad para los caracteres de forma analizados en el subconjunto de cultivares o accesiones. La curva indica la tendencia de distribución normal. Barras paralelas en la parte inferior del gráfico muestran concentración de datos. Se indica con * las variables que se transformaron con el logaritmo natural.

Los valores de heredabilidad en sentido amplio fueron altos y significativos para todas las características, en un rango comprendido entre 0,72 para el área de pericarpio y 0,94 para el área de fruto (Tabla I-1), lo cual indica que la variabilidad observada para dichos caracteres se debe principalmente al componente genético.



Tabla I-1: Parámetros estadísticos descriptivos y heredabilidad (H^2) para rasgos de forma latitudinal.

Carácter	Media \pm de	Min	Max	Mediana	Q1	Q3	IQ rango	$H^2 \pm ee$
Número de lóculos*	3,13 \pm 2,22	2,00	17,00	2,00	2,00	3,00	1,00	0,79 \pm 0,02
Perímetro	13,78 \pm 4,89	3,43	49,15	13,39	10,72	16,17	5,45	0,91 \pm 0,02
Área*	14,61 \pm 10,15	0,83	90,60	12,74	8,06	18,13	10,07	0,94 \pm 0,01
Grado de irregularidad*	1,76 \pm 1,16	0,38	9,12	1,44	0,96	2,23	1,27	0,79 \pm 0,02
Área de pericarpio*	0,46 \pm 0,09	0,20	1,00	0,46	0,40	0,51	0,11	0,72 \pm 0,02
Espesor de pericarpio	1,07 \pm 0,36	0,18	2,55	1,11	0,84	1,32	0,48	0,88 \pm 0,02

Abreviaciones: de: desviación estándar, Min: valor mínimo, Max: valor máximo, Q1: primer cuartil, Q3: tercer cuartil, rango IQ: rango intercuartílico, ee: error estándar. Unidades: perímetro (cm), área (cm²). *: Variables transformadas mediante logaritmo natural.



Se encontraron correlaciones fenotípicas significativas para la mayoría de los atributos analizados, considerando un p-valor de 0,05 (Figura I-4). De forma esperable, hubo una correlación positiva cercana a 1 entre el perímetro y el área. Asimismo, perímetro y área presentaron una correlación intermedia positiva considerando el número de lóculos y el espesor de pericarpio. El espesor de pericarpio mostró una correlación positiva con el área del pericarpio, y en menor nivel con el grado de irregularidad. El perímetro, el área y el número de lóculos mostraron una correlación positiva con el grado de irregularidad, y por el contrario, una correlación negativa con área de pericarpio. Se encontraron correlaciones no significativas entre el número de lóculos y el espesor del pericarpio, y entre el área del pericarpio y el grado de irregularidad (Figura I-4).

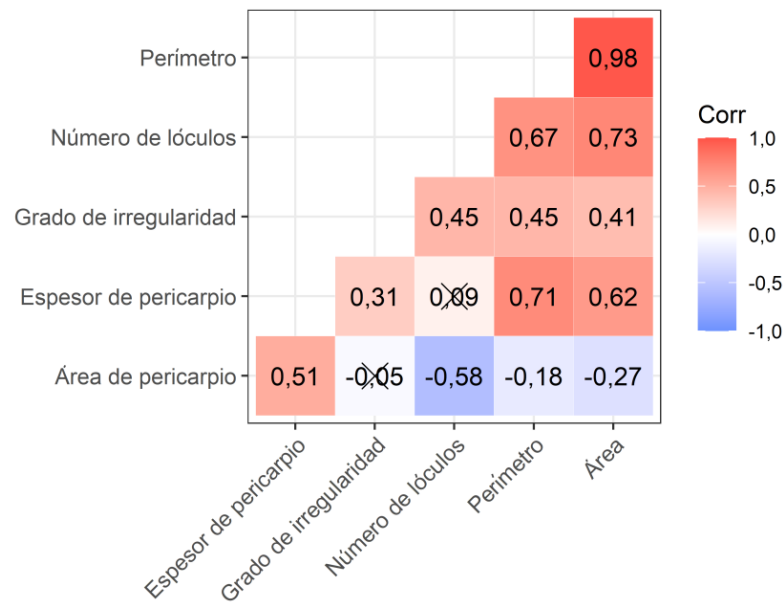


Figura I-4: Matriz de correlación indicando la asociación fenotípica entre los caracteres analizados. Los colores de las celdas indican la magnitud de las correlaciones de rango de Pearson (positivas o negativas) entre pares de caracteres. Las correlaciones fuertes positivas se resaltan en color rojo oscuro y los colores más claros indican relaciones más débiles. Las cruces indican correlaciones no significativas al 5%.

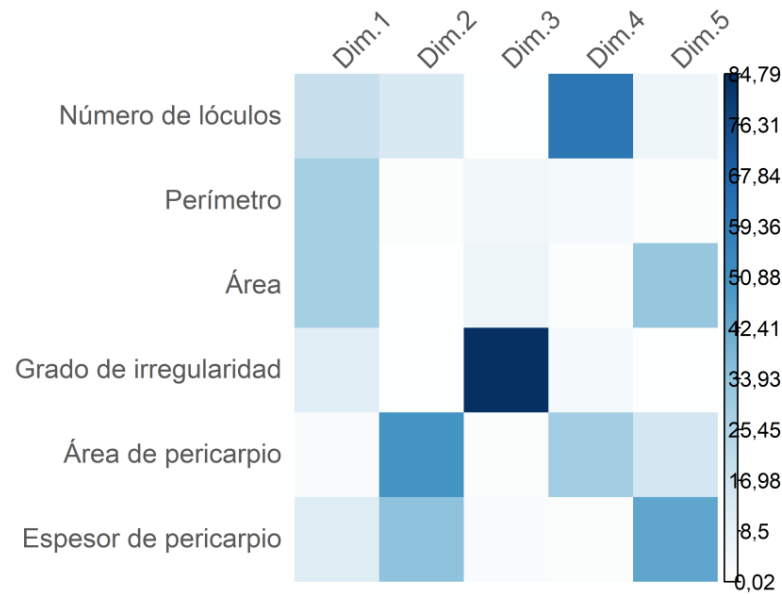
Dado la alta correlación entre las variables de este estudio, se realizó un Análisis de Componentes Principales para reducir la dimensionalidad de los datos multivariados, minimizando la pérdida de información. El Análisis de Componentes Principales (PCA) mostró que las tres primeras componentes principales (CP) representaron el 55,11%, el 28,43% y el 12,33% de la varianza total, respectivamente. El primer componente fue explicado principalmente por el perímetro, el área y en menor grado por el número de lóculos; el segundo se explicó mayormente por el área del pericarpio y el espesor del pericarpio; mientras que el tercer componente se explicó casi exclusivamente por el grado de irregularidad (Figura I-5a). Teniendo en cuenta la composición alélica de los genes *FAS* y *LC*, se encontró un patrón claro que diferenció las accesiones de tomate en el subconjunto. La variación en los caracteres en la dirección medio-lateral se correlacionó altamente con la composición alélica, según los resultados de PCA (Figura I-5b). Así, las accesiones que portaban los alelos de tipo silvestre ($lc^{+/+}$: $fas^{+/+}$) se caracterizaron principalmente por frutos



pequeños con menos lóculos y forma externa más regular (valores bajos para el primer y tercer componente), y valores intermedios a altos para el área del pericarpio (segundo componente). En el otro extremo, la mayor parte de las accesiones que portaban los alelos cultivados ($lc^{-/-}$: $fas^{-/-}$) dieron lugar a frutos más grandes con más lóculos y forma irregular o fasciada (valores más altos para el primer y tercer componente), y con valores menores de área del pericarpio (segundo componente). Sin embargo, estas accesiones también mostraron una mayor dispersión en la tercera dimensión, lo que indica una mayor variabilidad para el grado de irregularidad. Es notable que existieron accesiones con la misma composición alélica pero valores contrastantes para los componentes principales, por ejemplo los cultivares “Voyage” y “Old Brooks”, “LYC1917”, “Yellow Stuffer” y “Heinz 1439”, y “Zapotec Pink Ribber” y “LA2690”.



a



b

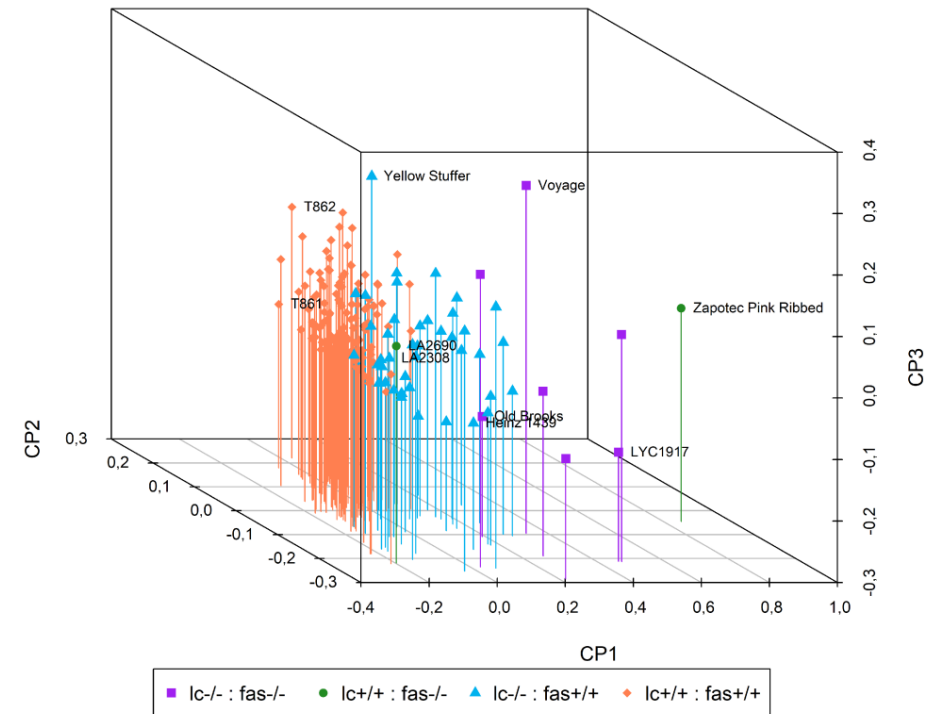


Figura I-5: Gráfico del Análisis de Componentes Principales para rasgos de forma en dirección medio-lateral. (a) Contribución de las variables a los componentes principales (Dim.), expresados como porcentajes. Se muestra como una escala de colores. Los colores azules más oscuros indican una mayor contribución de la variable sobre el componente principal. (b) Gráfico de componentes principales, en relación a las tres primeras dimensiones (CP). Colores y figuras diferentes representan accesiones de tomate con una constitución alélica específica para los genes *LC* y *FAS*. Los grupos son: $lc^{+/+} : fas^{+/+}$ (alelos silvestres para ambos genes), $lc^{-/-} : fas^{-/-}$ (alelos cultivados para ambos genes), y las opciones alternadas, $lc^{+/+} : fas^{-/-}$ y $lc^{-/-} : fas^{+/+}$. Se nombran ejemplos de accesiones con valores extremos para las características de la forma del fruto.



Mediante el análisis de la distribución de frecuencias relativas para las diferentes composiciones alélicas, se encontró una mayor correspondencia con la variación en el número de lóculos (Figura I-6a), y en menor nivel con el grado de irregularidad (Figura I-6b), en el germoplasma de tomate. En este sentido, las accesiones que llevaban los alelos cultivados para ambos genes ($lc^{-/-}$: $fas^{-/-}$) mostraron el mayor número de lóculos, mientras que el grado de irregularidad estuvo menos influenciado por la presencia de los alelos cultivados. Todos los genotipos que portaban la composición silvestre para ambos genes ($lc^{+/+}$: $fas^{+/+}$) mostraron un número de lóculos bajo (≤ 3), mientras que los genotipos que portaban los alelos $lc^{-/-}$: $fas^{-/-}$ presentaron frutos con muchos lóculos (≥ 5). Considerando el grado de irregularidad, la composición $lc^{+/+}$: $fas^{+/+}$ mostró un valor inferior a 4,5; mientras que para la mayoría de las accesiones con $lc^{-/-}$: $fas^{-/-}$ el grado de irregularidad superó el valor de 3,6. Es remarcable, que la composición $lc^{+/+}$: $fas^{-/-}$ estuvo presente sólo en dos accesiones del conjunto (Figura I-6c), con características opuestas para el grado de irregularidad y número de lóculos.

La distribución de las accesiones considerando el número de lóculos y el grado de irregularidad se representan en la Figura I-6c. La mayoría de los genotipos presentaron valores dentro del rango comprendido entre la media ± 1 desvío estándar para ambas características (entre 0,91 y 5,35 para número de lóculos y 0,60 y 2,92 para grado de irregularidad). Algunas accesiones con diferentes composiciones de alelos mostraron valores altos para el grado de irregularidad y el número de lóculos (por ejemplo, los cultivares “Cour di Bue”, “Yellow Stuffer”, “Zapotec Pink Ribbed”, “Voyage” y “LA2845”). Además, accesiones con diferentes composiciones alélicas mostraron valores extremos y bajos para el grado de irregularidad y elevados para número de lóculos (por ejemplo, cultivares “Heinz 1439”, “T546”, “LA1216”, “Pearson” y “Old Brooks”).

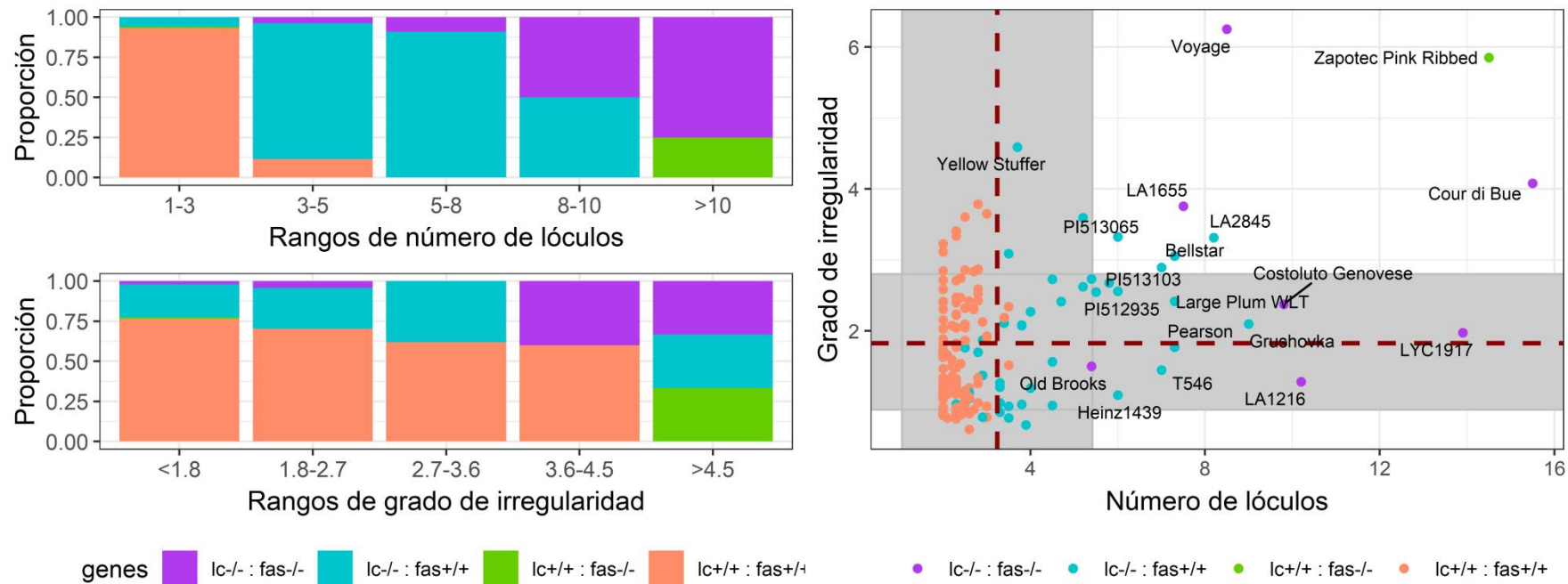


Figura I-6: Impacto de los alelos en los genes *LC* y *FAS* en el número de lóculos y grado de irregularidad. Distribución de frecuencias relativas para los alelos en los genes *LC* y *FAS* según los rangos de números de lóculos (a) y el grado de irregularidad (b). (c) Caracterización de las accesiones considerando la relación entre el grado de irregularidad y el número de lóculos. El área gris destaca los valores de los rasgos entre la media ± 1 desvío estándar. Los colores de los puntos representan accesiones de tomate con una constitución alélica específica para los genes *LC* y *FAS*. Las distintas categorías de composiciones alélicas son: $lc^{+/+} : fas^{+/+}$ (alelos silvestres para ambos genes), $lc^{-/-} : fas^{-/-}$ (alelos cultivados para ambos genes), y las opciones alternadas, $lc^{+/+} : fas^{-/-}$ y $lc^{-/-} : fas^{+/+}$. Se nombran ejemplos de accesiones con valores extremos para las características de la forma del fruto.



DISCUSIÓN

La forma del fruto en la dirección medio-lateral es un carácter clave que influye en la calidad y la aceptabilidad del consumidor en tomate (*S. lycopersicum* L.), altamente relacionado con el tamaño y el peso del fruto (Nankar et al., 2020). Sin embargo, en tomate, la mayoría de los estudios realizados en morfología de fruto se han centrado en atributos en la dirección próximo-distal, por lo que el efecto de los genes principales de forma sobre caracteres en la dirección medio-lateral continúa siendo poco claro.

En el presente estudio se encontraron valores significativos y elevados de H^2 para todos los atributos de forma de fruto analizados, lo que demuestra que hay una amplia diversidad genética presente en el germoplasma de tomate para estos caracteres. Resultados similares se encontraron en estudios previos (Adhikari et al., 2020; Figàs et al., 2018; Panthee et al., 2013). Sin embargo, el análisis de caracteres morfológicos de fruto en la dirección medio-lateral sobre una colección de imágenes de estas dimensiones resulta un enfoque novedoso.

Es remarcable que los caracteres de morfología asociados al tamaño de fruto, perímetro y área, se encontraron altamente correlacionados y en forma positiva con los caracteres número de lóculos y espesor de pericarpio, y moderadamente correlacionados con el grado de irregularidad externa. Esto coincide con trabajos previos donde se demuestra que los alelos mutados o cultivados de los genes *LC* y *FAS* dan lugar a frutos con mayor número de lóculos, forma fasciada o irregular y mayor tamaño, (Barrero y Tanksley, 2004; Lippman y Tanksley, 2001; Rodríguez et al., 2011a). A su vez, se ha visto que componentes reguladores que afectan el tamaño de fruto, afectan también el espesor de pericarpio (Cheniclet et al., 2005; Czerednik et al., 2015; Gan et al., 2022). Genes o *QTL* asociados a varios caracteres pueden explicarse debido a una alta correlación existente entre los descriptores fenotípicos del fruto, o bien por efectos pleiotrópicos (Sacco et al., 2015). Por lo tanto, el estudio de los caracteres de forma en el plano medio-lateral pueden permitir la identificación indirecta de los mecanismos subyacentes del peso del fruto (Gonzalo y van Der Knaap, 2008).

Se ha comprobado que la forma del fruto puede explicarse por una pequeña cantidad de genes (Rodríguez et al., 2011a), incluidos *LC* y *FAS*, los cuales controlan las características de la forma en la dirección medio-lateral, como forma fasciada y achatada de fruto y el número de lóculos (Chu et al., 2019). Sin embargo, los resultados mostraron que existen accesiones con la misma composición alélica para *LC* y *FAS*, y valores contrastantes para los atributos morfológicos. El efecto de estos genes se correlacionó en mayor grado con el número de lóculos, pero no fue suficiente para explicar la variación presente para el carácter grado de irregularidad. Esto sugiere la presencia de genes desconocidos o con efecto modificador, que actúan en la determinación de la forma de fruto en la dirección medio-lateral y específicamente el grado de irregularidad externa. Un trabajo previo observó que los alelos mutantes del *locus fas* ocurren en la mayoría de las accesiones multiloculares planteando la posibilidad de que los mutantes del *locus lc* se seleccionaran en stocks ya fijados para mutaciones en el *locus fas*. Así la selección de



mutaciones de *lc* en dichos fondos genéticos puede haber sido mejorada por interacciones epistáticas positivas entre los ambos *loci* (Barrero y Tanksley, 2004).

Previamente se ha demostrado que las poblaciones derivadas de progenitores estrechamente relacionados, genéticamente similares, en los que *QTL* mayores se encuentran fijados, resultaron útiles para detectar nuevos *QTL* con efecto menor o modificador, permitiendo la segregación inequívoca de marcadores estrechamente relacionados con los caracteres analizados (Abe et al., 2012; Kimbara et al., 2018; Rodríguez et al., 2013). Por lo tanto, un posible enfoque para el mapeo de nuevos *QTL* subyacentes a la forma de fruto es la caracterización de poblaciones segregantes, derivadas de cruzamientos intraespecíficos entre cultivares que portan la misma constitución alélica para los genes principales de forma, pero difieren en la morfología de sus frutos. Pudiendo entonces considerar a los genes subyacentes como probables modificadores de *LC* y *FAS*.

De acuerdo a estos antecedentes y los resultados obtenidos en este Capítulo I, se seleccionaron cuatro cultivares de tomate (*S. lycopersicum*) denominados: “Voyage” (V), “Old Brooks” (OB), “Yellow Stuffer” (YS) y “Heinz 1439” (H), como progenitores iniciales para el desarrollo de poblaciones segregantes. Todos los cultivares se caracterizan por presentar hábito de crecimiento semi-indeterminado, frutos de gran tamaño, alto número de lóculos y forma achatada. Sin embargo, se diferencian en la morfología del fruto en la dirección medio-lateral (Tabla Suplementaria S1). Remarcablemente, “Voyage” presenta flores con alto número de órganos en los verticilos internos, gineceo apocárpico y frutos altamente fasciados con carpelos extras y no fusionados en una sutura carpelar normal, siendo una característica exclusiva de este cultivar en el germoplasma de tomate. El cultivar “Yellow Stuffer” tiene frutos amarillos, mientras que el resto de los cultivares presentan frutos rojos. Con respecto a los alelos conocidos que afectan la morfología del fruto, los cultivares “Voyage” y “Old Brooks” portan los alelos cultivados de *LC* y *FAS* ($lc^{-/-}$: $fas^{-/-}$), mientras que los cultivares “Yellow Stuffer” y “Heinz 1439” llevan los alelos cultivados de *LC* y alelos tipo silvestre para *FAS* ($lc^{-/-}$: $fas^{+/+}$). A su vez, los cuatro cultivares portan los alelos de tipo silvestre para los genes *SUN*, *OVATE* y *SOV1* (Rodríguez et al., 2011a; Wu et al., 2018).

A partir de los resultados de este capítulo, se plantearon dos cruzamientos intraespecíficos independientes entre cultivares con la misma composición alélica y fenotípicamente discrepantes para la morfología de frutos en la dirección medio-lateral. En este sentido, se desarrollaron poblaciones a partir de los cruzamientos entre “Voyage” x “Old Brooks” (población 1) y “Yellow Stuffer” x “Heinz 1439” (población 2). Es esperable entonces, que las poblaciones segregantes derivadas de estos cruzamientos muestren variabilidad para los caracteres de forma en la dirección medio-lateral, y dado que los genes mayores de forma no presentan polimorfismos, segregarán otros genes implicados en la determinación de estos caracteres. Por consiguiente, sería posible identificar nuevas regiones genómicas que controlan caracteres de morfología en dichas poblaciones.

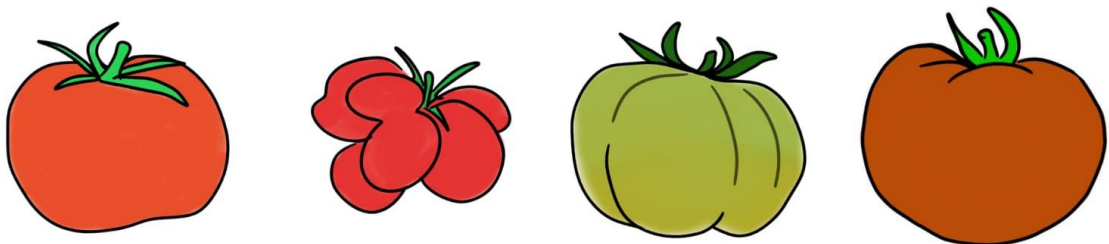


CONCLUSIONES PARCIALES

- La caracterización de la diversidad morfológica sugiere que en tomate existe una gran variabilidad genética para caracteres de forma de fruto en la dirección medio-lateral.
- La combinación de los alelos cultivados de *LC* y *FAS* no fue suficiente para explicar toda la variabilidad presente en el germoplasma de tomate. La constitución alélica se correlacionó principalmente con los caracteres de tamaño de fruto y número de lóculos y en menor nivel con el grado de irregularidad de fruto.
- Se identificaron cultivares de tomate con la misma composición alélica para los genes mayores de forma y fenotípicamente discrepantes para caracteres de morfología de frutos en la dirección medio-lateral.
- Se plantearon dos cruzamientos intraespecíficos entre cultivares, donde el efecto de los alelos conocidos que controlan la forma de fruto se encuentra fijo, pero presentan variabilidad para caracteres de morfología de fruto en el plano medio-lateral.

CAPÍTULO II

Caracterización fenotípica y estimación de parámetros genéticos en genotipos uniformes (progenitores e híbridos) en dos cruzamientos intraespecíficos





OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar características de calidad, morfológicas y bioquímicas en frutos de los cultivares de *S. lycopersicum* L.: “Voyage”, “Old Brooks”, “Yellow Stuffer” y “Heinz 1439”, y en los híbridos derivados del cruzamiento entre ellos.
- Estimar parámetros genéticos para caracteres de calidad, morfológicos y bioquímicos en frutos de los cultivares de *S. lycopersicum* L.: “Voyage”, “Old Brooks”, “Yellow Stuffer” y “Heinz 1439”, y en los híbridos derivados del cruzamiento entre ellos.
- Identificar atributos divergentes con elevada heredabilidad entre los cultivares para conducir un enfoque de *QTL-seq* e identificar nuevos *QTL*.



MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

Previamente se seleccionaron cuatro cultivares de tomate como progenitores iniciales para el presente trabajo, llamados “Voyage” (V), “Old Brooks” (OB), “Yellow Stuffer” (YS) y Heinz 1439 (H). Los mismos se escogieron ya que presentan la misma constitución alélica para los principales genes de forma pero difieren para caracteres de morfología en la dirección medio-lateral (Figura II-1). Las características de estos materiales fueron descritas en el Capítulo I.

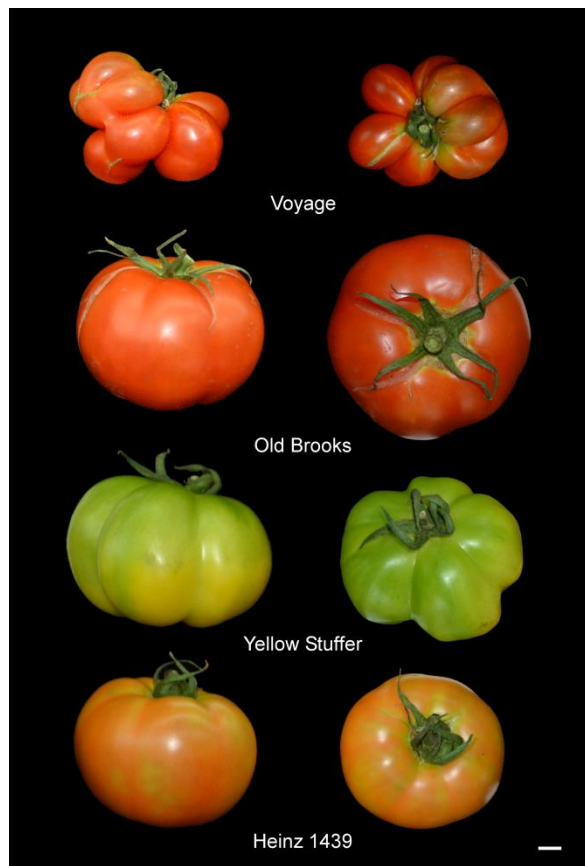


Figura II-1: Progenitores iniciales de los cruzamientos. Izquierda: vista lateral. Derecha: Vista superior. La línea horizontal blanca es la referencia de escala correspondiente a 1 cm.

Mediante cruzamiento manual de los cultivares seleccionados se obtuvieron dos híbridos o primera generación filial: F_1 VxOB y F_1 YSxH. Se siguió la metodología descrita por Rick (1973). Se realizó la emasculación manual de flores del cultivar que actuó como progenitor femenino, aproximadamente un día antes de la apertura de la flor, cuando la corola cambia de color amarillo pálido a amarillo crema. Para la polinización, se tomó una flor en anthesis del progenitor masculino, con corola amarilla y polen maduro. Se realizó un corte en cono de anteras de la flor masculina, se extrajo el polen con una pinza, y se depositó sobre el estigma de las flores femeninas, previamente emasculadas. Las flores polinizadas se etiquetaron y se recubrieron con sobre de papel para evitar polinización con otras plantas. Los sobres se retiraron pasados aproximadamente 5 días desde la



polinización. Los frutos se dejaron crecer hasta alcanzar la madurez y se cosecharon manualmente.

Se realizó la extracción de semillas, siguiendo las recomendaciones disponibles en el sitio web del *Tomato Genetics Resource Center* (<https://tgrc.ucdavis.edu/>). Las semillas se colocaron en un vaso de precipitado, y se agregó 1 volumen de HCl 25% durante 30 minutos. Luego se enjuagaron con abundante agua, se colocaron nuevamente en el vaso, se cubrieron con trisodio fosfato (TSP) 10% durante 20 minutos, y se volvieron a lavar con abundante agua. Las semillas se dejaron secar sobre papel absorbente, correctamente rotulado, durante 2 a 3 días, hasta que estuvieron completamente secas. Luego se colocaron en sobres de papel etiquetados, y se llevaron a la estufa durante 4 días a 70 °C a fin de eliminar enfermedades virósicas, como el virus del mosaico de tomate. Finalmente, los sobres con semillas se almacenaron en una cámara refrigerada a 4 °C, en un ambiente húmedo y con oscuridad, para su conservación.

En la primera campaña agrícola del presente trabajo, se sembraron en invernadero 5 plantas de cada uno de los genotipos uniformes para ambos cruzamientos: progenitores (“Voyage”, “Old Brooks”, “Yellow Stuffer” y “Heinz 1439”) y los híbridos derivados (F₁ VxOB y F₁ YSxH).

Los experimentos se llevaron a cabo en el módulo de Horticultura, localizado en el Campo Experimental Villarino de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario, en la localidad de Zavalla (33° S, 61° W). La siembra se realizó en bandejas de germinación con 72 celdas de 55 cm³ utilizando el sustrato N°1 de Dynamics (www.dynamicscompost.com.ar), durante los meses de julio/agosto. Previo a la siembra, se llevó a cabo un tratamiento de blanqueo de las semillas, sumergiéndolas durante 15 minutos en una solución de hipoclorito de sodio 2,7 % v/v para favorecer la germinación. Las bandejas se mantuvieron en invernadero con condiciones de temperatura y fotoperíodo controladas. Aproximadamente 45 días después de realizada la siembra se efectuó el trasplante a invernadero, una vez que pasó la fecha histórica de última helada. Las plantas se dispusieron en doble hilera apareada sobre lomos, con un diseño completamente aleatorizado, manteniendo una distancia entre plantas 0,35 m y una distancia entre surcos de 1 m. Los lomos fueron previamente recubiertos con *mulching* o plástico negro para el control de las malezas. El riego se realizó mediante sistema de goteo, de acuerdo al requerimiento de las plantas en los distintos estadios fisiológicos y la demanda ambiental, para evitar estrés hídrico. Las plantas fueron conducidas mediante sistema de tutorado con hilos y podadas periódicamente. A lo largo del desarrollo del cultivo se realizaron labores culturales de desmalezado, fertilización y pulverización, siguiendo las recomendaciones estándar para el cultivo en la zona.

Metodología

Caracterización fenotípica

En los genotipos uniformes correspondientes a ambos cruzamientos (parentales e híbridos) se cosecharon entre 4-8 frutos por planta, en un total de 29 individuos. La cosecha de los frutos se realizó en forma manual y escalonada para la caracterización de variables



cuantitativas de calidad, bioquímicas y morfológicas. Entre las variables analizadas se encuentran:

I) Caracteres de calidad:

Se evaluaron un total de 159 frutos, en estado de madurez pintón o rojo maduro, en función del carácter analizado. Se entiende por estado pintón cuando el fruto presenta el tamaño máximo y un 10 % de la superficie con el color de madurez, aquí se detectan visualmente los primeros síntomas de acumulación de carotenoides, y aumenta exponencialmente la liberación de etileno. Por su parte el estado rojo maduro se refiere al momento fisiológico en que el fruto alcanza enteramente su color de madurez, con máxima acumulación de carotenoides. A partir de este momento, la firmeza y acumulación de etileno del fruto disminuyen, generando pérdida de calidad comercial. (Giovannoni, 2004).

Los caracteres analizados en estado pintón fueron:

- Peso (g): medido con balanza digital al momento de la cosecha.
- Altura y diámetro (cm) de fruto: medido con calibre en el plano longitudinal y transversal, respectivamente.

El parámetro “Forma de fruto” indica el cociente entre la altura/diámetro. Así valores cercanos a uno indican forma perfectamente esférica, valores >1 indican forma alargada y valores <1 demuestran forma achatada.

- Índice de forma: relación entre altura y diámetro.
- Vida poscosecha: cantidad de días transcurridos entre la cosecha y el descarte de los frutos. Los frutos cosechados se almacenaron en estanterías a $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ y se eliminaron al presentar síntomas de ablandamiento excesivo, arrugamiento o características comercialmente inaceptables.

Los caracteres analizados en estado rojo maduro fueron:

- Color: al momento de la cosecha, se cuantificaron los parámetros del espacio CIE LAB con cromámetro portátil CR-400 Konica Minolta. Los parámetros evaluados fueron L (porcentaje de reflectancia), a (absorbencias a longitudes de onda de 540 nm) y b (absorbencias a longitudes de onda de 675 nm), y el cociente a/b. El valor se obtuvo como un promedio de tres lecturas en la zona ecuatorial de cada fruto.

- Firmeza: representa el valor promedio entre los resultados de dos mediciones realizadas con durómetro tipo Shore A (Durofel DFT100) en puntos opuestos del plano ecuatorial.

II) Caracteres morfológicos cuantitativos:

Se cosecharon 153 frutos, correspondientes a 29 plantas de los genotipos uniformes. La cosecha se realizó en estado de madurez verde maduro o pintón. El estado verde maduro se refiere al momento en que el fruto es inmaduro pero ha alcanzado su tamaño máximo y presenta semillas maduras y viables (Giovannoni, 2004). Los frutos se cortaron en la dirección medio-lateral, se secaron con papel absorbente, se colocaron con el lado cortado hacia abajo en un escáner y se digitalizaron a 300 ppp (píxeles por pulgada) con un escáner. Se escaneó una mitad por fruto para obtener una imagen digital representativa de cada



planta con repeticiones. Las imágenes se analizaron con el programa informático *Tomato Analyzer 3.0* (Rodríguez et al., 2010, 2011b). Se siguieron las recomendaciones para la toma de imágenes descritas por Brewer et al. (2006). Se realizó el ajuste manual del perímetro y bordes de pericarpio en cada imagen y se llevó a cabo la medición automática de los atributos morfológicos como se describe en el Capítulo I. Se consideraron las variables perímetro, área, ancho, y alto máximo, grado de irregularidad, área de pericarpio y espesor de pericarpio. Finalmente el número de lóculos se contabilizó en forma automática, sobre las imágenes digitales con la herramienta *LocAnalyzer* (Spetale et al., 2020) basada en visión por computadora.

III) Caracteres bioquímicos

Se evaluaron sobre un total de 27 muestras de jugo homogeneizado, formado por 10g de jugo disueltos en 100 ml de agua destilada. Los jugos se obtuvieron a partir del pericarpio de frutos cosechados en estado rojo maduro.

- Sólidos solubles (°brix): porcentaje de glucosa más fructosa, medido en un jugo homogeneizado, con refractómetro manual.
- Acidez: evaluada a través del pH del jugo homogeneizado y de la acidez titulable (en gramos de ácido cítrico/100 gramos de jugo homogeneizado) calculada en función del volumen de NaOH 0,1 N necesario para llevar a 8,1 el pH del jugo.

IV) Caracteres cualitativos:

La evaluación del carácter tipo de carpelos se realizó primero sobre un total de 14 plantas de las generaciones uniformes únicamente en la población 1 (cultivares “Voyage” y “Old Brooks” e híbrido F₁ VxOB). Se cosecharon 5 frutos promedio por planta, con un mínimo de cuatro frutos por planta. La cosecha de los frutos se realizó en forma manual y escalonada cuando los frutos alcanzaron el tamaño máximo. Se clasificó visualmente cada fruto en función del tipo de carpelos, ya sea fusionado o no fusionado (Figura II-2).



Figura II-2: Frutos representativos de los fenotipos fusionados y no fusionados

También se caracterizó el color de frutos sobre un total de 38 plantas de las generaciones uniformes de ambos cruzamientos.

Análisis estadísticos



Se estimaron los valores medios, errores estándares, varianza para todos los caracteres. Se determinó la normalidad para cada carácter con la prueba de Shapiro y Wilk (1965). Se determinó si existían diferencias significativas entre los valores medio de los progenitores utilizando la prueba de ANOVA, considerando una significancia del 5%. Cuando existieron diferencias significativas, se realizó la comparación de medias con la prueba de Duncan. Se utilizó la prueba *t-Student* o su alternativa no paramétrica Wilcoxon para discriminar si existían diferencias significativas entre las medias de los progenitores y el híbrido derivado de ellos. Con estos datos se determinó la acción génica en la F_1 . Se definieron cuatro tipos diferentes de acción génica: dominancia, sobredominancia, aditividad y dominancia parcial siguiendo la metodología descrita por Gimenez et al. (2021). Se consideró acción génica de dominancia cuando no se encontraron diferencias significativas entre el híbrido y el valor medio presentado por un genotipo parental. Se estableció una acción de sobredominancia cuando el valor medio del híbrido era significativamente mayor/menor que el del progenitor de mayor/menor valor. La acción génica se definió como aditiva cuando el valor medio del híbrido estaba dentro del rango de la media de ambos padres y presentó al menos una desviación estándar de diferencia de los genotipos de ambos padres. Se consideró dominancia parcial cuando el valor medio del híbrido difería significativamente de los valores medios intermedios de ambos progenitores y tenían al menos una desviación estándar de diferencia con respecto al valor medio de ambos progenitores. Se calculó la heredabilidad en sentido amplio (H^2) y error estándar de todos los caracteres con distribución normal, a través de los distintos componentes de la varianza obtenidos por ANOVA (Mariotti y Collavino, 2014). En todos los análisis se consideró un umbral de significancia de 5%. Los análisis se realizaron con el programa informático *Infostat*, versión 2017 (Di Rienzo et al., 2001).



RESULTADOS

Caracterización fenotípica y genética de los progenitores y la generación F₁

Los caracteres presentaron una distribución de frecuencias que se ajustó a lo esperado para una distribución normal, a excepción de los parámetros: b, firmeza, altura máxima, pH y acidez, que mostraron una distribución no-normal.

La información de valores medios y errores estándar para todos los caracteres analizados en los cultivares progenitores se describe en la Tabla II-1. Si bien todos los cultivares mostraron elevado peso de fruto y forma achatada (índice de forma "H/D" < 1), se encontraron diferencias significativas entre ellos para los caracteres altura, forma y peso, donde "Heinz 1439" y "Old Brooks" presentaron mayor peso, altura de frutos, y forma menos achatada (Figura II-3, Tabla II-1). Existieron diferencias para color (a, b, a/b y L) debido a que "Yellow Stuffer" tiene frutos color amarillo y el resto de los cultivares frutos color rojo (Figura II-3). También se evidenciaron diferencias significativas para vida poscosecha, donde los frutos del cultivar "Heinz 1439" mostraron mayor vida poscosecha. Se observaron diferencias significativas para todos los caracteres morfológicos en la dirección medio-lateral, excepto para el perímetro. Es notable que todos los cultivares presentan frutos con alto número de lóculos, pero este valor fue muy superior en "Voyage" (11 lóculos en promedio). A su vez fueron importantes las diferencias para grado de irregularidad externa, donde "Voyage" es marcadamente más irregular que el resto de los cultivares. En cuanto a los caracteres relacionados al tamaño: área, ancho y alto máximos, se corresponden con los datos de peso en los distintos cultivares, presentando "Old Brooks" y "Heinz 1439" los mayores valores para todos estos caracteres. Finalmente los cultivares presentaron diferencias en los caracteres asociados al sabor, acidez titulable y sólidos solubles, donde "Old Brooks" mostró el mayor valor para sólidos solubles y el menor valor de acidez.

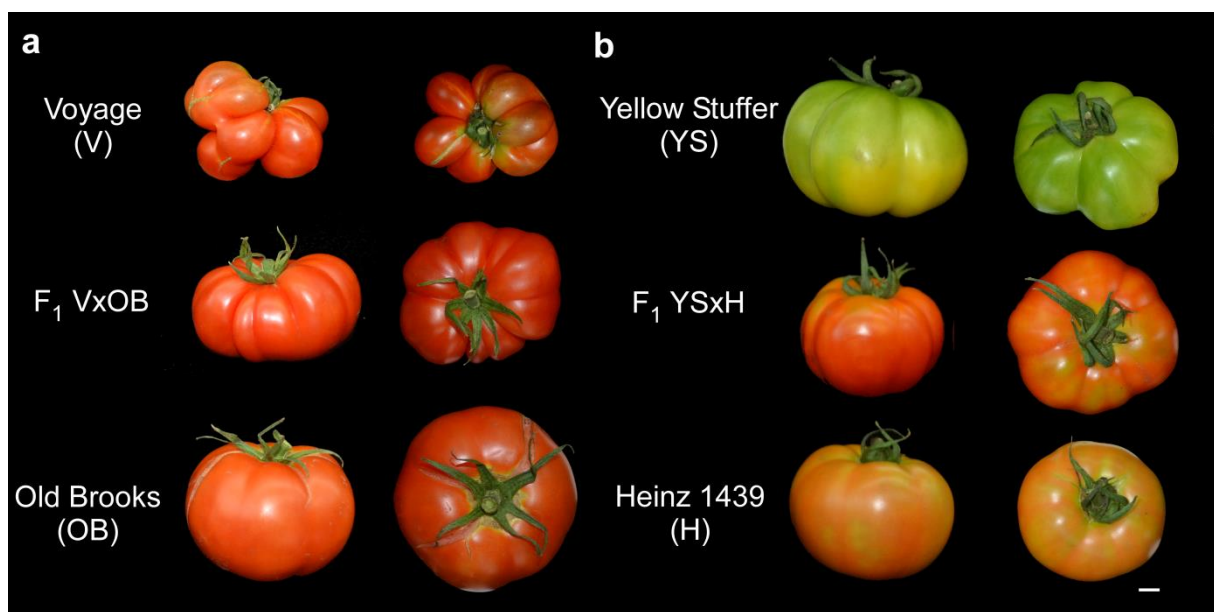


Figura II-3: Cultivares progenitores y sus híbridos. a) Población 1. b) Población 2. Izquierda: Vista lateral. Derecha: Vista superior. La línea horizontal blanca es la referencia de escala correspondiente a 1 cm.



El cultivar “Voyage” mostró un fenotipo con frutos de carpelos no fusionados en una sutura carpelar normal, mientras que el resto de progenitores tuvieron frutos normales fusionados en el total de frutos analizados.

Los valores de heredabilidad en sentido amplio (H^2) entre los cultivares fueron significativos para todos los caracteres, excepto para diámetro y perímetro. La heredabilidad resultó elevada para todos los caracteres evaluados y los valores estuvieron en el rango entre 0,93 para el carácter grado de irregularidad y 0,68 para espesor de pericarpio (Tabla II-1).



Tabla II-1: Media, error estándar (ee) y heredabilidad en sentido amplio (H^2) para los caracteres analizados en los cultivares progenitores.

	Voyage			Old Brooks			Yellow Stuffer			Heinz 1439			$H^2 \pm ee$	
	media	$\pm ee$		media	$\pm ee$		media	$\pm ee$		media	$\pm ee$			
Caracteres Calidad	Diámetro (D)	6,17	$\pm 0,13$	<i>a</i>	6,53	$\pm 0,27$	<i>a</i>	6,22	$\pm 0,36$	<i>a</i>	7,01	$\pm 0,12$	<i>a</i>	ns
	Altura (h)	4,21	$\pm 0,09$	<i>a</i>	5,50	$\pm 0,15$	<i>c</i>	4,79	$\pm 0,30$	<i>b</i>	5,86	$\pm 0,03$	<i>c</i>	0,75 $\pm 0,19$ ***
	Forma(h/D)	0,69	$\pm 0,02$	<i>a</i>	0,85	$\pm 0,02$	<i>c</i>	0,78	$\pm 0,03$	<i>b</i>	0,84	$\pm 0,01$	<i>c</i>	0,69 $\pm 0,20$ ***
	Peso	65,81	$\pm 5,43$	<i>a</i>	130,69	$\pm 16,54$	<i>b</i>	85,01	$\pm 13,42$	<i>a</i>	162,99	$\pm 5,52$	<i>b</i>	0,72 $\pm 0,20$ ***
	a	13,79	$\pm 1,39$	<i>b</i>	12,51	$\pm 1,15$	<i>b</i>	-5,10	$\pm 1,34$	<i>a</i>	14,69	$\pm 1,52$	<i>b</i>	0,91 $\pm 0,14$ ****
	b*	30,03	$\pm 1,42$	<i>a</i>	29,35	$\pm 0,40$	<i>a</i>	43,52	$\pm 1,25$	<i>b</i>	30,74	$\pm 0,86$	<i>a</i>	nc
	a/b	0,48	$\pm 0,02$	<i>b</i>	0,43	$\pm 0,04$	<i>b</i>	-0,13	$\pm 0,03$	<i>a</i>	0,49	$\pm 0,06$	<i>b</i>	0,90 $\pm 0,15$ ****
	L	50,36	$\pm 0,30$	<i>b</i>	48,84	$\pm 0,43$	<i>ab</i>	57,05	$\pm 0,87$	<i>c</i>	47,63	$\pm 1,01$	<i>a</i>	0,87 $\pm 0,16$ ****
	Firmeza*	52,09	$\pm 2,92$	<i>a</i>	57,55	$\pm 3,72$	<i>a</i>	63,44	$\pm 3,00$	<i>a</i>	58,69	$\pm 1,79$	<i>a</i>	nc
Vida Poscosecha	7,73	$\pm 0,86$	<i>a</i>	5,55	$\pm 0,88$	<i>a</i>	7,41	$\pm 0,79$	<i>a</i>	15,95	$\pm 0,59$	<i>b</i>	0,88 $\pm 0,16$ ****	
Caracteres Morfológicos	Núm. de lóculos	10,60	$\pm 0,45$	<i>d</i>	7,26	$\pm 0,70$	<i>c</i>	3,75	$\pm 0,35$	<i>a</i>	5,93	$\pm 0,19$	<i>b</i>	0,91 $\pm 0,14$ ****
	Perímetro	18,32	$\pm 0,89$	<i>a</i>	19,47	$\pm 0,75$	<i>a</i>	16,36	$\pm 0,79$	<i>a</i>	18,51	$\pm 0,77$	<i>a</i>	ns
	Área	14,61	$\pm 0,88$	<i>a</i>	27,09	$\pm 2,05$	<i>b</i>	16,45	$\pm 1,09$	<i>a</i>	24,61	$\pm 2,07$	<i>b</i>	0,74 $\pm 0,20$ ***
	Ancho máx.	4,32	$\pm 0,14$	<i>a</i>	5,87	$\pm 0,26$	<i>b</i>	4,53	$\pm 0,19$	<i>a</i>	5,48	$\pm 0,22$	<i>b</i>	0,72 $\pm 0,20$ ***
	Alto máx.*	4,54	$\pm 0,18$	<i>a</i>	5,86	$\pm 0,21$	<i>b</i>	4,70	$\pm 0,14$	<i>a</i>	5,62	$\pm 0,24$	<i>b</i>	nc
	Grado Irregularidad	7,66	$\pm 0,56$	<i>c</i>	1,61	$\pm 0,23$	<i>a</i>	3,51	$\pm 0,36$	<i>b</i>	1,15	$\pm 0,07$	<i>a</i>	0,93 $\pm 0,12$ ****
	Área Pericarpio	0,40	$\pm 0,01$	<i>b</i>	0,30	$\pm 0,02$	<i>a</i>	0,50	$\pm 0,02$	<i>c</i>	0,42	$\pm 0,02$	<i>b</i>	0,80 $\pm 0,18$
	Espesor Pericarpio	0,89	$\pm 0,08$	<i>a</i>	0,93	$\pm 0,05$	<i>a</i>	1,28	$\pm 0,05$	<i>b</i>	1,29	$\pm 0,04$	<i>b</i>	0,68 $\pm 0,20$ ****

Abreviaciones: a= parámetro de color verde/rojo, b= parámetro de color azul/amarillo, a/b= índice de color, L= luminosidad, Unidades: diámetro, altura, perímetro ancho y alto máximos en cm; área en cm², firmeza en %, vida poscosecha en días; sólidos solubles en °Brix; acidez en gr ácido cítrico/100gr de jugo. Letras cursivas distintas representan diferencias significativas (p<0,05). p-valor del ANOVA: >0,5= ns, < 0,001 y >= 0,0001 ****, < 0,0001 ****. nc: no calculado (cuando el carácter resultó no normal).



Tabla II-1: Media, error estándar (ee) y heredabilidad en sentido amplio (H^2) para los cultivares progenitores (continuación).

		Voyage media \pm ee			Old Brooks media \pm ee			Yellow Stuffer media \pm ee			Heinz 1439 media \pm ee			$H^2 \pm$ ee		
Caracteres Bioquímicos	Sólidos Solubles	4,88	\pm 0,19	c	4,87	\pm 0,27	c	3,32	\pm 0,07	a	4,08	\pm 0,06	b	0,87	\pm 0,17	****
	pH	4,37	\pm 0,10	a	4,79	\pm 0,14	a	4,41	\pm 0,04	a	4,38	\pm 0,10	a			nc
	Acidez	0,59	\pm 0,03	b	0,33	\pm 0,03	a	0,33	\pm 0,02	a	0,39	\pm 0,01	ab			nc
Caracteres cualitativos	Color Visual	Rojo			Rojo			Amarillo			Rojo					
	Tipo de Carpelo	No fusionado			Fusionado			Fusionado			Fusionado					

Abreviaciones: a= parámetro de color verde/rojo, b= parámetro de color azul/amarillo, a/b= índice de color, L= luminosidad, Unidades: diámetro, altura, perímetro ancho y alto máximos en cm; área en cm^2 , firmeza en %, vida poscosecha en días; sólidos solubles en °Brix; acidez en gr ácido cítrico/100gr de jugo. Letras distintas representan diferencias significativas ($p < 0,05$). p-valor del ANOVA: $>0,5=$ ns, $< 0,001$ y $\geq 0,0001$ ***, $< 0,0001$ ****. nc: no calculado (cuando el carácter resultó no normal).



Los valores medios, error estándar y acción génica de todos los caracteres analizados en los híbridos se detallan en la Tabla II-2. Considerando las acciones génicas, en el híbrido F_1 VxOB, se observó dominancia completa hacia “Voyage” (DcV) para los caracteres altura, peso, área, ancho y alto máximo; dominancia completa hacia “Old Brooks” (DcOB) para los caracteres: L, número de lóculos y grado de irregularidad; dominancia parcial (Dp) para índice de forma; y aditividad para área de pericarpio. Por otro lado, en el híbrido F_1 YSxH, se presentó dominancia completa hacia “Yellow Stuffer” (DcYS) para los caracteres: altura, peso, vida poscosecha, número de lóculos, área, ancho y alto máximo y acidez titulable; dominancia completa hacia “Heinz 1439” (DcH) para a, b, a/b, L y sólidos solubles. También se observó dominancia parcial (Dp) para el carácter grado de irregularidad y aditividad para área de pericarpio. El híbrido F_1 VxOB mostró un fenotipo fusionado para el carácter tipo de carpelos en el total de frutos analizados. Esto indica que existe una dominancia de los alelos del progenitor “Old Brooks”, que cuenta con frutos normales.



Tabla II-2: Valores medios, error estándar y acción génica de todos los caracteres en los híbridos.

		F ₁ "Voyage" x "Old Brooks"		F ₁ "Yellow Stuffer" x "Heinz 1439"	
		media ± ee	Acción Génica	media ± ee	Acción Génica
Caracteres Calidad	Diámetro (D)	5,61 ± 0,09	nc	5,77 ± 0,16	nc
	Altura (h)	4,07 ± 0,04	DcV	4,48 ± 0,10	DcYS
	Forma(h/D)	0,74 ± 0,01	Dp	0,78 ± 0,01	nc
	Peso	70,88 ± 3,22	DcV	81,77 ± 5,77	DcYS
	a	15,58 ± 0,71	nc	10,97 ± 2,37	DcH
	b*	28,68 ± 0,39	nc	31,37 ± 0,79	DcH
	a/b	0,56 ± 0,03	nc	0,39 ± 0,08	DcH
	L	48,25 ± 0,50	DcOB	49,32 ± 1,32	DcH
	Firmeza*	48,87 ± 2,02	nc	61,01 ± 2,15	nc
Vida Poscosecha	7,88 ± 0,65	nc	9,50 ± 1,06	DcYS	
Caracteres Morfológicos	Núm, de lóculos	6,28 ± 0,55	DcOB	4,26 ± 0,23	DcYS
	Perímetro	15,28 ± 0,27	nc	15,24 ± 0,47	nc
	Área	16,70 ± 0,57	DcV	16,46 ± 0,99	DcYS
	Ancho máx,	4,56 ± 0,07	DcV	4,51 ± 0,13	DcYS
	Alto máx,*	4,64 ± 0,10	DcV	4,63 ± 0,15	DcYS
	Grado Irreg,	1,52 ± 0,08	DcOB	1,51 ± 0,07	Dp
	Área Pericarpio	0,35 ± 0,02	Aditividad	0,44 ± 0,01	Aditividad
	Espesor Pericarpio	0,87 ± 0,04	nc	1,15 ± 0,03	nc
Caracteres Bioquímicos	SS	5,13 ± 0,16	nc	4,30 ± 0,10	DcH
	pH	4,50 ± 0,04	nc	4,62 ± 0,04	nc
	Acidez	0,39 ± 0,02	nc	0,28 ± 0,01	DcYS
Caracteres Cualitativos	Color Visual	Rojo		Rojo	
	Tipo de Carpelo	Fusionado		Fusionado	

Abreviaciones: a= parámetro de color verde/rojo, b= parámetro de color azul/amarillo, a/b= índice de color, L= luminosidad, Unidades: diámetro, altura, perímetro ancho y alto máximos en cm; área en cm², firmeza en %, vida poscosecha en días; sólidos solubles en °Brix; acidez en gr ácido cítrico/100gr de jugo. nc: no calculado (cuando no existieron diferencias significativas entre los progenitores); DcV= Dominancia completa de "Voyage", DcOB= Dominancia completa de "Old Brooks", Dp= Dominancia parcial; DcYS= Dominancia completa de "Yellow Stuffer"; DcH= Dominancia completa de "Heinz 1439".



DISCUSIÓN

Se evidenciaron diferencias significativas para todos los caracteres de calidad y bioquímicos, teniendo en consideración los cuatro cultivares seleccionados en el Capítulo I, excepto para diámetro, firmeza y pH. Si bien todos los cultivares mostraron frutos grandes y de forma achatada, “Old Broks” y “Heinz 1439” presentaron frutos con mayor altura y peso. Las diferencias encontradas para los caracteres de color están dadas por el cultivar “Yellow Stuffer”, el cual tiene frutos amarillos, mostrando en consecuencia valores mayores para los parámetros b (color azul/amarillo) y L (luminosidad), y menores valores del parámetro a (color verde/rojo). El cultivar “Old Brooks” exhibió el mayor valor para sólidos solubles y el menor para acidez. Sin embargo, si se analizan los pares de cultivares de cada cruzamiento planteado, no existieron diferencias significativas entre los cultivares “Voyage” y “Old Brooks” para los caracteres de calidad y bioquímicos analizados, pero sí para los rasgos altura e índice de forma, peso, y luminosidad. Por su parte, “Yellow Stuffer” y “Heinz 1439” difieren para los parámetros de altura, color y firmeza, vida poscosecha, acidez y sólidos solubles. Previamente, Di Giacomo et al. (2020) identificaron un *QTL*, cuyos alelos silvestres al estado homocigota se encontraron presentes en frutos amarillos y se asociaron a mayor vida poscosecha y firmeza, lo que sugiere el efecto pleiotrópico entre genes involucrados en la determinación del color y madurez del fruto. Contrariamente, los datos evidenciaron mayor vida poscosecha para el cultivar “Heinz 1439” y menor firmeza.

Por otro lado, todos los caracteres de morfología analizados en la dirección medio-lateral mostraron diferencias significativas entre los cuatro cultivares de tomate estudiados, a excepción del carácter perímetro. Esto podría explicarse ya que todos los cultivares presentan forma achatada, y las diferencias en el peso del fruto se explican por diferencias en la altura, mientras que el diámetro, y por consiguiente el perímetro, fueron similares en todos los cultivares. Al considerar las diferencias entre pares de cultivares, discriminando por cruzamiento, existieron diferencias significativas para todos los caracteres, menos para el perímetro y espesor de pericarpio. En un trabajo anterior, Gonzalo et al. (2009) observaron una correlación fenotípica positiva y superposición de los *loci* subyacentes al pericarpio, área de la placenta, grado de irregularidad, el número de lóculos y el tamaño o masa de fruto. Esto sugiere que los caracteres de forma resultan buenos indicadores del tamaño o peso de los frutos en tomate. Otro estudio, de 75 descriptores sobre 150 accesiones de tomate, mostró una asociación estrecha positiva entre el tamaño y la forma del fruto, pero notablemente los rasgos de la sección latitudinal relacionados con el pericarpio, incluyendo el grado de irregularidad, estuvieron claramente separados de aquellos asociados a la forma y el tamaño del fruto (Nankar et al., 2020).

Valores de heredabilidad altos indican que la mayor parte de la variación entre individuos es causada por la variación genética entre esos individuos y no por la variación ambiental. Esto significa entonces, que existe poco lugar para cambios ambientales que alteren el fenotipo (Kearsey y Pooni, 1996), demostrando la importancia de una mejora genética en estos caracteres. El carácter que exhibió mayor valor de H^2 fue el grado de irregularidad ($H^2=0,93$) lo que indica que se encuentra poco influenciado por el ambiente en su expresión fenotípica.



Las acciones génicas dependieron del cruzamiento y carácter analizado, sin embargo existió una mayor correspondencia entre las acciones génicas de ambas poblaciones para los caracteres de morfología, donde el progenitor de menor tamaño (“Voyage” y “Yellow Stuffer”), presentó dominancia sobre los caracteres de tamaño de fruto. A su vez, el número de lóculos, mostró dominancia del progenitor de menor valor en ambos cruzamientos y el grado de irregularidad mostró acción génica diferencial entre los híbridos, así en la F_1 VxOB este carácter exhibió dominancia del progenitor de forma regular (“Old Brooks”) y en la F_1 YSxH dominancia parcial hacia la forma regular. Esto es coincidente con un estudio previo donde se observó un efecto de dominancia y dominancia parcial hacia los menores valores, para los marcadores analizados de número de lóculos y fenotipo fasciado (Barrero y Tanksley, 2004).

El fenotipo tipo de carpelo no fusionado, presente en el cultivar “Voyage”, es un rasgo de herencia cualitativa, por lo que presentaría naturaleza monogénica u oligogénica, es decir que estaría controlado por el efecto de uno o pocos genes de elevada heredabilidad. Revisiones anteriores informaron que la existencia de alelos mutantes de *FAS* se han asociado con carpelos no fusionados (Barrero y Tanksley, 2004; Tanksley, 2004). Este es un rasgo de relevancia morfogénica e histórica, ya que el desarrollo de la sincarpia, la fusión de los carpelos en un gineceo compuesto unificado, se considera un aspecto clave, con efecto dominante y numerosas ventajas a lo largo de la evolución de las angiospermas (Armbruster et al., 2002). El proceso inverso, la separación de carpelos a partir de primordios de carpelos combinados, durante el desarrollo del gineceo se ha encontrado previamente en otras especies dicotiledóneas de los géneros *Phytolacca* y las familias Quillajaceae y Surianaceae del orden Fabales (Bello et al., 2008; Endress et al., 1983; Zhang et al., 2018). Sin embargo hasta el momento, no se registran estudios de dicho carácter en tomate. Debido a que “Old Brooks” presenta el fenotipo normal para dicho carácter, las poblaciones F_2 derivadas del cruzamiento de estos cultivares, deberían presentar segregación para el tipo de carpelos.

En función de estas consideraciones, en adelante el trabajo se centrará en el estudio de los mecanismos genéticos subyacentes a los caracteres cuantitativos de morfología en poblaciones segregantes. A su vez, debido a que el carácter tipo de carpelos no fusionados resultó un fenotipo exclusivo del cultivar “Voyage” dentro del germoplasma de tomate, mientras que Old Brooks exhibe frutos normales, se propone profundizar en el estudio de este rasgo en la población segregante derivada del cruzamiento de ambos cultivares.

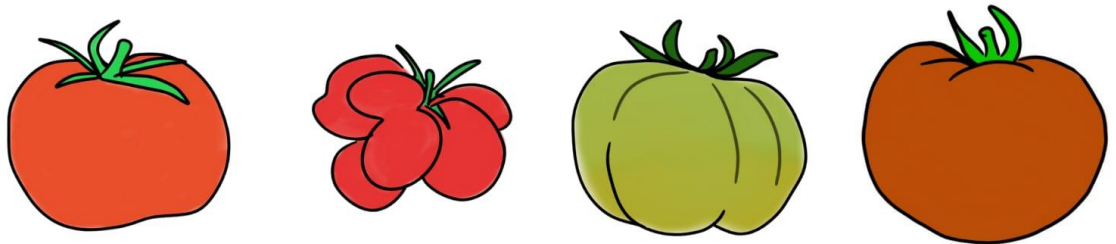


CONCLUSIONES PARCIALES

- Los cultivares se diferenciaron principalmente para caracteres de morfología en el plano medio-lateral y tamaño de fruto.
- Se hallaron elevados valores de heredabilidad en sentido amplio para la mayor parte de los caracteres analizados, y el grado de irregularidad exhibió el mayor valor. Esto indica una baja influencia del componente ambiental en la expresión del fenotipo y evidencia la importancia de la mejora genética de estos rasgos.
- Las acciones génicas fueron variables, sin embargo existió una mayor correspondencia entre ambas poblaciones para los caracteres de morfología. Así el progenitor de menor tamaño mostró dominancia sobre los caracteres de tamaño de fruto en ambas poblaciones, el número de lóculos exhibió dominancia del padre de menor valor y el grado de irregularidad presentó dominancia completa y dominancia parcial del progenitor de forma regular en la F_1 VxOB y F_1 YSxH, respectivamente.
- El fenotipo tipo de carpelos no fusionados es una característica única del cultivar “Voyage” en el germoplasma de tomate. Por su naturaleza cualitativa, dicho carácter presenta elevada heredabilidad y se encontrará segregando en la población F_2 derivada del cruzamiento de este cultivar con “Old Brooks”

CAPÍTULO III

Identificación de *loci* que controlan el carácter tipo de carpelo en la población F₂ “Voyage” x “Old Brooks”





OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar fenotípicamente las poblaciones derivadas del cruzamiento entre los cultivares de tomate *S. lycopersicum* L. “Voyage” y “Old Brooks” para el carácter tipo de carpelos.
- Estudiar el tipo de herencia del carácter tipo de carpelos mediante la evaluación de poblaciones derivadas del cruzamiento entre los cultivares de tomate *S. lycopersicum* L. “Voyage” y “Old Brooks”.
- Identificar regiones polimórficas entre grupos fenotípicamente extremos para el carácter tipo de carpelos en una población segregante F₂ derivada del cruzamiento entre los cultivares de tomate *S. lycopersicum* L. “Voyage” y “Old Brooks”, a través de un enfoque de *QTL-seq*.
- Confirmar las regiones genómicas asociadas al carácter tipo de carpelos identificadas en una población segregante completa, a través de marcadores moleculares.



MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

Se desarrollaron poblaciones segregantes derivadas del cruzamiento entre los cultivares de tomate “Voyage” (V) y “Old Brooks” (OB) para la caracterización y estudio de los mecanismos genéticos subyacentes al carácter tipo de carpelo. Se obtuvo el híbrido F_1 VxOB mediante castración y polinización manual. Luego, por autofecundación de flores F_1 se obtuvieron las semillas de las poblaciones de la segunda generación filial (F_2 VxOB). También se realizó el cruzamiento manual de las plantas F_1 VxOB con ambas líneas parentales, para obtener las correspondientes retrocruzas (BC, del inglés *backcross*). En este sentido, se emascularon flores provenientes de plantas híbridas y se polinizaron manualmente con polen de plantas “Voyage” para obtener por un lado las semillas de la retrocruza BC_{1-1} ($F_1 \times V$); y con polen del parental “Old Brooks” para generar por otro lado semillas de la retrocruza BC_{1-2} ($F_1 \times OB$). La metodología utilizada para realizar la polinización, obtención y extracción de semillas, siembra y cultivo de los materiales vegetales resultó idéntica en todas las campañas agrícolas a la que describe en la sección de Materiales y Métodos del Capítulo II. Los materiales vegetales analizados en este Capítulo se describen a continuación por campaña agrícola en la que se desarrollaron:

- Campaña año n° 2: se sembraron 5 plantas de cada uno de los cultivares “Voyage” y “Old Brooks” y el híbrido derivado de ellos (F_1 VxOB); junto con 100 plantas de la población segregante F_2 VxOB. Del total de plantas se perdió el 24 % debido a la ocurrencia de factores ambientales y patológicos durante el trasplante y cultivo. El número final de plantas F_2 resultó en 76.

- Campaña año n° 3: se llevó a cabo la siembra de un total de 215 plantas correspondientes a ambos progenitores (V y OB), híbrido (F_1 VxOB), población F_{2-2} VxOB y las retrocruzas del híbrido hacia los dos progenitores ($BC_{1-1} = F_1 \times V$ y $BC_{1-2} = F_1 \times OB$). Debido a la pérdida por factores ambientales y patológicos durante el trasplante y cultivo, la cantidad de plantas final para cada generación fue: “Voyage” (n=4), “Old Brooks” (n=3), F_1 VxOB (n=2), F_2 VxOB (n=83) y ambas retrocruzas: BC_{1-1} (n= 17), BC_{1-2} (n=47), sumando un total de 156 plantas.

Metodología

Caracterización fenotípica del carácter tipo de carpelos en poblaciones segregantes

Se determinó visualmente el carácter tipo de carpelos, diferenciando entre fenotipo fusionado o no fusionados, sobre un total de 76 plantas de la generación F_2 VxOB (ver campaña n°2) y 156 plantas correspondientes a las 6 generaciones básicas derivadas del cruzamiento de “Voyage” y “Old Brooks” (ver campaña n°3). Debido a que el carácter tipo de carpelos presentó expresividad variable, siendo el fenotipo más extremo en las primeras inflorescencias y en los primeros frutos de las inflorescencias, se consideró como no fusionada a aquella planta que mostró al menos un fruto con fenotipo no fusionado. Se probó la segregación mendeliana y las segregaciones esperadas para dos *loci* con tipo de epistasis doble recesiva, doble dominante y doble recesivo-dominante en todas las generaciones mediante la prueba de bondad de ajuste Chi-Cuadrado.



Identificación de regiones genómicas asociadas al carácter tipo de carpelo mediante el enfoque de *QTL-seq*

Se siguió la metodología descrita por Takagi et al. (2013), con modificaciones. Dicho enfoque combina la técnica de análisis de grupos segregantes (BSA, *Bulk Segregant Analysis*) y secuenciación de genoma de los grupos o mezclas de ADN.

Extracción y cuantificación de ADN en plantas F_2 discrepantes para el carácter tipo de carpelos y conformación de mezclas de ADN para secuenciación

En la población F_2 “Voyage” x “Old Brooks” (campaña año nº 2), se seleccionaron 20 plantas con fenotipo discrepante para el carácter tipo de carpelos, es decir 10 plantas con frutos de carpelos fusionados o normales y 10 plantas con frutos de carpelos no fusionados, para conformar dos grupos segregantes.

El ADN genómico de las plantas F_2 se extrajo siguiendo las metodologías descritas por Bernatzky y Tanksley (1986) y Fulton et al. (1995). La obtención de ADN se realizó a partir de 10 g de tejido foliar. El tejido se molió en licuadora junto con la solución *buffer* de extracción (0,35 M Sorbitol; 0,1 M Tris; 5Mm EDTA pH 8,25 y bisulfito de sodio) hasta pulverizar completamente las hojas, y se filtró la fase líquida con gazas para obtener una muestra homogeneizada del tejido. Se equilibró el peso de todas las muestras agregando solución *buffer* de extracción y luego se centrifugaron a 617 rcf durante 16 minutos. Se eliminó el sobrenadante, se agregaron las soluciones *buffer* para la lisis de núcleos y *Sarkosyl* y se re-suspendió el precipitado. Posteriormente se agitaron las muestras y se incubaron durante 30 minutos en un baño termostático a 65 °C. A continuación se agregó clorofomo:isoamílico (24:1) y se agitó por inversión durante 5 minutos. Las muestras se llevaron a la centrifuga a 617 rcf durante 16 minutos. El sobrenadante se trasvasó a un tubo nuevo y se añadieron 10 ml de isopropanol frío. El tubo se agitó suavemente hasta observar el ADN precipitado. El ADN se recolectó con una pipeta Pasteur y se lavó con una solución de 70 % v/v de etanol, se dejó secar a temperatura ambiente y se re-suspendió en 300 μ l de *buffer* TE (10 mM Tris pH 7,4 y 1 mM EDTA pH 8,0). Finalmente el ADN se disolvió colocando los tubos en el baño termostático a 65 °C por 30 minutos, y se precipitó al centrifugarlos durante 10 minutos a 9.500 rcf.

La cantidad e integridad de ADN extraído se evaluó en geles de agarosa al 1 % p/v teñidos con SYBRTM Safe (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA, EEUU) a través de la comparación con un estándar de ADN del fago lambda, con concentración conocida igual a 25 ng/ μ l. También se realizó la cuantificación de la concentración de ADN para cada muestra mediante espectrofotometría con un equipo NanoDropTM Lite (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA, EEUU). Por último, las muestras se igualaron a una concentración final de 50 ng/ μ l. El ADN de cada planta se mezcló proporcionalmente, tomando 10 μ l de cada una para conformar dos mezclas o *grupos* de 100 μ l con una concentración final igual 50 ng/ μ l de ADN. Los grupos de ADN se purificaron utilizando el kit comercial DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen). La concentración final de los grupos de ADN también se evaluó en geles de agarosa al 1 % p/v teñidos con SYBRTM Safe (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA, EEUU) y espectrofotómetro (NanoDropTM Lite, Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA, EEUU).



Secuenciación, alineado de genomas y comparación de secuencias genómica de grupos segregantes para el carácter tipo de carpelos

Las muestras de los dos grupos fueron secuenciadas en el Centro de Acceso a la Tecnología del Genoma o GTAC (Universidad de Washington, Saint Louis, Missouri, EEUU) con un equipo Illumina HiSeq 2500 en una célula de flujo de 2x101 lecturas apareadas.

Mediante la secuenciación del ADN se obtuvieron dos archivos FASTQC por cada grupo, provenientes de las lecturas apareadas. Estos archivos contienen la secuencia total fragmentada en millones de lecturas cortas y sus correspondientes puntuaciones de calidad (Q). Los datos de secuencia sin procesar se filtraron utilizando el programa Trim Galore (<https://github.com/FelixKrueger/TrimGalore>), versión 0.4.5, para eliminar las secuencias del adaptador Illumina (secuencia universal AGATCGGAAGAGC) y lecturas con mala calidad. Se consideró como límite de calidad un valor de Q igual a 20, lo que equivale a un 99% de precisión. Se dispuso una superposición requerida con la secuencia del adaptador mínima de 6 bases y se eliminaron ambas lecturas apareadas si al menos una de ellas resultó de una longitud menor a 60 pb. Se evaluó la calidad de las lecturas recortadas mediante el programa FastQC, versión 0.11.4 (Andrews et al., 2010). Las lecturas cortas de los dos bloques de ADN se alinearon con la secuencia del genoma de consenso del tomate (*S. lycopersicum* L. cultivar Heinz 1706, versión de ensamblaje de referencia SL4.0) (The Tomato Genome Consortium, 2012) usando Bowtie 2, versión 2.3.2 (Langmead y Salzberg, 2013), con la opción “--very-sensitive-local”. Se obtuvieron así dos archivos de secuencia alineados en formato SAM (*Sequence Alignment Map*, mapa de alineación de secuencia). Los archivos SAM de salida fueron ordenados por coordenadas, clasificados, etiquetados y convertidos a un formato de archivo BAM (*Binary Alignment Map*, mapa de alineación binaria), usando herramientas Picard, versión 1.119 (<http://broadinstitute.github.io/picard/>). Las lecturas duplicadas se identificaron y etiquetaron con el mismo programa. Los archivos BAM resultantes con la información de secuencia alineada se analizaron mediante el programa Qualimap, versión 2.2.1 (García-Alcalde et al., 2012).

Una vez alineadas las secuencias genómicas de los grupos de ADN se realizó la comparación genómica de las mismas y se combinó la información utilizando distintas herramientas del programa GATK, versión 4.0.9.0 (Depristo et al., 2011; McKenna et al., 2010), para obtener las listas de polimorfismos de tipo *SNP* e *InDel* (inserciones/delecciones) entre los grupos alineados a la misma referencia. En primer lugar se obtuvieron los archivos con las variantes genómicas gVCF (*Genomic Variant Calling Format*) con la herramienta “*HaplotypeCaller*”. Los archivos gVCF derivados de los grupos de ADN se combinaron en un único archivo con la herramienta “*CombineGVCFs*”. El genotipado de los datos de ambas muestras incluidos en el archivo gVCF se realizó con la herramienta “*GenotypeGVCFs*”, dando como resultado un archivo VCF (*Variant Call Format*, formato de archivos de texto que almacena las variantes detectadas en la comparación de secuencias). Los datos de *SNP* e *InDel*, se extrajeron en archivos diferentes con la opción “--select-type-to-include” de la herramienta “*SelectVariants*”. Los polimorfismos de baja confiabilidad se filtraron con la opción “--filter-expression” incluida en la herramienta “*VariantFiltration* del programa GATK, versión 4.0.9.0 (Depristo et al., 2011; McKenna et al., 2010). Se utilizó la opción “--remove-filter-all” del programa VCFtools, versión 0.1.15 (Danecek et al., 2011) para remover las variantes que no sobrepasaron los filtros de calidad. Se utilizó la herramienta



“*VariantsToTable*” del programa GATK (Depristo et al., 2011; McKenna et al., 2010) para extraer del archivo VCF combinado la información de: cromosoma, posición física, alelo de referencia y alternativo, cantidad de lecturas para cada alelo, la profundidad de cobertura total, genotipo detectado en cada grupo y valores de calidad para cada posición física donde se detectó un *SNP*. Estos datos se exportaron en formato de tabla.

El proceso de alineamiento y comparación de las secuencias genómicas se realizó utilizando el Centro de Cómputo de Alto Rendimiento perteneciente al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) Rosario.

Identificación de regiones genómicas asociadas al carácter tipo de carpelo

La identificación de regiones genómicas asociadas significativamente al carácter tipo de carpelo se realizó con el paquete de software *QTLseqr* (Mansfeld y Grumet, 2018) versión 0.7.4, desarrollado en lenguaje de computación R, versión 3.6.3 (R Core Team, 2014). La significancia estadística de los *loci* se evaluó de acuerdo a la metodología descrita por Magwene et al. (2011), que se basa en un valor suavizado del estadístico G, llamado G' (Vazquez, 2019).

Se importaron los datos de *SNP* y se calcularon la frecuencia del alelo de referencia (1), el índice-*SNP* (2), y el Δ (índice-*SNP*) (3) para cada *SNP* utilizando la función “*importFromGATK*”.

$$(1) \text{ Frecuencia alelo de referencia} = \frac{\text{Profundidad del alelo ref}_{NF} + \text{Profundidad del alelo ref}_F}{\text{Cobertura total de ambos grupos}}$$

$$(2) \text{ índice-}SNP = \frac{\text{Profundidad del alelo alternativo}}{\text{Profundidad total}}$$

$$(3) \Delta (\text{índice-}SNP) = \text{índice-}SNP_{NF} - \text{índice-}SNP_F$$

Donde NF son los datos correspondientes al grupo de plantas con fenotipo no fusionado para el tipo de carpelos y F los datos del grupo con fenotipo fusionado o normal.

Los *SNP* de baja confiabilidad se filtraron según Takagi et al. (2013) utilizando la opción “*filterSNP*”. Se evaluaron descriptores estadísticos (valores mínimos y máximos, media, mediana, primer y tercer cuartil) y gráficos de distribuciones. Se conservaron los *SNP* con profundidad de lectura con valores dentro del rango entre el primer y el tercer cuartil, diferencia absoluta entre los grupos menor a 50x y una calidad igual a 99. A continuación se realizó el análisis de los grupos segregantes.

Se usó la función “*runGprimeanalysis*”, para la determinación de regiones genómicas significativamente asociadas al grado de irregularidad de acuerdo a Magwene et al. (2011). Se calculó el estadístico G (4) para cada *SNP* en función de las profundidades observadas y esperadas de los alelos, asumiendo que la profundidad de lectura es igual para todos los alelos en ambos grupos. Luego este valor G se multiplicó por un valor de ponderación núcleo tricubo (5), en una ventana deslizante de 2 Mb, mediante regresión local constante dentro de cada cromosoma, obteniendo un parámetro suavizado, llamado G' (6). A su vez, se calculó la significancia o p-valor para cada *SNP* en base a la estimación no paramétrica de la distribución nula de G' especificada por Magwene et al. (2011). Con un enfoque de Tasa de Descubrimiento Falso (FDR) se definió un valor umbral de p-valor (o el valor de G' correspondiente) para determinar aquellos sitios que se desvían significativamente de la



distribución nula. Este valor de significancia se ajustó mediante la función definida por Benjamini y Hochberg (1995) para obtener un valor de Q-valor.

$$(4) G = 2 \sum_{i=1}^4 n_i \ln \left(\frac{\text{Obs}(n_i)}{\text{Esp}(n_i)} \right)$$

Donde, para cada *SNP*, n_i es igual a la profundidad del alelo de referencia y alternativo para cada grupo, con un valor de i de 1 a 4; $\text{Obs}(n_i)$ es la profundidad de alelo observada y $\text{Esp}(n_i)$ son los valores esperados.

$$(5) k_j = \frac{(1-D_j^3)^3}{S_w}$$

Siendo k_j , es el núcleo tricubo, donde D_j es la distancia relativa de un *SNP* j a un *SNP* focal, con el valor 0 en la posición focal y el valor 1 en el borde de la ventana deslizante W . S_w es la suma de $(1-D_j^3)^3$ para todos los *SNP* en la ventana deslizante W .

$$(6) G' = \sum_{j \text{ in } W} k_j G_j$$

W : es la ventana deslizante, K_j núcleo tricubo, G_j valor de G para el *SNP* j .

Se graficaron los valores de G' y FDR (q) o umbral de 0,01 y 0,05 de significancia a lo largo de todo el genoma, con las opciones `var = "Gprime"` y `plotThreshold = TRUE` de la función "`plotQTLStat`". Las regiones continuas que presentan valores de G' por encima del umbral de FDR constituyen las regiones genómicas candidatas que controlarían el carácter de interés. Los esquemas se exportaron utilizando la función `jpeg()` disponible en los paquetes básicos del programa R. La información de los *QTL* putativos fue exportada como archivo delimitado por coma (CSV) considerando la opciones: `method = "Gprime"`, `alpha = 0.01` y `export = TRUE` de la función "`GetQTLTable`".

Valores elevados de G' indican la presencia de frecuencias alélicas significativamente diferentes entre los grupos, o bien que un grupo presenta una sobre o sub-representación del genoma de un parental mientras que en el otro grupo sucede lo contrario. Esto sugiere que dichas regiones presentan un efecto significativo sobre el carácter de interés y denota que existen genes putativamente relacionados con el carácter en dichas regiones. Los umbrales de significancia FDR fueron calculados en base a la distribución nula de G' suponiendo la ausencia de *QTL* vinculados al carácter analizado, por lo que aquellos valores de G' que superan dichos umbrales son considerados raros y representan los *QTL* putativos (Magwene et al., 2011; Yang et al., 2014).

Extracción y cuantificación de ADN en plantas F_2 derivadas del cruzamiento de "Voyage" x "Old Brooks"

Se llevó a cabo la extracción de ADN genómico de las plantas F_2 VxOB (campaña n°2). Se siguió el protocolo descrito por Fulton et al. (1995). Se tomó una muestra de hoja de aproximadamente 40 mg con un sacabocado para cada planta, esta se recogió en un tubo de 1,5 ml y se mantuvo en freezer a -80°C hasta su procesamiento. Se realizó la molienda del tejido con taladro mecánico junto a 200 μl de una solución de lisis. Dicha solución incluye: bisulfito de sodio, *buffer* de extracción (0,35 M Sorbitol, 0,1 M Tris, 5 mM EDTA, pH 8,25), *buffer* de lisis nuclear (0,2 M Tris, 0,05 M EDTA, 2 M NaCl, 2 % CTAB, pH 7,5/8) y Sarkosyl 5 %. Luego se agregó 450 μl de la solución de lisis a cada tubo y se incubó



durante 30 minutos en baño termostatzado a 65 °C. Se añadió 600 µl de una mezcla cloroformo:isoamyl alcohol (24:1) y se centrifugó 5 min a 9.500 rcf, logrando separar las proteínas y el resto de compuestos celulares del ADN. El sobrenadante se traspasó a un nuevo tubo de 1,5 ml con 600 µl de isopropanol frío (-20°C). Las muestras se agitaron suavemente y se centrifugaron durante 5 minutos a 13.680 rcf, precipitando el ADN. Se descartó la fase acuosa y se lavó el precipitado con una solución de etanol al 70 % v/v, luego se centrifugó a 13.680 rcf durante 1 minuto. Finalmente el ADN precipitado se re-suspendió en 200 µl de *buffer* TE (10 mM Tris-Cl pH 8, 1 mM EDTA). La cantidad y calidad del ADN extraído se evaluó en geles de agarosa al 1 % teñidos con SYBRTM Safe (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA, EEUU) por comparación con un estándar de ADN del fago lambda y mediante espectrofotometría con NanoDrop (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA, EEUU). Finalmente, se realizaron las diluciones necesarias para obtener una solución de trabajo de 40 ng/µl de ADN.

Caracterización genotípica con marcadores moleculares de ADN

Marcadores tipo *InDel* (Inserción-Delección) se desarrollaron en base a los datos de llamada de variante *InDel*. Se usó la interfaz en línea Primer3, versión 0.4.0 (Untergasser et al., 2012) para diseñar cebadores flanqueando dichos polimorfismos. Se consideraron polimorfismos con longitud entre 15 y 50 pb, profundidades de lectura mayores a 10x en ambos grupos, calidad de genotipo igual a 99 y genotipos diferenciales entre los grupos. Según Takagi et al. (2013), se seleccionaron polimorfismos con valores altos de Δ (índice-*SNP*) en la regiones genómicas de interés y valores cercanos a cero fuera de la región analizada. También se evitaron regiones repetitivas, o regiones que presentaran homología con regiones de más de un cromosoma. El tamaño del amplificado fue de entre 100 y 500 pb dependiendo del largo del polimorfismo.

Se diseñaron un total de 29 marcadores moleculares *InDel* para caracterizar las regiones genómicas asociadas al carácter tipo de carpelo en la población F₂ VxOB. De la cantidad total, 22 marcadores se diseñaron para cubrir el cromosoma 6, cuatro para el cromosoma 3 y tres marcadores para el cromosoma 10. La información de los marcadores moleculares se detalla en la Tabla III-1. El cromosoma 11 no se incluyó en el análisis debido a su baja significancia.

La amplificación de los marcadores moleculares se realizó mediante la metodología de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), siguiendo el mismo protocolo en todos los casos. La preparación de la muestra consistió en 40 ng de ADN genómico, 2 µl de dNTPs 2,5 mM, 1 µl de cloruro de magnesio (MgCl₂) 40 mM, 10 µM de cada cebador, 2 µl 10X de Taq *buffer* (50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl pH 8,3) y 2 unidades de Taq polimerasa. El protocolo de amplificación utilizado consistió en cuatro etapas:

- Desnaturalización del ADN: 1 minuto a 94 °C
- Gradiente térmico de amplificación: que incluye siete ciclos de desnaturalización del ADN (30 segundos a 94 °C), hibridación (30 segundos a temperatura inicial de 58 °C y 1 °C por ciclo hasta los 52 °C) y extensión (dos minutos a 72 °C);
- Amplificación (30 ciclos): que abarca la desnaturalización del ADN (30 segundos a 94 °C), hibridación (30 segundos a 52 °C) y extensión (dos minutos a 72 °C);



- Elongación: 5 minutos a 72 °C.

La separación de los fragmentos amplificados se realizó en geles de agarosa al 3 % p/v en corridas electroforéticas de 2 horas con voltaje constante igual a 140V. La visualización se llevó a cabo mediante tinción con SYBR™ Safe (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA, EEUU) y un equipo de fotodocumentación ChemiDoc™ MP Imager (Bio-Rad Laboratories®, Hercules, California, EEUU).



Tabla III-1: Secuencia de los cebadores *forward* y *reverse* de los marcadores moleculares utilizados en la validación de *loci* asociados al tipo de carpelos en la población F₂ (VxOB).

Cebador ID	Secuencia	Posición física (pb)
PTZ-10F	AGAAAGAGGCAAACAACATGA	SL4.0cr06: 32246605
PTZ-10R	ACGGATTTTGGACGTGAAAC	
PTZ-11F	CTGCTCGTTGTTGATGGAAA	SL4.0cr06: 39568900
PTZ-11R	TCAAGTTTGGTATGTGATAGGTGA	
PTZ-12F	CATCCGTTTCAATTCGTTTG	SL4.0cr06: 40982214
PTZ-12R	TCCCTCAATTTAATTTATTTATCTGG	
PTZ-13F	GAAATTTCTTAAAGGGTATCCAAAAA	SL4.0cr06: 41317842
PTZ-13R	CCATCAAGGCCCTCCAATA	
PTZ-14F	TTCTGGTCCTCCAAAAATG	SL4.0cr06: 42401105
PTZ-14R	TGCTTGTCGTGTATCGTTTCG	
PTZ-15F	GACGCCACTCTCAATTTCAAG	SL4.0cr06: 42407214
PTZ-15R	TCAATGTTGTTTTAGTTTTTGGTG	
PTZ-16F	CAAAAGTTAATTGTTGAAGAGTTGAT	SL4.0cr06: 42447526
PTZ-16R	TGTTAGAGCATAGTTGAAGCCATT	
PTZ-17F	TCGATTGGAGAACGGGTTAG	SL4.0cr06: 42666208
PTZ-17R	TGTGAACGGATGTTTACACGA	
PTZ-18F	AAAGTCAAATGTCCTTTCAATCG	SL4.0cr06: 44167518
PTZ-18R	CATGAAAAGCAAATTACGAAAAA	
PTZ-19F	GAAATCGCCAGAGGGATTAAC	SL4.0cr06: 44327297
PTZ-19R	CTCCAGGAAAGCAAAGTGC	
PTZ-20F	TGGTAGAGGCTGAAGGTGGT	SL4.0cr06: 46523421
PTZ-20R	TCACCGTCAATAGTACTCCGTCT	
PTZ-21F	AGTGCATTTACATTCGTCA	SL4.0cr06: 47410
PTZ-21R	GATTGTTATTTCTTTTACACCATC	
PTZ-22F	ATGATAGGGGTGTGTTT	SL4.0cr06: 1344793
PTZ-22R	ATAACACTCTAATTTGC	
PTZ-23F	CATTTGGTTTTTACCTTG	SL4.0cr06: 3373219
PTZ-23R	TGCCTTTATTCCCTCACCAC	
PTZ-24F	CACCGAGTTAGCACTTTTTTG	SL4.0cr06: 15013804
PTZ-24R	TGTATGTGATTTGCTAGT	
PTZ-25F	CCGAACAAAAATAGTGAATG	SL4.0cr06: 23704155
PTZ-25R	CTCTCTCCCAATTTATCCG	
PTZ-26F	CGAGATGAGGGTGTAAGAA	SL4.0cr06: 30509964
PTZ-26R	ATGGTCCTTGGTGAAATCCA	
PTZ-27F	GCCTCTTCATTTGTCGGATA	SL4.0cr06: 34739901
PTZ-27R	GCTTACAATATGTTTACTGC	

Cebador ID: identificador del cebador, F: cebador *forward*, R: cebador *reverse*, SL4.0: versión del genoma de referencia, cr: cromosoma, pb: pares de bases.



Tabla III-1: Secuencia de los cebadores *forward* y *reverse* de los marcadores moleculares utilizados en la validación de *loci* asociados al tipo de carpelos en la población F₂ (VxOB) (continuación).

Cebador ID	Secuencia	Posición física (pb)
PTZ-28F	TTGACCAATTCGCTTCAATT	SL4.0cr06: 36257691
PTZ-28R	TGCCGCTACTCTTTTTCTCT	
PTZ-29F	AATCATCCCACATGGTTGTT	SL4.0cr06: 37479533
PTZ-29R	GAAATCTCAATCATCTCGCTC	
PTZ-30F	CGCATAAGACTGAATCTGCG	SL4.0cr06: 39701558
PTZ-30R	TGAGGTAGCTCGTTGGGTAA	
PTZ-31F	GCTTAGTGCGGCCTCTATGGAT	SL4.0cr06: 42455979
PTZ-31R	GGTGTAAGTGGCAGGGTTTC	
PTZ-32F	TGGAGTTGGTGTGTGAAATGA	SL4.0cr06: 42845486
PTZ-32R	AGAGTTGCGTGTTTATGATTA	
PTZ-43F	AACTTCTCTATCCCCACAAACCT	SL4.0cr03: 50341239
PTZ-43R	GGTGCTCGCTTTGTGAAAA	
PTZ-44F	AAAACAATTGTATCTTTAACCACACTT	SL4.0cr03: 49312433
PTZ-44R	AGGGTTCATTGGATAGGATGT	
PTZ-45F	AAAAGGGAAACTTTGGACTCG	SL4.0cr03: 54531399
PTZ-45R	CACTCGGGCTTATAAGAGAAGAA	
PTZ-46F	TTCAATAATCAAAGAACAAAGAGAA	SL4.0cr10: 21137081
PTZ-46R	AAAGGCGGATTCAGCTGTTA	
PTZ-47F	ACTGGTGCAACATCACGAAT	SL4.0cr10: 29631283
PTZ-47R	AGCCCTTTCTGATGCTATGG	
PTZ-48F	CAAGGGAATTACCCTCCACA	SL4.0cr10: 28627906
PTZ-48R	TCCCATGACACCAGTAGCAG	
PTZ-49F	GGCATCTGAATGTTCCACCT	SL4.0cr10: 61173116
PTZ-49R	GTCTCCTTGGTCTTGCTTGG	

Cebador ID: identificador del cebador, F: cebador *forward*, R: cebador *reverse*, SL4.0: versión del genoma de referencia, cr: cromosoma, pb: pares de bases.



Se analizó la segregación y asociación de los marcadores al carácter tipo de carpelo en todas las plantas de la población F_2VxOB , mediante la prueba de Chi-Cuadrado de bondad de ajuste e independencia, respectivamente. Se consideró que el *locus* presentaba un efecto significativo sobre el carácter cuando ambas variables se encontraron asociados, es decir cuando las frecuencias observadas no se ajustaron a las frecuencias esperadas bajo independencia.

Construcción del mapa de ligamiento

Se llevó a cabo la construcción de un mapa de ligamiento del cromosoma 6, usando el paquete R/QTL (Broman et al., 2003). Se utilizaron los datos obtenidos de la caracterización molecular de las plantas de la población F_2 . Se eliminaron los datos de individuos que presentaron información para menos de 15 marcadores. Se excluyeron del análisis los datos de marcadores con segregación distorsionada o falta de datos superior al 10 %. Se incorporó al carácter tipo de carpelo como un marcador dominante. En este caso, los marcadores se agruparon en el mismo grupo de ligamiento cuando los valores de puntuación LOD (*Logarithm Of Odds* o logaritmo de probabilidades) fueron superiores a 2,5 y la frecuencia de recombinación (Rf) menor de 0,5. Se utilizó la función “*orderMarkers*” para definir el ordenamiento de los marcadores moleculares en el mapa, mientras que se usó la función “*ripple*” para verificar el orden de los marcadores y probar posibles órdenes alternativos, los cuales compararon entre sí mediante la función “*compareorder*”. Se seleccionó el ordenamiento con mayor valor de LOD mediante la función “*switch.order*”. La distancia genética entre marcadores se determinó usando la función definida por Kosambi (1943).



RESULTADOS

Caracterización fenotípica del carácter tipo de carpelos en poblaciones segregantes

Fue posible caracterizar las poblaciones uniformes y la población F_2 derivada del cruzamiento de "Voyage" x "Old Brooks" para el carácter tipo de carpelos. El total de plantas analizadas de los cultivares "Voyage" y "Old Brooks" en la campaña n° 2 presentaron frutos con carpelos no fusionados y fusionados o normales, respectivamente. Las plantas híbridas tuvieron en todos los casos frutos con carpelos normales. Por su parte en la población F_2 VxOB analizada en la campaña n° 2, el carácter mostró segregación (Figura III-1).

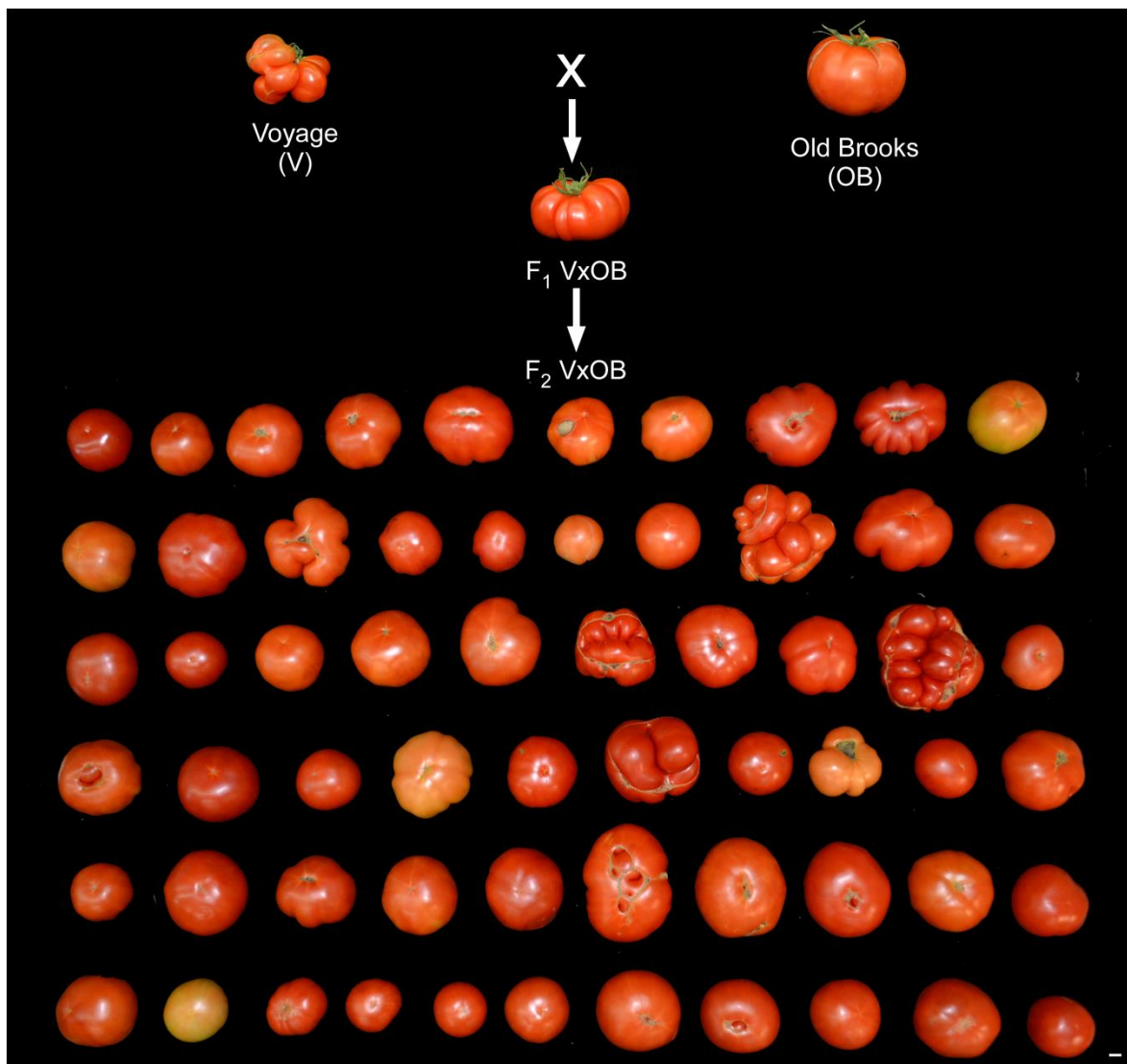


Figura III-1: Frutos representativos de los cultivares progenitores "Voyage" (V) y "Old Brooks" (OB) y poblaciones derivadas de su cruzamiento en la campaña agrícola n°2: F_1 VxOB y F_2 VxOB. Vista de base de frutos representativos de la población F_2 VxOB, donde se observa la segregación para el carácter tipo de carpelos. La línea horizontal blanca es la referencia de escala correspondiente a 1 cm.

El carácter tipo de carpelo (fusionados/no fusionados) segregó en la población F_2 VxOB analizada, en una cantidad de 61 a 15 fusionado: no fusionado, lo que se ajusta a una



relación 3:1 esperada para un carácter monogénico ($\chi^2=1,12ns$). Esto indicaría que el carácter se encuentra controlado por un único *locus*, siendo el fenotipo tipo de carpelo “fusionado” dominante sobre el fenotipo “no fusionado” (Tabla III-2). Los datos se ajustaron también a una relación de segregación 13:3 esperada cuando dos genes epistáticos actúan sobre la determinación de un carácter, uno con efecto dominante y otro con efecto recesivo ($\chi^2=0,83ns$) (campaña n° 2).



Tabla III-2: Frecuencias observadas y esperadas para los fenotipos tipo de carpelo fusionados y no fusionados analizados mediante la prueba Chi-Cuadrado de Bondad de ajuste en progenitores, y poblaciones F₁ y F₂ (campaña n°2).

Generación	Número de plantas		Proporción Esperada	χ^2	Probabilidad
	Carpelos: fusionado	Carpelos: no fusionado			
“Voyage” (V)	0	5	0:1	-	-
“Old Brooks” (OB)	5	0	1:0	-	-
F ₁ VxOB	5	0	1:0	-	-
F ₂ VxOB	61	15	3:1	1,12	0,29 ns
	61	15	9:7	17,81	<0,001
	61	15	15:1	23,59	<0,001
	61	15	13:3	0,05	0,83 ns

Proporción esperada: relación entre cantidad de plantas con fenotipo fusionado y no fusionado que se esperan de acuerdo al tipo de herencia analizada en cada generación. χ^2 = valor del estadístico Chi-Cuadrado. Probabilidad: probabilidad de cola derecha de la distribución Chi-Cuadrado considerando gl=1. ns: no significativo, p > 0,05.

El análisis basado en las seis generaciones básicas del cruzamiento “Voyage” x “Old Brooks” (campaña n° 3), arrojó que el fenotipo tipo de carpelo fusionado presentó dominancia sobre tipo de carpelo no fusionado al igual que lo observado anteriormente. Las frecuencias observadas en las distintas generaciones (F₂ y BC) se ajustaron a lo esperado para una epistasis doble recesiva (Tabla III-3).



Tabla III-3: Frecuencias observadas y esperadas para los fenotipos tipo de carpelo fusionados y no fusionados analizados mediante la prueba Chi-Cuadrado de Bondad de ajuste en progenitores, y poblaciones F₁, F₂, BC₁₋₁ y BC₁₋₂ (campaña n°3).

Generación	Tipo de Herencia	Número de plantas		Proporción esperada	χ^2	Probabilidad
		Carpelos: fusionado	Carpelos: no fusionado			
"Voyage" (V)		0	4	0:1	-	-
"Old Brooks" (OB)		3	0	1:0	-	-
F ₁ (VxOB)		2	0	1:0	-	-
F ₂ (VxOB)	monogénico	53	30	3:1	5,50	0,02
	epistasis doble recesiva	53	30	9:7	1,95	0,16ns
	epistasis doble dominante-recesiva	53	30	13:3	16,48	<0,001
	epistasis doble dominante	53	30	15:1	126,59	<0,001
BC ₁₋₁ F ₁ (VxOB) x V	monogénico	2	15	1:1	9,94	<0,01
	epistasis doble recesiva	2	15	1:3	1,59	0,21ns
	epistasis doble dominante-recesiva	2	15	1:1	9,94	<0,01
	epistasis doble dominante	2	15	3:1	9,06	<0,01
BC ₁₋₂ F ₁ (VxOB) x OB	monogénico	47	0	1:0	-	-
	epistasis doble recesiva	47	0	1:0	-	-
	epistasis doble dominante-recesiva	47	0	1:0	-	-
	epistasis doble dominante	47	0	1:0	-	-

Proporción esperada: relación entre cantidad de plantas con fenotipo fusionado y no fusionado que se esperan de acuerdo al tipo de herencia analizada en cada generación. χ^2 = valor del estadístico Chi-Cuadrado. Probabilidad: probabilidad de cola derecha de la distribución Chi-Cuadrado considerando gl=1. ns: no significativo, p > 0,05

Los resultados indican que las segregaciones observadas en las poblaciones segregantes analizadas en las distintas campañas agrícolas, se ajustaron a distintos tipos de herencias tales como la herencia monogénica o digénica con epistasis.



Identificación de regiones genómicas asociadas al carácter tipo de carpelo mediante el enfoque de *QTL-seq*

Secuenciación, alineado de genomas y comparación de secuencias genómica de grupos segregantes para el carácter tipo de carpelos

Mediante la secuenciación de última generación se obtuvieron 303.855.536 y 240.592.898 lecturas apareadas con una longitud de 101 pb de longitud para el grupo no fusionado (NF) y fusionado (F), respectivamente. Fue posible alinear el 98,47% y 97,59% de las lecturas cortas al genoma consenso de tomate, en los grupos NF y F respectivamente. La calidad promedio de mapeo fue igual a 34,06 en el grupo NF y 33,36 en el grupo F, lo que equivale a una tasa de error del 0,62% y 0,66%, respectivamente. La profundidad de cobertura promedio obtenida luego del alineamiento contra el genoma de referencia fue de 37,44x en NF y 29,32x en F. Este cálculo incluyó la profundidad de cobertura obtenida para el cromosoma 0, donde se ubican aquellas secuencias cuya posición en el genoma aún no ha sido resuelta, principalmente secuencias repetitivas. En la Tabla suplementaria S2 y Figura suplementaria S1 se representa la profundidad de cobertura y su correspondiente desvío estándar para los 12 cromosomas de tomate de cada muestra de ADN. Existieron regiones de alta profundidad cobertura, y otras de muy baja profundidad (Figura suplementaria S1), lo que determina altos valores de desvíos estándar respecto a la media en todos los cromosomas (Tabla suplementaria S1). En ambos grupos la mayor profundidad de cobertura se alcanzó en el cromosoma 12, mientras que los cromosomas que presentaron menor cobertura fueron el cromosoma 3 y 6 en los grupos, NF y F, respectivamente. El porcentaje de cobertura del genoma considerando una profundidad de 4x fue igual al 89,98% en el grupo NF y 89,91% en el F.

A través del alineado a la versión SL4.0 del genoma de referencia de tomate y la comparación de los datos de ambos grupos fue posible identificar un total de 206.623 *SNP* y 183.124 *InDel* a lo largo de todo el genoma, considerando el cromosoma cero en este análisis. Por su parte, si se excluyen los polimorfismos presentes en dicho cromosoma, se obtuvieron 205.329 *SNP* y 180.214 *InDel*. La distribución de estos polimorfismos en los distintos cromosomas se representa en la Tabla III-4. Se puede observar que la mayor cantidad de *SNP* se detectó en el cromosoma 10 y de *InDel* en el cromosoma 1. Mientras que la menor cantidad de *SNP* e *InDel* se detectó en el cromosoma 7. Por su parte, considerando ambos tipos de polimorfismos, la mayor cantidad se encontró en el cromosoma 4 y la menor cantidad en el cromosoma 8. La cantidad total de *SNP*, considerando los 12 cromosomas, resultó mayor a la cantidad total de *InDel*. Los polimorfismos se encuentran distribuidos a lo largo de todo el genoma en los cromosomas, y el número de polimorfismos no está relacionado con la longitud del cromosoma.



Tabla III-4: Cantidad de polimorfismos de tipo *SNP* e *InDel* identificados respecto de la secuencia de referencia (versión SL4.0) por cromosoma (Cr) en la población F₂ VxOB.

Cromosoma	<i>SNP</i>	<i>InDel</i>	Total
SL4.0cr01	14.293	28.248	42.541
SL4.0cr02	12.272	11.201	23.473
SL4.0cr03	20.028	12.561	32.589
SL4.0cr04	26.122	20.601	46.723
SL4.0cr05	20.961	24.049	45.010
SL4.0cr06	12.244	12.754	24.998
SL4.0cr07	8.941	8.520	17.461
SL4.0cr08	11.950	10.808	11.958
SL4.0cr09	13.431	12.571	26.002
SL4.0cr10	26.332	16.135	42.467
SL4.0cr11	24.993	12.268	37.261
SL4.0cr12	13.762	10.498	24.260
Total	205.329	180.214	374.743

Identificación de regiones genómicas asociadas al carácter tipo de carpelo.

La identificación de regiones genómicas asociadas al carácter tipo de carpelo se llevó a cabo a partir de los datos de 205.329 *SNP* identificados inicialmente a lo largo del genoma de tomate, versión SL4.0. Mediante el filtrado de los datos se eliminaron 71.549 *SNP* que presentaron frecuencia del alelo de referencia menor a 0,2 o mayor a 0,8 en ambos grupos, 26.057 *SNP* que tuvieron profundidades de lectura en ambos grupos menor a 38 pb y 30.076 *SNP* con profundidad de lectura en ambos grupos mayor a 64 pb. Además, se removieron 13 *SNP* que presentaron una profundidad de lectura individual menor a 5 y 11.696 *SNP* con calidad inferior a 99%. De este modo se excluyeron del análisis un total de 139.391 polimorfismos y se conservaron 65.938 *SNP* en total, lo que constituye un 32,11% de la cantidad inicial. En la Figura III-2 se visualiza la cantidad de *SNP* distribuidos a lo largo del genoma. Se puede observar que existen regiones con alta concentración de *SNP* mientras que otras tienen una cantidad prácticamente nula. Esto indica regiones en las que la secuencia de los grupos difiere ampliamente de la secuencia de referencia de tomate, y regiones en las que no existe polimorfismo entre ambas secuencias, respectivamente.

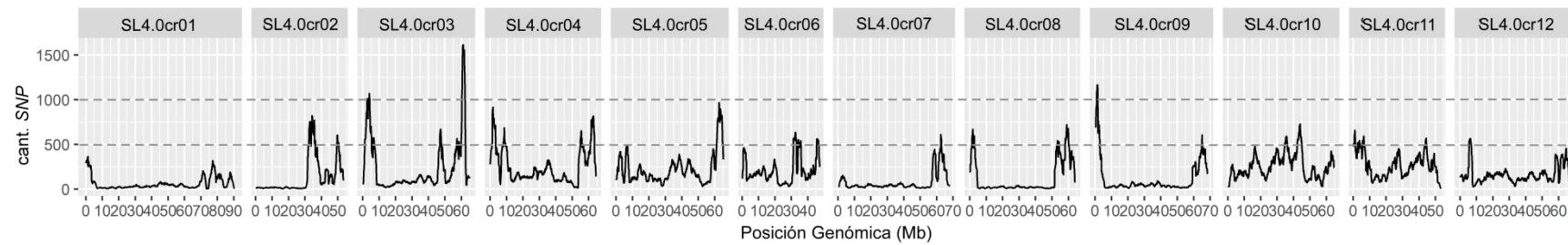


Figura III-2: Cantidad de *SNP* respecto al genoma de referencia detectados por análisis de grupos segregantes a lo largo de los 12 cromosomas de tomate en la población F_2 “Voyage” x “Old Brooks”. cant. *SNP*: cantidad de *SNP* detectados. SL4.0cr: cromosoma. Ventana deslizante: 2 Mb.



De acuerdo a la metodología G' se detectaron cuatro regiones genómicas asociadas al carácter tipo de carpelo ubicadas en los cromosomas 3, 6, 10 y 11 considerando una significancia de 5%. La tabla III-5 resume la información de dichas regiones genómicas. La región del cromosoma 3 presentó una longitud de 2,76 Mb, 374 *SNP* polimórficos entre los grupos, un valor máximo de Δ (índice-*SNP*) igual a -0,25 y de G' igual a 4,80 en la posición 49,92 Mb, con un valor de Q promedio de 0,027. El *QTL* ubicado en el cromosoma 6 alcanzó una longitud de 10,31 Mb, un valor máximo de Δ índice-*SNP* igual a 0,30 y G' de 9,72 en las posiciones 42,80 y 41,35 Mb, respectivamente. El valor de Q promedio en la región fue de 0,014 y presentó 1.243 *SNP* polimórficos entre los grupos. La región ubicada en el cromosoma 10 fue la más extensa, con una longitud de 59,13 Mb y 7.657 *SNP* polimórficos, y presentó un máximo valor de Δ (índice-*SNP*) igual a 0,32 y de G' igual a 7,26 en las posiciones 43,48 Mb y 5,20 Mb respectivamente. El Q promedio fue igual a 0,004. Finalmente la región identificada en el cromosoma 11 se caracterizó por una longitud de 0,96 Mb, con un valor máximo de Δ (índice-*SNP*) igual a -0,23 en la posición 5,83 Mb y un máximo valor máximo de G' igual a 3,93 en la posición 5,75 Mb con un valor de Q promedio de 0,05. Dicha región contuvo 193 *SNP* polimórficos. Esta información se resume en la Tabla III-5.

Un aspecto que brinda información de relevancia es la direccionalidad de los valores Δ (índice-*SNP*). En este sentido, un valor positivo o mayor a cero denota que el progenitor que contribuyó a las discrepancias entre los grupos es aquel que presenta el alelo alternativo; mientras que un valor de índice-*SNP* menor a cero o negativo indicaría que el progenitor que aportó los alelos es aquel que tiene el alelo igual a la referencia. En los resultados podemos visualizar que las regiones del cromosoma 3 y 11 presentan índice-*SNP* con valor negativo, lo que sugiere que los alelos son aportados por el padre como la referencia (*S. lycopersicum* L. cv. "Old Brooks"), mientras que en los *QTL* ubicados en los cromosomas 6 y 10 los alelos provienen del progenitor que presenta el alelo alternativo (*S. lycopersicum* L. cv. "Voyage").



Tabla III-5: Descripción de largo, cantidad de *SNP*, valor y posición de Δ (índice-*SNP*) y G' máximos y significancia hallados para los *QTL* putativos identificados en los distintos cromosomas (versión del genoma SL 4.0) para el carácter tipo de carpelos.

Cromosoma	Inicio (Mb)	Fin (Mb)	Longitud (Mb)	nSNP	pico Δ (índice- <i>SNP</i>)	Pos. pico Δ (índice- <i>SNP</i>)	Máx. G'	Pos. máx. G'	Q-valor
SL4.0cr03	48,15	54,15	2,76	374	-0,25	49,92	4,80	49,92	0,027
SL4.0cr06	36,94	47,25	10,31	1.243	0,30	42,80	9,72	41,35	0,014
SL4.0cr10	1,92	61,05	59,13	7.657	0,32	43,48	7,26	5,20	0,004
SL4.0cr11	5,62	6,58	0,96	193	-0,23	5,84	3,93	5,75	0,047

Cromosoma: el cromosoma en el que se identificó una región asociada al tipo de carpelo. Inicio: la posición en megabases (Mb) del primer *SNP* que sobrepasó el umbral de FDR en ese cromosoma. Fin: la posición final expresada en Mb. Longitud: extensión de la región en Mb. n*SNP*: el número de *SNP* en la región. Pico Δ (índice-*SNP*): el valor máximo de Δ (índice-*SNP*) suavizado por tricubo en la región. Pos. pico Δ (índice-*SNP*): la posición del máximo valor absoluto de Δ (índice-*SNP*) suavizado por tricubo. Max. G' : la puntuación máxima de G' en la región. Pos. max. G' : la posición genómica del valor máximo de G' en el *QTL*. Qvalor: valor promedio de p-valor ajustado en la región.



Estos resultados pueden visualizarse de una forma gráfica en la Figura III-3. Al analizar los valores obtenidos con la metodología G' , se identificaron cuatro regiones con valores de G' que sobrepasan el umbral de significancia FRD (q) de 0,05 en los cromosomas 3, 6, 10 y 11. Si se tiene en consideración el umbral FRD (q) de 0,01 solo los picos presentes en los cromosomas 6 y 10 fueron significativos. Es notorio que el pico más significativo ocurrió en el cromosoma 6, mientras que el pico del cromosoma 11 apenas sobrepasó el umbral de significancia (Tabla III-5, Figura III-3).

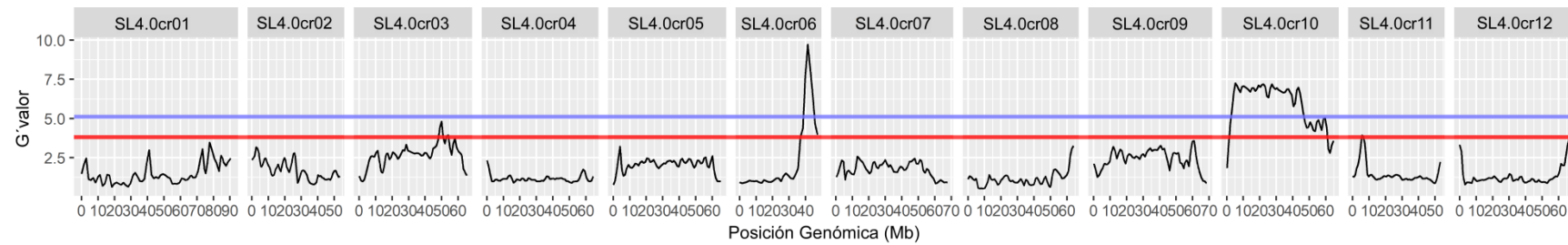


Figura III-3: Regiones genómicas asociadas al tipo de carpelo a lo largo de los 12 cromosomas de tomate en la población F_2 “Voyage” x “Old Brooks”. El umbral de la tasa de descubrimiento falso (FDR) de Benjamini-Hochberg igual a 0,05 se indica con una línea roja y el umbral de 0,01 se indica en azul. SL4.0cr: cromosoma. Ventana deslizante = 2Mb.



Caracterización genotípica con marcadores moleculares de ADN

Del total de marcadores diseñados fue posible amplificar 17 marcadores en el cromosoma 6, dos en el cromosoma 3 y dos en el cromosoma 10. Por su parte, cinco marcadores resultaron monomórficos entre los progenitores y F₂ analizada, y dos marcadores no amplificaron correctamente. En la Figura III-4 se muestra un ejemplo de un gel de agarosa al 3% p/v. En el mismo es posible diferenciar el polimorfismo detectado en la generación F₂ para el marcador PTZ-44.

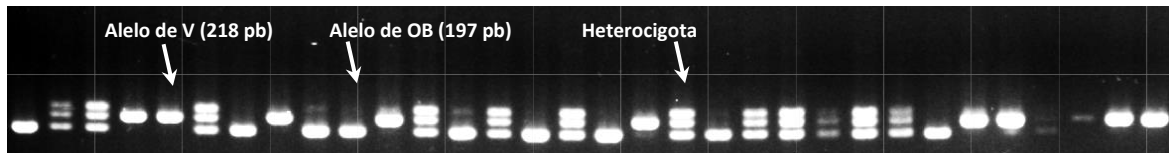


Figura III-4: Resultado del marcador molecular INDEL PTZ-44 del cromosoma 3, en la población F₂ “Voyage” x “Old Brooks”. Gel de agarosa 3% revelado con Syber Safe. V: cv. “Voyage”, OB: cv. “Old Brooks”, pb: pares de bases.

Mediante el test Chi-Cuadrado de Pearson o de independencia, se pueden analizar diferencias entre las frecuencias observadas y frecuencias esperadas bajo la hipótesis nula de que las variables son independientes. Teniendo esto en consideración se observa que los marcadores del cromosoma 3 y 10 resultaron independientes del carácter analizado tipo de carpelos, es decir que no existe asociación entre los marcadores y el fenotipo. Por otro lado, se observó asociación entre los marcadores PTZ-12 ($\chi^2=17,69$), PTZ-31 ($\chi^2=12,87$), PTZ-17 ($\chi^2=10,95$) y PTZ-18 ($\chi^2=15,47$) del cromosoma 6 y el carácter tipo de carpelo, considerando una significancia menor al 0,05. (Tabla III-6).



Tabla III-6: Resultados de prueba Chi-Cuadrado de independencia para el carácter tipo de carpelos en la población F₂ VxOB.

ID Marcador	Cromosoma	Posición (Mb)	χ^2 valor	p-valor
PTZ-44	3	49,31	6,34	0,27
PTZ-45		54,53	3,00	0,70
PTZ-24	6	15,01	4,24	0,51
PTZ-26		30,51	3,84	0,57
PTZ-10		32,25	5,89	0,32
PTZ-27		34,74	2,80	0,73
PTZ-28		36,26	2,47	0,78
PTZ-29		37,48	4,79	0,44
PTZ-11		39,57	6,07	0,30
PTZ-30		39,70	9,22	0,10
PTZ-12		40,98	17,69	<0,01
PTZ-14		42,40	8,56	0,13
PTZ-15		42,41	8,70	0,12
PTZ-31		42,46	12,87	0,02
PTZ-17		42,67	10,95	0,05
PTZ-32		42,85	6,34	0,27
PTZ-18		44,17	15,47	<0,01
PTZ-19		44,33	9,16	0,10
PTZ-20		46,52	6,96	0,22
PTZ-46	10	21,14	4,31	0,51
PTZ-48		28,63	4,63	0,46
PTZ-49		61,17	6,04	0,30

Se resaltan aquellos marcadores significativamente asociados al carácter tipo de carpelos

Los cuatro marcadores asociados al carácter tipo de carpelos se ubicaron en la base del cromosoma 6, entre las posiciones 40,98 Mb y 44,17 Mb, indicando que en la región basal de este cromosoma se encuentran los determinantes genéticos de este carácter. El marcador PTZ-12 resultó el más significativamente asociado al carácter tipo de carpelos.

Construcción del mapa de ligamiento

Fue posible obtener un mapa de ligamiento genético del cromosoma 6 en la población F₂ evaluada. Se eliminaron los datos de ocho individuos que presentaron datos faltantes para dos o más marcadores. Los 17 marcadores analizados se agruparon en un mismo grupo de ligamiento. El orden de todos los marcadores mapeados, se correspondió con lo esperado de acuerdo a su posición física. El mapa de ligamiento del cromosoma 6 se esquematiza en la Figura III-5a. La longitud total del mapa obtenido al valorar el carácter tipo de carpelo como un marcador dominante en la población, fue de 154,1 cM y la distancia promedio entre marcadores fue de 8,6 cM.

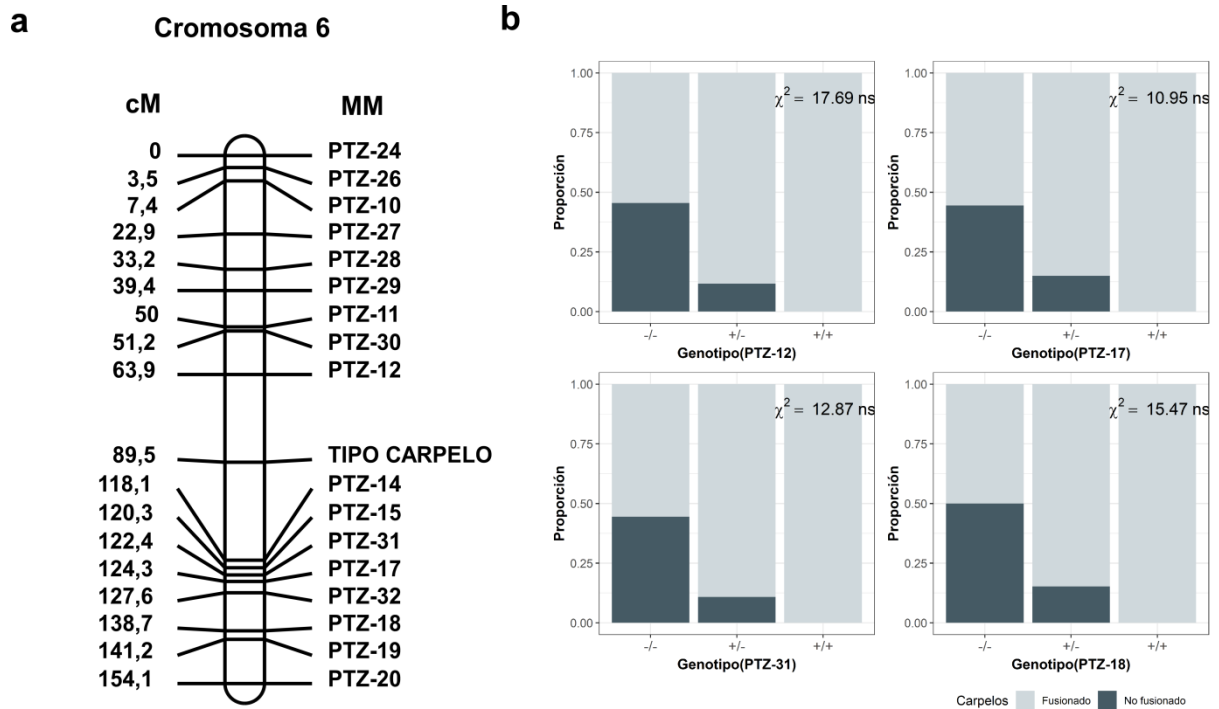


Figura III-5: Caracterización genotípica del cromosoma 6 con marcadores moleculares para poblaciones F₂ VxOB. (a) Mapa de ligamiento del cromosoma 6 considerando el carácter tipo de carpelo como marcador dominante. (b) Distribución del carácter tipo de carpelo (fusionado: no fusionado) en relación al genotipo, para los marcadores asociados presentados en la Tabla III-6. Genotipos: -/- genotipo homocigoto mutante (alelos como el padre “Voyage”), +/- genotipo heterocigoto, +/+ genotipo homocigoto de tipo silvestre (alelos como el padre “Old Brooks”).

La mayor distancia de ligamiento entre marcadores se encontró entre los marcadores PTZ-14 y el marcador “TIPO CARPELO”, siendo igual a 28,61 cM, mientras que la menor distancia ocurrió entre los marcadores PTZ-17 y PTZ-31 con un valor de 1,87 cM. El marcador “TIPO CARPELO” se ubicó entre los marcadores PTZ-12 y PTZ-14, en una región de 1,48 Mb en la región basal del cromosoma 6, entre las posiciones 40,98Mb y 42,40Mb (54cM). La Figura III-5b ilustra la distribución del carácter tipo de carpelo (fusionado: no fusionado) en los genotipos de los marcadores asociados presentados en la Tabla III-6. La presencia de genotipos heterocigotas con carpelos no fusionados es un indicativo de la recombinación entre el marcador y los determinantes genéticos del carácter cualitativo analizado.



DISCUSIÓN

La evaluación del tipo de herencia en las distintas generaciones derivadas del cruzamiento “Voyage” x “Old Brooks”, demostró que el fenotipo tipo de carpelo fusionado exhibe dominancia sobre el fenotipo no fusionado. La segregación se ajustó a lo esperado bajo una herencia monogénica y digénica de tipo recesivo-dominante y doble recesiva en las poblaciones analizadas en dos campañas agrícolas. La epistasis doble recesiva constituye una interacción génica en la que se requiere la presencia de alelos funcionales dominantes en ambos *loci* para la expresión del fenotipo, mientras que la presencia de alelos homocigotos dominante en cualquiera de los *locus* enmascararía el fenotipo. Lo cual indica que la expresión del carácter tipo de carpelos estaría controlada por dos *loci* diferentes y el fenotipo no fusionado surgiría debido a la presencia de pares de alelos homocigotos recesivos, mientras que si ambos *loci* son heterocigotos u homocigotos dominantes, el fenotipo sería fusionado o normal. En el caso de epistasis doble recesivo-dominante, se produce cuando el alelo dominante de un *locus* y el recesivo del otro *locus* suprimen, respectivamente, la acción de otros dos alelos. Esto implicaría, el tipo de fruto estaría controlado por dos *loci* diferentes y el fenotipo no fusionado aparecería únicamente cuando ocurra la combinación específica de alelos dominantes y recesivos en los *loci*.

Un estudio previo, realizado sobre un total de 604 plantas F_2 y 160 plantas de las retrocruzas derivadas de un cruzamiento entre un cultivar de tomate multi-pistilar, con frutos “compuestos” o no fusionados y un cultivar de tomate morado y normal, identificó que la segregación del carácter tipo de pistilo (multi-pistilar o pistilo único) se ajustó a una epistasis doble recesiva, en una proporción de 9:7 (un solo pistilo:múltiples pistilos). Mientras la herencia para el carácter tipo de carpelos estuvo controlada por la interacción de dos genes con epistasis doble dominante, ajustándose a una proporción 15:1 (fruto único: fruto compuesto) (Mahfud y Murti, 2020). Contrariamente, otro trabajo identificó que el rasgo tipo de carpelo no fusionado se comportó de manera dominante en los híbridos derivados de cruzamientos entre la accesión “LA0767” de *S. lycopersicum*, que lleva frutos de fenotipo no fusionado, con accesiones cultivadas de frutos fusionados. Además la progenie F_2 derivada del cruce entre “LA0767” y otra accesión cultivada (“LA2452”), mostró una segregación consistente con una proporción de 3:1 (no fusionado: fusionado). Sin embargo, esta dominancia no se manifestó en los cruces con la especie silvestre de frutos pequeños, ya que todas las plantas F_1 tenían carpelos/lóculos no fusionados. Esto sugiere que la expresión de este carácter depende del contexto genético (Barrero y Tanksley, 2004).

La falta de consistencia en el tipo de herencia encontrada en los análisis podría deberse a un tamaño poblacional demasiado pequeño, lo que reduce la potencia de la prueba para detectar diferencias significativas entre las proporciones observadas y esperadas (Jelinski, 1991). Otra limitante para el estudio de este carácter consiste en la presencia de expresividad variable. La expresividad se refiere al grado o intensidad con la que se manifiesta el fenotipo de un individuo con un genotipo determinado, dando lugar a un rango de fenotipos. La expresividad genética de un gen en particular puede verse influenciada por las condiciones ambientales (temperaturas extremas, fertilización, y desarrollo de semillas), por otros genes (Zhu et al., 2019), y variaciones en la metilación (Sekhon y Chopra, 2009). Se ha reportado diferente penetrancia y expresividad para el



carácter fasciado en tomate (Barrero y Tanksley, 2004), donde se observó que los alelos mutantes del gen *FAS* se asocian también con carpelos no fusionados. El efecto de expresividad se reportó también para los caracteres de múltiples pistilos en trigo (Zhu et al., 2019) y número de flores en garbanzo (Srinivasan et al., 2006), espiguillas multifloras en panojas de avena y altura de planta en arroz (Umar et al., 2010).

Por medio de la secuenciación y comparación genómica de grupos segregantes se identificaron tres regiones genómicas diferenciales entre los grupos, asociadas al carácter tipo de carpelo, en los cromosomas 3, 6 y 10. Una consideración está dada por la naturaleza cualitativa del carácter tipo de carpelo, donde el fenotipo no fusionado resultó recesivo. En consecuencia, el efecto de alelo recesivo se encuentra enmascarado por el alelo dominante, siendo imposible diferenciar los individuos homocigotos dominantes de aquellos heterocigotos. Esto afecta la aplicación de la metodología de BSA, ya que no permite la dispersión clara de los datos fenotípicos y es esperable que el grupo fusionado incluya una mezcla de individuos con genotipo homocigota y heterocigota para el *locus* de interés; mientras que el otro grupo tendrá sólo individuos homocigotos para el alelo recesivo. Esta modificación en la conformación de los grupos determina que la frecuencia alélica del grupo fusionado o *wild type* disminuya y por lo tanto las diferencias entre los grupos son menos claras y las regiones menos significativas (Garcia et al., 2016). Sin embargo, debido a la herencia monogénica o digénica del carácter, el tipo de carpelo estaría controlado por uno o pocos genes con efecto mayor y alta heredabilidad, y es posible considerar los tres picos más significativos como potenciales regiones de interés.

Únicamente los marcadores moleculares analizados en la región basal del cromosoma 6 se encontraron asociados al rasgo de interés, lo que sugiere que los determinantes genéticos del tipo de carpelo se encuentran en dicha región, entre las posiciones 40,98 Mb y 44,17 Mb. Por su parte al valorar el carácter tipo de carpelo como un marcador dominante, el mismo se localizó entre los marcadores posicionados en los 40,98 Mb y 42,40 Mb, y el marcador PTZ-12 resultó el más asociado. Esto señala que el *locus* de interés se posicionaría al principio de esta región. Es importante aclarar que no existen antecedentes que demuestren que esta región tuviera efectos importantes sobre el tipo de carpelos.

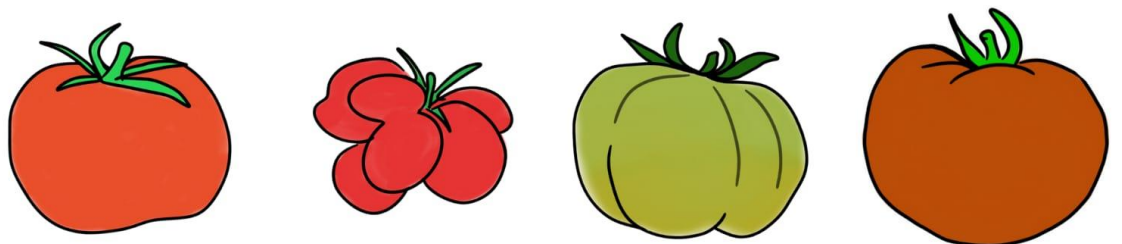


CONCLUSIONES PARCIALES

- El tipo de herencia resultó variable en las poblaciones segregantes analizadas en diferentes campañas, ajustándose a una segregación monogénica y epistasis doble dominante-recesiva o a una epistasis doble recesiva.
- Se encontraron tres regiones genómicas, ubicadas en la zona basal del cromosoma 3, zona basal del cromosoma 6 y a lo largo del cromosoma 10 de tomate, que presentaron polimorfismos diferenciales entre grupos fenotípicamente extremos para el carácter tipo de carpelos, a través de la metodología de *QTL-seq*.
- Los marcadores moleculares confirmaron que sólo la región basal del cromosoma 6 estuvo ligada al carácter analizado. El marcador TIPO CARPELO se localizó entre los marcadores PTZ12 y PTZ14 (región de 1,48 Mb).

CAPÍTULO IV

Detección de *QTL* asociados a caracteres cuantitativos en poblaciones segregantes derivadas de cruzamientos intraespecíficos





OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar la segregación de rasgos de forma de fruto en la dirección medio-lateral en las poblaciones derivadas del cruzamiento entre los cultivares de tomate: “Voyage” y “Old Brooks” (F_2 VxOB), y “Yellow Stuffer” y “Heinz 1439” (F_2 YSxH).
- Estimar los componentes genéticos y la heredabilidad de rasgos de forma de fruto en la dirección medio-lateral, a partir de las seis generaciones básicas derivadas del cruzamiento entre los cultivares “Voyage” y “Old Brooks”.
- Identificar regiones polimórficas entre grupos fenotípicamente extremos para el carácter grado de irregularidad en una poblaciones segregantes F_2 , a través de un enfoque de *QTL-seq*.
- Confirmar y validar los *QTL* para el carácter grado de irregularidad, detectados en las poblaciones segregantes completas, a través de marcadores moleculares.



MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

Se desarrollaron dos poblaciones segregantes derivadas del cruzamiento intraespecífico entre los cultivares “Voyage” x “Old Brooks” (población 1) y “Yellow Stuffer” x “Heinz 1439” (población 2). Las metodologías empleadas para realizar los cruzamientos y la obtención semillas, así como el cultivo de los materiales vegetales resultó idéntica en todas las campañas agrícolas (ver sección de Materiales y Métodos-Capítulo I). Los materiales vegetales considerados en este Capítulo son:

- Población 1: Campaña año n^o 2: desarrollado en el Capítulo III
- Población 1: Campaña año n^o 3: desarrollado en el Capítulo III
- Población 2: Campaña año n^o 4: se sembraron 5 plantas de cada uno de cultivares “Yellow Stuffer” y “Heinz 1439” y el híbrido derivado de ellos (F₁ YSxH); junto con 150 plantas de la población segregante F₂ YSxH. De la cantidad inicial hubo una pérdida del 19 % debido a factores ambientales y patológicos ocurridos durante la implantación y cultivo. El número final de plantas analizadas fue 122.

Metodología

Caracterización fenotípica y genética de dos poblaciones segregantes F₂ divergentes para caracteres de forma de fruto en la dirección medio-lateral

Caracterización fenotípica de poblaciones segregantes F₂

Se realizó la evaluación de los caracteres de forma de fruto en la dirección medio-lateral, en ambas poblaciones segregantes (F₂ VxOB campaña n^o 2 y F₂ YSxH). Se cosecharon 8 frutos promedio por planta en estado verde maduro o pintón. Los frutos se cortaron transversalmente, las mitades de frutos se secaron con papel y se acomodaron sobre un scanner para obtener una imagen digital representativa de cada planta. Se siguieron las recomendaciones para la toma de imágenes detalladas en Brewer et al. (2006). Las imágenes se guardaron en formato .jpg, con una resolución de 300 ppp. Las imágenes se analizaron con el programa informático *Tomato Analyzer 3.0* (Rodríguez et al., 2010, 2011b). Se realizó el ajuste manual del perímetro y borde interno del pericarpio. Luego se llevó adelante la medición automática de los atributos de forma, como se describió en el Capítulo I. Los caracteres analizados fueron: perímetro, área, ancho y alto máximo, grado de irregularidad externa, espesor y área de pericarpio. Se evaluaron un total de 544 frutos correspondientes a 76 plantas de la población F₂ VxOB de la campaña n^o 2, y 773 frutos de 122 plantas F₂ de la población YSxH.

También se determinó el peso de fruto en un total de 749 frutos de la población F₂ VxOB y 1.004 frutos de la población F₂ YSxH. Finalmente, se contabilizó el número de lóculos con el programa *LocAnalyzer* (Spetale et al., 2020) sobre 719 y 1.014 frutos de las poblaciones F₂ VxOB y F₂ YSxH, respectivamente.

Caracterización genética de poblaciones segregantes F₂



Se probó la distribución normal de todos los caracteres analizados mediante la prueba propuesta por Shapiro y Wilk (1965). La normalidad de los caracteres se evaluó también por métodos gráficos, como histograma de densidad y gráficos QQ. Se definió la distribución de una variable como normal cuando alcanzó un valor W , correspondiente a la prueba de Shapiro-Wilk, mayor a 0,85, y mostró una distribución de densidades que se ajustó gráficamente a una campana de Gauss y un gráfico QQ donde los puntos no presentaron desvíos sustanciales de la recta diagonal. Se verificaron los supuestos correspondientes a la prueba ANOVA de independencia analizando la dispersión de los residuos y homogeneidad de la varianza con prueba de Bartlett. Se calculó la H^2 a través de ANOVA, para los caracteres cuantitativos con distribución normal, y su correspondiente error (Mariotti y Collavino, 2014). Las correlaciones fenotípicas entre caracteres se determinaron mediante la prueba de Pearson. Se definió un p-valor de 0,05 como umbral de significancia.

Todos los análisis estadísticos y gráficos se llevaron a cabo con el programa informático R, versión 3.6.3 (R Core Team, 2014). Se utilizaron las funciones de estadísticas básicas y los paquetes *ggcorrplot* (Kassambara, 2019), *heritability* (Kruijer et al., 2014), *Hmisc* (Harrell y Dupont, 2018) y *dplyr* (Wickham et al., 2022)

Caracterización fenotípica y genética de las seis generaciones básicas derivadas del cruzamiento entre “Voyage” y “Old Brooks” para caracteres de forma de fruto en la dirección medio-lateral

Caracterización fenotípica para caracteres de forma de fruto en la dirección medio-lateral

Se realizó la evaluación sobre 156 plantas correspondientes a las seis generaciones básicas derivadas del cruzamiento entre “Voyage” (V) y “Old Brooks” (OB): progenitores (V y OB), híbrido (F_1 VxOB), población segregante F_2 VxOB y las retrocruzas del híbrido hacia los dos progenitores ($BC_{1-1} = F_1 \times V$ y $BC_{1-2} = F_1 \times OB$). Se cosecharon siete frutos en promedio por planta ($n=1.072$). Los frutos se pesaron y se midió altura y diámetro con calibre. El parámetro de forma se definió como el cociente altura sobre diámetro. Se tomaron imágenes de mitades de frutos y se calcularon las variables: perímetro, área, ancho y alto máximo y grado de irregularidad externa con el programa *Tomato Analyzer 3.0* (Rodríguez et al., 2010, 2011b) y el número de lóculos con el programa *LocAnalyzer* (Spetale et al., 2020), como se describe en el apartado superior.

Caracterización genética para caracteres de forma de fruto en la dirección medio-lateral

Se comprobó la distribución normal y los caracteres que no se ajustaron a una distribución normal se transformaron, del mismo modo que en el apartado superior. Al contar con las seis generaciones básicas se profundizó en los estudios de parámetros genéticos.

Se utilizó el análisis de medias generacionales para determinar el modo de herencia de los caracteres propuestos, de acuerdo a lo detallado en (Kearsey y Pooni, 1996). Se determinó si los caracteres evaluados respondían a un modelo de aditividad-dominancia. Dicho modelo plantea que en el cruzamiento de dos líneas homocigotas contrastantes, la variabilidad genética en las generaciones segregantes está determinada por los genes



diferenciales entre dichos parentales. Se determinó \bar{P}_1 como el progenitor de mayor valor para cada carácter (AA). El punto de origen "m" se consideró como el promedio fenotípico de los progenitores, y se definió la media esperada de los genotipos como desvíos:

$$\bar{P}_1 (AA) = m + a_A$$

$$\bar{P}_2 (aa) = m - a_A$$

$$\bar{F}_1(Aa) = m + d_A$$

Los parámetros a_A (aditividad) y d_A (dominancia) son desviaciones de la media, m, debido a los efectos de los genotipos homocigotos o heterocigotos respectivamente. Estos tres parámetros: m, a_A y d_A pueden estimarse utilizando las comparaciones ortogonales entre las tres medias generacionales.

$$m = \frac{1}{2} \bar{P}_1 + \frac{1}{2} \bar{P}_2$$

$$a_A = \frac{1}{2} \bar{P}_1 - \frac{1}{2} \bar{P}_2$$

$$d_A = \bar{F}_1 - \frac{1}{2} \bar{P}_1 - \frac{1}{2} \bar{P}_2$$

Considerando la constitución de la generación F_2 ($\frac{1}{4}$ AA, $\frac{1}{2}$ Aa, $\frac{1}{4}$ aa), se deriva que el efecto genético esperado de la F_2 es: $m + \frac{1}{2} d_A$. Por su parte la retrocruza BC_{1-1} se derivó del cruzamiento de la F_1 (Aa) con el progenitor P_1 (AA), por lo que el efecto genético esperado será: $m + \frac{1}{2} a_A + \frac{1}{2} d_A$. De igual manera, la retrocruza BC_{1-2} tendrá un efecto: $m - \frac{1}{2} a_A + \frac{1}{2} d_A$.

Estas relaciones esperadas se mantienen sólo si los valores medios de cada generación dependen únicamente de los efectos aditivos y de dominancia de los genes. Por lo tanto se realizó la prueba de escala de Mather (Mather y Jinks, 1982) para probar que el modelo de dominancia-aditividad es adecuado. Esta consistió en contrastar las medias generacionales con un arreglo que permita que las esperanzas se anulen y la diferencia sea igual a cero.

$$A = 2\overline{BC}_1 - \overline{P}_1 - \overline{F}_1$$

$$B = 2\overline{BC}_2 - \overline{P}_2 - \overline{F}_1$$

$$C = 4\overline{F}_2 - 2\overline{F}_1 - \overline{P}_1 - \overline{P}_2$$

Se utilizó la prueba *t-Student*, para determinar la significancia de las pruebas estadísticas A, B y C. Cuando la z calculada resultó mayor que el valor t tabulado, considerando un p-valor= 0,05, la desviación se consideró estadísticamente diferente de cero. Si alguno de los parámetros difiere significativamente de cero, se asume la existencia de epistasis o efectos maternos en la determinación del carácter.

$$t_A = (A-0) / \sqrt{S_A}$$

$$t_B = (B-0) / \sqrt{S_B}$$



$$t_C = (C-0) / \sqrt{S_C}$$

Donde las varianzas se calcularon como,

$$S_A^2 = 4S_{BC1-1}^2 + S_{P1}^2 + S_{F1}^2$$

$$S_B^2 = 4S_{BC1-2}^2 + S_{P2}^2 + S_{F1}^2$$

$$S_C^2 = 16S_{F2}^2 + 4S_{F1}^2 + S_{P1}^2 + S_{P2}^2$$

El número de grados de libertad se determinó sumando los grados de libertad individual para cada una de las generaciones presentes en el cálculo de los parámetros.

Para definir qué proporción de la variación fenotípica de un carácter es hereditaria, qué factores contribuyen a la variabilidad genética y cuáles son sus magnitudes e importancia relativas, se llevó a cabo la estimación de los componentes de varianza genética a partir de los datos de los progenitores homocigotos (V y OB), las generaciones F₁ VxOB y F₂ VxOB y las generaciones de retrocruza hacia ambos padres (BC₁₋₁ y BC₁₋₂). Donde,

$$V_E = \frac{1}{3} (V_{P1} + V_{P2} + V_{F1})$$

$$V_G = V_{F2} - V_E$$

La variación genotípica entre individuos F₂ se fracciona en dos componentes: la varianza genética aditiva (V_A^{*}) y la varianza de dominancia (V_D^{*}). Para separar los componentes de varianza aditiva y de dominancia se requieren las dos retrocruzas.

$$V_A^* = 2S_{F2}^2 - S_{BC1-1}^2 - S_{BC1-2}^2$$

$$V_D^* = S_{BC1-1}^2 + S_{BC1-2}^2 - S_{F2}^2 - V_E$$

Finalmente, se calculó heredabilidad con la fórmula definida por Warner (1952)

$$h^2 = V_A^* / S_{F2}^2$$

$$H^2 = V_G / S_{F2}^2$$

Identificación de QTL asociadas al carácter grado de irregularidad mediante el enfoque de QTL-seq

Se seleccionó el carácter grado de irregularidad para llevar a cabo la identificación de nuevos QTL. El grado de irregularidad externa es un rasgo de importancia económica, relacionado al tamaño de fruto y número de lóculos, que aún no ha sido mapeado. En el Capítulo I se observó que existió variabilidad para este carácter en el germoplasma de tomate y que dicha variabilidad se explicó principalmente por la componente genética de la varianza. Sin embargo, la constitución génica para los alelos de *FAS* y *LC*, los genes conocidos subyacentes a la forma de fruto en el plano transversal, no resultó suficiente para explicar la variabilidad presente para este carácter. El grado de irregularidad resultó



divergente entre los progenitores analizados en el Capítulo II y mostró elevada heredabilidad entre los cuatro cultivares seleccionados. Se siguió la metodología descrita por Takagi et al. (2013), para la determinación de nuevos QTL que determinan la irregularidad externa de fruto. La metodología se describió previamente (ver sección Materiales y Métodos –Capítulo III)

Extracción y cuantificación de ADN para secuenciación

El enfoque *QTL-seq* se aplicó en dos poblaciones segregantes F_2 . Se generaron mezclas o grupos de ADN con valores contrastantes para el carácter grado de irregularidad. Se formó un grupo de ADN mezclando cantidades iguales de ADN proveniente de plantas con alto de grado de irregularidad (HLD) y bajo grado de irregularidad (LLD). Los grupos de ADN incluyeron 10 plantas de la población F_2 VxOB (campaña año nº 2) (Figura IV-1a) y 14 plantas de la población F_2 YSxH (campaña año nº 4) (Figura IV-1b).

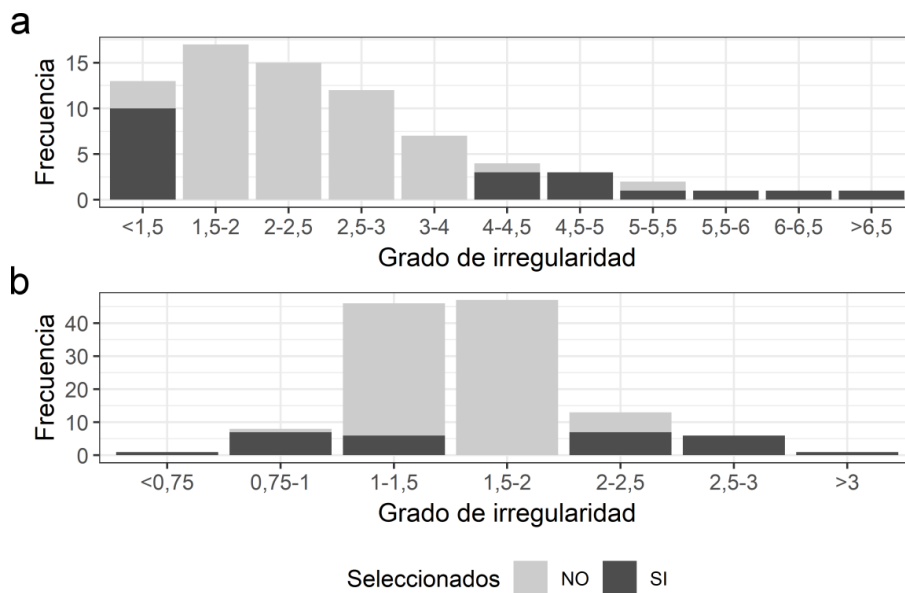


Figura IV-1: Esquema de plantas seleccionadas para el análisis de grupos segregantes de acuerdo al grado de irregularidad. (a) población F_2 Voyage x Old Brooks. (b) población F_2 Yellow Stuffer x Heinz 1439. En color gris más oscuro se indican las plantas seleccionadas.

El ADN genómico se extrajo a partir de hojas jóvenes de las plantas seleccionadas, utilizando el método de bromuro de cetil-trimetil-amonio (CTAB), adaptado de las metodologías descritas por Bernatzky y Tanksley (1986) y Fulton et al. (1995). Se partió de 10 g de tejido foliar. El tejido se molió con N_2 líquido en mortero, hasta pulverizar completamente las hojas. Se agregó a cada muestra la solución de extracción a una temperatura de 65 °C y se mezcló con espátula para obtener una muestra homogeneizada del tejido. La solución de extracción estuvo compuesta por: 5ml de *buffer* de extracción (0,35 M Sorbitol; 0,1 M Tris; 5Mm EDTA pH 8,25), 5 ml de *buffer* de lisis nuclear (0,2 M Tris, 0,05 M EDTA, 2 M NaCl, 2 % CTAB, pH 8), 2 ml de Sarkosyl 5% y 0.03 g de bisulfito de sodio. Las muestras se incubaron durante una hora en un baño termostatizado a 65 °C, agitando cada 15 minutos. Todas las muestras se llevaron al mismo peso agregando solución *buffer* de extracción y se dejaron enfriar por 10 minutos. A continuación se agregó ½ volumen de clorofomo:isoamílico (24:1) y se agitó manualmente por inversión suave durante 10 minutos.



Las muestras se llevaron a la centrífuga a 1.715 rcf durante 20 minutos, a temperatura ambiente (~25°C). Se repitieron los dos últimos pasos. Luego, el sobrenadante se traspasó a un tubo nuevo y se añadió un volumen de isopropanol frío (-20 °C). El tubo se agitó suavemente hasta observar el ADN precipitado. El ADN se pescó con una pipeta Pasteur y se lavó con una solución de 70 % v/v de etanol, se dejó secar a temperatura ambiente y se re-suspendió en 300 µl de *buffer* TE (10 mM Tris pH 7,4 y 1 mM EDTA pH 8,0). Finalmente el ADN se disolvió colocando los tubos en el baño termostatzado a 65 °C por 30 minutos, y se precipitó al centrifugarlos durante 10 minutos a 9.500 rcf. La cantidad e integridad de ADN extraído se evaluó en geles de agarosa al 1 % p/v teñidos con SYBR™ Safe (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA, EEUU) y por espectrofotometría como se describió en el Capítulo III.

Se mezclaron 10 µl de ADN con una concentración de 50 ng/µl proveniente de cada planta, para conformar dos grupos. La concentración final de los grupos de ADN se evaluó por comparación con un estándar de ADN del fago lambda en geles de agarosa y por espectrofotometría como se detalló previamente (ver sección Materiales y Métodos -Capítulo III).

Secuenciación y alineado de genomas

El genoma completo de los grupos de ADN fue secuenciado con un equipo NovaSeq 6000, para obtener lecturas de extremos emparejados de 151 pb. Se utilizó el servicio de Macrogen Inc. (Seoul, Corea) para el armado de librerías genómicas y secuenciación genómica.

Siguiendo la metodología descrita en el Capítulo III, se recortaron y filtraron por calidad las lecturas de secuencia corta en los archivos FASTQC con el programa Trim Galore (<https://github.com/FelixKrueger/TrimGalore>), versión 0.4.5. Se evaluó la calidad de las lecturas recortadas usando el programa FastQC, versión 0.11.4 (Andrews et al., 2010). Se usó la opción “--very-sensitive-local” del programa de Bowtie 2, versión 2.3.2 (Langmead y Salzberg, 2013) para alinear las secuencias de los grupos con el genoma consenso de *S. lycopersicum* L. cultivar Heinz 1706, versión de ensamblaje de referencia SL4.0 (The Tomato Genome Consortium, 2012). Los archivos SAM obtenidos fueron ordenados por coordenadas, clasificados, etiquetados y convertidos a un formato de archivo BAM, con el programa Picard, versión 1.119 (<http://broadinstitute.github.io/picard/>). La detección de variantes (*SNP* e *InDel*) se realizó empleando la herramienta “*HaplotypeCaller*” de GATK, versión 4.0.9.0 (Depristo et al., 2011; McKenna et al., 2010). Los archivos de ambos grupos se combinaron en un único archivo y se realizó el genotipado para cada posición con las herramientas de GATK (Depristo et al., 2011; McKenna et al., 2010), “*CombineGVCFs*” y “*GenotypeGVCFs*”, respectivamente. Los polimorfismos de baja confiabilidad se filtraron y exportaron en formato de tablas con herramientas de los programas GATK (Depristo et al., 2011; McKenna et al., 2010) y VCFtools (Danecek et al., 2011).

Los datos de secuencia generados en este estudio se han depositado como Archivo de Lectura de Secuencia (SRA, *Sequence Read Archive*) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, *National Center for Biotechnology Information*) con el número de registro SRP354680.



El proceso de alineamiento y comparación de las secuencias genómicas se realizó utilizando el Centro de Cómputo de Alto Rendimiento del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) Rosario.

Identificación de QTL asociados al carácter grado de irregularidad

La identificación de QTL se realizó con el paquete de programa *QTLseqr* (Mansfeld y Grumet, 2018) versión 0.7.4, desarrollado en lenguaje de computación R, versión 3.6.3 (R Core Team, 2014), como se describió en el Capítulo III. Se obtuvieron para cada *SNP* la frecuencia del alelo de referencia, el índice-*SNP* y el Δ (índice-*SNP*) utilizando la función "*importFromGATK*". El Δ (índice-*SNP*) se calculó como la diferencia entre los valores de índice-*SNP* del grupo de alto grado de irregularidad (HLD) y bajo (LLD). Los *SNP* de baja confiabilidad se filtraron según Takagi et al. (2013), utilizando la opción "*filterSNP*". Se conservaron los *SNP* con profundidad de lectura entre los valores del primer y el tercer cuartil, diferencia absoluta entre grupos menor a de 50x y una calidad igual a 99. La significancia estadística de los QTL se evaluó según Magwene et al. (2011). Se calculó un parámetro G suavizado por tricubo (G') para cada *SNP*. Además, se calcularon el p-valor (Magwene et al., 2011) y los valores p ajustados de Benjamini-Hochberg o el valor Q (Benjamini y Hochberg, 1995). Los valores de G' superiores al umbral de significancia sugieren la presencia de QTL asociado al carácter de interés. Los pasos del análisis principal se realizaron utilizando la función "*runGprimeanalysis*". Se consideró una ventana deslizante de 2 Mb. El valor de FDR se definió considerando un valor Q umbral de 0,05 y 0,01 para determinar aquellos sitios que se desviaron significativamente de la distribución nula de G' . Los resultados se representaron gráficamente con la función *plotQTLStat*, y se exportaron como archivos CSV.

Caracterización molecular para confirmar los QTL detectados en poblaciones segregantes completas

Extracción y cuantificación de ADN

Se llevó a cabo la extracción de ADN genómico de las plantas F_2 VxOB (campaña n° 2) y F_2 YSxH (campaña n° 4). Se siguió la metodología descrita por Fulton et al. (1995), con modificaciones menores. Este protocolo, incluyó la maceración del tejido vegetal joven, una extracción del ADN y desnaturalización de proteínas con CTAB empleando altas concentraciones de sales, extracción con cloroformo:isoamyl alcohol, precipitación con isopropanol y centrifugación, lavado con etanol y re-suspensión en *buffer* TE. La cuantificación del ADN extraído se realizó por espectrofotometría con NanoDrop y la calidad del ADN se corroboró en geles de agarosa. Finalmente, obtuvieron las diluciones de trabajo con una concentración de 40 ng/ μ l de ADN. El protocolo se detalla en la sección Materiales y Métodos del Capítulo II.

Desarrollo de marcadores moleculares en función de datos de polimorfismos

Se desarrollaron marcadores tipo *InDel* para ambas poblaciones, según las consideraciones ya desarrolladas en el Capítulo III. Se utilizó la interfaz en línea Primer3, versión 0.4.0 (Untergasser et al., 2012).



La población F_2 VxOB se caracterizó con un total de 38 marcadores *InDel* específicos diseñados a lo largo de las diferentes regiones de interés, para mapear *QTL* asociados al grado de irregularidad.

Inicialmente se desarrollaron dos marcadores comprendiendo cada una de las cinco regiones identificadas asociadas al carácter grado de irregularidad. Ya que se encontró una región en el cromosoma 8 asociada a dicho carácter conservada en ambas poblaciones, se desarrollaron marcadores en la región con el fin de construir un mapa de ligamiento y validar dicho *locus*. Se diseñaron un total de 10 marcadores a lo largo de este cromosoma en la población F_2 VxOB. El cromosoma 6 se encontró asociado al carácter tipo de carpelo, y se genotipó previamente en el Capítulo III con un total de 17 marcadores finales (ver Tabla III-1 y sección Resultados). Por otro lado, la población F_2 YSxH se caracterizó con 19 marcadores *InDel* diseñados, aproximadamente cada 5 Mb, cubriendo todo el cromosoma 8. Algunos de estos marcadores también se usaron para el genotipado del cromosoma 8 en la población F_2 VxOB. Los detalles sobre los marcadores moleculares utilizados son resumidos en la Tabla IV-1.



Tabla IV-1: Secuencia de los cebadores *forward* y *reverse* de los marcadores moleculares utilizados para mapas desarrollo de los mapas de ligamiento y análisis de *QTL* en las poblaciones F_2 (VxOB) y F_2 (YSxH).

Cebador ID	Secuencia	Posición física (pb)	Población
PTZ-50F	AGATGGCAACTTGTCAAAATCA	SL4.0cr08: 625462	F_2 (YSxH)
PTZ-50R	GCATTCCGGTGAATGACTTC		
PTZ-51F	CGGAGGAGCATGATTTGAAG	SL4.0cr08: 958186	F_2 (VxOB)
PTZ-51R	TTCAAAATTCGTGGAAGTCTCTT		F_2 (YSxH)
PTZ-52F	TTGCAATGATTTTTGTGTTCCG	SL4.0cr08: 1715650	F_2 (YSxH)
PTZ-52R	AAGCCAAAACACCTCCATTT		
PTZ-53F	ATGAGATGCAAACCGTTGAA	SL4.0cr08: 5324354	F_2 (YSxH)
PTZ-53R	GAGTAGCTGGTGCATCAAGG		
PTZ-54F	TTGAGGGGATACTTGGGTATTA	SL4.0cr08: 10355125	F_2 (YSxH)
PTZ-54R	GCCAACTAGACTCATCGCCTA		
PTZ-55F	AGGAGATGGGGTAAGGCAAT	SL4.0cr08: 14502721	F_2 (YSxH)
PTZ-55R	TAGGCGACATTTGTGTTGGA		
PTZ-56F	AATCTAGCATGCCACAATAGTTCA	SL4.0cr08: 19043487	F_2 (YSxH)
PTZ-56R	TGTGTGCACCACATCTTTTG		
PTZ-57F	ATCGTCGCCTATTGCTTCTG	SL4.0cr08: 23631355	F_2 (YSxH)
PTZ-57R	AAATGTCCAGCCCAATTCAC		
PTZ-58F	CCTCATTTGCAAAGTCACCA	SL4.0cr08: 30480984	F_2 (YSxH)
PTZ-58R	AGCCACGAGCAGTTGAAAAC		
PTZ-59F	GGGGGAATGCTTTCTATTTCG	SL4.0cr08: 33183742	F_2 (YSxH)
PTZ-59R	GGGGGTTCTTTTAGGTCGTG		
PTZ-60F	ATGATTTGTCCTTGCGGACT	SL4.0cr08: 34622447	F_2 (YSxH)
PTZ-60R	TGGAGAAGGTAGTTCCTCCTTG		
PTZ-61F	TCATCCTCGGTCTTTTTCACT	SL4.0cr08: 40571168	F_2 (YSxH)
PTZ-61R	CATGCCCTTGTTATGTCAGG		
PTZ-62F	CGTTGACTATTCAATCTCGATCA	SL4.0cr08: 45520125	F_2 (YSxH)
PTZ-62R	AATTGGCAAGACCTTCTACTCTTC		
PTZ-63F	GCTGCTGTTCTGTCTGCAAT	SL4.0cr08: 51752028	F_2 (YSxH)
PTZ-63R	CCTGATCGAGGGAAAATCAA		
PTZ-64F	CTTCATGCTGACATGGGAAA	SL4.0cr08: 53518397	F_2 (YSxH)
PTZ-64R	TTTGGCTAAATCCTTGAAAA		

Cebador ID: identificador del cebador, F: cebador *forward*, R: cebador *reverse*, SL4.0: versión del genoma de referencia, cr: cromosoma, pb: pares de bases, Población: población en la que se utilizó el marcador.



Tabla IV-1: Secuencia de los cebadores *forward* y *reverse* de los marcadores moleculares utilizados para mapas desarrollo de los mapas de ligamiento y análisis de QTL en las poblaciones F₂ (VxOB) y F₂ (YSxH) (continuación).

Cebador ID	Secuencia	Posición física (pb)	Población
PTZ-65F	TGTCTGATAATAAGGCAAAACAAAA	SL4.0cr08: 53947369	F ₂ (YSxH)
PTZ-65R	GGATGAATGAAGAGGAACACG		
PTZ-66F	TGTACTCCGTGACTCAAGAATCC	SL4.0cr08: 56013320	F ₂ (YSxH)
PTZ-66R	CAAGCAGAGACAGTTGATTATTCCG		
PTZ-67F	TCGTTTTGCTGGTGAATGAA	SL4.0cr08: 56031224	F ₂ (YSxH)
PTZ-67R	TTACGTGAGGGCCAAGTACC		
PTZ-68F	ATTGCAGTCCTGTCCACTCA	SL4.0cr08: 60956246	F ₂ (VxOB)
PTZ-68R	AATATAAGTCCCGCCGCAAT		F ₂ (YSxH)
PTZ-74F	TGGGAGTTTGCAATATTCATC	SL4.0cr08: 53434724	F ₂ (VxOB)
PTZ-74R	CCACCAAGCCAACGACTTTA		
PTZ-81F	GCTTGGGGATGAGAGCTATG	SL4.0cr08: 900423	F ₂ (VxOB)
PTZ-81R	TTGCATCACACACATTGCAG		
PTZ-82F	CAATCATCGATCCGCATATTT	SL4.0cr08: 2112571	F ₂ (VxOB)
PTZ-82R	GGTTTTGCTATGCTCATGGA		
PTZ-83F	TGACCTACGCAATGCATCTT	SL4.0cr08: 2343711	F ₂ (VxOB)
PTZ-83R	CGCTGCCAAAATCTTTTAAATC		
PTZ-84F	TGCAGGGACTCGTAGACACA	SL4.0cr08: 2845050	F ₂ (VxOB)
PTZ-84R	AATTACGCGGCTGTACCATC		
PTZ-85F	CTTTATCGTGGGCTTTTCGAG	SL4.0cr08: 15459676	F ₂ (VxOB)
PTZ-85R	GTTGGGAATAAGGGGACAT		
PTZ-86F	AAATCCCAACCATGAGTCC	SL4.0cr08: 25730793	F ₂ (VxOB)
PTZ-86R	TGCGGTTCAACACTTTGTTT		
PTZ-87F	CGCCCCCTATATCCTCATCT	SL4.0cr08: 36029676	F ₂ (VxOB)
PTZ-87R	TTGTGACATTTGCGCATAGC		
PTZ-88F	GGTGTGCGGACAGAAGAAAT	SL4.0cr08: 52568663	F ₂ (VxOB)
PTZ-88R	CCAGTTTGTTTCAGGAGATGC		
PTZ-89F	TCATGCGGAGAAGAAGTTTG	SL4.0cr08: 54113731	F ₂ (VxOB)
PTZ-89R	AGACTTCGTGTTGGTCTTGTA		
PTZ-90F	TTTGCAAACGTGCACATGGAG	SL4.0cr08: 56985681	F ₂ (VxOB)
PTZ-90R	TTCATGGAATTTTATGAGCTCTCT		
PTZ-91F	CGACTTGTCGCAGAGGTAATA	SL4.0cr08: 62100192	F ₂ (VxOB)
PTZ-91R	TGATCCACATGAGGTTCCAC		
PTZ-92F	ACCTGGTGCGGGTAAGTTTT	SL4.0cr04: 867375	F ₂ (VxOB)
PTZ-92R	AGGATTGGGCTCTAGGTGTG		
PTZ-93F	AATGAAGAGGGTTTGTAGTTGC	SL4.0cr04: 973359	F ₂ (VxOB)
PTZ-93R	AAGTGCACCCATATCAAGATGA		

Cebador ID: identificador del cebador, F: cebador *forward*, R: cebador *reverse*, SL4.0: versión del genoma de referencia, cr: cromosoma, pb: pares de bases, Población: población en la que se utilizó el marcador.



Tabla IV-1: Secuencia de los cebadores *forward* y *reverse* de los marcadores moleculares utilizados para mapas desarrollo de los mapas de ligamiento y análisis de *QTL* en las poblaciones F_2 (VxOB) y F_2 (YSxH) (continuación).

Cebador ID	Secuencia	Posición física (pb)	Población
PTZ-94F	TTCAACATGGAGGAGGAAGG	SL4.0cr04: 2724489	F ₂ (VxOB)
PTZ-94R	GTGTGGCTAGCTCGTTGTCA		
PTZ-95F	TTACGACTGTTTGGCGTTCA	SL4.0cr04: 57815022	F ₂ (VxOB)
PTZ-95R	CCACATAATCAACGTCCCTCT		
PTZ-96F	GGGACGATGAATTCAAATTGT	SL4.0cr04: 59995911	F ₂ (VxOB)
PTZ-96R	CTTGAGAGATTTACGCAAGTGA		
PTZ-97F	TGGGAAGCTCTCCGTAGTGA	SL4.0cr04: 62529995	F ₂ (VxOB)
PTZ-97R	TCATCAAGCAGCACAGATCC		
PTZ-98F	CAACTCCGATCTATCTAACATTGC	SL4.0cr09: 676632	F ₂ (VxOB)
PTZ-98R	ACAAATCTCTGGCCCTTCAA		
PTZ-99F	TGAAAGTAAGGCAAGACAAGGA	SL4.0cr09: 12780562	F ₂ (VxOB)
PTZ-99R	AAAGTAAGGCATGGCGACTC		
PTZ-100F	TCTTCGTTTGATTGCTCCAA	SL4.0cr09: 44712089	F ₂ (VxOB)
PTZ-100R	GGTCCATTCTCGCTTGATGT		
PTZ-101F	CGGTCAACTTCACCCAAAGA	SL4.0cr09: 65080420	F ₂ (VxOB)
PTZ-101R	GGTTGCTAATTGGCTTTCCA		
PTZ-102F	AGGCTTGATCCGAGGTAGGT	SL4.0cr11: 49773016	F ₂ (VxOB)
PTZ-102R	AATCTCCTCCCACCGTTCTT		
PTZ-103F	GCTCGTGACGAGAGATCGAA	SL4.0cr11: 53260607	F ₂ (VxOB)
PTZ-103R	AAGCAAACCTGTGGCAAAT		

Cebador ID: identificador del cebador, F: cebador *forward*, R: cebador *reverse*, SL4.0: versión del genoma de referencia, cr: cromosoma, pb: pares de bases, Población: población en la que se utilizó el marcador.

La amplificación de los marcadores moleculares se realizó mediante la metodología de PCR, siguiendo el mismo protocolo descrito previamente (ver sección Materiales y Métodos - Capítulo III), en todos los casos. La muestra para la reacción incluyó ADN genómico molde, dNTPs, MgCl₂, cebadores específicos, *buffer* Taq y enzima de Taq polimerasa. El protocolo de amplificación, descrito previamente, consistió en desnaturalización, gradiente térmico de amplificación, amplificación y elongación. La separación de los fragmentos amplificados se realizó en geles de agarosa al 3 % p/v mediante tinción con SYBRTM Safe (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA, EEUU).

Construcción de un mapa de ligamiento

Debido a que se encontró un *locus* asociado a grado de irregularidad en el cromosoma 8 en ambas poblaciones analizadas, se decidió llevar a cabo la construcción de un mapa de ligamiento genético y la identificación de *QTL* por mapeo de intervalo simple (SIM, *Simple Interval Method*). La misma metodología se aplicó para la validación de la región genómica del cromosoma 6 en la población F₂ VxOB.

Se utilizaron los datos obtenidos de la caracterización molecular de las plantas de ambas poblaciones F₂ para llevar a cabo la construcción de los mapas de ligamiento. Para



esta tarea se utilizó el paquete R/QTL (Broman et al., 2003). No se consideraron aquellas plantas con datos faltantes para la mitad o más del total de marcadores para el cromosoma. Se eliminaron los marcadores con segregación distorsionada o falta de datos superior al 10 %. Se definieron valores de puntuación de LOD (*Logarithm Of Odds* o logaritmo de probabilidades) y frecuencia de recombinación (Rf) de al menos 5 y 0,35, respectivamente. Se utilizaron las funciones “*orderMarkers*” y “*ripple*” a fin de establecer y verificar el orden de los marcadores en los grupos de ligamiento y se calculó la distancia entre marcadores con la función de Kosambi (1943).

DetECCIÓN DE QTL

La detección de QTL se llevó a cabo en base a datos genotípicos y fenotípicos de los individuos que conformaban las poblaciones F₂.

La detección de QTL mediante análisis de intervalos simple (SIM, *Simple Interval Mapping*) (Lander y Botstein, 1989) se llevó a cabo para el cromosoma 8 en ambas poblaciones segregantes y en el cromosoma 6 de la población F₂ VxOB, utilizando el paquete R/QTL (Broman et al., 2003). Se simularon datos genotípicos y marcadores moleculares a una distancia genómica máxima fija de dos centiMorgan (cM) utilizando la función “*sim.geno*”. Esta simulación se basó en los datos genotípicos de la población F₂ y la frecuencia de recombinación entre los marcadores especificada en el mapa de ligamiento. Se definió un valor de LOD correspondiente a una probabilidad asociada superior a 0,05, siendo este el umbral inferior del nivel de significancia. Dicho valor se estimó realizando 1000 permutaciones con la función “*scanone*”. Los marcadores con segregación distorsionada no fueron considerados en el análisis. Los picos significativos o QTL se definieron con la función “*define.peak*” cuando el LOD fue superior a 3, lo que se corresponde con un valor de probabilidad de error tipo I (α) entre 0,01 y 0,05. El valor de R² y la significación se calcularon para todos los QTL con la función “*calc.Rsq*”, mediante ANOVA.

La asociación entre los marcadores moleculares y los caracteres cuantitativos de forma analizados se determinó inicialmente mediante método de un solo punto (SPA, *single point analysis*) (Tanksley, 1993) en todas las regiones genómicas asociadas al grado de irregularidad en la población F₂ VxOB. Se aplicó la metodología ANOVA unidireccional, en la cual los diferentes marcadores fueron las fuentes de variación. La lista de marcadores analizados se detalla en la Tabla IV-1. Se verificaron los supuestos de independencia, normalidad y homocedasticidad de los residuos para la prueba ANOVA. Se utilizó el entorno de programación libre R, versión 3.6.3 (R Core Team, 2014) para realizar un análisis de ligamiento de marcadores. Se definió una probabilidad menor a 0,01 para indicar diferencias entre las medias de los caracteres. Según Grandillo y Tanksley (1996) dicho valor correspondería a un LOD de 2,4. También se consideró, a nivel exploratorio, un valor de p menor a 0,05. El valor de R² indicaría el porcentaje de variancia fenotípica total explicada para el QTL estudiado por cada marcador (Liu, 1998).

Cuando se halló más de una región genómica asociada al mismo carácter se evaluaron las interacciones epistáticas, mediante un ANOVA de dos factores. Se eligió el marcador molecular más significativo por región. Los análisis estadísticos se realizaron con

CAPÍTULO IV- MATERIALES Y MÉTODOS



el entorno de programación R, versión 3.6.3 (R Core Team, 2014). Las interacciones genéticas *intralocus* e *interloci* se evaluaron aplicando contrastes ortogonales siguiendo el procedimiento detallado en Jana (1972) con el programa *InfoStat*, versión 2017 (Di Rienzo et al., 2001)



RESULTADOS

Caracterización fenotípica y genética de dos poblaciones segregantes F_2 divergentes para caracteres de forma de fruto en la dirección medio-lateral.

Todos los caracteres se ajustaron a una distribución normal en ambas poblaciones (Figura IV-2 y Figura IV-3). En la población F_2 VxOB, si bien el carácter grado de irregularidad se ajustó a una distribución normal, se visualiza una tendencia hacia los menores valores (forma regular), con un comportamiento bimodal (Figura IV-2). Remarcablemente, esto no se observa en la población F_2 YSxH (Figura IV-3).

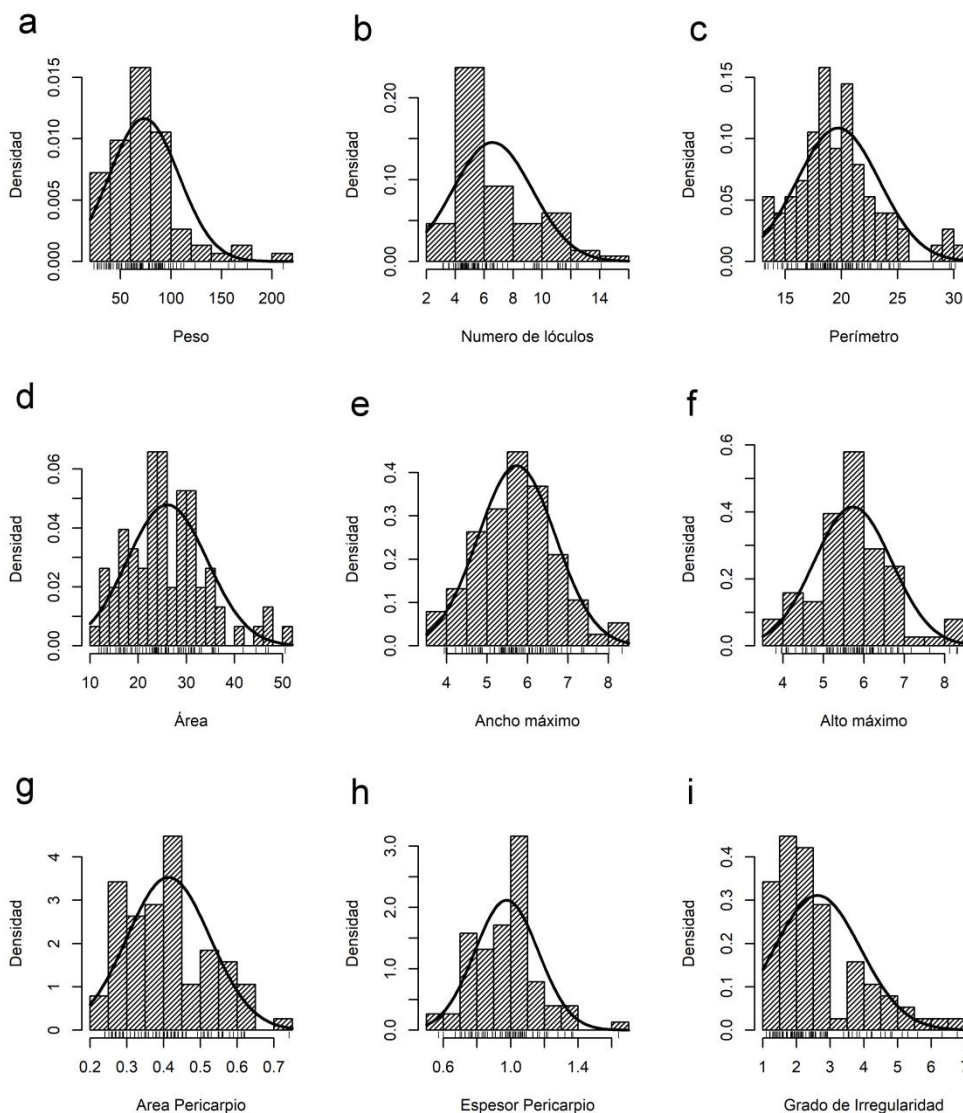


Figura IV-2: Histogramas de densidad para caracteres de forma analizados en la población F_2 “Voyage” x “Old Brooks”. (a) Peso de fruto, unidad: gramos. (b) Número de lóculos. (c) Perímetro, unidad: cm. (d) Área, unidad: cm^2 . (e) Ancho máximo, unidad: cm. (f) Alto máximo, unidad: cm. (g) Área de pericarpio (h) Espesor de pericarpio (i) Grado de irregularidad externa. Las tendencias de distribución normal se indican con una curva. Las barras paralelas en la parte inferior del gráfico muestran la concentración de datos: la línea más gruesa, mayor concentración.

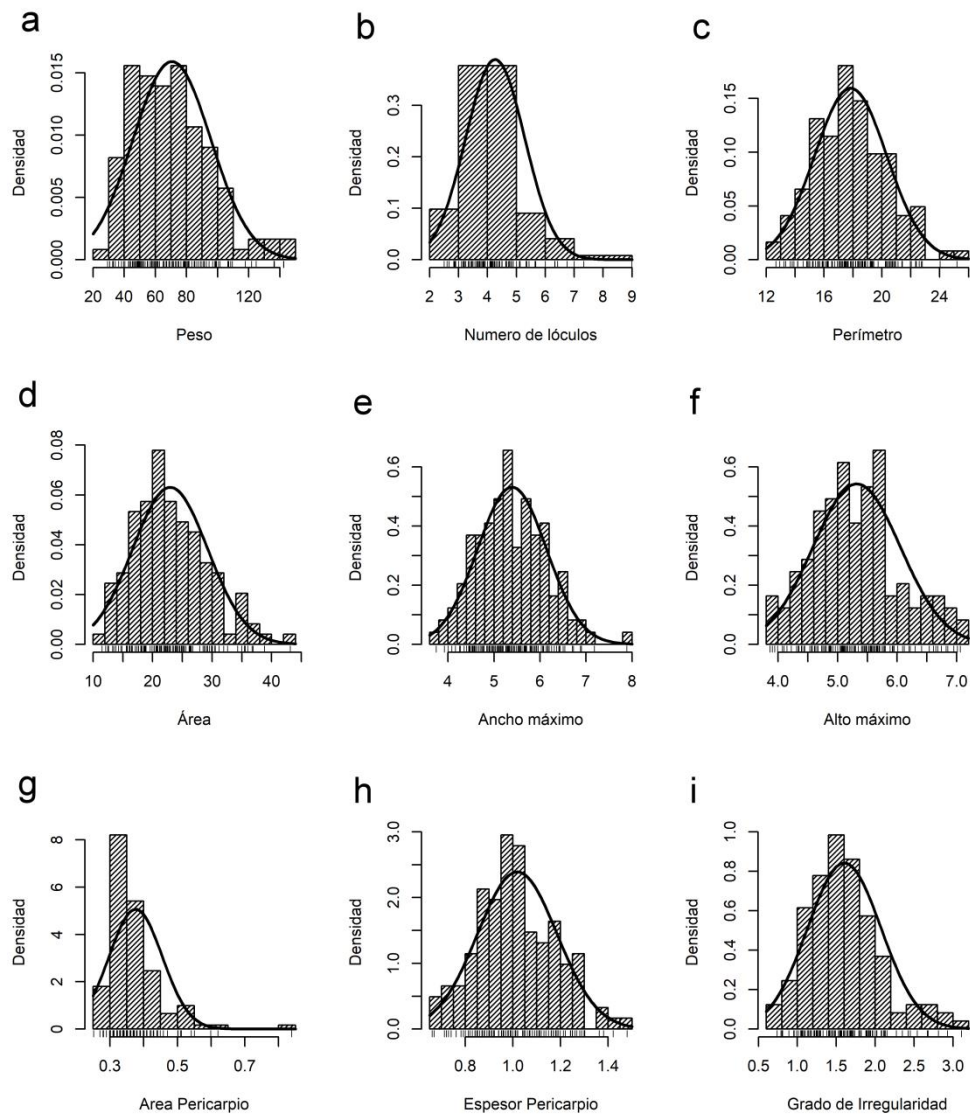


Figura IV-3: Histogramas de densidad para caracteres de forma analizados en la población F_2 “Yellow Stuffer” x “Heinz 1439”. (a) Peso de fruto, unidad: gramos. (b) Número de lóculos. (c) Perímetro, unidad: cm. (d) Área, unidad: cm^2 . (e) Ancho máximo, unidad: cm. (f) Alto máximo, unidad: cm. (g) Área de pericarpio (h) Espesor de pericarpio (i) Grado de irregularidad externa. Las tendencias de distribución normal se indican con una curva. Las barras paralelas en la parte inferior del gráfico muestran la concentración de datos: la línea más gruesa, mayor concentración.



Las plantas de la población segregante F_2 VxOB presentaron en promedio frutos grandes ($\bar{x}=73,89$ gr), con alto número de lóculo ($\bar{x}=6,59$) y forma irregular ($\bar{x}=2,56$). Por su parte las plantas de la población F_2 YSxH, se caracterizaron por presentar frutos grandes ($\bar{x}=70,63$), de alto número de lóculos ($\bar{x}=4,27$) y forma moderadamente irregular ($\bar{x}=1,62$).

La información fenotípica y datos de heredabilidad obtenidos en ambas poblaciones se resumen en la Tabla IV-2. Los valores de heredabilidad en sentido amplio (H^2), fueron altamente significativos para todos los caracteres analizados, en ambas poblaciones. Las estimaciones de la heredabilidad en sentido amplio para cada variable mostraron un rango de 0,05-0,67 en la población F_2 "Voyage" x "Old Brooks" (Tabla IV-2). El número de lóculos, perímetro, área, ancho máximo, alto máximo y peso mostraron los mayores valores de heredabilidad ($0,50 \leq H^2 \leq 0,67$). Por su parte, el grado de irregularidad y espesor de pericarpio tuvieron valores intermedios (0,34 y 0,18, respectivamente), mientras que área de pericarpio presentó un valor de 0,05. Un valor de H^2 cercano a cero sugiere una fuerte componente ambiental para el carácter, mientras que valores cercanos a uno representan una elevada influencia genética en la variación fenotípica del carácter. Por otro lado, en la población F_2 YSxH, los valores de H^2 para todos los caracteres se encontraron dentro del rango de 0,10-0,57. Así, los caracteres perímetro, alto máximo, área, ancho máximo, peso y espesor de pericarpio alcanzaron los mayores valores de heredabilidad ($0,41 \leq H^2 \leq 0,57$). Los caracteres número de lóculos y grado de irregularidad presentaron valores intermedios (0,28 y 0,26 respectivamente). Finalmente el carácter área de pericarpio presentó un valor bajo, con una H^2 de 0,1.



Tabla IV-2: Media, desvió estándar, heredabilidad en sentido amplio (H^2) y su correspondiente probabilidad en las dos poblaciones segregantes analizadas (F_2 . “Voyage” x “Old Brooks” y F_2 “Yellow Stuffer” x “Heinz 1439”).

	F_2 “Voyage” x “Old Brooks”			F_2 “Yellow Stuffer” x “Heinz 1439”		
	media \pm de	$H^2 \pm$ ee	p-valor	media \pm de	$H^2 \pm$ ee	p-valor
Peso	73,89 \pm 33,94	0,50 \pm 0,03	<0,0001	70,63 \pm 25,08	0,43 \pm 0,02	<0,0001
Número de lóculos	6,59 \pm 2,75	0,67 \pm 0,03	<0,0001	4,27 \pm 1,025	0,28 \pm 0,02	<0,0001
Perímetro	19,68 \pm 3,69	0,62 \pm 0,03	<0,0001	17,84 \pm 2,501	0,57 \pm 0,03	<0,0001
Área	26,04 \pm 8,33	0,60 \pm 0,03	<0,0001	22,94 \pm 6,326	0,54 \pm 0,03	<0,0001
Ancho máximo	5,72 \pm 0,97	0,59 \pm 0,03	<0,0001	5,39 \pm 0,734	0,53 \pm 0,03	<0,0001
Alto máximo	5,74 \pm 0,95	0,58 \pm 0,03	<0,0001	5,31 \pm 0,726	0,56 \pm 0,03	<0,0001
Grado de irregularidad	2,56 \pm 1,25	0,34 \pm 0,03	<0,0001	1,62 \pm 0,512	0,26 \pm 0,02	<0,0001
Área de pericarpio	0,41 \pm 0,11	0,05 \pm 0,01	<0,0001	0,38 \pm 0,078	0,10 \pm 0,01	<0,0001
Espesor de pericarpio	0,97 \pm 0,19	0,18 \pm 0,02	<0,0001	1,02 \pm 0,165	0,41 \pm 0,03	<0,0001

de: desvió estándar. ee: error estándar. H^2 : heredabilidad en sentido amplio o grado de determinación génica. p-valor: significancia de la prueba de ANOVA realizado para cada carácter.



El análisis de correlaciones mostró que los caracteres perímetro y área de fruto presentaron los valores de correlación más elevados en ambas poblaciones (Figura IV-4). Las variables descriptoras de tamaño: peso, perímetro, área, alto y ancho máximos se correlacionaron positivamente entre sí, y con el espesor de pericarpio. El número de lóculos mostró una correlación positiva y alta con el grado de irregularidad en la población F_2 VxOB, mientras que esta correlación fue baja en la población F_2 YSxH. Por su parte, ambos caracteres se vincularon en forma directa con los caracteres de tamaño en ambas poblaciones. Considerando el carácter área de pericarpio, la correlación resultó no significativa respecto al resto de variables, a excepción del espesor de pericarpio y grado de irregularidad que mostraron una relación directa e inversa, respectivamente, con el área de pericarpio en la población F_2 YSxH.

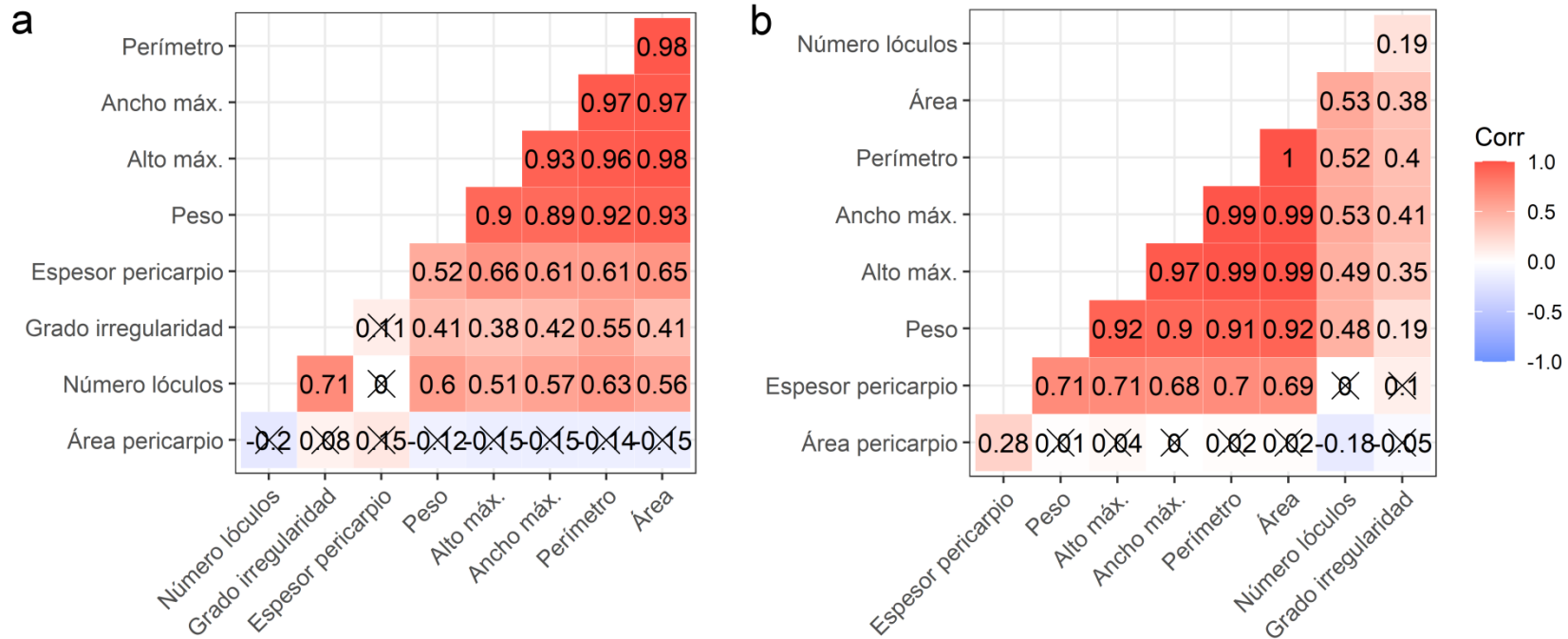


Figura IV-4.: Matriz de correlación indicando la asociación fenotípica entre los caracteres analizados. (a) Población F₂ “Voyage” x “Old Brooks”. (b) Población F₂ “Yellow Stuffer” x “Heinz 1439”. Los colores de las celdas indican la magnitud de las correlaciones de rango de Pearson (positivas o negativas) entre pares de caracteres. Las correlaciones fuertes positivas se resaltan en color rojo oscuro y los colores más claros indican relaciones más débiles. Las cruces indican correlaciones no significativas al 5%.



Caracterización fenotípica y genética de las seis generaciones básicas derivadas del cruzamiento entre “Voyage” y “Old Brooks” para caracteres de forma de fruto en la dirección medio-lateral

Los caracteres analizados se ajustaron a una distribución normal, a excepción de los caracteres número de lóculos y grado de irregularidad. En la Tabla IV-3 y Figura IV-5, se observa que el cultivar “Old Brooks” presentó en promedio frutos de mayor tamaño, forma menos achatada, menor cantidad de lóculos y forma externa más regular, respecto al cultivar “Voyage”. El híbrido (F_1 VxOB), mostró valores intermedios entre ambos progenitores para los caracteres de peso y tamaño, grado de irregularidad, y número de lóculos. Por su parte es remarcable que la BC_{1-1} derivada del cruzamiento entre el híbrido y cultivar “Voyage”, presentó en promedio frutos marcadamente más irregulares, con mayor cantidad de lóculos y menor tamaño que la BC_{1-2} derivada del cruzamiento entre el híbrido y cultivar “Old Brooks”.

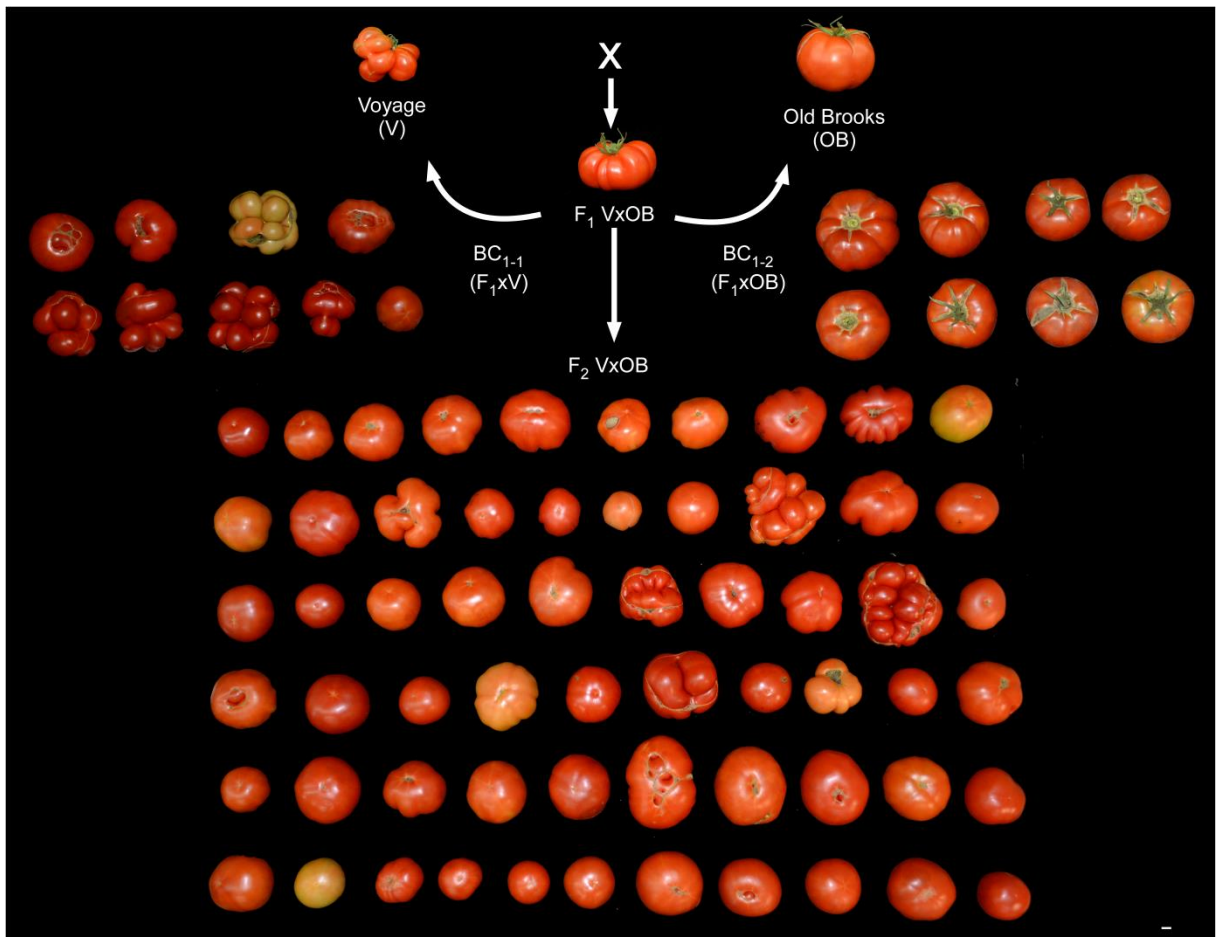


Figura IV-5: Frutos representativos de los cultivares progenitores “Voyage” (V) y “Old Brooks” (OB) y poblaciones derivadas de su cruzamiento, y esquema de obtención de las mismas. F_1 VxOB: híbrido; F_2 VxOB Vista de base de frutos representativos de la población F_2 VxOB, donde se observa la segregación para el carácter tipo de carpelos y grado de irregularidad BC_{1-1} : retrocruza ($F_1 \times V$), BC_{1-2} : Vista de base de frutos representativos de la retrocruza ($F_1 \times OB$), donde se observa la segregación para el carácter tipo de carpelos. La línea blanca horizontal representa la escala de 1cm.



Tabla IV-3: Valores medios y desvíos para los caracteres de forma de fruto en las seis generaciones básicas derivadas del cruzamiento entre “Voyage” y “Old Brooks”

	“Voyage”	“Old Brooks”	F ₁	F ₂	BC ₁₋₁	BC ₁₋₂
	media ± ee	media ± ee	media ± ee	media ± de	media ± de	media ± de
Peso	86,03 ± 14,32	114,65 ± 25,80	86,24 ± 1,04	81,84 ± 28,29	75,32 ± 19,43	102,89 ± 28,22
Número de lóculos	9,30 ± 0,42	5,00 ± 0,76	6,00 ± 0,25	6,85 ± 2,53	8,54 ± 1,90	5,49 ± 1,44
Diámetro (D)	6,60 ± 0,27	6,20 ± 0,60	6,23 ± 0,03	5,97 ± 0,81	6,20 ± 0,76	6,17 ± 0,68
Altura (h)	4,87 ± 0,42	5,32 ± 0,27	4,40 ± 0,01	4,32 ± 0,48	4,33 ± 0,50	4,72 ± 0,41
Índice de forma (h/D)	0,74 ± 0,04	0,87 ± 0,05	0,71 ± 0,01	0,73 ± 0,06	0,70 ± 0,05	0,77 ± 0,04
Perímetro	24,65 ± 2,07	20,64 ± 1,95	21,16 ± 0,37	20,12 ± 2,99	21,65 ± 3,37	20,42 ± 2,17
Área	26,58 ± 2,79	30,80 ± 5,54	30,87 ± 1,1	26,79 ± 5,98	25,85 ± 4,91	29,94 ± 6,24
Ancho máximo	6,43 ± 0,32	6,30 ± 0,63	6,53 ± 0,09	5,96 ± 0,70	6,11 ± 0,68	6,19 ± 0,67
Alto máximo	5,93 ± 0,37	6,06 ± 0,53	6,09 ± 0,18	5,70 ± 0,65	5,62 ± 0,54	6,03 ± 0,63
Grado de irregularidad	7,00 ± 0,33	1,29 ± 0,10	1,81 ± 0,07	2,36 ± 1,61	4,22 ± 2,14	1,38 ± 0,41

ee: error estándar, de: desvío estándar. BC₁₋₁: retrocruza entre F₁ x V. BC₁₋₂: retrocruza entre F₁ x OB.



El análisis basado en las seis generaciones básicas del cruzamiento “Voyage” x “Old Brooks”, arrojó que los valores A, B y C de la prueba de escala no difirieron significativamente de cero, lo que indica que el modelo aditivo-dominante explica adecuadamente las diferencias entre las medias y podemos aceptar que los efectos maternos o la interacción génica, no están involucrados en el control genético de los caracteres analizados en este cruzamiento (Tabla IV-4).

Se encontraron valores elevados de H^2 con valores aproximados de 96% para todos los caracteres, indicando un alto componente genético y baja influencia del componente ambiental en la variancia fenotípica. Debido al bajo número de individuos de las líneas parentales e híbrido, los valores de varianzas y heredabilidad se calcularon a partir de los datos de suma de cuadrados en relación a los grados de libertad. De esta forma se logró ponderar el valor de la varianza en función de la cantidad de individuos, sin embargo, esta metodología podría generar una sobreestimación de los valores de H^2 , siendo estos valores cercanos a 0,96 para todos los rasgos. La h^2 alcanzó valores altos, en un rango de valores entre 0,72-0,95. Esto indica que, dependiendo del carácter, entre un 5 y 28% de la variación observada se debe a un efecto ambiental o no heredable, y la mayor proporción de la variación se debe a los efectos aditivos o de los genes en esta población específica. Es destacable que el carácter grado de irregularidad presentó el valor más alto de h^2 , mientras que el carácter área mostró el menor valor. Remarcablemente, esto resultó opuesto a lo observado para la H^2 en la población F_2 VxOB analizada en la campaña del año 2 (Tabla IV-2).



Tabla IV-4: Parámetros A, B y C de la prueba de escala derivados de las relaciones entre los valores medios de P₁, P₂, F₁, F₂, BC₁₋₁ y BC₁₋₂. Componentes de la varianza genética, heredabilidad en sentido amplio (H²) y heredabilidad en sentido estricto (h²).

	A	B	C	V _F	V _G	V _A	H ² ± ee	h ²
Peso	4,90 ns	-21,63 ns	-45,79 ns	800,57	772,43	622,19	0,96 ± 0,02	0,78
Número de lóculos*	1,79 ns	-0,01 ns	1,11 ns	0,12	0,11	0,11	0,96 ± 0,02	0,92
Diámetro	-0,42 ns	-0,08 ns	-1,39 ns	0,65	0,63	0,53	0,96 ± 0,02	0,82
Altura	-0,28 ns	-0,61 ns	-1,73 ns	0,23	0,22	0,19	0,96 ± 0,02	0,80
Índice de forma	-0,03 ns	-0,04 ns	-0,10 ns	0,00	0,00	0,00	0,96 ± 0,02	0,93
Perímetro	-2,51 ns	-0,95 ns	-7,14 ns	8,96	8,63	7,51	0,96 ± 0,02	0,84
Área	-1,78 ns	-5,74 ns	-11,98 ns	35,75	34,47	25,91	0,96 ± 0,02	0,72
Ancho máximo	-0,74 ns	-0,45 ns	-1,95 ns	0,48	0,47	0,36	0,96 ± 0,02	0,75
Alto máximo	-0,08 ns	-0,77 ns	-1,37 ns	0,42	0,41	0,33	0,96 ± 0,02	0,77
Grado de irregularidad*	-0,37 ns	-0,33 ns	-2,47 ns	0,28	0,27	0,27	0,96 ± 0,02	0,95

*: Caracteres transformados por logaritmo natural (para cálculos de H² y h²). VF: variación fenotípica, VG: variancia genética, VA: variancia aditiva, ee: error estándar. ns: no significativo.



Identificación de QTL asociados al carácter grado de irregularidad mediante el enfoque de QTL-seq

Secuenciación y alineado de genomas

En la población F_2 VxOB se obtuvieron por secuenciación de genoma completo un total de 142.183.992 y 144.912.334 lecturas apareadas con una longitud de 151 pb para los grupos HLD y LLD, respectivamente. La mayoría de las lecturas se alinearon con el genoma consenso de tomate (99,43% en HLD y 99,49% en LLD). La calidad promedio de mapeo fue 32,52 y 32,40 en los grupos HLD y LLD respectivamente, lo que indica una precisión mayor a 99,90%. La profundidad de cobertura promedio luego del alineamiento fue igual a 26,52x en el grupo HLD y 27,01x en los grupos LLD. Este cálculo incluyó la profundidad de cobertura obtenida para el cromosoma 0, donde se ubican aquellas secuencias cuya posición en el genoma aún no ha sido resuelta, principalmente secuencias repetitivas. Considerando solamente la profundidad de cobertura obtenida para los 12 cromosomas de tomate, el promedio de cobertura descendió a 21,98x para HLD y 22,24x para LLD. La profundidad de cobertura y su correspondiente desvío estándar para los 12 cromosomas de tomate en cada grupo de ADN y el cromosoma 0, se representan en la Tabla suplementaria S3 y Figura suplementaria S2. Existen altos valores de desvíos estándar respecto a la media en todos los cromosomas (Tabla suplementaria S3). La mayor profundidad de cobertura se alcanzó en el cromosoma 9 en ambos grupos, mientras que los menores valores se encontraron en los cromosomas 6 para HLD y 7 para LLD. El porcentaje de cobertura del genoma considerando una profundidad de 4x fue 99,66% y 99,69% en los grupos HLD y LLD, respectivamente.

El alineado a la versión SL4.0 del genoma de referencia de tomate (*S. lycopersicum* cv Heinz 1706, liberación 2019), llamada de variantes y comparación genómica de los grupos reveló un total de 217.058 *SNP* y 214.972 *InDel* considerando el cromosoma 0, o bien 215.875 *SNP* y 211.747 *InDel*, distribuidos a lo largo de los 12 cromosomas que componen el genoma de tomate. La distribución de estos polimorfismos en los distintos cromosomas se representa en la Tabla IV-5. Se puede observar que la mayor cantidad de *SNP* se detectó en el cromosoma 4 y de *InDel* en el cromosoma 1. Por su parte, la menor cantidad de *SNP* e *InDel* se detectó en el cromosoma 7. El número de polimorfismos no se correlacionó con la longitud del cromosoma.

Considerando la población F_2 YSxH, por secuenciación de genoma se obtuvieron 139.626.546 y 151.813.138 lecturas apareadas de 151 pb, de las cuales fue posible alinear el 99,39% y 99,50%, con una calidad promedio (Q) de 31,55 y 31,70 para los grupos HLD y LLD, respectivamente. La profundidad de cobertura promedio obtenida luego del alineamiento fue igual a 25,82x y 28,07x en los grupos HLD y LLD, incluyendo el cromosoma 0, o bien 21,67x y 23,77x sin considerarlo. La profundidad de cobertura a lo largo de todo el genoma y sus correspondientes valores desvío estándar, para cada uno de los grupos, se representan en la Tabla suplementaria S3 y en forma gráfica en la Figura suplementaria S2. La mayor profundidad de cobertura se alcanzó en los cromosomas 12 y 2 en los grupos HLD y LLD, respectivamente; mientras que los cromosomas con menor cobertura fueron el 5 y el 7, en cada grupo. El porcentaje de cobertura del genoma



considerando una profundidad de 4x fue de 99,53% y 99,63% en los grupos HLD y LLD, respectivamente.

Los cromosomas 2, 12 y 9 se destacan por presentar valores de desvíos altos en los grupos HLD y LLD de ambas poblaciones. Esto indica regiones con coberturas muy altas y otras regiones con coberturas muy bajas, respecto de los valores medios.

Mediante alineamiento, llamada de variantes y la comparación de los grupos fue posible identificar un total de 235.935 *SNP* y 225.902 *InDel* distribuidos en todo el genoma, incluyendo el cromosoma 0; o bien 234.153 *SNP* y 222.874 *InDel* en los 12 cromosomas de tomate. En la Tabla IV-5. Se describe la cantidad de polimorfismos (*SNP* e *InDel*) distribuidos en los distintos cromosomas del genoma. Se puede observar que la mayor cantidad de *SNP* e *InDel* se alcanzaron en los cromosomas 11 y 1, respectivamente. Por el contrario el menor valor de *SNP* se halló en el cromosoma 6, y el cromosoma 7 presentó la menor cantidad de *InDel*. La cantidad de polimorfismos no guardó relación con la longitud del cromosoma.



Tabla IV-5: Cantidad de polimorfismos de tipo *SNP* e *InDel* identificados entre ambos *grupos* respecto de la secuencia de referencia (versiones SL4.0) por cromosoma (Cr) en las poblaciones F₂ VxOB y F₂ YSxH.

Cromosoma	F ₂ VxOB			F ₂ YSxH		
	<i>SNP</i>	<i>InDel</i>	Total	<i>SNP</i>	<i>InDel</i>	Total
SL4.0cr01	18.051	31.369	49.420	21.176	32.957	54.133
SL4.0cr02	13.656	13.879	27.535	16.427	14.978	31.405
SL4.0cr03	20.704	15.118	35.822	15.803	13.617	29.420
SL4.0cr04	26.130	23.628	49.758	25.529	23.630	49.159
SL4.0cr05	20.644	26.986	47.630	18.571	25.926	44.497
SL4.0cr06	12.409	14.679	27.088	7.544	12.862	20.406
SL4.0cr07	11.438	11.362	22.800	11.715	11.888	23.603
SL4.0cr08	13.961	13.396	27.357	12.238	13.078	25.316
SL4.0cr09	15.389	15.215	30.604	17.141	16.032	33.173
SL4.0cr10	24.213	18.972	43.185	14.805	16.187	30.992
SL4.0cr11	24.292	14.709	39.001	53.952	26.414	80.366
SL4.0cr12	14.988	12.434	27.422	19.252	15.305	34.557
Total	215.875	211.747	427.622	234.153	222.874	457.027

F₂ VxOB: población F₂ "Voyage" x "Old Brooks" (campaña n° 2), F₂ YSxH: población F₂ "Yellow Stuffer" x "Heinz 1439" (campaña n° 4).

Identificación de QTL asociados al carácter grado de irregularidad

La identificación de regiones genómicas asociadas al grado de irregularidad estuvo basada en los datos de *SNP* identificados en todo el genoma de ambas poblaciones. Del total de 215.875 *SNP* identificados en la población F₂ VxOB se eliminaron 101.532 *SNP* que presentaron frecuencia del alelo de referencia menor a 0,2 o mayor a 0,8 en ambos grupos, 6.959 *SNP* que tuvieron profundidad total de lectura de muestra de entre 20 y 75, 19 *SNP* que presentaron una profundidad de lectura individual menor a 5 y 30.638 *SNP* con calidad inferior a 99%. De este modo, se excluyeron del análisis un total de 139.148 polimorfismos y se conservaron 76.727 *SNP* en total, lo que constituye un 35,54 % de la cantidad inicial. En la población F₂ YSxH la cantidad inicial de *SNP* fue 234.153 y se filtraron 11.6047 *SNP* con frecuencia del alelo de referencia menor a 0,2 o mayor a 0,8 ambos grupos, 3.324 que tuvieron profundidad total de lectura de muestra de entre 4 y 76 y 2.962 *SNP* que presentaron una profundidad de lectura individual menor a 5 y 27.456 *SNP* con calidad inferior a 99%. De esta forma se removieron un total de 149.789 polimorfismos y se conservaron 84.364 *SNP* (36,03 %) para el análisis de *QTL-seq*. Si bien la cantidad de *SNP* disponibles se redujo notoriamente, la aplicación de filtros rigurosos permite incrementar la confiabilidad de los resultados obtenidos. La Figura IV-6 representa la cantidad de *SNP* que se conservaron en el análisis, a lo largo de los 12 cromosomas de tomate. Se observa que existen regiones con alta concentración de variantes, indicando que la secuencia de los grupos difiere ampliamente de la secuencia consenso de tomate, mientras que otras regiones, donde el genoma de ambos progenitores es igual a la referencia, la cantidad de *SNP* tiene valores cercanos a cero. Comparando la cantidad de *SNP* en ambas poblaciones (Figura IV-6 a y b) se observa que a pesar de existir regiones con alta densidad de *SNP* comunes entre ellas, la densidad de *SNP* no parece ser coincidente entre las poblaciones.



De acuerdo con el enfoque G' se identificaron cinco regiones genómicas con valores de G' superiores a 5 en la población F_2 VxOB, ubicadas en los cromosomas 4, 6, 8, 9 y 11 (Figura IV-7a, Tabla IV-6). Nótese, que la región del cromosoma 9 fue la de mayor longitud, abarcando casi todo el cromosoma, sin embargo dicha región presentó el menor valor de G' . La región del cromosoma 4, fue la de menor longitud y menor número de *SNP*, y sin embargo presentó el valor más alto de G' . Por su parte el pico más significativo de G' , tuvo lugar en el cromosoma 6.

En la población F_2 YSxH, se identificaron cinco regiones genómicas asociadas con el grado de irregularidad ubicadas en el cromosoma 8, según el enfoque G' (Figura IV-7b, Tabla IV-6). Remarcablemente, las regiones se mapearon en el área centromérica de este cromosoma, por lo que existe la posibilidad de que algunos *SNP* representen falsos positivos y dichas regiones formen parte del mismo *locus*. Más de la mitad de los *SNP* (69,6 %) se detectaron en el último *locus*, mientras que la primera región solo contuvo 3 *SNP*. El valor máximo de G' se alcanzó en el tercer *locus*, sin embargo el pico más significativo fue el del cuarto *locus*.

Es de destacar que se halló una región en el cromosoma 8 asociada con el grado de irregularidad en ambas poblaciones, indicando que dicho *locus* estaría conservado en el germoplasma de tomate.



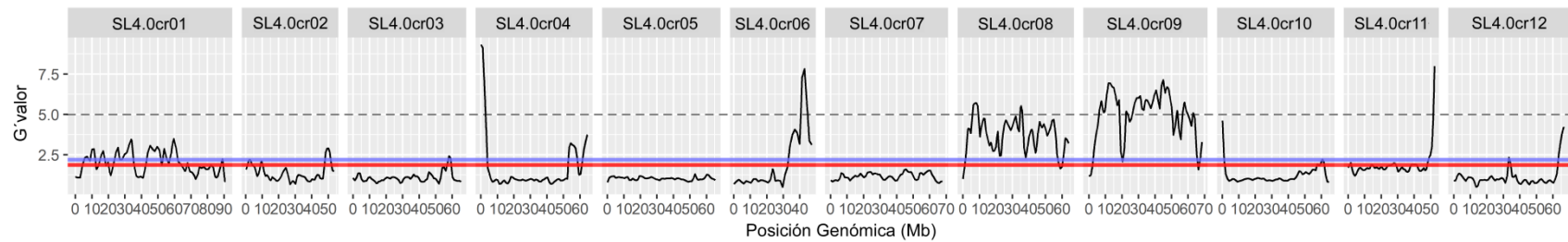
Tabla IV-6: Descripción regiones genómicas asociadas a grado de irregularidad identificados por *QTL-seq* en los diferentes cromosomas (versión del genoma SL 4.0). Se detalla longitud; número de SNP; valor, posición y significado de Δ (índice-SNP) y G' máximos.

Población	Cromosoma	Inicio (Mb)	Fin (Mb)	Longitud (Mb)	nSNP	pico Δ (índice-SNP)	Pos. pico Δ (índice-SNP)	Max. G'	Pos. max. G'	Qvalor
F ₂ VxOB	SL4.0ch04	0,11	4,06	3,95	583	-0,44	1,10	9,32	0,11	0,001
	SL4.0cr06	32,71	47,25	14,54	2515	0,39	42,83	7,82	42,83	0,000
	SL4.0cr08	1,16	58,22	57,05	1652	0,27	52,98	5,71	8,05	0,005
	SL4.0cr09	2,62	65,96	63,34	2140	0,37	44,90	7,14	44,90	0,003
	SL4.0cr11	47,93	52,29	4,36	679	0,12	51,46	7,98	52,29	0,006
F ₂ YSxH	SL4.0cr08	8,46	9,07	0,61	3	-0,27	8,46	6,02	8,46	0,029
	SL4.0cr08	10,73	14,94	4,21	27	-0,26	12,04	5,74	14,94	0,038
	SL4.0cr08	23,45	29,74	6,29	49	-0,34	29,16	8,31	24,95	0,020
	SL4.0cr08	34,99	43,11	8,12	51	-0,37	40,00	7,01	37,11	0,018
	SL4.0cr08	51,13	54,84	3,71	256	0,38	52,98	7,20	52,98	0,016

Población: Población F₂ derivada de cruzamiento entre cultivares de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cv “Voyage” x cv. “Old Brooks” (F₂ VxOB) y cv. “Yellow Stuffer” x cv. “Heinz 1439” (F₂ YSxH). Cromosoma: el cromosoma en el que se identificó una región asociada al grado de irregularidad. Inicio: la posición en megabases (Mb) del primer SNP que sobrepasó el umbral de FDR en ese cromosoma. Fin: la posición final expresada en Mb. Longitud: extensión de la región en Mb. nSNP: el número de SNP en la región. Pico Δ (índice-SNP): el valor máximo de Δ (índice-SNP) suavizado por tricubo en la región. Pos. pico Δ (índice-SNP): la posición del máximo valor absoluto de Δ (índice-SNP) suavizado por tricubo. Max. G': la puntuación máxima de G' en la región. Pos. max. G': la posición genómica del valor máximo de G' en el QTL. Qvalor: valor promedio de p-valor ajustado en la región.



a



b

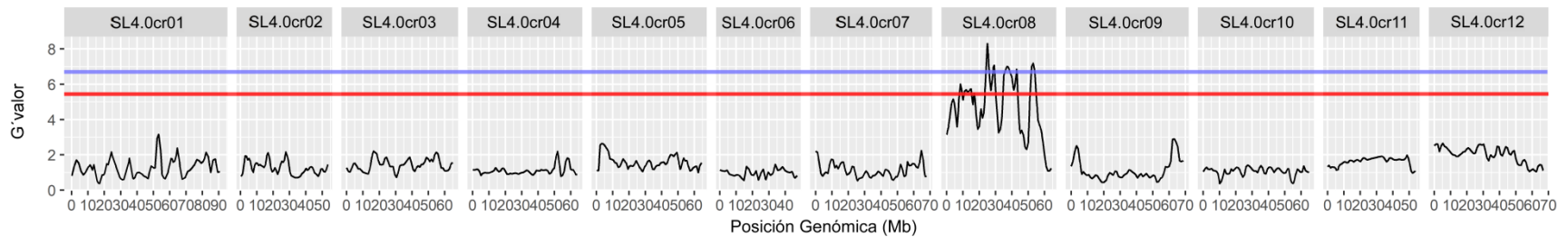


Figura IV-7: Regiones genómicas asociadas al grado de irregularidad a lo largo de los 12 cromosomas de tomate en las dos poblaciones F_2 analizadas. (a) F_2 “Voyage” x “Old Brooks” (b) F_2 “Yellow Stuffer” x Heinz 1439. La línea discontinua indica el valor G' de 5. El umbral de la tasa de descubrimiento falso (FDR) de Benjamini-Hochberg igual a 0,05 se indica con una línea roja y el umbral de 0,01 se indica en azul. SL4.0cr: cromosoma. Ventana deslizante = 2Mb.

CAPÍTULO IV- RESULTADOS



Otro aspecto que brinda información de relevancia es la direccionalidad de los valores de índice-*SNP* (Tabla IV-6). En este sentido, un valor positivo denota que el progenitor que contribuyó a las discrepancias entre los grupos es aquel que presenta el alelo alternativo; mientras que un valor negativo indicaría que los alelos provienen del padre de genotipo como la referencia. En tomate el genoma de referencia se basa en el cultivar “Heinz 1706”, que presenta frutos con forma externa regular. Teniendo esto en consideración, en nuestros datos podemos visualizar que en la población F_2 VxOB en la región del cromosoma 4, los alelos son aportados por el padre “Old Brooks”, mientras que en el resto de los *loci*, los alelos provienen del padre “Voyage”. Por su parte, en la población F_2 YSxH el progenitor “Heinz 1439”, estaría aportando los alelos que contribuyen a las diferencias en los tres primeros *loci*, mientras que en el último *locus* los alelos provendrían del padre “Yellow Stuffer”.



Caracterización molecular para confirmar los *QTLs* detectados en poblaciones segregantes completas

Se genotiparon 28 marcadores moleculares en las cinco regiones genómicas de interés de la población F_2 VxOB. De los 38 marcadores diseñados inicialmente, ocho resultaron monomórficos entre los progenitores y en dos casos los fragmentos no pudieron amplificarse. Todos los marcadores moleculares evaluados se ajustaron a la segregación esperada para un marcador codominante. En la Figura IV-8 se muestra un ejemplo de un gel de agarosa al 3% p/v, en el mismo es posible diferenciar el polimorfismo detectado en la generación F_2 por el marcador PTZ-12 luego de la amplificación mediante PCR.

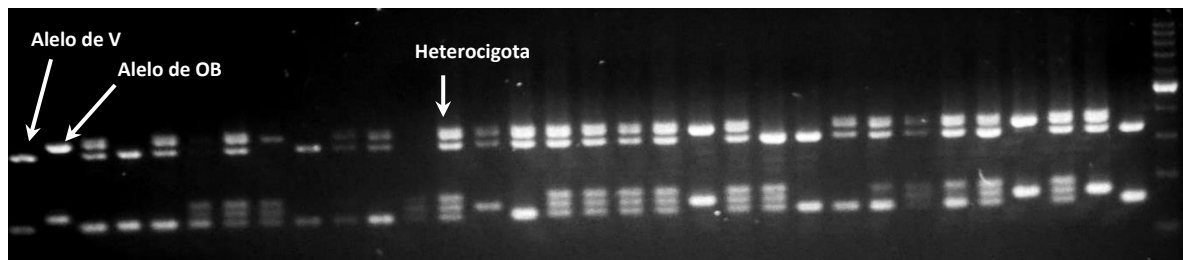


Figura IV-8: Resultado de los marcadores moleculares del cromosoma 6, INDEL PTZ-18 (arriba) e INDEL PTZ-12 (abajo) en la población F_2 “Voyage” x “Old Brooks”. Los marcadores fueron multiplexados en la misma reacción de PCR. Gel de agarosa 3%, revelado con Syber Safe. V: *S. lycopersicum* cv. “Voyage”, OB: *S. lycopersicum* cv. “Old Brooks”. pb: pares de bases.

En la población F_2 YSxH, del total inicial de 19 marcadores, cuatro resultaron monomórficos, dos pudieron amplificarse, en tres casos la diferencia entre bandas no pudo resolverse adecuadamente en geles de agarosa y el resto resultó heterocigota. Siete marcadores amplificaron fragmentos polimórficos de acuerdo a lo esperado, y segregaron como un marcador codominante.

Se avanzó utilizando los marcadores que amplificaron correctamente para la construcción de un mapa de ligamiento y validación de *QTL*.

Construcción del mapa de ligamiento

La construcción de un mapa de ligamiento se llevó a cabo en base a datos genotípicos de 72 individuos en la población F_2 VxOB y 120 individuos en la población F_2 YSxH.

Fue posible obtener un mapa de ligamiento genético del cromosoma 6 en la población F_2 VxOB. Se eliminaron los datos de cuatro individuos que presentaron datos faltantes para dos o más marcadores. Los 17 marcadores evaluados se agruparon en un mismo grupo de ligamiento. El orden de los marcadores se correspondió con el orden físico en el cromosoma. La longitud total del mapa obtenido fue igual a 127,8 cM con una distancia promedio de 7,5 cM entre los marcadores (Figura IV-9a) y una distancia máxima de 15,67 cM entre los marcadores PTZ-10 (32,25 Mb) y PTZ-27 (34,74 Mb).

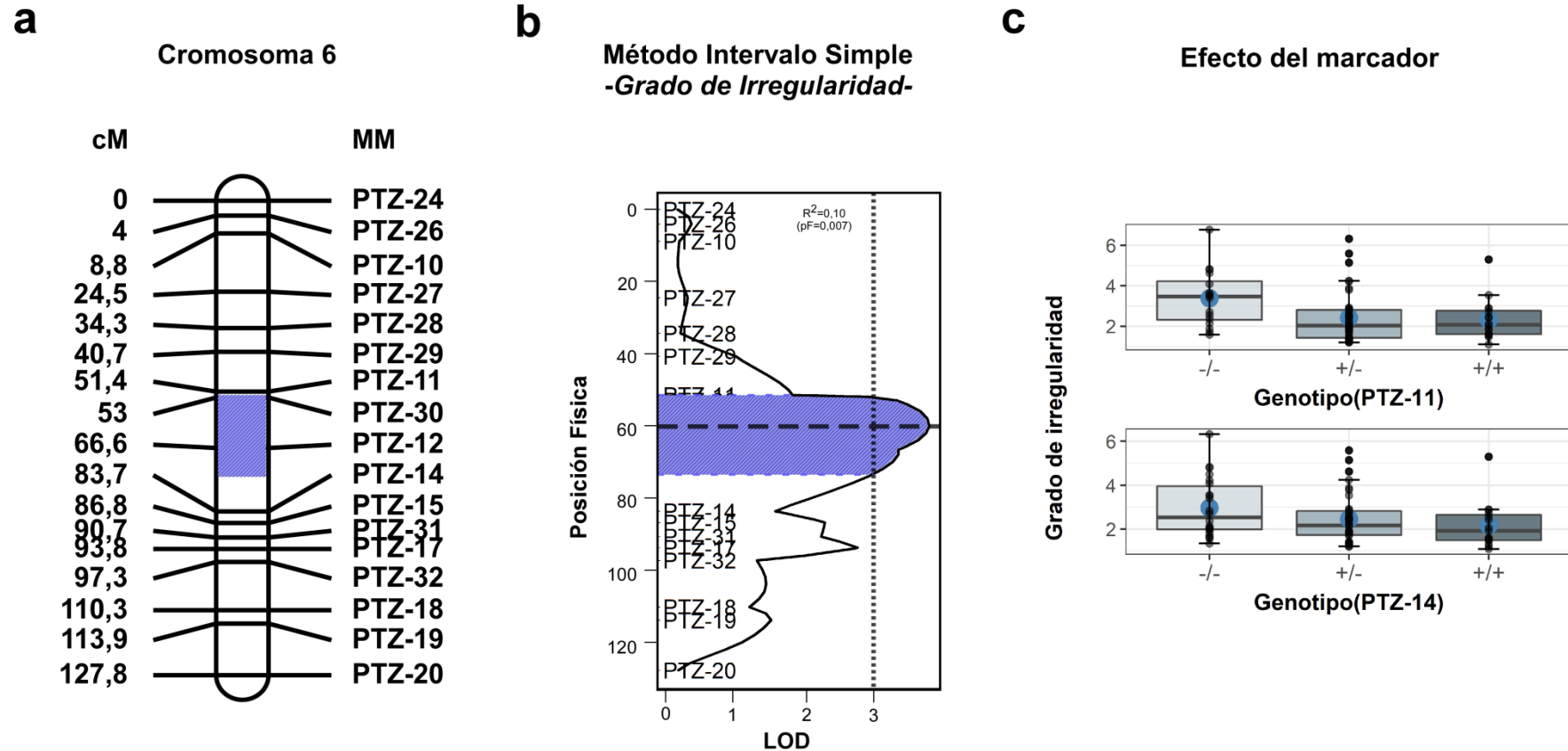
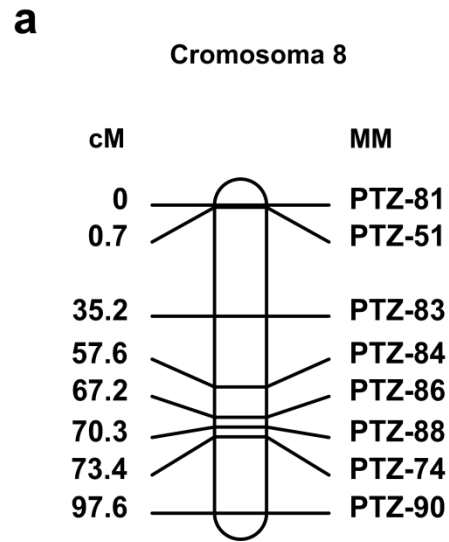


Figura IV-9: Validación de QTL asociados al grado de irregularidad en el cromosoma 6 para la población F_2 VxOB. (a) Mapa de ligamiento del cromosoma 6 para el grado de irregularidad en F_2 VxOB. (b) Logaritmo de las puntuaciones de probabilidades (LOD) a lo largo del cromosoma 6 en F_2 VxOB. cM: Centimorgan. MM: identificador del marcador molecular. Posición física expresada en megabases (Mb). La línea punteada señala el umbral de significancia. La línea discontinua indica la puntuación LOD máxima (3,73) en la posición de 62 cM. (c) *Box-plot* del valor del grado de irregularidad en relación al genotipo de los marcadores PTZ-11 y PTZ-14- en la F_2 VxOB. El punto azul más grande indica el valor medio del grado de irregularidad y los puntos negros corresponden a los genotipos imputados. Genotipo: -/- homocigoto mutante (alelos como padre irregular), +/- heterocigoto, +/+ homocigoto de tipo silvestre (alelos como padre regular). Las barras de error indican ± 1 error estándar.

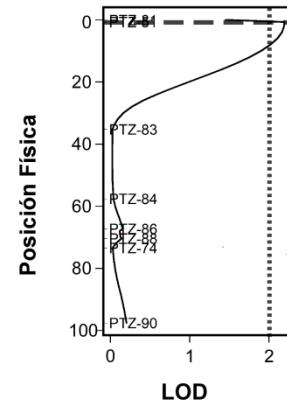


En la población F_2 VxOB también se mapearon 8 marcadores moleculares a lo largo del cromosoma 8. Existió correlación entre el orden genético y físico de los marcadores (Figura IV-10a). La longitud del mapa fue de 97,56 cM, con una distancia promedio entre marcadores de 12,19 cM y un espaciamiento máximo de 34,52 cM, en el extremo inicial del cromosoma, entre los marcadores PTZ-51 (0,96 Mb) y PTZ-83 (2,34 Mb).

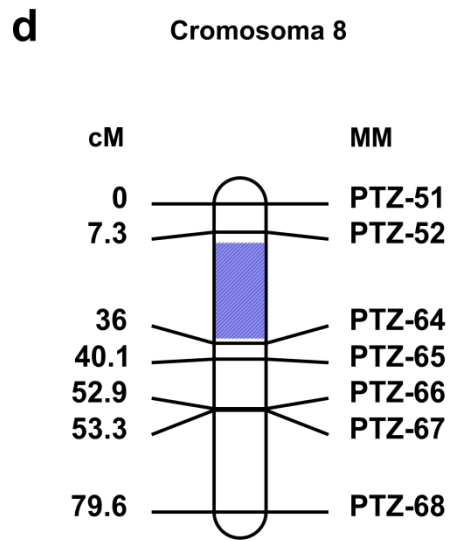
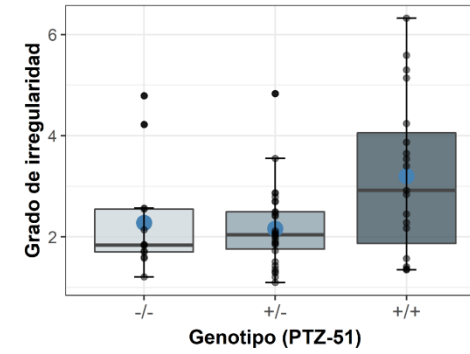
También fue posible obtener un mapa de ligamiento genético del cromosoma 8 en la población F_2 YSxH (Figura IV-10d). Se eliminó la información de dos individuos por presentar datos faltantes en dos o más marcadores. Se obtuvo un solo grupo de ligamiento con los siete marcadores mapeados. El orden genético se correspondió el orden físico de los marcadores. La longitud total del mapa obtenido fue igual a 79,56 cM, con una distancia promedio entre marcadores de 11,37 cM y un espaciamiento máximo de 28,7 cM, en la región centromérica, entre los marcadores PTZ-52 (1,72 Mb) y PTZ-64 (53,52 Mb).



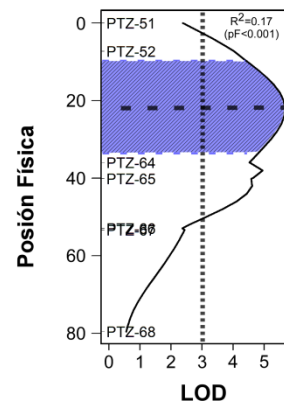
b Método Intervalo Simple
-Grado de Irregularidad-



c Efecto del marcador



e Método Intervalo Simple
-Grado de Irregularidad-



f Efecto del marcador

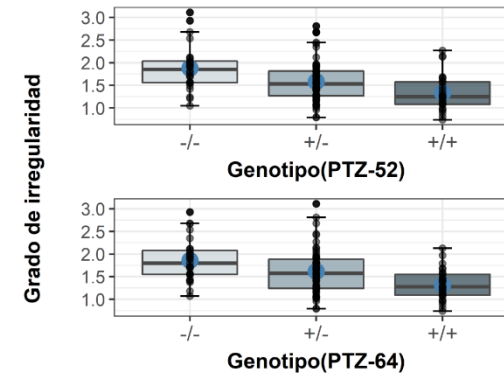




Figura IV-10: Validación de QTL asociados al grado de irregularidad en el cromosoma 8 para poblaciones F₂ VxOB y F₂ YSxH. (a) Mapa de ligamiento del cromosoma 8 para el grado de irregularidad en F₂ VxOB. (b) Logaritmo de las puntuaciones de probabilidades (LOD) a lo largo del cromosoma 8 en F₂ VxOB. cM: Centimorgan. MM: identificador del marcador molecular. Posición física expresada en megabases (Mb). La línea punteada señala el umbral de significancia. La línea discontinua indica la puntuación LOD máxima (2,2) en la posición de 0,69 cm. (c) *Box-plot* del valor del grado de irregularidad en relación al genotipo del marcador PTZ-51 en F₂ VxOB. El punto azul más grande indica el valor medio del grado de irregularidad y los puntos negros corresponden a los genotipos imputados. Genotipo: -/- homocigoto mutante (alelos como padre irregular), -/+ heterocigoto, +/+ homocigoto de tipo silvestre (alelos como padre regular). Las barras de error indican ± 1 error estándar. (d) Mapa de ligamiento del cromosoma 8 para el grado de irregularidad en F₂ YSxH. La región significativamente asociada con el grado de irregularidad se destaca con sombreado azul. (e) Puntuaciones LOD a lo largo del cromosoma 8 en F₂ YSxH. La línea punteada señala el umbral de significancia. La línea discontinua gris indica la puntuación LOD máxima (5,71) en la posición de 22 cm. (f) *Box-plot* del grado de irregularidad en relación al genotipo en el marcador PTZ-52 y PTZ-64 en la F₂ YSxH.



DetECCIÓN DE QTL

Mapeo de QTLs por Método de Intervalos Simples (SIM)

La detección de QTL se llevó a cabo en base a datos genotípicos y fenotípicos de 72 y 120 individuos en las poblaciones F_2 VxOB y F_2 YSxH, respectivamente.

Se consideraron significativas aquellas regiones genómicas con valores de LOD superiores a un valor de 3, indicando la presencia de un QTL. Aplicando SIM fue posible identificar un único QTL para el carácter grado de irregularidad externa en el cromosoma 6 de la población F_2 VxOB. El *locus* se ubicó entre los marcadores PTZ-11 y PTZ-14 y alcanzó un valor máximo de LOD igual a 3,73 en la posición 62 cM. Dicho *locus* abarcó una región de 12 cM, desde la posición 60 cM hasta 72 cM. El marcador molecular más cercano, PTZ-12 (40,98 Mb), se localizó a los 66,6 cM. Este marcador presentó un valor de R^2 de 0,10 ($pF= 0,009$), lo que indica que dicho marcador explica el 10% de la variación fenotípica presente para el carácter grado de irregularidad en la población analizada (Figura IV-9b). Por su parte tanto el marcador PTZ-11 como PTZ-14 mostraron una acción génica del tipo de dominancia, donde los alelos “Voyage” aumentaron el grado de irregularidad en forma recesiva (Figura 9c).

Considerando el enfoque SIM en el cromosoma 8 de la población F_2 VxOB, el marcador PTZ-51 (0,96 Mb) alcanzó un valor máximo de LOD igual a 2,2 para el grado de irregularidad externa (Figura IV-10b). El valor LOD fue significativo al 5 % pero por debajo del umbral de significación definido. Por lo tanto, el QTL en el cromosoma 8 no se validó en esta población. Los valores del grado de irregularidad para los alelos del marcador PTZ-51 (Figura IV-10c) mostraron el efecto contrario al fenotipo esperado según la morfología del fruto parental.

Sólo un QTL se asoció significativamente con el grado de irregularidad externa en la población F_2 YSxH, considerando un enfoque de SIM (Figura IV-10e). Este presentó un valor máximo de LOD igual a 5,71 en la posición 22 cM. El intervalo de significancia de este *locus* presentó una longitud de 24 cM, desde 10 cM hasta 34 cM. Sin embargo, el QTL se ubicó en la región centromérica del cromosoma, entre los marcadores moleculares PTZ-52 (1,72 Mb) y PTZ-64 (53,52 Mb). El *locus* explicó el 17% de la variación fenotípica observada para el grado de irregularidad en esta población. Además, ambos marcadores ligados significativamente mostraron una acción génica aditiva, donde los alelos “Yellow Stuffer” aumentaron el grado de irregularidad en forma recesiva (Figura IV-10f).

Análisis de marcador único (SPA)

Se caracterizaron un total de ocho marcadores para el SPA en la población F_2 VxOB, dos para cada una de las cuatro regiones de interés (cromosomas 4, 6, 9 y 11) y dos marcadores a lo largo del cromosoma 8 en la población F_2 YSxH (Tabla IV-1 y Tabla IV-7). Se excluyó del análisis la región del cromosoma 8 en la población F_2 VxOB, debido a que no fue validada por SIM. El marcador PTZ-102 resultó monomórfico y no se consideró en la evaluación. Tres QTL con efecto mayor ($\%R^2$ igual o superior al 15%) ubicados en los cromosomas 6 (PTZ-12 y PTZ-17) y 11 (PTZ-103), fueron validados para el grado de irregularidad en la población F_2 VxOB (Tabla IV-7). Mediante el SIM se observó que ambos



QTL del cromosoma 6 forman parte del mismo *locus* (en adelante llamado, *ld6*). El *locus* del cromosoma 11 (en adelante llamado, *ld11*) explicó el 46% de la varianza fenotípica observada para el grado de irregularidad, mientras que el *ld6*, representado por los marcadores PTZ-12 y PTZ-17 explicaron el 23% y 15% de la varianza, respectivamente.

Los *locus ld6* y *ld11*, estuvieron también asociados al carácter número de lóculos, y *ld11* a su vez se asoció significativamente con los caracteres de tamaño de fruto, peso perímetro y área.

Por otro lado, en la población F₂ YSxH los marcadores PTZ-51 y PTZ-65 se asociaron significativamente al grado de irregularidad. Dichos marcadores explicaron el 9% (PTZ-51) y el 17% (PTZ-65) de la varianza fenotípica presente para este carácter. Previamente se determinó por SIM que ambos marcadores forman parte del mismo *locus* (en adelante llamado, *ld8*). El marcador PTZ-51, también se asoció al carácter número de lóculos (p-valor = 0,02), explicando el 8% de la varianza fenotípica total.

La epistasis o interacción entre *ld6* y *ld11* fue significativa (p<0,05) para el carácter grado de irregularidad. Se consideró sólo el PTZ-12 en el análisis, debido a que fue el marcador más significativo de la región. Juntos, ambos marcadores explicaron el 61% de la variabilidad fenotípica del grado de irregularidad. Esto indica que ambos *loci* tienen un efecto sinérgico sobre el grado de irregularidad del fruto, donde la presencia de alelos “Voyage” conduce a un aumento de la irregularidad (Figura IV-11). Debido a la mayor significancia de *ld11* con respecto a *ld6*, el cambio de un alelo “Old Brooks” por un alelo “Voyage” en *ld6* no generó un gran cambio en el valor medio de ese rasgo, y solo individuos con el alelo “Voyage” en ambos *loci* (*ld6*^{+/+}: *ld11*^{+/+}) mostraron diferencias significativas (Figura IV-11b). Se detectaron interacciones *intra locus* dominantes tanto para *ld6* (valor de p = 0,05) como para *ld11* (valor de p = 0,04), y se encontró un efecto aditivo altamente significativo solo para *ld11* (valor de p <0,0001). Aunque no se detectó una interacción *interloci* significativa aplicando contraste ortogonal, el valor F de interacción aditivo por aditivo fue 2,80 (p = 0,09). Estos resultados respaldan que el QTL detectado en el cromosoma 11 tiene un efecto más fuerte sobre el carácter, mientras que el QTL en el cromosoma 6 actúa como un modificador con un efecto leve.

No se encontraron interacciones significativas entre *ld6* y *ld11* para el carácter número de lóculos, indicando que estas regiones están asociadas al mismo rasgo pero actúan independientemente.



Tabla IV-7: Validación de QTL por análisis de marcador único (SPA) para rasgos de forma de fruto en F₂ VxOB y F₂ YSxH

F ₂	ID	Chr	Pos (Mb)	Peso		Número de lóculos		Perímetro		Área		Área de Pericarpio		Espesor de Pericarpio		Grado de irregularidad	
				F	pvalor	F	pvalor	F	pvalor	F	pvalor	F	pvalor	F	pvalor	F	pvalor
	PTZ-93	4	0,97	0,58	0,56	0,85	0,43	0,19	0,83	0,23	0,80	0,28	0,76	0,92	0,40	1,07	0,35
	PTZ-97	4	62,53	0,30	0,74	0,14	0,87	0,82	0,45	0,94	0,40	0,97	0,39	2,74	0,07	0,33	0,72
	PTZ-12	6	40,98	1,30	0,28	4,24	0,02	0,92	0,40	0,44	0,65	0,05	0,95	1,39	0,25	10,88	0,0001
1	PTZ-17	6	0,96	1,75	0,18	1,94	0,15	2,30	0,11	1,14	0,32	0,78	0,46	0,15	0,86	6,35	0,0029
	PTZ-99	9	12,78	1,37	0,26	0,07	0,94	1,84	0,17	2,02	0,14	0,98	0,38	1,94	0,15	0,37	0,69
	PTZ-101	9	65,08	1,16	0,32	0,62	0,54	0,72	0,49	0,80	0,45	0,43	0,65	2,27	0,11	0,27	0,77
	PTZ-103	11	53,26	13,62	<0,0001	139,32	<0,0001	18,15	<0,0001	11,65	<0,0001	2,55	0,09	0,16	0,85	30,39	<0,0001
2	PTZ-51	8	1,72	0,84	0,48	3,45	0,02	0,60	0,62	0,69	0,56	1,89	0,14	0,48	0,69	3,77	0,0126
	PTZ-65	8	53,52	0,20	0,89	0,97	0,41	0,31	0,82	0,30	0,83	0,93	0,43	0,84	0,48	8,15	0,0001

F₂: población 1 (F₂ VxOB) y 2 (F₂ YSxH), ID: identificador del marcador molecular, Chr: cromosoma, Posición: Posición física correspondiente al genoma de referencia del tomate versión SL4.0; El valor F y el valor p corresponden a la prueba ANOVA. Unidades: peso (g), perímetro (cm), área (cm²).

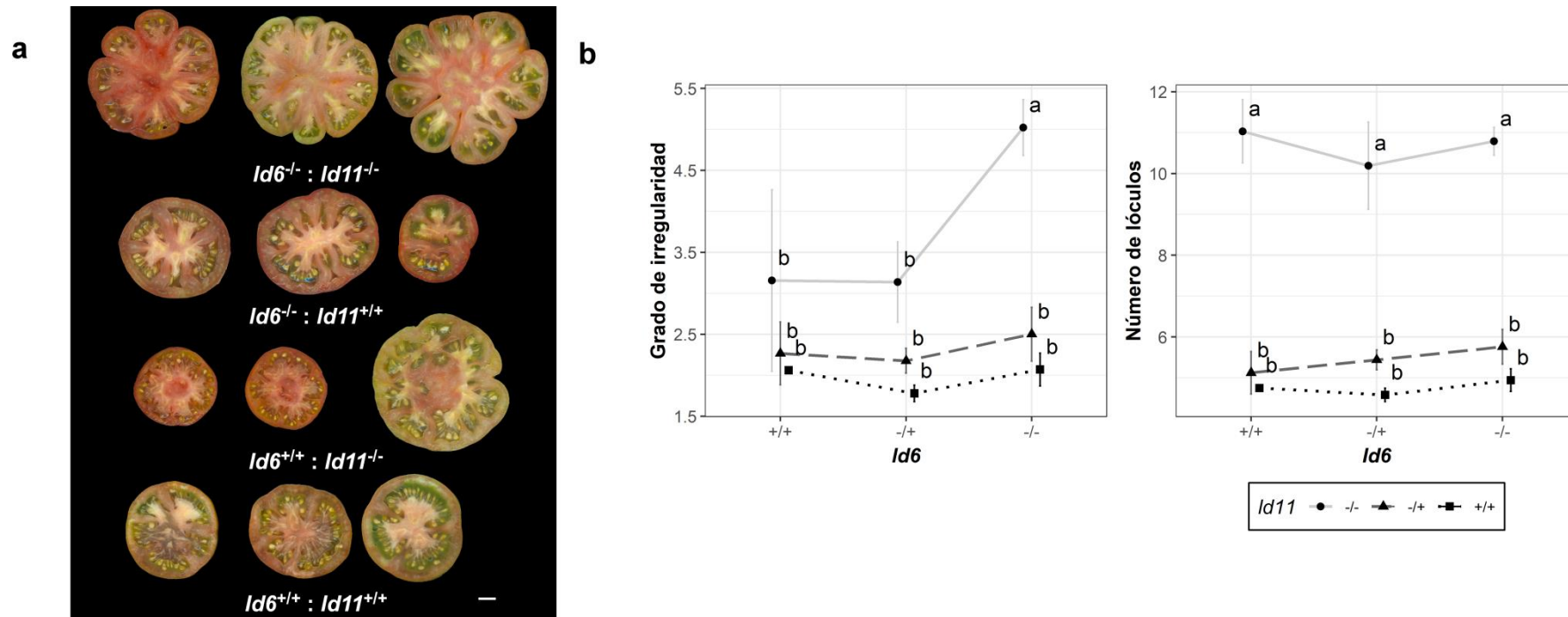


Figura IV-11: Efectos de la interacción entre los loci *Id6* y *Id11* sobre el grado de irregularidad y número de lóculos en la población F₂ VxOB. (a) Imágenes de cortes e frutos en dirección medio-lateral representativas de las combinaciones de alelos de los loci *Id6* y *Id11*. La línea blanca horizontal representa la escala de 1 cm. (b) Gráfico de interacción fenotipo x genotipo para el grado de irregularidad (izquierda) y número de lóculos (derecha). Genotipos: -/- genotipo homocigoto mutante, +/- genotipo heterocigoto, +/+ genotipo homocigoto de tipo silvestre. Los puntos representan el valor medio del genotipo y las barras de error mostraron ± 1 desviación estándar.



DISCUSIÓN

En este capítulo, donde se analizaron las segregaciones fenotípicas para caracteres cuantitativos de forma en poblaciones segregantes, todos los caracteres exhibieron heredabilidad altamente significativa, con valores intermedios a altos, excepto el área de pericarpio que presentó valores bajos en ambas poblaciones. El carácter número de lóculos mostró el mayor valor de heredabilidad en la población F_2 VxOB, mientras que este valor resultó intermedio en la población F_2 YSxH. Por su parte, el grado de irregularidad mostró valores intermedios en ambas poblaciones, siendo mayor en F_2 VxOB. Las diferencias observadas entre las poblaciones segregantes puede deberse a una menor diferencia fenotípica entre los cultivares progenitores de la población F_2 YSxH para estos caracteres y a la segregación de menor cantidad de *loci* controlando el carácter. Previamente se ha observado que existe una correlación positiva entre las distancias fenotípicas parentales y las estimaciones de la variación genética dentro de las poblaciones segregantes, cuando los efectos alélicos en los *loci* son consistentes dentro de un padre y distintos en el otro progenitor (Hung et al., 2012). Sin embargo, considerando el análisis de las seis generaciones básicas derivadas del cruzamiento entre VxOB, el mayor valor de heredabilidad en sentido estricto (h^2) correspondió al carácter grado de irregularidad, lo que indica que la mayor parte de la variación fenotípica es explicada por el componente genético, principalmente aditivo. Por su parte, este análisis arrojó valores de heredabilidad en sentido amplio (H^2) ~96% para todos los rasgos analizados. Una sobreestimación de estos parámetros puede deberse al reducido tamaño de las poblaciones, y a una elevada proporción de *loci* en estado heterocigoto (Cambiaso et al., 2019a). Por su parte, también se observó una sobre estimación de la variancias aditivas y de la dominancia en presencia de epistasis, consistentemente con lo encontrado por Kearsey et al. (2003).

Los caracteres número de lóculos y grado de irregularidad se correlacionaron positivamente en ambas poblaciones segregantes, sin embargo la correlación fenotípica resultó mayor en la población F_2 VxOB. Los rasgos morfométricos de tamaño y el peso de fruto, mostraron una correlación significativa positiva principalmente con el carácter número de lóculos y en menor medida con el grado de irregularidad. Estos resultados coinciden con lo observado en Gonzalo et al. (2009). Notablemente, otro estudio mostró que los rasgos de la sección medio-lateral relacionados con el pericarpio, incluyendo el grado de irregularidad, estuvieron claramente separados de los relacionados con la forma y tamaño de fruto (Nankar et al., 2020), mientras que el número de lóculos se asoció positivamente al grado de fasciación y tamaño de fruto.

La calidad y coberturas obtenidas por secuenciación resultaron similares en ambas poblaciones y acorde a los estándares de calidad de tomate (Cambiaso et al., 2019b; Gao et al., 2019; The 100 Tomato Genome Sequencing Consortium, 2014). La cantidad de polimorfismos encontrados entre ambos grupos respecto al genoma de referencia fueron mucho menores que los valores encontrados en un trabajo similar realizado por Cambiaso et al. (2019b) (1.081.626 *SNP* y 315.892 *InDel*). Esto podría explicarse ya que dicho estudio abarca la comparación del genoma de una especie cultivada y una especie silvestre alineadas respecto a la secuencia de referencia, mientras que en el presente análisis constituye una comparación de los extremos fenotípicos en una población segregante



derivada del cruzamiento de dos cultivares. Siendo esperable que las diferencias genómicas sean mayores entre especies más distanciadas genéticamente. Sin embargo la cantidad de polimorfismos detectados puede variar ampliamente de acuerdo a las metodologías utilizadas y materiales analizados (Causse et al., 2013; Jung et al., 2016; Yang et al., 2014).

Debido a que el grado de irregularidad es un rasgo poco estudiado que influye en la preferencia del consumidor, y la calidad del fruto, el trabajo se centró en esta característica para la identificación de regiones genómicas subyacentes. Se desarrollaron dos poblaciones intraespecíficas a partir de cruzamientos independientes entre cultivares de tomate con valores contrastantes para la irregularidad de frutos y la misma composición alélica para los principales genes de forma: “Voyage” x “Old Brooks” (F_2 VxOB) y “Yellow Stuffer” x “Heinz 1439” (F_2 YSxH). Mediante un enfoque de *QTL-seq*, se identificó un *locus* en cromosoma 8 (*ld8*) que se asoció con el grado de irregularidad en ambas poblaciones. Esta región fue validada en la población F_2 YSxH mediante análisis de intervalos simples, donde *ld8* actuó como un *QTL* mayor para el grado de irregularidad, explicando ~17% de la variabilidad total. Este resultado es consistente con los publicados por van der Knaap y Tanksley (2003), quienes encontraron dos *QTL* en la parte superior del cromosoma 8 vinculados a la irregularidad de fruto, y postularon que uno de estos *QTL* es *fs8.1* que posee acciones pleiotrópicas. Sin embargo, *ld8* constituye un nuevo *QTL*, ya que ambos progenitores portan los alelos de tipo salvaje en *fs8.1*, por lo que el *locus* no segrega en esta población (van der Knaap, comunicación personal). Por otro lado, ningún marcador en el cromosoma 8 se asoció significativamente con el grado de irregularidad en la población F_2 VxOB. Sólo el marcador PTZ-51 alcanzó un valor de LOD significativo al 5%, pero no superó el umbral de significancia definido, y el aumento en el grado de irregularidad controlado por PTZ-51 fue atribuible al alelo de “Heinz 1439”, lo que sugiere la presencia de genes que actúan como reguladores negativos en la región. En conjunto, estos resultados indican que diferentes alelos estuvieron presentes en ambas poblaciones para los *loci* que controlan el carácter.

Se encontraron dos *QTL* adicionales en los cromosomas 6 y 11 con un efecto significativo para el grado de irregularidad en la población F_2 VxOB mediante *QTL-seq*, y se validaron por análisis de punto único. Los *loci* *ld6* (PTZ-12) y *ld11* (PTZ-103) mostraron epistasis y juntos explicaron más del 60% de la variación fenotípica. Se han encontrado interacciones epistáticas significativas entre los rasgos de forma en muchos estudios previos. Entre ellos, es posible nombrar la interacción epistática entre *SUN*, *OVATE* y *FS8.1* (Wu et al., 2015), *LC* y *FAS* (Muños et al., 2011; Tanksley, 2004) o *fs2.1* y *fs8.1* (Green et al., 2016). En contraste con esto, considerando los resultados del análisis de contrastes ortogonales y del test de escala, indican que los efectos maternos o la interacción génica no estarían involucrados en el control genético del carácter grado de irregularidad en la población analizada. Sin embargo, tampoco es correcto decir que tales factores no existen, sino que probablemente debido a un tamaño reducido del experimento no se evidencian dichos efectos. Esto crea un dilema ya que un experimento muy pequeño invariablemente no detectará ninguna desviación de un modelo lineal, mientras que un experimento muy grande puede ser demasiado sensible y detectar todo tipo de desviaciones (Kearsey y Pooni, 1996). Debido a que en genética estadística la epistasis es un subproducto del modelo aditivo, su efecto rara vez es significativo, excepto cuando se utilizan diseños específicos (Kearsey et al. 2003). El *locus* *ld11* exhibió mayor efecto que *ld6*, y solo los



individuos con los alelos “Voyage” en ambos *loci* ($Id6^{-/-}:Id11^{-/-}$) presentaron diferencias significativas. El término epistasis se ha utilizado para describir el efecto de enmascaramiento de un alelo en un *locus* sobre un alelo en otro *locus* (Bateson, 1909). Así, estos resultados y antecedentes sugieren que los determinantes genéticos del grado de irregularidad están presentes en la parte inferior del cromosoma 11, y el efecto más fuerte de *Id11* podría estar enmascarando el efecto *Id6*, lo que explica que no se encontraron interacciones *interloci* significativas mediante el contraste ortogonal y test de escala.

El efecto de *FAS* se debe a una pérdida parcial de la función causada por una inversión que interrumpe el promotor del tomate *CLV3* (*SICLV3*) (Huang y van der Knaap, 2011; Xu et al., 2015), lo que resulta en un aumento del número de lóculos y, por lo tanto, del tamaño del fruto. *FAS* mapea cerca de *Id11*, que estaba ubicado en la posición 53.3 Mb. Aquí se demuestra que el número de lóculos y el grado de irregularidad son rasgos correlacionados, lo que podría sugerir un efecto pleiotrópico del alelo *Id11* en ambos rasgos. Esto concuerda con las publicaciones que describen que el gen *FAS* aumenta el número de lóculos y la forma fasciada (Chu et al., 2019). Un estudio más reciente demostró que la edición del genoma del elemento regulador *cis* de *SICLV3* por CRISPR/Cas9 creó nuevos alelos que mostraban una variación continua para el número de lóculos en frutos de tomate (Rodríguez-Leal et al., 2017). En base a estas consideraciones, se postula que *Id11* es un nuevo alelo del gen *FAS* o un *QTL* estrechamente ligado. Sin embargo, todos estos estudios se centran principalmente en el número de lóculos, la ramificación de las inflorescencias y el tamaño del fruto, por lo que la caracterización de su impacto en el grado de irregularidad constituye una perspectiva novedosa. Además, el gen *CELL SIZE REGULATOR* (*CSR*, Solyc11g071940), que subyace en el *locus* *fw11.3*, se mapeó finamente en esta región y se demostró que genera un aumento del peso del fruto a través de la ampliación de las áreas del pericarpio al aumentar el tamaño de la célula (Mu et al., 2017). Sin embargo, no hay evidencia de que este gen afecte la forma del fruto (Roohanitaziani et al., 2020).

Se han mapeado dos *QTL* menores en la región centromérica del cromosoma 6, uno para la forma alargada del fruto y el otro para el tamaño del fruto (van der Knaap y Tanksley, 2003). Sin embargo, no se sabe que estas regiones tengan efectos importantes sobre el grado de irregularidad o la forma del fruto en la dirección medio-lateral. Otro estudio identificó un *QTL* menor para el número de lóculos en la base del cromosoma 6 en una población, y se postuló como un modificador de la mutación *FAS* (Illa-Berenguer et al., 2015). A pesar de este *QTL* mapea cerca de *Id6*, en el presente trabajo no se encontraron interacciones significativas entre los *loci* de los cromosomas 6 y 11 para el carácter, indicando que no existen relaciones epistáticas entre ellos y que distintas regiones estarían controlando los caracteres grado de irregularidad y número de lóculos. Experimentos adicionales serán necesarios para confirmar el efecto de *Id11* y *Id6*.

La precisión de la identificación de los *QTL* depende en gran medida del tamaño de la población, y elegir un tamaño de población es un compromiso entre lo teóricamente deseable y lo factible en la práctica. El tamaño de la población dependerá del tipo de herencia del rasgo, antecedentes genéticos, tipo de población de mapeo, enfoque de mapeo de *QTL*, etc. En tomate, algunos *QTL* con efectos importantes se mapearon en poblaciones pequeñas y para la mayoría de ellos el gen que controla el rasgo se identificó mediante clonación posicional (Adhikari et al., 2020; Celik et al., 2017; Liu et al., 2002; Rodríguez et



al., 2013; The Tomato Genome Consortium, 2012; E. van der Knaap et al., 2004). En vista de los resultados previos, y dado que era esperable que el grado de irregularidad estuviese controlado por uno o pocos *QTL*, un tamaño poblacional de ~100 individuos resultó válido para el mapeo de *QTL* en las poblaciones analizadas.

Otra restricción para la detección de *QTL* ocurre cuando un alelo es recesivo. En este trabajo se demostró que los alelos de forma regular son dominantes sobre los alelos de forma irregular, por lo que individuos heterocigotos han sido incluidos durante la conformación de los grupos de ADN de forma regular. En este estudio, los alelos de “Heinz 1439” en *Id8* (Figura IV-10) y los alelos de Old Brooks en *Id6* y *Id11* (Figura IV-9 y Figura IV-11) son dominantes sobre los alelos de “Yellow Stuffer” y “Voyage”, respectivamente. Por lo tanto, la frecuencia alélica en el grupo de baja irregularidad fue menor que el promedio, y la diferencia entre las frecuencias de las variantes alélicas en los dos grupos se redujo. Aunque esto podría disminuir la viabilidad de detectar variantes subyacentes al grado de irregularidad (García et al., 2016), el efecto importante de estos *QTL* pudo resolver esta restricción.

Es remarcable que por medio de un enfoque de *QTL-seq* se identificó una región del cromosoma 6 asociado también al carácter tipo de carpelos en la población F_2 “Voyage” x “Old Brooks”. Sin embargo, no se encontró efecto significativo del cromosoma 11 sobre este carácter. Mediante un análisis molecular y prueba de asociación Chi-Cuadrado, y considerando el carácter tipo de carpelos (fusionado/no fusionado) como un marcador fenotípico dominante, el *locus Id6* exhibió el mayor valor de significancia, indicando que los determinantes genéticos de este carácter se encuentran en la base del cromosoma 6. Esto resulta contrario a otro trabajo que indica que un alelo mutante de *FAS* está controlado la presencia de carpelos no fusionados. Más estudios serán necesarios para determinar si los fenotipos carpelos no fusionados y mayor grado de irregularidad son causados por mutaciones en el mismo gen o en dos genes estrechamente ligados.

Finalmente, es destacable que el *locus Id6*, que controla el grado de irregularidad, se encontró asociado también al carácter tipo de carpelo (carácter cualitativo desarrollado en el Capítulo III), donde el genotipo homocigota mutante (o “Voyage”) determinó carpelos no fusionados y mayor valor de irregularidad. En un trabajo previo, realizado sobre la población F_2 VxOB, se encontró una elevada correspondencia entre los caracteres grado de irregularidad y tipo de carpelos, por lo que ambos caracteres podrían estar controlados por el mismo gen o genes estrechamente relacionados (Vázquez, 2019). Esto podría indicar que dicho *locus* presenta un efecto pleiotrópico sobre ambos caracteres.



CONCLUSIONES PARCIALES

- Se observó heredabilidad en sentido amplio significativa y elevada o moderada para todos los caracteres morfológicos analizados en la dirección medio-lateral, a excepción del carácter área de pericarpio. Mediante el análisis de las seis generaciones básicas derivadas del cruzamiento entre “Voyage” x “Old Brooks” se determinó que el modelo aditivo-dominante explica adecuadamente las diferencias entre las medias. Por otro lado, los valores de heredabilidad en sentido estricto resultaron significativos, y moderados a altos, en todos los caracteres analizados.
- Se identificaron tres nuevos *QTL* para el grado de irregularidad localizados en los cromosomas 6, 8 y 11 (*Id6*, *Id8* y *Id11*, respectivamente). Todos los *QTL* mostraron un efecto importante sobre el grado de irregularidad, pero diferentes *QTL* estuvieron presentes en las distintas poblaciones analizadas.
- Los *loci Id6* y *Id11* resultaron epistáticos de acuerdo al análisis de ANOVA bidireccional. El locus *Id11* presentó un efecto significativo mayor sobre el grado de irregularidad, mientras que *Id6* parece actuar como un modificador sobre el carácter.



CONSIDERACIONES FINALES

El estudio y caracterización de la diversidad para caracteres de morfología de fruto en el plano medio-lateral en el germoplasma de tomate reveló que la gran variabilidad presente para estos rasgos se debe a la componente genética, demostrando que la manipulación de las condiciones ambientales del cultivo tendrá baja influencia en el fenotipo y la relevancia del mejoramiento genético sobre estos caracteres. Numerosos antecedentes exponen que la gran variabilidad existente para la forma de fruto en tomate es explicada por el efecto de unos pocos genes. Sin embargo, dichos trabajos se han enfocado en el estudio de la morfología de fruto en la dirección proximal-distal, y el efecto de estos genes en la dirección medio-lateral continúa siendo poco claro. En este trabajo, se evidenció la presencia de materiales genéticos con la misma constitución génica pero morfología de fruto discrepante. Se observó que la constitución alélica para los genes *LC* y *FAS* en el germoplasma de tomate se correlacionó principalmente con los caracteres de tamaño de fruto y número de lóculos y en menor nivel con el grado de irregularidad, lo que sugiere la presencia de genes no conocidos en la determinación de este rasgo.

Se seleccionaron cuatro cultivares de tomate llamados: “Voyage”, “Old Brooks”, “Yellow Stuffer” y “Heinz 1439”, y se dirigieron dos cruzamientos intraespecíficos, segregantes para caracteres de morfología de frutos donde el efecto de los alelos conocidos de forma se encontró fijo. El carácter grado de irregularidad exhibió el mayor valor de heredabilidad entre los materiales, lo que indica que uno o pocos genes con efecto mayor controlarían este rasgo. Por otro lado el cultivar “Voyage” mostró flores con gineceo apocárpico y numerosos órganos en sus verticilos, y frutos multi-loculares, de forma fasciada y carpelos no fusionados o compuestos. Se observó un tipo de herencia monogénica o digénica para el tipo de carpelo en las distintas campañas agrícolas analizadas. Si bien el tipo de herencia no resultó consistente, el fenotipo no fusionado resultó recesivo en todos los casos. Se encontró una elevada correspondencia entre los caracteres grado de irregularidad y tipo de carpelos, por lo que ambos caracteres podrían estar controlados por el mismo gen o genes estrechamente relacionados.

Mediante el enfoque de *QTL-seq* en las poblaciones F_2 “Voyage” x “Old Brooks” y F_2 “Yellow Stuffer” x “Heinz 1439”, se identificaron y mapearon tres nuevos *QTL* asociados al grado de irregularidad, en los cromosomas 6, 8 y 11 (*ld6*, *ld8* y *ld11*, respectivamente). Todos los *QTL* mostraron un efecto importante dicho rasgo, pero diferentes *loci* estuvieron segregando en las poblaciones analizadas. Así, *ld8* estuvo presente en la población F_2 YSxH donde explicó más del 17% de la variabilidad presente para el grado de irregularidad. Por otro lado *ld6* y *ld11* fueron mapeados en la población F_2 VxOB, mostrando una interacción epistática y juntos explicaron más del 60% de la variabilidad para el grado de irregularidad. A pesar de que la mutación en el gen *FAS* determina un mayor número de lóculos, frutos más grandes, con forma achatada y fasciada e irregular, el efecto de este gen se encuentra fijo en la población F_2 VxOB. Los reportes y comparaciones con otros estudios indicarían que tampoco se trataría del gen *CSR*. De este modo, los resultados informados en este trabajo de tesis constituyen un hallazgo novedoso. Otros trabajos mapearon *QTL* menores en la región centromérica del cromosoma 6 asociados a forma alargada del fruto,



tamaño del fruto y número de lóculos. Este último postuló que dicha región actuaría como un modificador de la mutación *FAS*. A pesar de esto, no se ha demostrado que este *locus* tengan efectos importantes sobre el grado de irregularidad o la forma de la fruto en la dirección medio-lateral. En base a estas consideraciones, y dado que el *locus Id11* presentó un efecto más fuerte sobre el carácter grado de irregularidad, se postula que *Id11* constituye un nuevo alelo del gen *FAS* o un *QTL* estrechamente ligado, mientras que *Id6* parece actuar como un modificador sobre el carácter.

Es remarcable que por medio de un enfoque de *QTL-seq* se identificó una región del cromosoma 6 asociado también al carácter tipo de carpelos en la población F_2 "Voyage" x "Old Brooks". Sin embargo, no se encontró efecto significativo del cromosoma 11 sobre este carácter. Por análisis molecular y considerando el carácter tipo de carpelos (fusionado/no fusionado) como un marcador fenotípico dominante, el *locus Id6* exhibió el mayor valor de significancia, indicando que los determinantes genéticos de este carácter se encuentran en la base del cromosoma 6. Esto resulta contrario a otro trabajo que indica que un alelo mutante de *FAS* está controlado la presencia de carpelos no fusionados. Más estudios son necesarios para determinar si los fenotipos carpelos no fusionado y mayor grado de irregularidad son causados por mutaciones en el mismo gen o en dos genes estrechamente ligados.

En definitiva, este trabajo de tesis aporta nuevos conocimientos sobre las bases genéticas de la forma de fruto en tomate en la dirección medio-lateral. Este estudio original fue capaz de identificar y mapear las regiones genómicas que controlan los caracteres grado de irregularidad y tipo de carpelos. Investigaciones adicionales sobre estos *QTL*, especialmente en términos de la introgresión de *QTL* en un fondo genético de élite, pueden ser útiles para ayudar al mejoramiento dirigido a morfología de fruto y obtener nuevos cultivares con morfologías más uniformes, o en forma opuesta frutos con formas atípicas destinadas a nichos de mercado especiales.



CONCLUSIÓN FINAL

A partir de dos cruzamientos entre cultivares fenotípicamente discrepantes para la morfología del fruto en la dirección medio-lateral, cuyos genotipos parentales presentaban idéntica constitución génica para *FAS* y *LC*, fue posible identificar nuevas regiones genómicas que controlan caracteres de morfología del fruto. En la población F_2 “Voyage” x “Old Brooks”, la base del cromosoma 6 se encontró asociada al carácter tipo de carpelo de herencia mono o digénica. Por otro lado, se identificó un *QTL* en el cromosoma 8 (*Id8*) con efecto mayor sobre el carácter cuantitativo grado de irregularidad en la población F_2 “Yellow Stuffer” x “Heinz 1439”. Mientras que otros dos *QTL* subyacentes a este carácter se encontraron en la población F_2 “Voyage” x “Old Brooks” en los cromosomas 6 (*Id6*) y 11 (*Id11*), los cuales mostraron interacción epistática.



BIBLIOGRAFÍA

- Abe, A., Kosugi, S., Yoshida, K., Natsume, S., Takagi, H., Kanzaki, H., Matsumura, H., Yoshida, K., Mitsuoka, C., Tamiru, M., Innan, H., Cano, L., Kamoun, S., y Terauchi, R. (2012). Genome sequencing reveals agronomically important loci in rice using MutMap. *Nature Biotechnology*, 30(2), 174–178. <https://doi.org/10.1038/nbt.2095>
- Adhikari, P., McNellie, J., y Panthee, D. R. (2020). Detection of quantitative trait loci (Qtl) associated with the fruit morphology of tomato. *Genes*, 11(10), 1–15. <https://doi.org/10.3390/genes11101117>
- Andrews, S., Krueger, F., Segonds-Pichon, A., Biggins, L., Krueger, C., y Wingett, S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects>
- Armbruster, W. S., Debevec, E. M., y Willson, M. F. (2002). Evolution of syncarpy in angiosperms: theoretical and phylogenetic analyses of the effects of carpel fusion on offspring quantity and quality. *15*, 657–672.
- Asnaghi, C., Roques, D., Ruffel, S., Kaye, C., J.-Y. Hoarau, Télismart, H., Girard, J. C., Raboin, L. M., Risterucci, A. M., Grivet, L., y D'Hont, A. (2004). Targeted mapping of a sugarcane rust resistance gene (Bru1) using bulked segregant analysis and AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 108(4), 759–764.
- Asociación Tomate 2000. (2021). Programa para el aumento de la competitividad de la industria del tomate.
- Barrero, L. S., y Tanksley, S. D. (2004). Evaluating the genetic basis of multiple-locule fruit in a broad cross section of tomato cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 109(3), 669–679. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1676-y>
- Basu, A., y Imrhan, V. (2007). Tomatoes versus lycopene in oxidative stress and carcinogenesis: Conclusions from clinical trials. *European Journal of Clinical Nutrition*, 61(3), 295–303. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602510>
- Bateson, W. (1909). Heredity and variation in modern lights. *Darwin and Modern Science*.
- Bello, M. A., Hawkins, J. A., y Rudall, P. J. (n.d.). Floral Morphology and Development in Quillajaceae and Surianaceae (Fabales), the Species-poor Relatives of Leguminosae and Polygalaceae. *Annals of Botany*, 101(3), 483–483. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn002>
- Benjamini, Y., y Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 57(1), 289–300.
- Bernatzky, R., y Tanksley, S. D. (1986). Genetics of actin-related sequences in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 72, 314–321.
- Blanca, José, Montero-Pau, J., Sauvage, C., Bauchet, G., Illa, E., Díez, M. J., Francis, D., Causse, M., van der Knaap, E., y Cañizares, J. (2015). Genomic variation in tomato, from wild ancestors to contemporary breeding accessions. *BMC Genomics*, 16(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1444-1>
- Blanca, Jose, Sanchez-Matarredona, D., Ziarsolo, P., Montero-Pau, J., van der Knaap, E., Díez, M. J., y Cañizares, J. (2022). Haplotype analyses reveal novel insights into tomato history and domestication driven by long-distance migrations and latitudinal adaptations. *Horticulture Research*, 1–43. <https://doi.org/10.1093/hr/uhac030>
- Bommisetty, R., Chakravartty, N., Bodanapu, R., Naik, J. B., Panda, S. K., Lekkala, S. P., Lalam, K., Thomas, G., Mallikarjuna, S. J., Eswar, G. R., Kadambari, G. M., Bollineni, S. N., Issa, K., Akkareddy, S., Srilakshmi, C., Hariprasadreddy, K., Rameshbabu, P., Sudhakar, P., Gupta, S., ... Vemireddy, L. R. (2020). Discovery of genomic regions and candidate genes for grain weight employing next generation sequencing based QTL-seq approach in rice (*Oryza sativa* L.). *Molecular Biology Reports*, 47(11), 8615–8627. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05904-7>



- Brewer, M. T., Lang, L., Fujimura, K., Dujmovic, N., Gray, S., y van der Knaap, E. (2006). Development of a controlled vocabulary and software application to analyze fruit shape variation in tomato and other plant species. *Plant Physiology*, 141(1), 15–25. <https://doi.org/10.1104/pp.106.077867>
- Broman, K. W., Wu, H., Sen, S., y Churchill, G. A. (2003). R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics*, 19(7), 889–890. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg112>
- Cambiaso, V., Gimenez, M. D., Pereira da Costa, J. H., Vazquez, D. V., Picardi, L. A., Pratta, G. R., y Rodríguez, G. R. (2019). Selected genome regions for fruit weight and shelf life in tomato RILs discernible by markers based on genomic sequence information. *Breeding Science*, 69(3). <https://doi.org/10.1270/jsbbs.19015>
- Cambiaso, Vladimir, Pratta, G. R., Pereira da Costa, J. H., Zorzoli, R., Francis, D. M., y Rodríguez, G. R. (2019). Whole genome re-sequencing analysis of two tomato genotypes for polymorphism insight in cloned genes and a genetic map construction. *Scientia Horticulturae*, 247. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.12.001>
- Casals, J., Rivera, A., Sabaté, J., del Castillo, R. R., y Simó, J. (2019). Cherry and fresh market tomatoes: Differences in chemical, morphological, and sensory traits and their implications for consumer acceptance. *Agronomy*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/agronomy9010009>
- Causse, M., Desplat, N., Pascual, L., Le Paslier, M. C., Sauvage, C., Bauchet, G., Bérard, A., Bounon, R., Tchoumakov, M., Brunel, D., y Bouchet, J. P. (2013). Whole genome resequencing in tomato reveals variation associated with introgression and breeding events. *BMC Genomics*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-791>
- Causse, M., Giovannoni, J., Bouzayen, M., y Zouine, M. (2016). *The Tomato Genome*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-53389-5>
- Celik, I., Gurbuz, N., Uncu, A. T., Frary, A., y Doganlar, S. (2017). Genome-wide SNP discovery and QTL mapping for fruit quality traits in inbred backcross lines (IBLs) of *solanum pimpinellifolium* using genotyping by sequencing. *BMC Genomics*, 18(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3406-7>
- Chagué, V., Mercier, J. C., Guénard, M., Courcel, A. de, y Vedel, F. (1997). Identification of RAPD markers linked to a locus involved in quantitative resistance to TYLCV in tomato by bulked segregant analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 95(4), 671–677.
- Chen, Q., Song, J., Du, W.-P., Xu, L.-Y., Jiang, Y., Zhang, J., Xiang, X.-L., y Yu, G.-R. (2017). Identification, mapping, and molecular marker development for Rgsr8.1: a new quantitative trait locus conferring resistance to gibberella stalk rot in maize (*Zea mays* L.). *Frontiers in Plant Science*, 8, 1355. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01355>
- Cheniclet, C., Rong, W. Y., Causse, M., Frangne, N., Bolling, L., Carde, J.-P., y Renaudin, J.-P. (2005). Cell expansion and endoreduplication show a large genetic variability in pericarp and contribute strongly to tomato fruit growth. *Plant Physiology*, 139(4), 1984–1994. <https://doi.org/10.1104/pp.105.068767>
- Chu, Y. H., Jang, J. C., Huang, Z., y van der Knaap, E. (2019). Tomato locule number and fruit size controlled by natural alleles of *lc* and *fas*. *Plant Direct*, 3(7), 1–20. <https://doi.org/10.1002/pld3.142>
- Collard, B. C. Y., Jahufer, M. Z. Z., Brouwer, J. B., y Pang, E. C. K. (2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica*, 142(1–2), 169–196. <https://doi.org/10.1007/s10681-005-1681-5>
- Cong, B., Barrero, L. S., y Tanksley, S. D. (2008). Regulatory change in YABBY-like transcription factor led to evolution of extreme fruit size during tomato domestication. *Nature Genetics*, 40(6), 800–804. <https://doi.org/10.1038/ng.144>
- Czerednik, A., Busscher, M., Angenent, G. C., y de Maagd, R. A. (2015). The cell size distribution of tomato fruit can be changed by overexpression of CDKA1. *Plant Biotechnology Journal*, 13(2), 259–268. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/pbi.12268>



- Danecek, P., Auton, A., Abecasis, G., Albers, C. A., Banks, E., DePristo, M. A., Handsaker, R. E., Lunter, G., Marth, G. T., Sherry, S. T., McVean, G., y Durbin, R. (2011). The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics*, 27(15), 2156–2158. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr330>
- Das, S., Upadhyaya, H. D., Bajaj, D., Kujur, A., Badoni, S., Laxmi, V. K., Shailesh Tripathi, C. L. L. G., Sharma, S., Singh, S., Tyagi, A. K., y Parida, S. K. (2015). Deploying QTL-seq for rapid delineation of a potential candidate gene underlying major trait-associated QTL in chickpea. *DNA Research*, 22(3), 193–203. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/dnares/dsv004>
- DePristo, M. A., Banks, E., Poplin, R., Garimella, K. V., Maguire, J. R., Hartl, C., Philippakis, A. A., Del Angel, G., Rivas, M. A., Hanna, M., McKenna, A., Fennell, T. J., Kernytsky, A. M., Sivachenko, A. Y., Cibulskis, K., Gabriel, S. B., Altshuler, D., y Daly, M. J. (2011). A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nature Genetics*, 43(5), 491–501. <https://doi.org/10.1038/ng.806>
- Di Giacomo, M., Luciani, M. D., Cambiaso, V., Zorzoli, R., Rodríguez, G. R., y Pereira da Costa, J. H. (2020). Tomato near isogenic lines to unravel the genetic diversity of *S. pimpinellifolium* LA0722 for fruit quality and shelf life breeding. *Euphytica*, 216(8). <https://doi.org/10.1007/s10681-020-02649-z>
- Di Rienzo, J. A., Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., y Robledo, C. W. (2001). *InfoStat: software estadístico*. Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba.
- Endress, P. K., Jenny, M., y Fallen, M. E. (1983). Convergent elaboration of apocarpous gynoecia in higher advanced dicotyledons. *Endress 1982*.
- Falconer, D., y Mackay, T. (1996). Introduction to quantitative genetics. In *London: Prentice Hall: Vol. 4th edn*.
- Fernández-Lozano, A., Yuste-Lisbona, F. J., Pérez-Martín, F., Pineda, B., Moreno, V., Lozano, R., y Angosto, T. (2015). Mutation at the tomato EXCESSIVE NUMBER OF FLORAL ORGANS (ENO) locus impairs floral meristem development, thus promoting an increased number of floral organs and fruit size. *Plant Science*, 232, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.12.007>
- Figàs, M. R., Prohens, J., Casanova, C., Fernández-de-Córdoba, P., y Soler, S. (2018). Variation of morphological descriptors for the evaluation of tomato germplasm and their stability across different growing conditions. *Scientia Horticulturae*, 238(November 2017), 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.04.039>
- Fulton, T. M., Chunwongse, J., y Tanksley, S. D. (1995). Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 13(3), 207–209.
- Gan, L., Song, M., Wang, X., Yang, N., Li, H., Liu, X., y Li, Y. (2022). Cytokinins is involved in regulation of tomato pericarp thickness and fruit size. *Horticulture Research*. <https://doi.org/10.1093/hr/uhab041>
- Gao, L., Gonda, I., Sun, H., Ma, Q., Bao, K., Tieman, D. M., Burzynski-Chang, E. A., Fish, T. L., Stromberg, K. A., Sacks, G. L., Thannhauser, T. W., Foolad, M. R., Diez, M. J., Blanca, J., Canizares, J., Xu, Y., van der Knaap, E., Huang, S., Klee, H. J., ... Fei, Z. (2019). The tomato pan-genome uncovers new genes and a rare allele regulating fruit flavor. *Nature Genetics*, 51(6), 1044–1051. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0410-2>
- García-Alcalde, F., Okonechnikov, K., Carbonell, J., Cruz, L. M., Götz, S., Tarazona, S., Dopazo, J., Meyer, T. F., y Conesa, A. (2012). Qualimap: evaluating next-generation sequencing alignment data. *Bioinformatics*, 28(20), 2678–2679. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts503>
- Garcia, V., Bres, C., Just, D., Fernandez, L., Tai, F. W. J., Mauxion, J. P., Le Paslier, M. C., Bérard, A., Brunel, D., Aoki, K., Alseekh, S., Fernie, A. R., Fraser, P. D., y Rothan, C. (2016). Rapid identification of causal mutations in tomato EMS populations via mapping-by-sequencing. *Nature Protocols*, 11(12), 2401–2418.



- <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.143>
- Jimenez, M. D., Vazquez, D. V., Trepas, F., Cambiaso, V., y Rodríguez, G. R. (2021). Fruit quality and DNA methylation are affected by parental order in reciprocal crosses of tomato. *Plant Cell Reports*, 40(1), 171–186. <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02624-x>
- Giovannoni, J. J. (2004). Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell*, 16(SUPPL.), 170–181. <https://doi.org/10.1105/tpc.019158>
- Giovannoni, J. J., Wing, R. A., Ganai, M. W., y Tanksley, S. D. (1991). Isolation of molecular markers from specific chromosomal intervals using DNA pools from existing mapping populations. *Nucleic Acids Research*, 19(23), 6553–6568. <https://doi.org/10.1093/nar/19.23.6553>
- Gonzalo, M. J., Brewer, M. T., Anderson, C., Sullivan, D., Gray, S., y Van Der Knaap, E. (2009). Tomato fruit shape analysis using morphometric and morphology attributes implemented in tomato analyzer software program. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 134(1), 77–87. <https://doi.org/10.21273/jashs.134.1.77>
- Gonzalo, M. J., y Van Der Knaap, E. (2008). A comparative analysis into the genetic bases of morphology in tomato varieties exhibiting elongated fruit shape. *Theoretical and Applied Genetics*, 116(5), 647–656. <https://doi.org/10.1007/s00122-007-0698-7>
- Grandillo, S., Ku, H. M., y Tanksley, S. D. (1999). Identifying the loci responsible for natural variation in fruit size and shape in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 99(6), 978–987. <https://doi.org/10.1007/s001220051405>
- Grandillo, S., y Tanksley, S. D. (1996). Genetic analysis of RFLPs, GATA microsatellites and RAPDs in a cross between *L. esculentum* and *L. pimpinellifolium*. *Theoretical and Applied Genetics*, 92(8), 957–965. <https://doi.org/10.1007/BF00224035>
- Green, G. Y., Pereira da Costa, J. H., Cambiaso, V., Pratta, G. R., Zorzoli, R., y Rodríguez, G. R. (2016). Single and joint effect of the basal region of chromosome 2 and centromeric region of chromosome 8 on morphological and fruit quality traits in tomato. *Euphytica*, 210(3), 327–339. <https://doi.org/10.1007/s10681-016-1689-z>
- Halldén, C., Säll, T., Olsson, K., Nilsson, N. -O., y Hjerdin, A. (1997). The use of bulked segregant analysis to accumulate RAPD markers near a locus for beet cyst nematode resistance in *Beta vulgaris*. *Plant Breeding*, 116(1), 18–22. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.1997.tb00970.x>
- Harrell, F. E., y Dupont, C. (2018). Hmisc: harrell miscellaneous. <https://hbiostat.org/R/Hmisc/>
- Huang, X., Feng, Q., Qian, Q., Zhao, Q., Wang, L., Wang, A., Guan, J., Fan, D., Weng, Q., Huang, T., Dong, G., Sang, T., y Han, B. (2009). High-throughput genotyping by whole-genome resequencing. *Genome Research*, 19(6), 1068–1076. <https://doi.org/10.1101/gr.089516.108>
- Huang, Z., y van der Knaap, E. (2011). Tomato fruit weight 11.3 maps close to fasciated on the bottom of chromosome 11. *Theoretical and Applied Genetics*, 123(3), 465–474. <https://doi.org/10.1007/s00122-011-1599-3>
- Hung, H.-Y., Browne, C., Guill, K., Coles, N., Eller, M., Garcia, A., Lepak, N., Melia-Hancock, S., Oropeza-Rosas, M., Salvo, S., Upadyayula, N., Buckler, E. S., Flint-Garcia, S., McMullen, M. D., Rocheford, T. R., y Holland, J. B. (2012). The relationship between parental genetic or phenotypic divergence and progeny variation in the maize nested association mapping population. *Heredity*, 108(5), 490–499. <https://doi.org/10.1038/hdy.2011.103>
- Illa-Berenguer, E., Van Houten, J., Huang, Z., y van der Knaap, E. (2015). Rapid and reliable identification of tomato fruit weight and locule number loci by QTL-seq. *Theoretical and Applied Genetics*, 128(7), 1329–1342. <https://doi.org/10.1007/s00122-015-2509-x>
- Jana, S. (1972). Simulation of quantitative characters from qualitatively acting genes - II. Orthogonal subdivision of hereditary variance in two-locus genetic systems. *Theoretical and Applied Genetics*, 42(3), 119–124. <https://doi.org/10.1007/BF00583413>
- Jatoi, A., Burch, P., Hillman, D., Vanyo, J. M., Dakhil, S., Nikcevich, D., Rowland, K., Morton,



- R., Flynn, P. J., Young, C., y Tan, W. (2007). A Tomato-Based, Lycopene-Containing Intervention for Androgen-Independent Prostate Cancer: Results of a Phase II Study from The North Central Cancer Treatment Group. *Urology*, 69(2), 289–294. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2006.10.019>
- Jelinski, D. E. (1991). On the use of chi-square analyses in studies of resource utilization. *Canadian Journal of Forest Research*, 21(1), 58–65. <https://doi.org/10.1139/x91-009>
- Jung, Y. J., Nou, I. S., Cho, Y. G., Kim, M. K., Kim, H. T., y Kang, K. K. (2016). Identification of an SNP variation of elite tomato (*Solanum lycopersicum* L.) lines using genome resequencing analysis. *Horticulture Environment and Biotechnology*, 57(2), 173–181. <https://doi.org/10.1007/s13580-016-0132-7>
- Kassambara, A. (2019). ggcorrplot: Visualization of a correlation matrix using “ggplot2”. R package version 0.1. 3.
- Kassambara, A., y Mundt, F. (2017). Package ‘factoextra’. Extract and visualize the results of multivariate data analyses.
- Kearsey, M J, Pooni, H. S., y Syed, N. H. (2003). Genetics of quantitative traits in *Arabidopsis thaliana*. *Heredity*, 91(5), 456–464. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800306>
- Kearsey, Michael J., y Pooni, H. S. (1996). *The Genetical Analysis of Quantitative Traits*. Chapman and Hall. <https://doi.org/10.1007/978-1-4899-4441-2>
- Kimbara, J., Ohyama, A., Chikano, H., Ito, H., Hosoi, K., Negoro, S., Miyatake, K., Yamaguchi, H., Nunome, T., Fukuoka, H., y Hayashi, T. (2018). QTL mapping of fruit nutritional and flavor components in tomato (*Solanum lycopersicum*) using genome-wide SSR markers and recombinant inbred lines (RILs) from an intra-specific cross. *Euphytica*, 214(11), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s10681-018-2295-z>
- Kosambi, D. D. (1943). The estimation of map distances from recombination values. *Annals of Eugenics*, 12(1), 172–175. <https://doi.org/doi:10.1111/j.1469-1809.1943.tb02321.x>
- Kruijjer, W., Boer, M. P., Malosetti, M., Flood, P. J., Engel, B., Kooke, R., Keurentjes, J. J. B., y Van Eeuwijk, F. A. (2014). Marker-based estimation of heritability in immortal populations. *Genetics*, 199(2), 379–398. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.167916>
- Labate, J. A., Grandillo, S., Fulton, T., Muños, S., Caicedo, A. L., Peralta, I., Ji, Y., Chetelat, R. T., Scott, J. W., Gonzalo, M. J., Francis, D., Yang, W., van derKnaap, E., Baldo, A. M., Smith-White, B., Mueller, L. A., Prince, J. P., Blanchard, N. E., Storey, D. B., ... Causse, M. (2007). Tomato. In *Vegetables* (pp. 1–125). Springer Berlin Heidelberg.
- Lander, E. S., y Botstein, D. (1989). Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics*, 121(1), 185–199.
- Langmead and Steven L Salzberg. (2013). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 9(4), 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Lê, S., Josse, J., y Husson, F. (2008). FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *Journal of Statistical Software*, 25(1), 1–18. <https://doi.org/10.18637/jss.v025.i01>
- Ligges, U., Maechler, M., y Schnackenberg, S. (2018). The scatterplot3d package. *Recovered from [https://Cran. Rproject. Org/Web/Packages/Scatterplot3d/Scatterplot3d. Pdf](https://cran.rproject.org/web/packages/scatterplot3d/scatterplot3d.pdf)*.
- Lin, T., Zhu, G., Zhang, J., Xu, X., Yu, Q., Zheng, Z., Zhang, Z., Lun, Y., Li, S., Wang, X., Huang, Z., Li, J., Zhang, C., Wang, T., Zhang, Y., Wang, A., Zhang, Y., Lin, K., Li, C., ... Huang, S. (2014). Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding. *Nature Genetics*, 46(11), 1220–1226. <https://doi.org/10.1038/ng.3117>
- Lippman, Z., y Tanksley, S. D. (2001). Dissecting the Genetic Pathway to Extreme Fruit Size in Tomato Using a Cross Between the Small-Fruited Wild Species *Lycopersicon pimpinellifolium* and *L. esculentum* var. Giant Heirloom. *Genetics*, 158(0016–6731), 413–422.
- Liu, B. H. (1998). *Statistical genomics: linkage, mapping and QTL analysis*. (1st ed.). CRC Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1201/9780203738658>
- Liu, J., Van Eck, J., Cong, B., y Tanksley, S. D. (2002). A new class of regulatory genes underlying the cause of pear-shaped tomato fruit. *Proceedings of the National Academy*



- of Sciences*, 99(20), 13302–13306. <https://doi.org/10.1073/pnas.162485999>
- López Marín, L. M. (2016). Manual técnico del cultivo de tomate. In L. R. Cartín (Ed.), *Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (inta)*.
- Lozano, R., Giménez, E., Cara, B., Capel, J., y Angosto, T. (2009). Genetic analysis of reproductive development in tomato. *International Journal of Developmental Biology*, 53(8–10), 1635–1648. <https://doi.org/10.1387/ijdb.072440rl>
- Lu, H., Lin, T., Klein, J., Wang, S., Qi, J., Zhou, Q., Sun, J., Zhang, Z., Weng, Y., y Huang, S. (2014). QTL-seq identifies an early flowering QTL located near Flowering Locus T in cucumber. *Theoretical and Applied Genetics*, 127(7), 1491–1499. <https://doi.org/10.1007/s00122-014-2313-z>
- Magwene, P. M., Willis, J. H., y Kelly, J. K. (2011). The statistics of bulk segregant analysis using next generation sequencing. *PLoS Computational Biology*, 7(11), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002255>
- Mahfud, y Murti, R. H. (2020). Inheritance pattern of fruit color and shape in multi-pistil and purple tomato crossing. *Agrivita*, 42(3), 572–583. <https://doi.org/10.17503/agrivita.v42i3.2515>
- Mansfeld, B. N., y Grumet, R. (2018). QTLseqr: An R package for bulk segregant analysis with next-generation sequencing. *Plant Genome*, 11(2), 1–5. <https://doi.org/10.3835/plantgenome2018.01.0006>
- Mansur, L. M., OrfK., J., y Lark, G. (1993). Determining the linkage of quantitative trait loci to RFLP markers using extreme phenotypes of recombinant inbreds of soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Theoretical and Applied Genetics*, 86(8), 914–918.
- Mariotti, J. A., y Collavino, N. G. (2014). Los caracteres cuantitativos en la mejora genética de los cultivos. Orientación Gráfica Editora.
- Mather, K., y Jinks, J. L. (1982). Biometrical genetics: the study of continuous variation (3rd edn.). Chapman and Hall, London, UK.
- McCouch, S. (2013). Feeding the future. *Nature*, 499, 23–24.
- McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernytsky, A., Garimella, K., Altshuler, D., Gabriel, S., Daly, M., y DePristo, M. A. (2010). The genome analysis toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Research*, 20(9), 1297–1303. <https://doi.org/10.1101/gr.107524.110>
- Mendiburu, F. de. (2013). Statistical procedures for agricultural research. Package ‘Agricolae,’ version 1.4-4.’
- Michaelson, M. J., Price, H. J., Ellison, J. R., y Johnston, J. S. (1991). Comparison of Plant Dna Contents Determined By Feulgen Microspectrophotometry and Laser Flow Cytometry. *American Journal of Botany*, 78(2), 183–188. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1991.tb15745.x>
- Michelmore, R. W., Paran, I., y Kesseli, R. V. (1991). Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(21), 9828–9832. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.21.9828>
- Miller, J. C., y Tanksley, S. D. (1990). RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. *Theoretical and Applied Genetics*, 80(4), 437–448. <https://doi.org/10.1007/BF00226743>
- Mondino, M. C., Longo, A., Vira Larrieu, E., Grasso, R., Ortiz Mackinson, M., y Ferratto, J. A. (2012). CENSO 2012 del Cinturón Hortícola de Rosario.
- Mu, Q., Huang, Z., Chakrabarti, M., Illa-Berenguer, E., Liu, X., Wang, Y., Ramos, A., y van der Knaap, E. (2017). Fruit weight is controlled by Cell Size Regulator encoding a novel protein that is expressed in maturing tomato fruits. *PLoS Genetics*, 13(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006930>
- Muños, S., Ranc, N., Botton, E., Berard, A., Rolland, S., Duffe, P., Carretero, Y., Le Paslier, M.-C., Delalande, C., Bouzayen, M., Brunel, D., y Causse, M. (2011). Increase in



- Tomato Locule Number Is Controlled by Two Single-Nucleotide Polymorphisms Located Near WUSCHEL. *Plant Physiology*, 156(4), 2244–2254. <https://doi.org/10.1104/pp.111.173997>
- Nadaraya, E. A. (1964). On Estimating Regression. *Theory of Probability y Its Applications*, 9(1), 141–142. <https://doi.org/https://doi.org/10.1137/1109020>
- Nankar, A. N., Kostova, D., Tringovska, I., Grozeva, S., y Ganeva, D. (2020). Tomato phenotypic diversity determined by combined approaches of conventional and high-throughput tomato analyzer phenotyping. *Plants*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/plants9020197>
- Nuez, F., Rodríguez Del Rincón, Á., Tello, J., Cuartero, J., y Segura, B. (1995). El cultivo del tomate (Mundi Prensa (ed.1995)).
- Panthee, D. R., Labate, J. A., McGrath, M. T., Breksa, A. P., y Robertson, L. D. (2013). Genotype and environmental interaction for fruit quality traits in vintage tomato varieties. *Euphytica*, 193(2), 169–182. <https://doi.org/10.1007/s10681-013-0895-1>
- Paran, I., y van der Knaap, E. (2007). Genetic and molecular regulation of fruit and plant domestication traits in tomato and pepper. *Journal of Experimental Botany*, 58(14), 3841–3852. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm257>
- Park, Y. H., West, M. A. ., y St. Clair, D. A. (2004). Evaluation of AFLPs for germplasm fingerprinting and assessment of genetic diversity in cultivars of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Genome*, 47(3), 510–518. <https://doi.org/10.1139/g04-004>
- Peralta, I. E., Spooner, D. M., y Knapp, S. (2008). Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (*Solanum* sect. *Lycopersicoides*, sect. *Juglandifolia*, sect. *Lycopersicon*; Solanaceae) (Vol. 84). Systematic Botany Monographs.
- Pereira da Costa, J. H., Vega, T. A., Pratta, G. R., Picardi, L. A., Zorzoli, R., y Rodríguez, G. R. (2017). A 54-kDa polypeptide identified by 2D-PAGE and bulked segregant analysis underlies differences for pH values in tomato fruit. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39(3). <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2386-9>
- Quarrie, S. A., Lazić-Jančić, V., Kovačević, D., Steed, A., y Pekić, S. (1999). Bulk segregant analysis with molecular markers and its use for improving drought resistance in maize. *Journal of Experimental Botany*, 50(337), 1299–1306.
- R Core Team. (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. <http://www.r-project.org/>.
- Ranc, N., Múos, S., Santoni, S., y Causse, M. (2008). A clarified position for *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* in the evolutionary history of tomatoes (solanaceae). *BMC Plant Biology*, 8, 1–16. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-130>
- Razifard, H., Ramos, A., Della Valle, A. L., Bodary, C., Goetz, E., Manser, E. J., Li, X., Zhang, L., Visa, S., Tieman, D., Van Der Knaap, E., y Caicedo, A. L. (2020). Genomic evidence for complex domestication history of the cultivated tomato in Latin America. *Molecular Biology and Evolution*, 37(4), 1118–1132. <https://doi.org/10.1093/molbev/msz297>
- Rick, C. M. (1973). Potential genetic resources in tomato species: clues from observations in native habitats. *Basic Life Sciences*, 2, 255–269. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-2880-3_17
- Rodríguez-Leal, D., Lemmon, Z. H., Man, J., Bartlett, M. E., y Lippman, Z. B. (2017). Engineering Quantitative Trait Variation for Crop Improvement by Genome Editing. *Cell*, 171(2), 470–480.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.030>
- Rodríguez, G. R., Kim, H. J., y Van Der Knaap, E. (2013). Mapping of two suppressors of OVATE (sov) loci in tomato. *Heredity*, 111(3), 256–264. <https://doi.org/10.1038/hdy.2013.45>
- Rodríguez, G. R., Muños, S., Anderson, C., Sim, S.-C., Michel, A., Causse, M., Gardener, B. B. M., Francis, D., y van der Knaap, E. (2011). Distribution of SUN, OVATE, LC, and FAS in the Tomato Germplasm and the Relationship to Fruit Shape Diversity. *Plant Physiology*, 156(1), 275–285. <https://doi.org/10.1104/pp.110.167577>



- Rodríguez, Gustavo R., Francis, D. M., van der Knaap, E., Strecker, J., Njanji, I., Thomas, J., y Jack, A. (2011). New features and many Improvements to analyze morphology and color of digitalized plant organs are available in Tomato Analyzer 3.0. *Proceedings of the Twenty-Second Midwest Artificial Intelligence and Cognitive Science Conference, Vol-710*, 160–163. <http://ceur-ws.org/>
- Rodríguez, Gustavo R., Moyseenko, J. B., Robbins, M. D., Huarachi Morejón, N., Francis, D. M., y van der Knaap, E. (2010). Tomato Analyzer: a useful software application to collect accurate and detailed morphological and colorimetric data from two-dimensional objects. *Journal of Visualized Experiments*, 37, 1–12. <https://doi.org/10.3791/1856>
- Roohanitaziani, R., de Maagd, R. A., Lammers, M., Molthoff, J., Meijer-Dekens, F., van Kaauwen, M. P. W., Finkers, R., Tikunov, Y., Visser, R. G. F., y Bovy, A. G. (2020). Exploration of a resequenced tomato core collection for phenotypic and genotypic variation in plant growth and fruit quality traits. *Genes*, 11(11), 1–22. <https://doi.org/10.3390/genes11111278>
- Rothan, C., Diouf, I., y Causse, M. (2019). Trait discovery and editing in tomato. In *Plant Journal* (Vol. 97, Issue 1, pp. 73–90). <https://doi.org/10.1111/tpj.14152>
- Sacco, A., Ruggieri, V., Parisi, M., Festa, G., Rigano, M. M., Picarella, M. E., Mazzucato, A., y Barone, A. (2015). Exploring a tomato landraces collection for fruit-related traits by the aid of a high-throughput genomic platform. *PLoS ONE*, 10(9), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137139>
- Sekhon, R. S., y Chopra, S. (2009). Progressive loss of DNA methylation releases epigenetic gene silencing from a tandemly repeated maize Myb gene. *Genetics*, 181(1), 81–91. <https://doi.org/10.1534/genetics.108.097170>
- Shapiro, S. S., y Wilk, M. B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, 52(3–4), 591–611. <https://doi.org/10.1093/biomet/52.3-4.591>
- Sierra-Orozco, E., Shekasteband, R., Illa-Berenguer, E., Snouffer, A., van der Knaap, E., Lee, T. G., y Hutton, S. F. (2021). Identification and characterization of GLOBE, a major gene controlling fruit shape and impacting fruit size and marketability in tomato. *Horticulture Research*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41438-021-00574-3>
- Simonne, A. H., Behe, B. K., y Marshall, M. M. (2006). Consumers prefer low-priced and high-lycopene-content fresh-market tomatoes. *HortTechnology*, 16(4), 674–681. <https://doi.org/10.21273/horttech.16.4.0674>
- Singh, V. K., Khan, A. W., Jaganathan, D., Thudi, M., Roorkiwal, M., Takagi, H., Garg, V., Kumar, V., Chitkineni, A., Gaur, P. M., Sutton, T., Terauchi, R., y Varshney, R. K. (2016). QTL-seq for rapid identification of candidate genes for 100-seed weight and root/total plant dry weight ratio under rainfed conditions in chickpea. *Plant Biotechnology Journal*, 14(11), 2110–2119. <https://doi.org/10.1111/pbi.12567>
- Song, J., Li, Z., Liu, Z., Guo, Y., y Qiu, L.-J. (2017). Next-Generation Sequencing from bulked-segregant analysis accelerates the simultaneous identification of two qualitative genes in soybean. *Frontiers in Plant Science*, 8, 919. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00919>
- Spetale, F. E., Murillo, J., Vazquez, D. V., Cacchiarelli, P., Rodríguez, G. R., y Tapia, E. (2020). LocAnalyzer: A computer vision method to count locules in tomato fruits. *Computers and Electronics in Agriculture*, 173(March), 105382. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2020.105382>
- Srinivasan, S., Gaur, P. M., Chaturvedi, S. K., y Rao, B. V. (2006). Allelic relationships of genes controlling number of flowers per axis in chickpea. *Euphytica*, 152(3), 331–337. <https://doi.org/10.1007/s10681-006-9219-z>
- Takagi, H., Abe, A., Yoshida, K., Kosugi, S., Natsume, S., Mitsuoka, C., Uemura, A., Utsushi, H., Tamiru, M., Takuno, S., Innan, H., Cano, L. M., Kamoun, S., y Terauchi, R. (2013). QTL-seq: Rapid mapping of quantitative trait loci in rice by whole genome resequencing of DNA from two bulked populations. *Plant Journal*, 74(1), 174–183.



- <https://doi.org/10.1111/tpj.12105>
- Tanksley, S. D. (1993). Mapping polygenes. *Annual Review of Genetics*, 27, 205–233. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.27.120193.001225>
- Tanksley, S. D. (2004). The Genetic , developmental, and molecular bases of fruit size in tomato and shape variation. *The Plant Cell*, 16(2004). <https://doi.org/10.1105/tpc.018119.S182>
- The 100 Tomato Genome Sequencing Consortium. (2014). Exploring genetic variation in the tomato (*Solanum* section *Lycopersicon*) clade by whole-genome sequencing. *Plant Journal*, 80(1), 136–148. <https://doi.org/10.1111/tpj.12616>
- The Tomato Genome Consortium. (2012). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, 485(7400), 635–641. <https://doi.org/10.1038/nature11119>
- Umar, M., Basha, P. O., Puri, A., Rajpurohit, D., Randhawa, G. S., Sharma, T. R., y Dhaliwal, H. S. (2010). A candidate gene OsAPC6 of anaphase-promoting complex of rice identified through T-DNA insertion. *Functional y Integrative Genomics*, 10(3), 349–358. <https://doi.org/10.1007/s10142-009-0155-6>
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., y Rozen, S. G. (2012). Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40(15), 1–12. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>
- van der Knaap, E., Sanyal, A., Jackson, S. A., y Tanksley, S. D. (2004). High-resolution fine mapping and fluorescence *in situ* hybridization analysis of sun, a locus controlling tomato fruit shape, reveals a region of the tomato genome prone to DNA rearrangements. *Genetics*, 168(4), 2127–2140. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.031013>
- van der Knaap, E., y 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), 139–147. <https://doi.org/10.1007/s00122-003-1224-1>
- van der Knaap, Esther, Chakrabarti, M., Chu, Y. H., Clevenger, J. P., Illa-Berenguer, E., Huang, Z., Keyhaninejad, N., Mu, Q., Sun, L., Wang, Y., y Wu, S. (2014). What lies beyond the eye: The molecular mechanisms regulating tomato fruit weight and shape. *Frontiers in Plant Science*, 5(MAY), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00227>
- Vazquez, D. V. (2019). Alineado y comparación de secuencias genómicas obtenidas de grupos discrepantes para la detección de regiones cromosómicas que controlan caracteres de fruto en tomatE [Universidad Nacional de Rosario]. <https://rehip.unr.edu.ar/handle/2133/18980>
- Wang, R., Sun, L., Bao, L., Zhang, J., Jiang, Y., Yao, J., Song, L., Feng, J., Liu, S., y Liu, Z. (2013). Bulk segregant RNA-seq reveals expression and positional candidate genes and allele-specific expression for disease resistance against enteric septicemia of catfish. *BMC Genomics*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-929>
- Warner, J. N. (1952). A Method for Estimating Heritability. *Agronomy Journal*, 44(8), 427–430. <https://doi.org/10.2134/agronj1952.00021962004400080007x>
- Watson, G. S. (1964). Smooth regression analysis. *Sankhyā: The Indian Journal of Statistics, Series A (1961-2002)*, 26(4), 359–372. <https://doi.org/http://www.jstor.org/stable/25049340>
- Wei, T., y Simko, V. (2017). R package “corrplot”: visualization of a correlation matrix. Version 0.84.
- Wen, J., Jiang, F., Weng, Y., Sun, M., Shi, X., Zhou, Y., Yu, L., y Wu, Z. (2019). Identification of heat-tolerance QTLs and high-temperature stress-responsive genes through conventional QTL mapping , QTL- seq and RNA-seq in tomato. *BMC Plant Biology*, 19(1), 398.
- Wickham, H. (2009). ggplot2: Elegant graphics for data analysis. Springer-Verlag New York. In *Media* (Vol. 35, Issue July). <http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-98141-3>



- Wickham, H., Averick, M., Bryan, J., Chang, W., McGowan, L., François, R., Golemund, G., Hayes, A., Henry, L., Hester, J., Kuhn, M., Pedersen, T., Miller, E., Bache, S., Müller, K., Ooms, J., Robinson, D., Seidel, D., Spinu, V., ... Yutani, H. (2019). Welcome to the Tidyverse. *Journal of Open Source Software*, 4(43), 1686. <https://doi.org/10.21105/joss.01686>
- Wickham, H., François, R., Henry, L., y Müller, K. (2022). dplyr: A grammar of data manipulation.
- Wu, S., Clevenger, J. P., Sun, L., Visa, S., Kamiya, Y., Jikumaru, Y., Blakeslee, J., y van der Knaap, E. (2015). The control of tomato fruit elongation orchestrated by *sun*, *ovate* and *fs8.1* in a wild relative of tomato. *Plant Science*, 238, 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.05.019>
- Wu, S., Zhang, B., Keyhaninejad, N., Rodríguez, G. R., Kim, H. J., Chakrabarti, M., Illa-Berenguer, E., Taitano, N. K., Gonzalo, M. J., Díaz, A., Pan, Y., Leisner, C. P., Halterman, D., Buell, C. R., Weng, Y., Jansky, S. H., van Eck, H., Willemsen, J., Monforte, A. J., ... van der Knaap, E. (2018). A common genetic mechanism underlies morphological diversity in fruits and other plant organs. *Nature Communications*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07216-8>
- Xiao, H., Jiang, N., Schaffner, E., Stockinger, E. J., y Van Der Knaap, E. (2008). A retrotransposon-mediated gene duplication underlies morphological variation of tomato fruit. *Science*, 319(5869), 1527–1530. <https://doi.org/10.1126/science.1153040>
- Xu, C., Liberatore, K. L., Macalister, C. A., Huang, Z., Chu, Y. H., Jiang, K., Brooks, C., Ogawa-Ohnishi, M., Xiong, G., Pauly, M., Van Eck, J., Matsubayashi, Y., Van Der Knaap, E., y Lippman, Z. B. (2015). A cascade of arabinosyltransferases controls shoot meristem size in tomato. *Nature Genetics*, 47(7), 784–792. <https://doi.org/10.1038/ng.3309>
- Yang, J., Wang, Y., Shen, H., y Yang, W. (2014). *In silico* identification and experimental validation of insertion-deletion polymorphisms in tomato genome. *DNA Research*, 21(4), 429–438. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsu008>
- Yang, Z., Huang, D., Tang, W., Zheng, Y., Liang, K., Cutler, A. J., y Wu, W. (2013). Mapping of quantitative trait loci underlying cold tolerance in rice seedlings via high-throughput sequencing of pooled extremes. *PLoS ONE*, 8(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068433>
- Zhang, G., Chen, L., Xiao, G., Xiao, Y., Chen, X., y Zhang, S. (2009). Bulk segregant analysis to detect qtl related to heat tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) Using SSR Markers. *Agricultural Sciences in China*, 8(4), 482–487. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(08\)60235-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1671-2927(08)60235-7)
- Zhang, Q., Jie, L., Xiao, H., y Wang, F. (2018). The unusual gynoeceium structure and extragynoeceial pollen - tube pathway in *Phytolacca* (*Phytolaccaceae*). *Plant Systematics and Evolution*, 304(7), 885–894. <https://doi.org/10.1007/s00606-018-1518-z>
- Zhu, X., Ni, Y., He, R., Jiang, Y., Li, Q., y Niu, J. (2019). Genetic mapping and expressivity of a wheat multi-pistil gene in mutant 12TP. *Journal of Integrative Agriculture*, 18(3), 532–538. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(18\)61935-5](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(18)61935-5)

ANEXO

Tabla suplementaria S1: Representatividad de subconjuntos para categorías de forma de fruto, tamaño de fruto, clase de germoplasma y origen expresado como frecuencia absoluta y porcentaje.

	Clase	Sub-clase	Frecuencia	
Clase de germoplasma	Heirloom		31	16,94%
	Latinoamericana			9,84%
		Líneas	1	
		Regionales	17	
	Cerasiforme		20	10,93%
	Silvestres		2	1,09%
	Regional española		12	6,56%
	Regional italiana		71	38,80%
	Contemporáneas		21	11,48%
Otros		8	4,37%	
Forma de fruto	Alargado		16	8,74%
	Redondo		19	10,38%
	Elipsoide		42	22,95%
	Achatado		40	21,86%
	Corazón de buey		2	1,09%
	Obovoide		30	16,39%
	Acorazonado		15	8,20%
	Rectangular		19	10,38%
Tamaño de fruto	Grande		24	13,11%
	Mediano		114	62,30%
	Pequeño		45	24,59%
Origen geográfico	Latinoamérica		43	24,86%
		Perú	29	
		Méjico	3	
		Brasil	1	
		Guatemala	2	
		Ecuador	4	
		El salvador	2	
		Honduras	1	
		Panamá	1	
	EE.UU		17	9,83%
	China		2	1,16%
	Italia		87	50,29%
	España		12	6,94%
	Francia		1	0,58%

Tabla suplementaria S1: Representatividad de subconjuntos para categorías de forma de fruto, tamaño de fruto, clase de germoplasma y origen expresado como frecuencia absoluta y porcentaje (continuación).

	Clase	Sub-clase	Frecuencia
Origen geográfico	Alemania	2	1,16%
	Canadá	1	0,58%
	Reino Unido	1	0,58%
	Australia	1	0,58%
	Polonia	1	0,58%
	Tailandia	1	0,58%
	Rusia	4	2,31%
	Desconocido	10	

Tabla suplementaria S2: Profundidad de cobertura promedio y desvío estándar para cada cromosoma en los grupos de ADN segregantes para el carácter tipo de carpelos, derivados de la población F₂ VxOB (campana agrícola n°2)

Cromosoma	Largo (pb)	Grupo no fusionado			Grupo fusionado		
		Bases mapeadas	Cobertura promedio	Desvío estándar	Bases mapeadas	Cobertura promedio	Desvío estándar
SL4.0ch00	9.643.250	2.641.627.715	273,94	729,19	2.254.951.895	233,84	570,00
SL4.0cr01	90.863.682	3.166.818.580	34,85	22,59	2.428.326.674	26,72	24,21
SL4.0cr02	53.473.368	1.801.048.810	33,68	35,41	1.360.275.776	25,44	42,19
SL4.0cr03	65.298.490	2.244.897.591	34,38	23,49	1.728.667.547	26,47	23,90
SL4.0cr04	64.459.972	2.180.060.837	33,82	13,70	1.660.266.598	25,76	13,68
SL4.0cr05	65.269.487	2.221.769.364	34,04	16,41	1.753.621.754	26,87	16,50
SL4.0cr06	47.258.699	1.577.802.525	33,39	11,65	1.189.680.350	25,17	12,49
SL4.0cr07	67.883.646	2.329.565.859	34,32	10,88	1.830.237.613	26,96	11,52
SL4.0cr08	63.995.357	2.252.505.819	35,20	18,41	1.770.284.998	27,66	20,03
SL4.0cr09	68.513.564	2.416.944.226	35,28	37,42	1.881.899.845	27,47	37,08
SL4.0cr10	64.792.705	2.241.913.484	34,60	20,02	1.757.413.490	27,12	17,87
SL4.0cr11	54.379.777	1.862.591.891	34,25	16,61	1.458.219.203	26,82	15,77
SL4.0cr12	66.688.036	2.359.319.326	35,38	69,81	1.872.883.079	28,08	72,51
TOTAL	772.876.783	26.655.238.312	34,39	24,89	20.691.776.927	26,71	25,65

SL4.0cr: versión del genoma de referencia, pb: pares de bases. El valor total no contabiliza el cromosoma cero.

Tabla suplementaria S3: Profundidad de cobertura promedio y desvío estándar para cada cromosoma en los grupos de ADN segregantes para el carácter grado de irregularidad, derivados de la población F₂ VxOB (campeña agrícola n°2) y F₂ YSxH.

Cr	Largo (Mb)	F ₂ VxOB HLD			F ₂ VxOB LLD			F ₂ YSxH HLD			F ₂ YSxH LLD		
		Bases mapeadas	Cobertura promedio	DE	Bases mapeadas	Cobertura promedio	DE	Bases mapeadas	Cobertura promedio	DE	Bases mapeadas	Cobertura promedio	DE
0	9,64	3.767.195.891	390,66	1.222,02	3.945.910.702	409,19	1.301,20	3.454.723.150	358,25	895,48	3.592.022.839	372,49	932,54
1	90,86	2.031.890.138	22,36	24,68	2.053.483.846	22,60	26,30	2.012.780.768	22,15	22,17	2.205.891.342	24,28	22,88
2	53,47	1.190.167.480	22,26	63,38	1.204.746.566	22,53	65,98	1.225.749.937	22,92	61,99	1.338.343.605	25,03	67,48
3	65,30	1.429.023.143	21,88	23,53	1.445.113.323	22,13	25,27	1.414.557.331	21,66	18,73	1.554.443.037	23,81	19,73
4	64,46	1.392.403.023	21,60	20,90	1.413.360.002	21,93	23,58	1.368.235.339	21,23	14,54	1.503.213.970	23,32	14,40
5	65,27	1.400.587.318	21,46	21,77	1.417.258.067	21,71	24,06	1.379.492.375	21,14	19,39	1.517.567.332	23,25	21,07
6	47,26	1.013.473.186	21,45	18,60	1.025.874.271	21,71	20,75	1.012.031.848	21,41	17,83	1.112.764.841	23,55	18,13
7	67,88	1.457.750.186	21,47	16,19	1.471.186.689	21,67	17,86	1.435.330.824	21,14	12,29	1.575.097.029	23,20	12,35
8	64,00	1.417.619.697	22,15	23,79	1.429.820.512	22,34	25,73	1.402.897.505	21,92	19,24	1.537.387.945	24,02	20,04
9	68,51	1.535.930.285	22,42	47,67	1.560.039.939	22,77	52,10	1.473.694.137	21,51	37,51	1.613.237.366	23,55	39,33
10	64,79	1.430.772.840	22,08	41,93	1.449.434.266	22,37	45,83	1.404.322.726	21,67	23,60	1.538.689.840	23,75	22,76
11	54,38	1.205.741.008	22,17	36,27	1.223.640.363	22,50	40,60	1.164.306.115	21,41	25,54	1.276.252.149	23,47	25,20
12	66,69	1.479.177.584	22,18	49,44	1.497.253.427	22,45	52,21	1.455.824.788	21,83	43,10	1.596.871.817	23,95	48,31
TOTAL	772,88	16.984.535.888	21,96	32,34	17.191.211.271	22,23	35,02	16.749.223.693	21,67	26,33	18.369.760.273	23,76	27,64

Cr: cromosoma (versión del genoma de tomate SL4.0), Largo: largo del cromosoma en megabases (Mb), DE: desvío estándar, HLD: grupo de alto valor de grado de irregularidad, LLD: grupo de bajo valor de grado de irregularidad. El valor total no contabiliza el cromosoma cero.

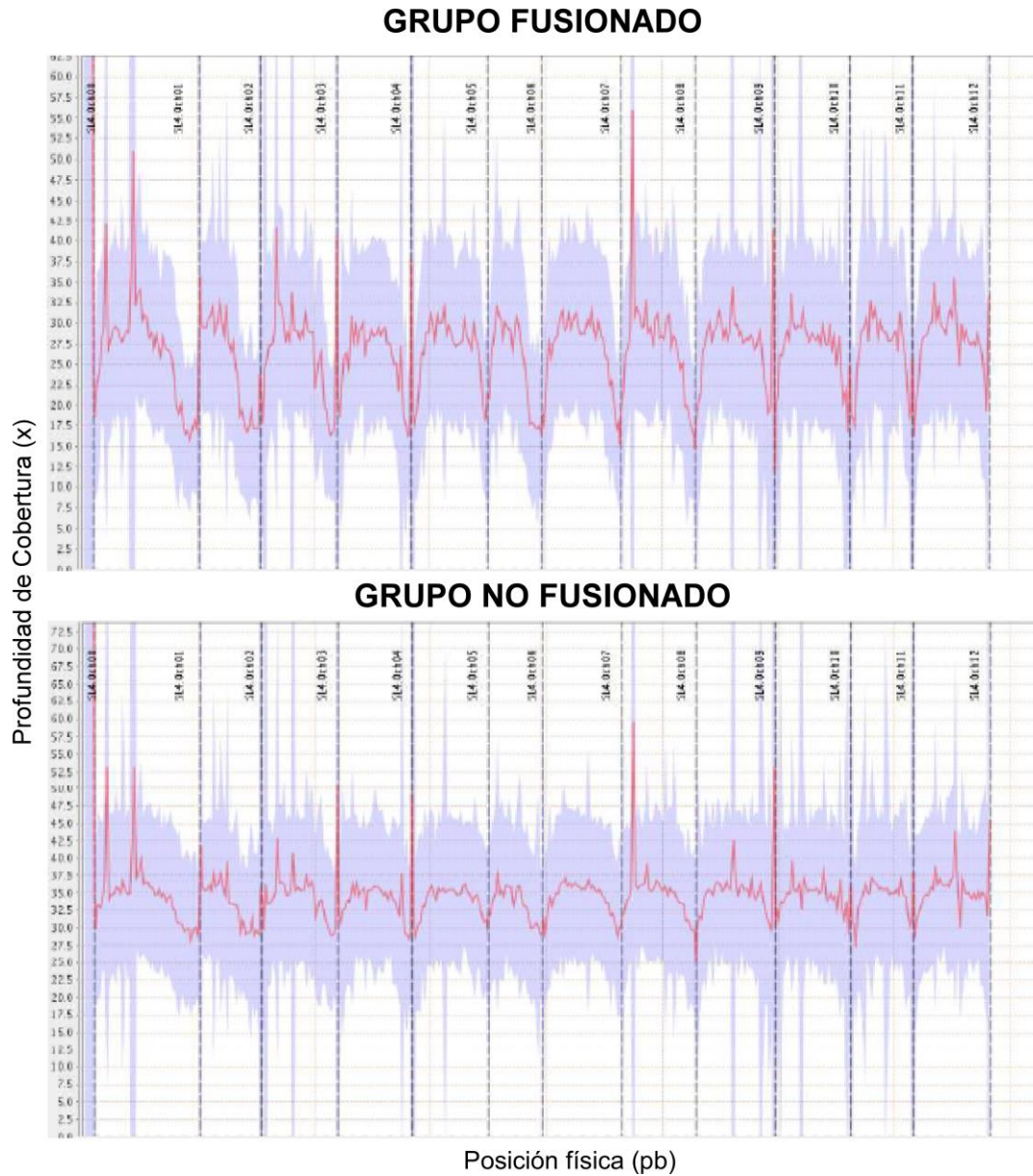
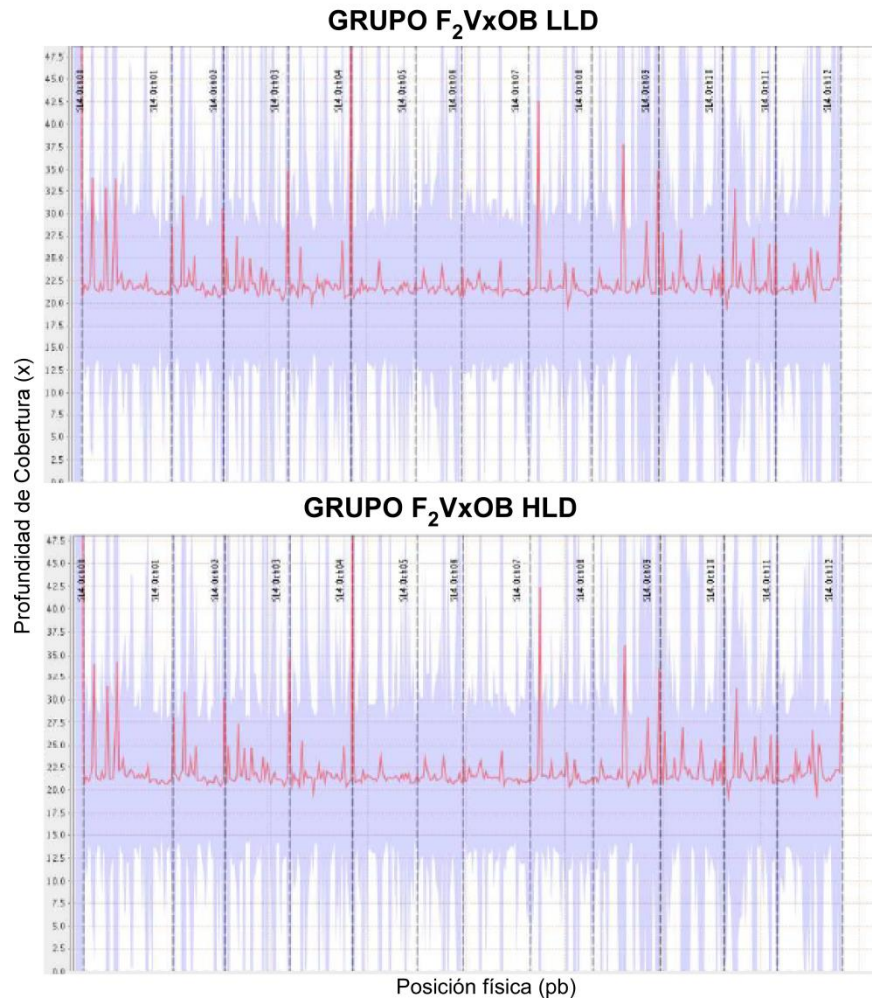


Figura suplementaria S1: Profundidad de cobertura en función de la posición física en pares de base (pb) para los grupos fusionado (arriba) y no fusionado (abajo) en la población F_2 “Voyage” x “Old Brooks” respecto del genoma de referencia.

a



b

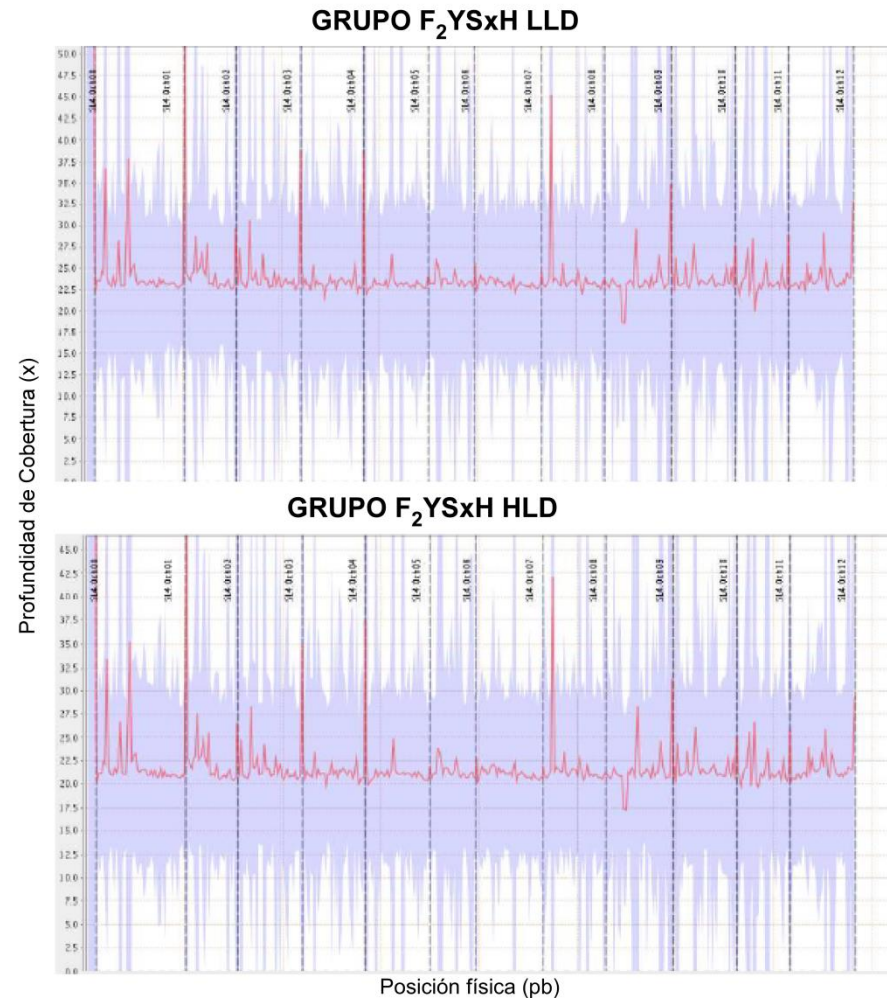


Figura suplementaria S2: Profundidad de cobertura en función de la posición física en pares de base (pb) para los grupos bajo grado de irregularidad (LLD) y alto grado de irregularidad (HLD) en la población F₂ “Voyage” x “Old Brooks” (a) y F₂ “Yellow Stuffer” x “Heinz 1439”(b), respecto del genoma de referencia.