



FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE LAS GENERACIONES
SEGREGANTES DE TRES HÍBRIDOS DE SEGUNDO CICLO EN TOMATE:
VALIDACIÓN DE QTLs ASOCIADOS A LA CALIDAD DE LOS FRUTOS**

ING. AGR. VICTORIA GUADALUPE CABODEVILA

TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR EN CIENCIAS AGRARIAS

DIRECTOR: DR. GUILLERMO RAÚL PRATTA

CO- DIRECTOR: DRA. LILIANA AMELIA PICARDI

2017

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE LAS GENERACIONES
SEGREGANTES DE TRES HÍBRIDOS DE SEGUNDO CICLO EN TOMATE:
VALIDACIÓN DE QTLs ASOCIADOS A LA CALIDAD DE LOS FRUTOS**

Victoria Guadalupe Cabodevila

Ingeniero Agrónomo - Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos
Aires (UNNOBA)

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Agrarias, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido previamente presentada para la obtención de otro título en ésta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario, durante el período comprendido entre abril de 2012 y marzo de 2017 bajo la dirección del Dr. Guillermo Raúl Pratta y la Co-dirección de la Dra. Liliana Amelia Picardi.

Ing. Agr. Victoria G. Cabodevila
Doctorando

Dr. Guillermo R. Pratta
Director

Dra. Liliana A. Picardi
Co-directora

Defendida: 20 de diciembre de 2017.

AGRADECIMIENTOS

A Guillermo y a Liliana. ¡Qué director y co-directora tuve! Les agradezco por darme la posibilidad de trabajar y de conocer el mundo de la Genética Vegetal, porque siempre sus palabras fueron de apoyo y de confianza, por estimular siempre mi pensamiento crítico y por la dedicación incansable al proyecto.

A mis padres y hermana por el apoyo de siempre.

A Juani por el empuje y las charlas de Genética, por acompañarme en todos los proyectos y por enseñarme que siempre hay una manera de poder hacer las cosas.

A Marta y Germán porque ayudaron para que todo fuese posible.

A todos los integrantes de la Cátedra de Genética.

A José Luis por estar siempre, aún en los momentos más complicados.

A Paolo y a Julia por su gran colaboración a la Tesis.

A Ariadna y Enzo por su ayuda con el proyecto.

A la familia zavalense: Mica, Gisela, Flor y Lourdes.

A mis compañeros de la Sala de Becarios.

A Rafael Lozano y a Juan Capel por recibirme en su laboratorio de la Universidad de Almería, por la gran colaboración en el proyecto y por la oportunidad única que me permitieron realizar, y a Fernando Yuste por su colaboración.

A Carmen por su hospitalidad y su ayuda y a Jorge, Rocío y Roberto por su colaboración, compañía y las noches de piña colada. Todos hicieron que nuestra estadía en Almería haya sido inmejorable.

A las fuentes de financiamiento: CONICET por la beca para llevar a cabo la presente Tesis y al programa Bec.Ar por el financiamiento para realizar la estadía internacional en España.

PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS

1. Trabajos publicados como resumen:

Cabodevila, V.G.; Cacchiarelli, P.; Pratta, G. 2013. AFLP characterization of uniform tomato genotypes and selection of primers that maximize the molecular polymorphism. *Biocell*, 37 (2), p. A94, abstract 47. ISSN 0327 – 9545 (versión impresa). ISSN 1667-5746 (versión electrónica). <http://www.cricyt.edu.ar/biocell>

Cacchiarelli, P.; **Cabodevila, V.G.**; Pratta, G. 2013. Phenotypic and molecular characterization of a tomato (*Solanum lycopersicum*) second cycle hybrid's backcross and QTLs detection. *Biocell*, 37 (3), p A148, abstract 38. ISSN 0327 – 9545 (versión impresa). <http://www.cricyt.edu.ar/biocell>

Cabodevila, V.G.; Picardi, L.A.; Pratta, G.R. 2014. QTLs detection for morphological traits and post harvest life in tomato fruits (*Solanum lycopersicum*). *Biocell*, 38 (Suppl.5), abstract 66. ISSN 0327-9545 (versión impresa). ISSN 1667-5746 (versión electrónica). <http://www.cricyt.edu.ar/biocell>

de Diego, J.; **Cabodevila, V.G.**; Pratta, G. 2015. Estimation of genetic variance components in a second cycle hybrid of tomato (*Solanum lycopersicum*). *Biocell*, 39 (Suppl.4), abstract 48. ISSN 1667-5746 (versión electrónica). <http://www.cricyt.edu.ar/biocell>

2. Trabajos publicados en revistas:

Cacchiarelli P.; **Cabodevila V.**; Pantuso F.S. y Pratta G.R. 2015. Segregación y Recombinación genética en las generaciones segregantes de un híbrido de segundo ciclo de tomate. *Revista de la Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales, Universidad de Morón*. ISSN N° 0328-6312. Incluida en el catálogo Latindex. N° 13: 25-38.

Cabodevila, Victoria Guadalupe; Cacchiarelli, Paolo; Pratta, Guillermo Raúl. 2017. Identificación de QTL en las generaciones segregantes de un híbrido de segundo ciclo de tomate. *Revista de Investigaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias (Universidad Nacional de Cuyo)*. 49(2):1-18. ISSN N° 0370-4661 (impreso); ISSN N° 1853-8665 (en línea).

Cabodevila, V.G.; Picardi, L.A.; Pratta, G.R. 2017. A multivariate approach to explore the genetic variability in the F₂ segregating population of a tomato second cycle hybrid. Journal of Basis & Applied Genetics (BAG). ISSN N°: 1852-6233. 28(1): 7-17.

3. Trabajos presentados en Congresos y Reuniones Científicas:

Cabodevila, V.G.; Cacchiarelli, P.; Pratta, G. 2012. Caracterización por AFLP de genotipos uniformes de tomate y selección de cebadores que maximizan la detección de polimorfismo molecular. XIV Congreso y XXXII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Casilda. Publicado en Actas del Congreso ISSN: 2314- 1484.

Cabodevila, V.G.; Cacchiarelli, P.; Pratta, G. 2013. Recombinación genética en generaciones segregantes de un híbrido de segundo ciclo de tomate. XLII Congreso Argentino de Genética - III Reunión Regional SAG-NOA. 20 al 23 de Octubre de 2013, Salta, Argentina. Publicado en Actas del Congreso ISSN: 1852-6233.

http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_issues&pid=1852-6233&lng=es&nrm=iso

Cabodevila, V.G.; Cacchiarelli, P.; Pratta, G. 2013. Phenotypic and molecular characterization of a tomato (*Solanum lycopersicum*) Second Cycle Hybrid and QTL detection in the F₂ segregating population. 4to. Congreso Argentino de Bioinformática y Biología Computacional (4CAB2C) y 4ta. Conferencia Internacional de la Sociedad Iberoamericana de Bioinformática (SolBio). 29 y 31 de octubre de 2013, Rosario, Argentina.

Cacchiarelli, P.; **Cabodevila, V.G.**; Pratta, G.R. 2013. Caracterización fenotípica y molecular mediante AFLP de retrocruzas de un híbrido de segundo ciclo en tomate (*Solanum lycopersicum*) y detección de QTLs. XV Congreso y XXXIII reunión Anual de la SBR. 28 y 29 de noviembre de 2013. Facultad de Ciencias Agrarias, UNR, Zavalla. Publicado en Actas del Congreso ISSN: 2314- 1484.

Cabodevila, V. G.; Cacchiarelli, P.; Masso, Y.; Pereira da Costa, J. H.; Rodríguez, G. R.; Pratta, G. R. 2014. Comparación de dos tipos de marcadores moleculares para la detección de QTLs en tomate (*Solanum lycopersicum*). XXXVII Congreso Argentino de Horticultura. Mendoza, Argentina, 23 al 26 de septiembre de 2014.

Cabodevila, V. G.; Madelón, E.; Picardi, L.A.; Pratta, G.R. 2014. Una aproximación multivariada a la detección de QTLs en un híbrido de segundo ciclo de tomate. XLIII Congreso Argentino de Genética – IV Reunión Regional SAG. San Carlos de Bariloche, Argentina, 19 al 21 de octubre de 2014. Publicado en Actas del Congreso ISSN: 1852-6233. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_issues&pid=1852-6233&lng=es&nrm=iso

Cabodevila, Victoria G.; Picardi, Liliana A.; Pratta, Guillermo R. Detección de QTLs asociados a caracteres morfológicos y vida pos-cosecha en frutos de tomate (*Solanum lycopersicum*). XVI Congreso y XXXIV Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario, Argentina, 4 y 5 de diciembre de 2014. Publicado en Actas del Congreso ISSN: 2314-1484.

de Diego, Julia; **Cabodevila, Victoria Guadalupe**; Pratta, Guillermo Raúl. 2015. Detección de regiones genómicas involucradas en la determinación de la calidad alimenticia de tomate mediante marcadores moleculares SSR. XXIII Jornada de Jóvenes Investigadores Grupo Montevideo (AUGM). La Plata, Argentina, 25, 26 y 27 de agosto de 2015.

Cabodevila, V. G.; de Diego, J.; Picardi, L.A.; Pratta, G.R. 2015. Diseño de estrategias de mejoramiento en un híbrido de segundo ciclo de tomate. XLIV Congreso Argentino de Genética – V Reunión Regional SAG. Mar del Plata, Argentina, 13 al 16 de septiembre de 2015. Publicado en Actas del Congreso ISSN: 1852-6233.

de Diego, Julia; **Cabodevila, Victoria G.**; Pratta, Guillermo R. 2015. Estimación de componentes de variancia genética en un híbrido de segundo ciclo de tomate (*Solanum lycopersicum*). XVII Congreso y XXXV Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario, Argentina, 30 de noviembre y 1 de diciembre de 2015. Publicado en Actas del Congreso ISSN: 2314-1484.

del Médico, A.P.; **Cabodevila, V.G.**; Vitelleschi, M.S.; Quaglino, M.B; Pratta, G.R. 2016. Heredabilidad para caracteres de interés agronómico estimada mediante análisis factorial múltiple. XXI Reunión Científica del Grupo Argentino de Biometría. 28, 29 y 30 de septiembre de 2016. Corrientes. Argentina.

del Médico, A.P.; **Cabodevila, V.G.**; Vitelleschi, M.S.; Pratta, G.R. 2016. Comparación de dos técnicas de Análisis de Datos a Tres Modos para caracterizar genotipos de tomate. XII Congreso Latinoamericano de Sociedades de Estadística (CLATSE). 25 al 28 de octubre 2016, Chiclayo, Lambayeque, Perú.

del Médico, A.P.; **Cabodevila, V.G.**; Vitelleschi, M.S.; Pratta, G.R. 2016. Estudio sobre la heredabilidad para caracteres de calidad en tomate mediante análisis de datos de tres modos. XVIII Congreso y XXXVI Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario, Argentina, 5 y 6 de diciembre de 2016. Publicado en Actas del Congreso ISSN: 2314-1484.

Cabodevila, V.G.; Cambiaso, V.; Rodríguez, G.R.; Picardi, L.A.; Pereira da Costa, J.; Zorzoli, R.; Capel, C.; Capel, J.; Lozano, R.; Pratta G.R. 2017. Mapeo físico y genético en una población de tomate por polimorfismos en la secuencia de sus progenitores. Simposio de Genómica Funcional de Plantas. 17 a 19 de mayo, Rosario, Argentina.

Del Médico, A. P.; **Cabodevila, V. G.**; Vitelleschi, M. S.; Lavallo, A.; Pratta, G. R. 2017. Asociación entre variabilidad molecular y fenotípica en tomate. Congreso Interamericano de Estadística (CIE). 17 al 20 de octubre de 2017. Facultad de Ciencias Económicas y Estadística de la Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Argentina.

Del Médico, A. P.; **Cabodevila, V.G.**; Vitelleschi, M.S.; Lavallo, A.; Pratta, G.R. 2017. Variabilidad genética en la generación segregante de un híbrido de segundo ciclo de tomate medida por AFLP y SSR. XIX Congreso y la XXXVII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Zavalla, Argentina, 28 y 29 de noviembre de 2017. Publicado en Actas del Congreso ISSN: 2314-1484.

4. Premios y reconocimientos:

“Mención en el concurso al Mejor Póster” en la XXI reunión Científica del Grupo Argentino de Biometría. 2016. Trabajo: “Heredabilidad para caracteres de interés agronómico estimada mediante análisis factorial múltiple”. Del Médico, A.P., Cabodevila, V.G., Vitelleschi, M.S., Quaglino, M.B., Pratta, G.R.

“Premio Sociedad de Biología de Rosario 2016 al Mejor Trabajo Científico en el Área Agropecuaria”. Trabajo: Estudio sobre la heredabilidad para caracteres de calidad en tomate mediante análisis de datos de tres modos”. Del Médico, A.P., Cabodevila, V.G., Vitelleschi, M.S., Pratta, G.R.

“Reconocimiento de la Facultad de Ciencias Económicas y Estadística de la Universidad Nacional de Rosario por el premio al mejor trabajo científico del Área Agropecuaria de la Sociedad de Biología de Rosario”. 2016. Trabajo: Estudio sobre la heredabilidad para caracteres de calidad en tomate mediante análisis de datos de tres modos”. Del Médico, A.P., Cabodevila, V.G., Vitelleschi, M.S., Pratta, G.R.

ÍNDICE
AGRADECIMIENTOS**PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS**

ÍNDICE	1
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	4
RESUMEN	5
ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓN	8
Origen y clasificación taxonómica	8
Características botánicas del tomate.....	10
Producción	11
Propiedades del tomate	11
Usos del tomate	13
Germoplasma silvestre y mejoramiento: una alternativa para mejorar caracteres de calidad	15
Genoma y genética molecular	15
Diferentes tipos de poblaciones.....	18
Marco de investigación donde está incluida esta Tesis	19
HIPÓTESIS	23
OBJETIVOS GENERALES	24
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
CAPÍTULO I	26
MATERIALES Y MÉTODOS	28
Materiales.....	28
Métodos.....	28
Caracterización molecular por perfiles de AFLP	28
Caracterización fenotípica por caracteres asociados a calidad de los frutos	29
Exploración del consenso entre la diversidad molecular y la variación para caracteres cuantitativos mediante Análisis de Procrustes Generalizado.....	32
RESULTADOS	33
Caracterización molecular, fenotípica y consenso entre la diversidad molecular y la variación para caracteres cuantitativos en la generación segregante F ₂ del HSC RIL18xRIL1.....	33

Caracterización molecular, fenotípica y consenso entre la diversidad molecular y la variación para caracteres cuantitativos en la generación segregante F ₂ del HSC RIL1xRIL8.....	46
Caracterización molecular, fenotípica y consenso entre la diversidad molecular y la variación para caracteres cuantitativos en la generación segregante F ₂ del HSC RIL1xRIL5.....	58
DISCUSIÓN	70
CAPÍTULO II	73
MATERIALES Y MÉTODOS	75
Materiales	75
Métodos.....	75
Estimación de parámetros genéticos.....	75
Detección de QTLs	75
Validación de QTLs detectados.....	76
RESULTADOS.....	77
Estimación de parámetros genéticos	77
Detección de QTLs.....	86
Validación de QTL detectados	90
DISCUSIÓN	91
CAPÍTULO III	98
MATERIALES Y MÉTODOS	100
Materiales	100
Métodos.....	100
Caracterización molecular por perfiles de SSR y detección de QTLs	100
Obtención y caracterización fenotípica de familias F ₃ provenientes de individuos F ₂ y estimación de la heredabilidad	102
RESULTADOS.....	106
Caracterización molecular por perfiles de SSR y detección de QTLs.....	106
Obtención y caracterización fenotípica de familias F ₃ provenientes de individuos F ₂ y estimación de la heredabilidad mediante RPP	108
DISCUSIÓN	113
CAPÍTULO IV	117
MATERIALES Y MÉTODOS	119
Materiales	119
Métodos.....	119

Detección de SNP utilizando la técnica de HRM	119
Diseño de cebadores	119
Chequeo del polimorfismo.....	121
Amplificación selectiva para HRM, escaneado de las placas y análisis de las fluorescencias	122
Chequeo de amplicones mediante secuenciación	123
Construcción y graficado del mapa genético	125
Caracterización fenotípica mediante caracteres relacionados a calidad de fruto	125
Detección de QTLs para caracteres de interés agronómico relacionados a fruto	125
RESULTADOS	126
DISCUSIÓN	141
CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES FINALES	147
BIBLIOGRAFÍA	152

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

a/b: cociente de absorbancias (relación entre las absorbancias a las longitudes de onda de 540 nanómetros(nm) (a) y 675 nm (b))

ACP: Análisis de Componentes Principales

ACoP: Análisis de Coordenadas Principales

ADN: ácido desoxirribonucleico

AFLP: polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (Amplified Fragment Length Polymorphism)

APG: Análisis de Procrustes Generalizado

BC: retrocruza (Backcross)

F₁: generación filial 1

F₂: generación filial 2

F₃: generación filial 3

GUPC: genotipos uniformes de primer ciclo

GUSC: genotipos uniformes de segundo ciclo

HSC: híbrido de segundo ciclo

HRM: fusión de alta resolución (High Resolution Melting)

L: porcentaje de reflectancia

LOD: logaritmo de probabilidades (Logarithm Of Odds)

MAS: selección asistida por marcadores (Marker Assisted Selection)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)

QTLs: *loci* de caracteres cuantitativos (Quantitative Trait *Loc*i)

RIL: líneas endocriadas recombinantes (Recombinant Inbred Lines)

SIM: mapeo por intervalo simple (Simple Interval Mapping)

SNP: polimorfismo de nucleótido simple (Single Nucleotide Polymorphism)

SSR: repeticiones de secuencia simple o microsatélite (Simple Sequence Repeats)

RESUMEN

El tomate es una de las hortalizas de mayor importancia económica mundial. A través del cruzamiento entre el cultivar argentino Caimanta de *Solanum lycopersicum* y la accesión LA722 de la especie silvestre *S. pimpinellifolium* mediante un programa de selección divergente-antagónica para el peso y la vida poscosecha de los frutos, se desarrollaron 17 líneas endocriadas recombinantes (RIL). Como resultado del cruzamiento entre RIL es posible obtener los llamados híbridos de segundo ciclo (HSC). En estos HSC es viable encontrar nueva variabilidad genética por recombinación de los genes seleccionados durante la obtención de las RIL progenitoras. El objetivo de la Tesis fue caracterizar fenotípica y molecularmente tres generaciones F_2 obtenidas de la autofecundación de tres HSC (RIL18xRIL1, RIL1xRIL8 y RIL1xRIL5), determinar la variabilidad existente en los dos niveles de caracterización, identificar regiones genómicas asociadas a caracteres de calidad de los frutos y seleccionar una generación segregante para iniciar un nuevo programa de mejoramiento. La caracterización molecular de las tres generaciones F_2 utilizando seis combinaciones de cebadores de AFLP (Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos Amplificados) originó en todas las poblaciones un número de bandas superior a 100 y un porcentaje de bandas polimórficas superior al 57%, determinando la presencia de una alta variabilidad molecular en todas las poblaciones. En el nivel fenotípico se evaluaron los caracteres del fruto: diámetro, altura, índice de forma, peso, vida poscosecha, firmeza, cociente de absorbancias (a/b), porcentaje de reflectancia (L), pH, sólidos solubles y acidez titulable. La variabilidad generada fue evidenciada dado que, en la mayoría de los casos, se identificaron individuos F_2 que tuvieron valores superiores o inferiores a los valores promedios de las RIL. Por otro lado, la aplicación de diferentes herramientas multivariadas permitió conocer, en una primera aproximación integral, las diferentes estructuras de las poblaciones. En el Análisis de Componentes Principales, en las tres generaciones, fueron necesarias las primeras cuatro componentes para explicar cerca del 80% de la variabilidad fenotípica. Analizando la variabilidad molecular con el Análisis de Coordenadas Principales, para obtener el mismo porcentaje de variabilidad, fueron necesarias 12 o más coordenadas. El consenso obtenido entre ambas clases de variabilidad por un Análisis de Procrustes Generalizado fue superior al 64% en todas las F_2 . La alta asociación entre la información en los niveles fenotípico y molecular encontrada en esta primera aproximación fue profundizada mediante la estimación de diferentes parámetros genéticos y la detección de QTLs (*loci* de caracteres cuantitativos) por métodos convencionales. Respecto al grado de dominancia, en general, predominó la dominancia completa, aunque también se observó dominancia parcial,

sobredominancia y aditividad pura, pero en menor medida. Por otro lado, las tres generaciones presentaron los mayores valores de heredabilidad para los caracteres pH, sólidos solubles y acidez titulable. Se detectó un amplio número de QTLs para la mayoría de los caracteres en las tres generaciones, aunque ninguno de ellos se pudo validar ya que no fueron comunes. La generación F_2 del HSC RIL18xRIL1 presentó el mayor número de QTLs detectados y asociados a todos los caracteres; en consecuencia, fue seleccionada para hacer una caracterización molecular más exhaustiva y derivación de familias F_3 . En relación a la caracterización molecular se llevó a cabo utilizando marcadores de tipo SSR (Repeticiones de Secuencia Simple) y SNP (Polimorfismo de Nucleótido Simple). Por un lado, se utilizaron 12 combinaciones de cebadores de SSR de los cuales el 92% resultaron ser polimórficos. Con estos SSR polimórficos se detectó un total de siete QTLs para peso, vida poscosecha, ambos atributos de color (L y a/b), sólidos solubles y acidez titulable. Dos de ellos (asociados a a/b y a vida poscosecha) pudieron ser validados ya que también fueron identificados en una población retrocruza relacionada. Por otro lado, al disponer de las secuencias de Caimanta y la accesión LA722, se desarrollaron marcadores altamente específicos del tipo SNP. Se utilizaron 130 SNP localizados en los 12 cromosomas de la especie cultivada. De ellos, sólo el 59% segregaron en los individuos de la generación F_2 , y con ellos se detectaron siete QTLs para diámetro, peso e índice de forma. Se elaboró un mapa físico y genético. Mediante el primero, se pudo estimar que las regiones no segregantes fueron levemente superiores al 50% mientras que el porcentaje de regiones segregantes fue de unos puntos por debajo del 50% (46%). En cuanto al mapa genético, se obtuvieron 23 grupos de ligamiento. En relación al avance a la siguiente generación de autofecundación, aplicando criterios fenotípicos y moleculares se seleccionaron 18 individuos F_2 para obtener las familias F_3 , que fueron caracterizadas fenotípicamente para los mismos atributos que sus progenitores. Se detectaron heredabilidades en sentido estricto significativas para diámetro, altura, índice de forma, peso, pH y acidez titulable. Se concluye que a través de la caracterización fenotípica y molecular con los diferentes tipos de marcadores de ADN utilizados se pudo corroborar que los HSC presentan combinaciones genotípicas favorables entre los genes que fueron seleccionados en generaciones previas. Estas nuevas combinaciones originaron variabilidad genética en el nivel molecular y fenotípico. También fue posible identificar numerosos QTLs mediante los diferentes marcadores moleculares y validar algunos de ellos. Con la información obtenida en estas generaciones tempranas se seleccionaron individuos dentro de la población base seleccionada para obtener familias F_3 , para iniciar en base a estos resultados un nuevo programa de mejoramiento genético para los caracteres de calidad de fruto.

ABSTRACT**Phenotypic and molecular characterization in the segregating generations of three tomato second cycle hybrids: QTL validation for fruit quality traits**

F₂ segregating progeny from three tomato second cycle hybrids (SCH) were obtained from crossing RIL (Recombinant Inbred Lines), which were derived from an interspecific cross between *Solanum lycopersicum* cv. Caimanta and the accession LA722 from *S. pimpinellifolium*. The objectives of this Thesis were to characterize three F₂ populations by molecular markers and morphological traits in order to evaluate the molecular and morphological variability, to identify genetics regions associated to quality fruit traits and to select the best population to begin a new breeding program. The phenotypic fruit traits evaluated were: diameter, height, weight, shape index, post-harvest life, firmness, absorbance index, reflectance percentage, pH, soluble solids and titratable acidity. A high molecular diversity was found through six AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). Also a high level of morphological diversity was found using the phenotypic traits. Different multivariate analyses were used to assess the degree of concordance among these two approaches. High consensus was found between these methods suggesting that it could be possible to detect QTLs (Quantitative Trait *Loc*i) for these traits. Several QTLs were identified for most of the traits. Because of the promissory characteristics of the F₂ derived from the SCH RIL18xRIL1, this population was selected to be characterized by other DNA markers and to obtain individuals to generate the F₃ families. Using 12 primer combinations of SSR (Simple Sequence Repeats), seven QTLs were detected for weight, shelf life, absorbance index, reflectance percentage, soluble solids and titratable acidity. Sequences of both parental of these RIL allowed designing specific SNP (Single Nucleotide Polymorphism) markers. Scattered over the 12 chromosomes, 130 SNP were used and seven QTLs were found for diameter, weight and shape index. The physic map obtained showed that the not segregating regions were slightly higher than 50%, while the percentage of segregating regions was below 50% (46%). The genetic map exhibited 23 linkage groups. Besides, through the phenotypic and molecular data obtained, 18 F₂ individuals were selected to generate F₃ families. The phenotypic and molecular characterization here obtained has allowed detecting favourable genotypic combinations among the genes that were selected in previous generations. Also, several QTLs were identified. The information obtained in these early generations together with these F₃ families indicates that it could be possible to initiate a new breeding program to improve fruit quality traits.

INTRODUCCIÓN

El tomate es una de las hortalizas de mayor importancia económica mundial, además de ser un sistema modelo para el desarrollo del fruto (Nuez *et al.*, 2004; The Tomato Genome Consortium, 2012). Como todo organismo vivo, el fruto de tomate madura, ya sea en la planta o fuera de ella, por lo tanto cualquier intento de prolongar su vida poscosecha favorece la comercialización y disminuye las pérdidas, estimadas en aproximadamente el 50 % de lo producido en países en desarrollo (Meli *et al.*, 2010). Por lo tanto, con el exigente y cambiante mercado, es necesario mejorar atributos relacionados a calidad, tanto interna como externa del fruto.

Por un lado, los genotipos cultivados aportan los genes que fueron seleccionados durante la obtención de los mismos, generalmente son frutos de alto peso, color y forma adecuados, aunque a veces se dejan de lado características organolépticas. Por otro lado, las variedades silvestres generalmente aportan resistencias a diferentes enfermedades y representan una fuente importante de variabilidad.

En el presente trabajo, se evaluaron tres generaciones de híbridos de segundo ciclo (HSC) de tomate las cuales se originaron a partir de cruzamientos entre líneas endocriadas recombinantes (RIL) obtenidas mediante un cruzamiento entre un cultivar comercial y una accesión silvestre. Se detectaron las combinaciones genotípicas favorables entre aquellos genes que fueron seleccionados en generaciones previas para caracteres de calidad y vida poscosecha de frutos y que fueron fijados durante el proceso de obtención de las RIL.

Origen y clasificación taxonómica

El tomate pertenece a la familia de las *Solanaceae* que incluye a más de 3000 especies. La sección *Lycopersicum* del género *Solanum* consiste en 13 especies con subespecies: el tomate cultivado, *Solanum lycopersicum*, el cual es el único domesticado, y 12 especies silvestres y subespecies (tales como *S. chmielewskii*, *S. habrochaites*, *S. pennellii* y *S. pimpinellifolium*, o *S. lycopersicum* variedad (var.) *cerasiforme*) (Raiola *et al.*, 2014).

Tomatl es una palabra mexicana de la lengua Nahuatl, que designa a una planta con frutos. Este *tomatl* era muy cultivado en México, aunque no era originario de esta región. De hecho, las especies silvestres son originarias de la región de los Andes, repartida entre lo que hoy sería Chile, Colombia, Ecuador, Bolivia y Perú (Hedde *et al.*, 1984). La palabra tomate fue introducido en la lengua castellana en 1532 (Corominas, 1987).

Según describen Peralta y Spooner (2000), desde que el tomate fue introducido en Europa en el siglo XVI, los botánicos reconocieron la cercanía de los tomates con el género *Solanum*, y fue identificado como *S. pomiferum*. Aun así, su posición genérica dentro de las Solanáceas ha sido controvertida. Linneo en 1753 ubicó a los tomates en *Solanum* mientras que Miller, un contemporáneo de Linneo, los incluyó dentro del nuevo género *Lycopersicon*. Posteriormente, la mayoría de los botánicos siguieron la clasificación de Miller. Recientes investigaciones moleculares han mostrado que los tomates y las papas están muy relacionadas filogenéticamente y apoyan la inclusión de los tomates dentro de *Solanum* (Peralta y Spooner, 2000).

El tomate cultivado (*S. lycopersicum* L.) es entonces miembro de las familias de las Solanáceas, género *Solanum* L. y sección *Lycopersicon* (Peralta *et al.*, 2008). Sus antecesores silvestres son nativos del oeste de Sud América, incluyendo las Islas Galápagos. *S. pimpinellifolium* L., es considerado como el antecesor silvestre más cercano al tomate cultivado. Las accesiones fueron encontradas en Perú y Ecuador. *S. lycopersicum* se divide en dos variedades botánicas: *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* y *S. lycopersicum* var. *lycopersicum*. La primera variedad es nativa de la región andina abarcando Perú y Ecuador, pero también es encontrado en regiones subtropicales de todo el mundo. A pesar de no haber barrera reproductiva entre ambas variedades, las montañas de los Andes imponen una fuerte barrera física y ecológica para la reproducción cruzada entre estas especies (Blanca *et al.*, 2015).

La domesticación se puede considerar como el primer paso en la mejora vegetal. *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* fue propuesto como evolucionariamente intermedio entre *pimpinellifolium* y *lycopersicum*, o alternativamente una mezcla resultante de la hibridación entre ambas. El lugar de la domesticación aún se mantiene incierto. Tanto Mesoamérica o Ecuador y el norte de Perú, cerca de la zona originaria de *pimpinellifolium*, han sido propuestas como centros de la domesticación. Blanca *et al.* (2012), basados en información molecular y morfológica, establecen que *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* se originó a partir de *S. pimpinellifolium*. El tomate luego fue domesticado a partir de *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* en un proceso compuesto por varias fases. La primera, una predomesticación, fue llevada a cabo en la región andina, en la cual *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* desarrolló una notable diversidad morfológica en la cual se incluyen frutos más grandes. Esos materiales luego fueron llevados a Mesoamérica y fue allí donde se originó la verdadera domesticación, creándose las variedades de tomate de fruto grande (Blanca *et al.*, 2012). Estos procesos de domesticación y mejoramiento continúan en el presente. El germoplasma

de tomate no es actualmente estático como tampoco lo es la adaptación a las necesidades humanas y a su consumo.

Características botánicas del tomate

La planta de tomate es una planta perenne, de porte arbustivo y que se cultiva como anual. Se puede desarrollar de manera rastrera, semierecta o erecta. La estructura de la planta es la de un simpodio (Chamarro Lapuerta, 2001).

El tallo tiene dos a cuatro centímetros (cm) de diámetro en la base y está cubierto de pelos glandulares y no glandulares. El tallo principal forma de seis a 12 hojas, que crecen lateralmente antes de que la yema principal se transforme en una inflorescencia. El crecimiento subsiguiente se origina por la yema axilar de la última hoja, la cual desarrolla un tallo secundario que crece como una prolongación del primario y desplaza lateralmente la inflorescencia. Los sucesivos segmentos del tallo se desarrollan de manera similar, produciendo inflorescencias cada tres hojas. Cuando este proceso se repite indefinidamente los cultivares se denominan indeterminados. Estos cultivares son muy adecuados para la recolección continua, ya que florecen y fructifican de manera regular. Por el contrario, los cultivares determinados tienen un crecimiento limitado. Los segmentos sucesivos del eje principal soportan un número inferior de hojas y terminan en una inflorescencia. Ya que la floración y fructificación se produce de manera más concentrada, se permite la recolección mecánica.

En cuanto a la semilla, esta posee forma lenticular y recubierta de pelos.

El sistema radicular está compuesto por la raíz principal, las raíces secundarias y las raíces adventicias.

Las hojas son pinnado compuestas. Los folíolos son usualmente peciolados y lobulados irregularmente con bordes dentados. A su vez, están cubiertas con pelos del mismo tipo que los del tallo.

En cuanto a la flor, la misma es perfecta, regular e hipógina y consta de cinco o más sépalos, cinco o más pétalos, de color amarillo, dispuestos en forma helicoidal. Posee igual número de estambres que se alternan con los pétalos. Posee ovario bi o plurilocular. Las inflorescencias son del tipo racemosas.

Los frutos son bayas bi o pluriloculares. Su peso final en madurez oscila entre los cinco y los 500 gramos (g) aproximadamente, dependiendo de la variedad. El fruto está constituido básicamente por el pericarpio, tejido placentario y las semillas, y está unido a la planta por un pedicelo.

Producción

La producción de tomate a nivel mundial es de 170.750.076 toneladas (tn), de las cuales Argentina produce 667.972 tn (0,39%). En cuanto al área cosechada, a nivel mundial se destinan unas 5.023.810 hectáreas (ha), de las cuáles en Argentina se destinan unas 15.975 ha (0,32%) (FAOSTAT, 2014).

En relación al total de la producción hortícola, las provincias de Mendoza, Buenos Aires y Córdoba, son las que aportan mayor porcentaje a la producción. Por su parte, la provincia de Santa Fe, aporta un 4,3% a la producción hortícola total (Censo Nacional Agropecuario, 2008).

La mayoría de las grandes ciudades cuentan con un área cercana en la cual se cultivan hortalizas cuyo principal destino es el abastecimiento de esa población urbana. Podemos definir “cinturón verde” al territorio ocupado por quintas o huertas familiares y comerciales que rodea a las ciudades y donde se producen hortalizas para abastecer a la población urbana. Se destacan los cinturones hortícolas del área metropolitana de Buenos Aires, La Plata, Rosario, Córdoba, Mar del Plata, Mendoza y Tucumán.

El cinturón hortícola de Rosario es una zona muy importante, no sólo productivamente sino en cuanto a la comercialización, ya que abastece a más de dos millones de habitantes de la región. El mismo incluye a los departamentos de Rosario, Constitución y San Lorenzo (un productor de San Jerónimo es considerado en los censos como parte del mencionado cinturón por las características del destino de la producción y otras características socio-económicas). Acorde con el censo 2011-2012 (Grasso *et al.*, 2013), la superficie destinada a hortalizas fue de 2.485 ha, representando un 49,3% del total. Comparado con el censo 2007-2008 (Ferrato *et al.*, 2009), se observa una caída del 18,79% (3.060 ha). En relación a la producción de tomate a campo, al comparar ambos censos, se observa una disminución del 66,66% (de 27 ha (2007-2008) a 9 ha (2011-2012)). Mientras que la reducción de tomate producido en invernadero fue menor (27,27%, pasando de 22 ha (2007-2008) a 16 ha (2011-2012)).

Propiedades del tomate

El consumo regular de tomate y de sus productos está asociado con un bajo riesgo de enfermedades como las cardiovasculares, coronarias, hipertensión, diabetes, y varios tipos de cáncer, debido a la interacción de fitoquímicos con vías metabólicas relacionados a

respuestas infamatorias y estrés oxidativos (Raiola *et al.* 2014). Dentro de los compuestos del tomate, se encuentran carotenoides, vitaminas y compuestos volátiles.

Los carotenoides son pigmentos orgánicos del grupo de los isoprenoides y son el grupo más representativo de los tetraterpenos. Varios estudios han reportado los beneficios de los carotenoides en relación a su poder antioxidante, tal como en la estimulación del sistema inmune y la actividad antitumoral (Raiola *et al.*, 2014). Dentro de los carotenoides se encuentran el licopeno, β - caroteno y luteína. Los carotenoides, incluyendo el licopeno, pueden ser potentes antioxidantes y son especialmente eficaces contra las especies reactivas del oxígeno (ERO) (Story *et al.*, 2010). Por su parte el β - caroteno, es considerado una provitamina porque se puede convertir en retinol, un compuesto esencial para la vista. También posee propiedades antioxidantes (Raiola *et al.*, 2014). Respecto a la luteína (junto a la zeaxantina y meso-zeaxantina) cumple un rol fundamental en la salud ocular, ya que se encuentran en la mácula y son considerados como pigmentos maculares. Bajos niveles de estos pigmentos están asociado a altos riesgos de degeneración macular relacionada a la edad (Scripsema *et al.*, 2015).

Por su parte, las vitaminas cumplen un rol muy importante. La familia de la vitamina E, incluye ocho moléculas: α -, β -, γ - y δ -tocoferol y α -, β -, γ - y δ -tocotrienol. Estas moléculas son potentes antioxidantes liposolubles (Raiola *et al.*, 2014). La vitamina C está presente en las frutas, verduras y patatas en forma de ácido L-ascórbico y ácido dehidroascórbico. El ascorbato es, probablemente, el antioxidante hidrosoluble más efectivo presente en el plasma. Es capaz de atrapar y reducir nitritos, inhibiendo por tanto la formación en el estómago de compuestos carcinogénicos N-nitrosos. Los estudios *in vitro* sugieren que ejerce un papel protector contra el daño oxidativo de los constituyentes celulares y las lipoproteínas circulantes (Zapata *et al.*, 2007). La vitamina C en tomate es altamente biodisponible, por lo que un consumo regular de pequeñas cantidades de productos de tomate puede aumentar la protección de las células contra el daño del ADN inducido por especies oxidantes (Raiola *et al.*, 2014). La vitamina A, retinol o antixeroftálmica, es una vitamina liposoluble que interviene en la formación y mantenimiento de las células epiteliales, en el crecimiento óseo, el desarrollo, protección y regulación de la piel y de las mucosas. Desempeña un papel importante en el desarrollo de una buena visión, especialmente ante la luz tenue. El β -caroteno, es un precursor de la vitamina A, y tiene propiedades antioxidantes que ayudan a eliminar radicales libres previniendo el envejecimiento celular.

En cuanto a los compuestos volátiles (fenoles), se pueden mencionar los flavonoides, ácidos fenólicos y taninos. Los flavonoides pueden comportarse como antioxidantes y pro-

oxidantes (Pérez Trueba, 2003). El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplemento (Martínez-Flórez *et al.*, 2002). Los ácidos fenólicos incluyen los ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámico, y son principalmente estudiados por su rol de antioxidantes. En cuanto a los taninos, incluyen a los compuestos de taninos hidrolizables que son polímeros del ácido elágico, o ácidos gálico y elágico, con glucosa y taninos condensados (proantocianidinas), que se derivan de la condensación de monómeros de unidades de flavanoles. Su capacidad antioxidante es ejercida por los radicales libres, quelantes de metales traza, y proteína de unión (Raiola *et al.*, 2014).

Usos del tomate

Pocos productos hortícolas permiten tanta diversidad de usos como el tomate. Según Diez Niclos (2001) su uso se podría clasificar en:

- Consumo en fresco: se prefieren los tomates medianos a grandes. En el caso gourmet, o para decoración, se prefieren las variedades de tamaño pequeño y redondo (tipo cereza o cherry).

- Procesado industrial: sin bien son importantes las características externas, prevalecen más las características de calidad internas tales como acidez, contenido en azúcares y materia seca. Sus usos son variados: tomate al natural pelado, jugo de tomate, puré, pasta o concentrado de tomate, salsa de tomate, tomate en polvo, tomate confitados o encurtidos.

En el caso del mercado del tomate fresco tanto local como mundial, debe ser abastecido continuamente ya que el consumo mundial de tomate fresco ha aumentado a razón de 1 kilo por habitante por año en estos últimos 10 años. El tomate fresco argentino tiene como destino principal el mercado interno y dentro de él a los supermercados. La exportación de tomate en fresco o refrigerado es realmente baja, registrándose un volumen promedio de estos últimos 5 años de 6000 tn de tomate, siendo los países limítrofes el principal destino. Argentina se encuentra en el puesto número 47 de exportadores mundiales de tomates frescos o refrigerados. Se estima que exporta menos del 1 % de su producción (Ministerio de Agroindustria, 2017). El destino principal de sus exportaciones son los países limítrofes destacándose Paraguay, absorbiendo el 70 % del mercado. Se estima que en Argentina se producen anualmente cerca de 1,2 millones de tn de tomate. Cabe destacar que dicho volumen no llega a cubrir la demanda del mercado interno. Por ende, aún queda un amplio margen para aumentar la producción nacional. En 2016, Argentina

importó de Brasil un volumen de 1.851 tn, debido principalmente a la disminución de la producción nacional afectada por las inclemencias (granizo). Anualmente ingresa al Mercado Central de Buenos Aires un volumen promedio de 120.000 tn de tomate fresco provenientes de la región NEA (Corrientes), NOA (Salta y Jujuy), Cuyo (Mendoza y San Juan) y Bonaerense (La Plata). La estimación de la superficie destinada a la producción de tomate para el año 2016 fue de 800 ha (en invernadero y a campo) para la región del NEA (Corrientes), de 2000 ha (protegido y a campo) para la región del NOA (Salta y Jujuy), de 4700 ha (protegido y a campo) para la región de Cuyo (Mendoza: 3600 ha y San Juan: 1100 ha) y de 8000 ha (principalmente invernadero) para la región Bonaerense (La Plata) (Ministerio de Agroindustrias, 2017).

En cuanto al tomate para industria los productos que se elaboran principalmente son las conservas de tomate entero, cubeteado y pastas y en menor medida el deshidratado o seco el cual ha tenido un mayor desarrollo en el último quinquenio. La producción de tomate para industria se basa en la variedad perita u oblongo, concentrándose en su mayoría en las provincias de Cuyo, NOA y Río Negro (Ministerio de Agroindustrias, 2016). Argentina se encuentra en el puesto número 12 con una producción de 488.000 tn anuales. El tomate para industria en Argentina posee tal importancia que se encuentra en sexto lugar en el rubro hortalizas procesadas. Los tomates en conserva (en trozos o enteros) representan el principal producto de exportación dentro de la cadena de conserva vegetales. Las exportaciones argentinas de tomate en conserva tuvieron como destino Paraguay y Brasil con una participación en el valor del mercado del 40%, Cuba con un 9,5% y Uruguay con una participación de un 8%, entre otros. Se exportan concentrados o puré de tomate y salsas principalmente a Paraguay y Uruguay, y tomates pelados a Brasil para la industria hotelera. En 2016 se ha visto disminuida la producción debido principalmente al granizo que ocasionó graves pérdidas. De este modo se importó tomate pelado, ketchup y fundamentalmente pasta de tomate desde Chile, por un volumen de 34.900 tn (Ministerio de Agroindustria, 2017). Mundialmente se comercializan unos 6,2 millones de tn por un valor de 6.200 millones de dólares. En los últimos 10 años el comercio total de conservas de tomate tuvo un crecimiento del 38,3% destacándose el desarrollo de las salsas con un 66% (Ministerio de Agroindustria, 2016).

Germoplasma silvestre y mejoramiento: una alternativa para mejorar caracteres de calidad

Existe una gran variedad de especies silvestres y con el correr del tiempo, las mismas han sido utilizadas como dadores de algunos caracteres de calidad. El interés en estas especies silvestres radica en que, las mismas han superado diversos procesos selectivos durante la adaptación a los ambientes siendo en ellas posible encontrar resistencia a insectos y enfermedades, tolerancia a condiciones ambientales adversas, mejores atributos de calidad de fruto, entre otras características de interés agronómico (Pratta *et al.*, 1996). Comparado con otros antecesores silvestres, *S. pimpinellifolium* L. tiene varios caracteres deseables y significativamente menos características no deseables (Capel *et al.*, 2015). Pratta *et al.* (2003a), al evaluar cruzamientos inter e intra varietales entre el cultivar comercial *S. lycopersicum* cultivar (cv.) Caimanta (tipo 'Platense') y accesiones silvestres (*S. lycopersicum* var. cerasiforme accesión LA1385 y *S. pimpinellifolium* accesión LA722) y cultivares mutantes (Nor: sin maduración (non ripening) y Rin: maduración inhibida (ripening inhibitor)), concluyeron que todos los híbridos, en los cuales uno de los progenitores fue un genotipo silvestre, tuvieron un desarrollo vegetativo adecuado, buen número de flores por racimo y una vida en estantería más prolongada. En base a estos resultados proponen la incorporación del germoplasma silvestre para el mejoramiento de atributos que confieren calidad al fruto del tomate. A su vez Pratta *et al.* (2003b), establecieron que el híbrido 'Caimanta x LA722' sería el híbrido más promisorio al considerar que los progenitores presentaban la mayor diferencia en las frecuencias alélicas y la mayor divergencia genética.

Genoma y genética molecular

Desde los comienzos, el objetivo del mejoramiento vegetal ha sido seleccionar genotipos superiores a partir de la identificación de fenotipos superiores, dependiendo el éxito del número de genes involucrados en el control del carácter (herencia monogénica o poligénica), las relaciones interalélicas (dominancia o aditividad) y por supuesto la respuesta a las influencias ambientales (Martínez *et al.*, 2010).

Es un hecho conocido hoy en día que a través del uso de marcadores de ADN se aumenta la eficiencia y precisión en los programas de mejoramiento vegetal. El uso de marcadores de ADN en el mejoramiento se conoce como selección asistida por marcadores (MAS) y es un componente de la nueva disciplina del mejoramiento molecular (Collard y Mackill, 2008). La MAS puede incrementar la ganancia por unidad de tiempo y por unidad de

costo en los programas de mejoramiento, especialmente cuando la determinación del fenotipo de los caracteres de interés demora tiempo, es caro o errático (Bernardo, 2008)

Los marcadores genéticos permiten detectar diferencias genéticas entre organismos o especies aunque no indiquen la región blanco de un gen, y solo pueden actuar como señales (Collard *et al.*, 2005). El lugar que ocupa ese marcador en el genoma es conocido como *locus* (del latín lugar, *loci* en plural) siendo su utilidad que éstos pueden encontrarse asociados a caracteres fenotípicos. Por otro lado, la variación fenotípica es usualmente continua y condicionada por la variación alélica de varios *loci*, cada uno con un pequeño efecto. A estos caracteres cuya variación es continua y determinada por la segregación de múltiples *loci* se los conoce como caracteres cuantitativos y de herencia poligénica. Los *loci* que controlan un carácter cuantitativo son denominados como poligenes o *loci* de caracteres cuantitativos (QTL) (Tanksley, 1993).

Los marcadores que pueden revelar diferencias entre individuos (de la misma o diferentes especies) son llamados polimórficos, mientras que los que no pueden discriminar entre genotipos se llaman monomórficos.

Hay tres tipos de marcadores genéticos: marcadores morfológicos, marcadores bioquímicos y marcadores de ADN.

Los marcadores morfológicos son usualmente características fenotípicas de identificación visual como color de flor, forma de semilla, hábitos de crecimiento o pigmentación (Collard *et al.*, 2005). Por otro lado, los marcadores bioquímicos son aquellos polimorfismos presentes en ciertas proteínas (Martínez *et al.*, 2010). Ambos tipos de marcadores poseen como desventaja que su número es limitado y están influenciados por factores ambientales o estados de desarrollo de la planta (Winter y Kahl, 1995).

En cuanto a los marcadores de ADN éstos se pueden dividir en tres clases:

- Basados en la hibridación del ADN: entre ellos los RFLP (Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción) y VNTR (Repeticiones en Tándem en Número Variable).

- Basados en la amplificación a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR): se encuentran los RAPD (ADN Polimórfico Amplificado Aleatoriamente), AFLP (Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos Amplificados) y SSR (Repeticiones de Secuencia Simple).

- Basados en la secuencia de ADN: como los SNP (Polimorfismo de Nucleótido Simple) e InDel (Inserción/Delección).

Cada uno de estos marcadores de ADN, varían en cuanto a costo, reproducibilidad, tiempo empleado, robustez, entre otras características.

Los marcadores AFLP son del tipo dominantes, es decir, no se puede distinguir el genotipo heterocigota. A su vez, son multi-*loci* y generan un alto nivel de polimorfismo, aunque la técnica es más laboriosa y requiere mayor cantidad de ADN, si bien no se requiere para su utilización conocer la secuencia del individuo para su utilización. Por otro lado, los SSR son marcadores codominantes, es decir, se puede distinguir el genotipo heterocigota, son de único *locus*, aunque técnicamente más simples, robustos y confiables, se requiere conocer la secuencia, al menos, de la región flanqueante al SSR para poder diseñar los cebadores (Collard *et al.*, 2005). En relación a los marcadores SNP se basan en la detección de polimorfismos resultantes de la alteración en una única base en la secuencia de ADN. Son, al igual que los SSR, de único *locus* y codominantes y constituyen aproximadamente el 90% de la variación genética en un organismo (Gupta *et al.*, 2008). Se encuentran distribuidos a lo largo del genoma, proveen marcadores estables para análisis genéticos y su detección es factible de automatizar (Sim *et al.*, 2012). Además de poder identificar los genotipos heterocigotas, el disponer de marcadores del tipo codominantes, permite calcular el grado de dominancia de los QTLs detectados.

Existe una gran cantidad de trabajos publicados, en los cuales se usan marcadores de ADN.

Thomas *et al.* (1995), utilizando AFLP, hallaron tres marcadores que co-segregaban con el gen Cf-9, responsable de la cladosporiosis del tomate (*Cladosporium fulvium*). Pratta *et al.* (2006) mediante AFLP evaluaron diferencias entre porcentaje de callos, regeneración y tasa de productividad en RIL de tomate. Miao *et al.* (2009), encontraron dos marcadores de AFLP ligados a la resistencia a la marchitez bacteriana del tomate (*Ralstonia solanacearum*). A su vez, Pratta *et al.* (2011a; 2011b), caracterizaron 16 RIL de tomate con AFLP y por caracteres fenotípicos, encontrando un alto porcentaje de polimorfismo molecular y hallando asociación (QTLs) entre los caracteres fenotípicos y las bandas de AFLP. En el caso de SSR, Pereira da Costa *et al.* (2013), comparando una población BC1 (retrocruza 1) y BC2 (retrocruza 2) y BC1S1 (autofecundación de la retrocruza 1) encontraron QTLs para diferentes caracteres de interés agronómico. Capel *et al.* (2015) en una población de RIL (del cruzamiento entre *S. lycopersicum* cv. Moneymaker y *S. pimpinellifolium* accesión To937) localizaron QTLs asociados a sólidos solubles totales, acidez titulable, fructosa, entre otros caracteres.

La aparición de la secuenciación masiva en paralelo, conocida como secuenciación de próxima generación, ha cambiado de manera drástica las estrategias de secuenciación del ADN y ha acelerado la secuenciación de genomas, no solamente de organismos unicelulares y plantas modelos, sino de plantas con genomas más complejos (Hirakawa *et*

al., 2013). Esta nueva tecnología ha sido utilizada para una gran variedad de aplicaciones, entre ellas el desarrollo de SNP, tanto en aquellas especies con un genoma de referencia disponible como en aquellas en las cuales no se dispone (Varshney *et al.*, 2009).

Referido a los SNP, numerosos trabajos han utilizados estos marcadores para determinar el genotipo de distintos cultivares y accesiones de tomate y posterior evaluación de las relaciones evolutivas y origen del mismo (Sim *et al.*, 2012; Blanca *et al.*, 2012). También, Capel *et al.* (2015) encontraron SNP asociados a diferentes atributos agronómicos.

En mayo de 2012, se publica el genoma de tomate (The Tomato Genome Consortium, 2012). Esta actividad fue realizada por un consorcio en la cual participaron científicos de varios países y la información está disponible.

Diferentes tipos de poblaciones

Los programas de mejoramiento pueden utilizar distintos tipos de poblaciones, generarlas o hacer uso de las ya existentes. Existen diferentes tipos de poblaciones derivadas de cruzamientos biparentales, cada una de ellas posee sus ventajas y desventajas, en cuanto a la facilidad y tiempo para la obtención, reproducibilidad, entre otras.

La población F_2 (filial 2) es originada a partir de la autofecundación de un individuo F_1 (filial 1), el cual resulta del cruzamiento entre dos líneas puras. Cada individuo F_2 posee combinaciones únicas de cada uno de los padres, o sea, cada individuo F_2 es genéticamente diferente al otro, por lo que estas poblaciones no se pueden replicar en ambientes y años, y tampoco, en estas poblaciones es posible evaluar la interacción genotipo-ambiente, excepto si se las reproduce mediante propagación asexual. Se definen como poblaciones “efímeras” y no se pueden mantener en el tiempo (salvo, como ya se comentó mediante reproducción asexual) (Singh y Singh, 2015). La principal ventaja es la facilidad y el relativo corto tiempo necesario para su obtención.

Las RIL se originan por avanzadas autofecundaciones derivadas de individuos heterocigóticos F_1 durante seis a ocho generaciones. Las RIL son líneas homocigotas y tienen en su constitución genética fragmentos recombinados al azar del genoma de ambos progenitores a lo largo de los cromosomas. Pueden contener en menor proporción fragmentos heterocigotas, dependiendo del número de generaciones (a mayor número de autofecundaciones, menor la heterocigosidad). Al ser homocigotas, estas poblaciones pueden ser propagadas indefinidamente, sin cambios en el genotipo, lo cual hace a estas

poblaciones “perpetuas” (anteriormente se las denominaba “inmortales”). Una de las principales desventajas, es su tiempo de obtención, ya que son necesarias entre seis a ocho generaciones de autofecundación (Collard *et al.*, 2005). Otra de las desventajas es su dificultad de obtención en aquellas especies con depresión por endocria o alógamas exclusivas (Singh y Singh, 2015).

Como resultado del cruzamiento entre RIL se originan los HSC. Su principal ventaja es que puede haber genotipos únicos que son capaces de superar a la mejor de las RIL (De Toledo *et al.*, 1984). El tiempo destinado a su obtención, es más largo, si se tienen en cuenta la producción previa de las líneas.

Las poblaciones retrocruzas (BC) se obtienen al cruzar un individuo homocigota que posee el carácter o alelo de interés (el parental dador) con un individuo homocigota que no posee ese carácter o alelo (parental recurrente). Luego esa F_1 es retrocruzada contra el padre recurrente. La principal ventaja es la facilidad y el relativo corto tiempo necesario para su obtención (Collard *et al.*, 2005). Pero las mismas no son reproducibles, tales como las F_2 . Si las especies lo permiten, la reproducibilidad se podría lograr a través de una reproducción vegetativa.

Las líneas casi isogénicas (NIL) se originan luego del proceso de retrocruza sucesivas contra el parental recurrente y una posterior autofecundación. Las mismas no son más que líneas idénticas al padre recurrente con la excepción de ese gen/*locus* ingresado desde el padre dador. En cada generación de retrocruza, se reduce en 50% el genoma del parental dador (Singh y Singh, 2015). Como desventaja se presenta el tiempo de obtención de las mismas (entre ocho a diez generaciones), pero poseen la ventaja de ser poblaciones del tipo perpetuas.

Por último, las poblaciones de dobles haploides (DH) se pueden producir por duplicación cromosómica a partir de óvulos (ginogénesis) o a partir de granos de polen (androgénesis) (Forster *et al.*, 2007). Las especies destinadas a producir DH, deben soportar el cultivo de tejidos. La ginogénesis es usada en cebolla, remolacha y algunos árboles, mientras que la androgénesis es usada en cebada (Forster *et al.*, 2007). Los DH al ser homocigotas, se pueden multiplicar y reproducir sin que ocurran cambios genéticos, lo cual permite su permanencia en el tiempo y en diferentes ubicaciones (Collard *et al.*, 2005).

Marco de investigación donde está incluida esta Tesis

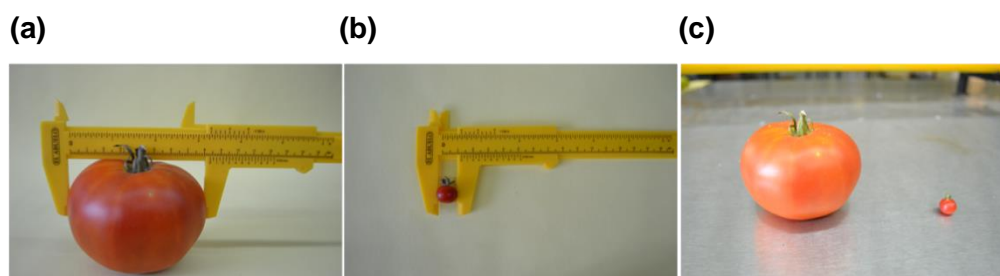
El grupo de investigadores de la Cátedra de Genética de la Facultad de Ciencias Agrarias (UNR) trabaja desde hace más de 20 años en cruzamientos con genotipos

silvestres y mutantes para la madurez del fruto hacia el tomate cultivado para mejorar caracteres de calidad, siendo pioneros en el empleo de los genotipos silvestres para prolongar la vida poscosecha de los frutos. Pratta *et al.* (1996) y Zorzoli *et al.* (1998) han demostrado que los frutos de algunas formas silvestres tienen mayor vida poscosecha que los cultivares comerciales de tomate y menor que los genotipos homocigotas para los mutantes de madurez del fruto *nor* (*non ripening*) y *rin* (*ripening inhibitor*) de *S. lycopersicum*. Los genotipos silvestres tienen la ventaja que pueden prolongar la vida poscosecha de los frutos sin provocar efectos desfavorables sobre otros atributos de calidad tales como el color, sabor, textura, entre otros.

Estos primeros resultados determinaron que el grupo iniciara a mediados de 1990 un programa de selección divergente-antagónica para el peso y la vida poscosecha de los frutos a partir de la generación F₂ del cruzamiento entre el cultivar argentino Caimanta (*S. lycopersicum*) y la accesión LA722 de la especie silvestre *S. pimpinellifolium*.

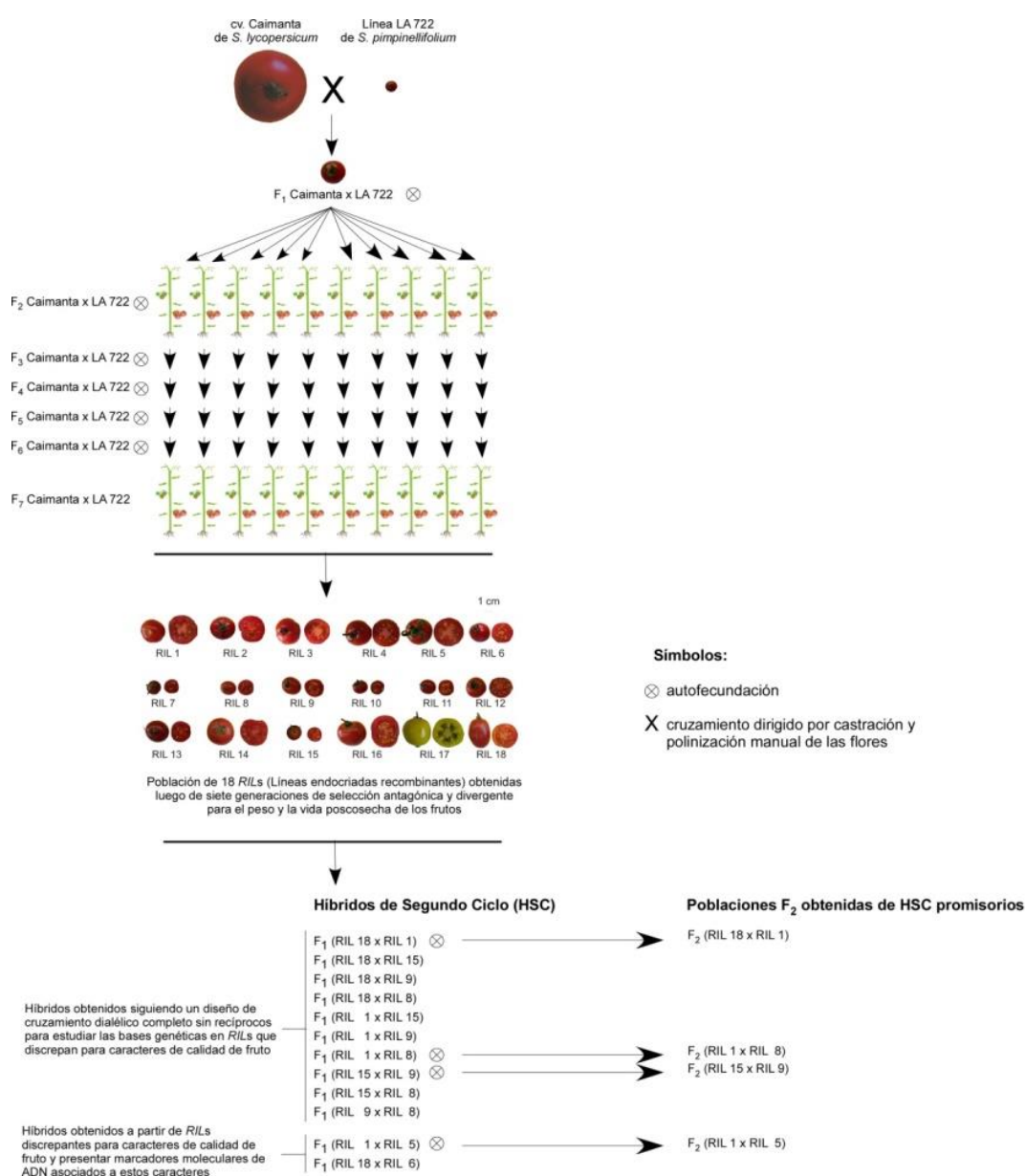
Caimanta es un cultivar argentino del tipo comercial, originado por el INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria) Los Cerrillos (Salta). Es un cultivar de hábitos de crecimiento determinado, frutos a la madurez de color rojo y tipo 'platense' de forma aplanada (diámetro del fruto superior a la altura del mismo) (Pratta *et al.*, 2003a), de alto peso, cuya media aproximada es de unos $98,48 \pm 9,87$ g y una vida poscosecha media (como días transcurridos desde cosecha a descarte del fruto) de $9,74 \pm 0,91$ días (d) (Rodríguez *et al.*, 2006). *S. pimpinellifolium* accesión LA722, es de hábito de crecimiento indeterminado, frutos esféricos, de color rojo intenso a la madurez, de tamaño muy reducido, cuya media es de $0,87 \pm 0,02$ g y vida en estantería de $15,67 \pm 0,37$ d (Pratta *et al.*, 2003; Rodríguez *et al.*, 2006) (Figura 1).

Figura 1: Fotografías de **(a)** *S. lycopersicum* cv. Caimanta; **(b)** *S. pimpinellifolium* accesión LA722; **(c)** comparación de ambas



Como resultado del cruzamiento entre ambos materiales se obtuvo la F₁. A estos tres genotipos (Caimanta, LA722 y la F₁ entre ellos), se los denominó genotipos uniformes de primer ciclo (GUPC). A partir de allí, se generó la población F₂ (por autofecundación de la F₁) y se comenzó un proceso de selección divergente-antagónica para peso y vida poscosecha. El mismo continuó hasta F₆. Como resultado de este proceso, se originaron 17 RIL (Rodríguez *et al.*, 2006) (Figura 2).

Figura 2: Esquema de obtención de las RIL e HSC (fragmento de imagen extraída de Rodríguez *et al.*, 2013)



Pratta *et al.* (2011b), realizaron una caracterización fenotípica y molecular de 16 de estas RIL. Ninguna de ellas tuvo un peso similar al de Caimanta. Teniendo en cuenta la media de las RIL (10,82 g), siete de ellas fueron clasificadas de alto peso, ocho como de bajo peso y solo una de peso intermedio. En relación a la vida poscosecha, cuatro RIL superaron el valor de ambos padres, 11 de ellas tuvieron un valor intermedio a ambos y solo una tuvo un valor inferior a ambos padres (Tabla 1).

Tabla 1: Agrupamiento de las RIL (en números) de acuerdo al peso y vida poscosecha (tabla elaborada a partir de Pratta *et al.* (2011b))

		Peso		
		Bajo	Intermedio	Alto
Vida poscosecha	Inferior a ambos padres			14
	Intermedio a ambos padres	7, 9, 10, 11, 12, 13		1, 3, 4, 15, 16
	Superior a ambos padres	6, 8	5	18

Cabe destacar que la RIL1 y la RIL18, se encuentran inscritas en el registro Nacional de Cultivares y en el Registro Nacional de la Propiedad de Cultivares del Instituto Nacional de Semillas (INASE), como creaciones fitogenéticas de tomate bajo los nombres de GEMA-FCA (RIL18) y QUERUBIN-FCA (RIL1) (Boletín Oficial, 2013).

Como resultado del cruzamiento entre RIL se obtienen los HSC (de Toledo *et al.*, 1984) en los que cabe esperar que se recombinen alelos que ya fueron seleccionados durante el proceso de obtención de las RIL. Al conjunto de las dos RIL parentales junto a su HSC se lo denominó como genotipos uniformes de segundo ciclo (GUSC). En las generaciones segregantes de estos HSC es posible detectar variabilidad tanto en los niveles molecular como fenotípico. Por lo tanto, la magnitud de la asociación entre la variabilidad molecular y la fenotípica podría ser un criterio válido para seleccionar poblaciones bases derivadas de los híbridos de segundo ciclo. El uso de la información obtenida en estas generaciones tempranas contribuiría a diseñar eficientemente un programa de mejoramiento a partir de la variabilidad genética presente en la población base seleccionada.

Utilizando las generaciones segregantes de tres HSC que se caracterizaron morfológica y molecularmente se plantea la siguiente hipótesis y los objetivos a cumplir.

HIPÓTESIS

Los híbridos de segundo ciclo presentan combinaciones genotípicas favorables entre los genes que fueron seleccionados en generaciones previas. En sus generaciones segregantes, estas nuevas combinaciones originan variabilidad genética en el nivel molecular y fenotípico por recombinación.

OBJETIVOS GENERALES

1. Estudiar en diferentes híbridos de segundo ciclo y sus generaciones segregantes el efecto de la recombinación continua entre el germoplasma silvestre y cultivado sobre los caracteres de calidad de los frutos y la vida poscosecha.
2. Identificar las regiones genómicas asociadas a estos caracteres de calidad de los frutos y la vida poscosecha que se expresan independientemente del contexto genético en el que se encuentren.
3. Seleccionar una generación segregante derivada de un híbrido de segundo ciclo para iniciar un nuevo programa de mejoramiento.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar la variabilidad molecular y fenotípica mediante marcadores moleculares AFLP en tres híbridos de segundo ciclo y sus generaciones segregantes y cuantificar el consenso entre ambas caracterizaciones.

2. Estimar parámetros genéticos y detectar QTLs para caracteres de calidad de fruto en las tres generaciones segregantes caracterizadas a fin de seleccionar entre ellas una población base que permita iniciar un nuevo programa de mejoramiento.

3. Incrementar la precisión de la caracterización molecular y fenotípica en la generación segregante seleccionada mediante marcadores moleculares SSR y la obtención de su generación F₃.

4. Desarrollar marcadores moleculares específicos para la población base seleccionada basados en la secuencia de los progenitores y construir los mapas físico y genético correspondientes.

Para facilitar la presentación y el análisis de los resultados obtenidos, este trabajo se presenta en cuatro Capítulos en los que se desarrollan los diferentes objetivos específicos.

CAPÍTULO I

En este Capítulo se aborda el Objetivo Específico 1: Caracterizar la variabilidad molecular y fenotípica mediante marcadores moleculares AFLP en tres híbridos de segundo ciclo y sus generaciones segregantes y cuantificar el consenso entre ambas caracterizaciones.

Para cumplir con este objetivo se llevaron a cabo las siguientes actividades:

1. Caracterización de la diversidad genética en las generaciones segregantes F_2 de los tres híbridos de segundo ciclo (HSC RIL18xRIL1, RIL1xRIL8 y RIL1xRIL5) mediante seis combinaciones de marcadores moleculares AFLP.
2. Evaluación de la variación para 11 caracteres cuantitativos relacionados a la calidad de fruto en estas tres generaciones segregantes F_2 .
3. Exploración del consenso entre la diversidad molecular y la variación para caracteres cuantitativos mediante Análisis de Procrustes Generalizado (APG).

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se utilizaron 69, 76 y 82 individuos correspondientes a las generaciones segregantes F_2 de tres híbridos de segundo ciclo (HSC) RIL18xRIL1, RIL1xRIL8 y RIL1xRIL5.

Métodos

Caracterización molecular por perfiles de AFLP

La caracterización molecular de cada generación segregante F_2 (filial 2), líneas endocriadas recombinantes (RIL) e HSC, se realizó de la manera descrita en Cachiarelli *et al.* (2015). Se utilizaron seis combinaciones de cebadores +3 de AFLP (Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos Amplificados), las cuales fueron seleccionadas por presentar elevados número de bandas y alto porcentaje de polimorfismo para materiales uniformes de primer y segundo ciclo (Cachiarelli *et al.*, 2015). En la Tabla 1, se pueden observar los cebadores utilizados y las combinaciones selectas.

Tabla 1: Descripción de cebadores utilizados y combinaciones selectas para la obtención de los perfiles de AFLP

Adaptadores para la ligación					
Msel	Descripción	Eco RI	Descripción		
GACGATGAGTCCTGAG	Msel Adapter	CTCGTAGACTGCGTACC	EcoRI Adapter		
TACTCAGGACTCAT	Msel Adapter	AATTGGTACGCAGTC	EcoRI Adapter		
Adaptadores para amplificación pre-selectiva y selectiva					
Mse I	Descripción	Núcleótidos selectivos	EcoRI	Descripción	Núcleótidos selectivos
GATGAGTCCTGAGTAA	Msel+1	C	GACTGCGTACCAATTC	EcoRI+1	A
GATGAGTCCTGAGTAA	Msel+3	CAC	GACTGCGTACCAATTC	EcoRI+3	ACT
GATGAGTCCTGAGTAA	Msel+3	CAG	GACTGCGTACCAATTC	EcoRI+3	AGA
GATGAGTCCTGAGTAA	Msel+3	CAT	GACTGCGTACCAATTC	EcoRI+3	AGC
GATGAGTCCTGAGTAA	Msel+3	CTA	GACTGCGTACCAATTC	EcoRI+3	ATC
GATGAGTCCTGAGTAA	Msel+3	CTG	GACTGCGTACCAATTC	EcoRI+3	ATG
GATGAGTCCTGAGTAA	Msel+3	CGT	GACTGCGTACCAATTC	EcoRI+3	ATT
Combinaciones selectas					
Combinación	Msel+3		EcoRI+3		
F	GATGAGTCCTGAGTAACGT		GACTGCGTACCAATTCACT		
H	GATGAGTCCTGAGTAACAG		GACTGCGTACCAATTCACT		
J	GATGAGTCCTGAGTAACTA		GACTGCGTACCAATTCAGA		
HH	GATGAGTCCTGAGTAACTA		GACTGCGTACCAATTCATT		
II	GATGAGTCCTGAGTAACTG		GACTGCGTACCAATTCATT		
JJ	GATGAGTCCTGAGTAACGT		GACTGCGTACCAATTCATT		

En cada generación F_2 se evaluó el número total de bandas, número de bandas polimórficas, porcentaje de polimorfismo (número de bandas polimórficas/número de bandas totales) y número de bandas que ajustaron a la segregación mendeliana esperada (3:1).

Con esta información molecular se realizó un análisis de conglomerados para cada generación F_2 , en el cual se incorporaron las RIL y su HSC. Para ello, se siguió un criterio de agrupamiento jerárquico de encadenamiento promedio (*average linkage*) y la distancia de Jaccard (1-S). Este análisis fue realizado mediante el software estadístico InfoStat versión 2016 (Di Rienzo *et al.*, 2016).

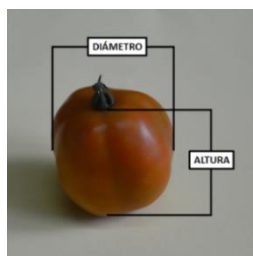
Caracterización fenotípica por caracteres asociados a calidad de los frutos

En cada generación segregante F_2 (incluyendo los parentales y su HSC), se evaluaron 11 caracteres relacionados a calidad de fruto. Las mediciones se realizaron en dos estados:

a) Estado pintón (primeras acumulaciones de carotenoides (Giovannoni, 2004)):

- Peso (en gramos (g)): evaluado mediante balanza.
- Altura (en centímetros (cm)): evaluado mediante calibre (Figura 1).
- Diámetro (en cm): evaluado mediante calibre (Figura 1).

Figura 1: Ubicación de la medición de altura y diámetro del fruto



- Índice de forma: cociente entre la altura y el diámetro.

- Vida poscosecha (en días (d)): días transcurridos entre la cosecha del fruto hasta la pérdida de calidad comercial del mismo (ablandamiento, arrugamiento, desarrollo de enfermedades, etc.). El almacenamiento se realiza en estantería a 25 ± 3 °C (grados centígrados) (Figura 2).

Figura 2: Ubicación de los frutos para la toma de datos del carácter vida poscosecha



En todos los casos se evaluaron diez frutos por planta.

b) Estado maduro (aproximadamente 90% de la superficie de color rojo):

- Firmeza: dos mediciones en el plano ecuatorial opuesto, utilizando un durómetro (Durofel, DFT 100), con punta de 0,10 cm² (centímetros cuadrados) (Figura 3).

Figura 3: medición de firmeza usando un durómetro



- Color: medido a través de dos parámetros: L (porcentaje de reflectancia) que indica la luminosidad y cociente de absorbancias (a/b, también conocido como matiz o relación rojo/amarillo). L es un parámetro que indica la luminosidad, tomando valores de 0 para negro y 100 para blanco. Los parámetros a y b corresponden a las absorbancias a 540 nanómetros (nm) y 675 nm respectivamente. Los valores para el parámetro a oscilan entre valores negativos para colores verdes y positivos para rojos, mientras que el parámetro b, toma valores negativos para azules y positivo para amarillos (Figura 4). Tanto para firmeza como para color se evaluaron diez frutos por planta.

Figura 4: medición de los parámetros L (porcentaje de reflectancia), a y b (absorbancias) usando un cromámetro



- Sólidos Solubles (en °Brix): medido como el porcentaje de fructosa más glucosa del jugo homogeneizado, mediante un refractómetro manual.
- pH: medido mediante pHmetro manual en el jugo homogeneizado.
- Acidez titulable (g de ácido cítrico /100 g de jugo homogeneizado): calculada a partir del volumen de NaOH 0,1 N (normal) necesario para llevar a 8,1 el pH de 10 g de jugo disueltos en 100 mililitros (ml) de agua destilada (Figura 5).

Figura 5: bureta, pHmetro, agitador y jugo disuelto en agua para medición de acidez titulable



Para el caso de sólidos solubles, acidez titulable y pH, se tomaron tres muestras independientes de jugo a partir de cinco a ocho frutos maduros por planta, dependiendo del tamaño de los mismos.

Se hicieron histogramas para cada carácter, sobre los cuáles se incorporaron los valores medios tanto de los individuos F_2 , como de las RIL y su HSC, como así también de

los parentales y F₁ (filial 1) de las cuales derivaron las RIL (cultivar (cv.) Caimanta, accesión LA722 y su F₁). En este Capítulo al conjunto de las RIL y sus respectivos HSC lo llamaremos genotipos uniformes de segundo ciclo (GUSC), mientras que al cv. Caimanta, la accesión LA722 y su F₁ serán llamados genotipos uniformes de primer ciclo (GUPC). A partir de estos gráficos y los valores medios se evaluó la presencia de individuos en la población segregante que desvían de los valores de los fenotipos de sus parentales (de Vicente y Tanksley, 1993). Las comparaciones de medias entre las RIL y su HSC se realizaron mediante el test de Tukey.

Exploración del consenso entre la diversidad molecular y la variación para caracteres cuantitativos mediante Análisis de Procrustes Generalizado

Para evaluar el consenso entre la diversidad molecular y la variación para caracteres cuantitativos en las generaciones segregantes F₂ de los tres HSC y como paso previo a la detección de QTLs (*loci* de caracteres cuantitativos), se determinó la asociación entre la información molecular obtenida a través de seis combinaciones de cebadores de AFLP y la información fenotípica, medida a través de 11 variables relacionadas a calidad de los frutos. Para evaluar la asociación/ consenso entre la información fenotípica y molecular se aplicó un Análisis de Procrustes Generalizado (APG). Previamente, se analizaron las 11 variables cuantitativas (fenotípicas) con un Análisis de Componente Principales (ACP) y con la información molecular se realizó un Análisis de Coordenadas Principales (ACoP). Cabe destacar que para el ACoP solo se utilizó la información molecular de las bandas que segregaron de manera mendeliana. Todos los análisis fueron realizados mediante el software estadístico InfoStat versión 2016 (Di Rienzo *et al.*, 2016).

RESULTADOS

Caracterización molecular, fenotípica y consenso entre la diversidad molecular y la variación para caracteres cuantitativos en la generación segregante F₂ del HSC RIL18xRIL1

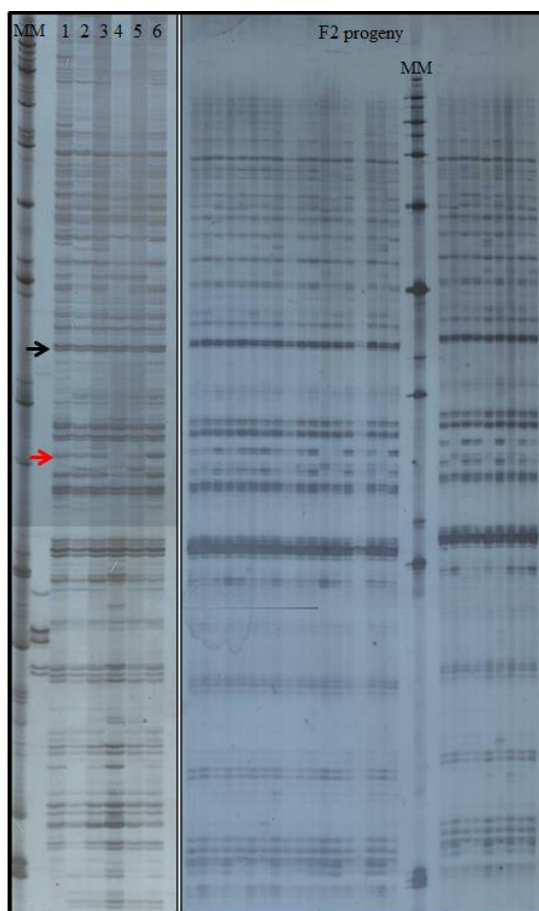
La caracterización molecular por perfiles de AFLP, utilizando las seis combinaciones seleccionadas, mostró un total de 110 bandas de las cuales 68 resultaron ser polimórficas (61,82%). El total de bandas relevadas y bandas polimórficas por combinación, se presenta en la Tabla 2. En la Figura 6 se puede observar un fragmento de un gel de poliacrilamida

Tabla 2: Combinaciones de cebadores, bandas totales y bandas polimórficas

Combinación de cebadores (Código)	Bandas totales	Bandas polimórficas
F	29	23
H	14	10
J	24	12
HH	13	4
II	18	11
JJ	12	8
Total	110	68

De las 68 bandas polimórficas, 29 ajustaron a la segregación mendeliana esperada (42,65%).

Figura 6: Sección de un gel de poliácridamida para los GUPC, GUSC y algunos individuos de la generación segregante F_2 del HSC RIL18xRIL1



Referencias: **MM:** marcador molecular; **1:** *Solanum lycopersicum* cv. Caimanta (C); **2:** *S. pimpinellifolium* accesión LA722 (P); **3:** F_1 CxP; **4:** RIL1; **5:** RIL18; **6:** HSC RIL18xRIL1; **F_2 progeny:** individuos de la generación segregante F_2 ; **flecha negra:** banda monomórfica; **flecha roja:** banda polimórfica

El análisis de conglomerados (Figura 7) permitió observar un ordenamiento de los individuos de la F_2 como así también de las RIL y de su HSC, en el que en una primera división se separa el genotipo I-44. En cuanto a la RIL1 y la RIL18, forman un grupo por separado, mientras que el HSC fue más parecido al genotipo VIII-17 de la generación F_2 .

En la Tabla 3, se muestran los valores medios y su error estándar para la RIL1, RIL18, el HSC RIL18xRIL1 y la F_2 para los 11 caracteres de interés agronómico. En la Figura 8, se pueden observar los frutos correspondientes a las RIL, su HSC y la generación segregante F_2 . En la Figura 9, se muestran los histogramas para la población F_2 para los 11 caracteres fenotípicos y en los mismos se marcan los valores medios para los GUPC (*Solanum lycopersicum* cv. Caimanta, *S. pimpinellifolium* accesión LA722 y su F_1) y GUSC (RIL1, RIL18 y su HSC) y el valor medio de los individuos F_2 . En la Figura 9, se puede observar que para todos los caracteres hubo individuos de la generación F_2 cuyos valores promedios fueron tanto superiores o inferiores a los valores promedios de los parentales de los GUSC, con excepción de diámetro, ya que no hubo individuos que superen al valor promedio de la RIL1. Al realizar esta misma comparación, pero teniendo en cuenta los promedios de los parentales de los GUPC, para los caracteres diámetro, altura y peso, no hubo individuos F_2 que presenten valores promedios superiores o inferiores a los valores medios de Caimanta y LA722, ya que para estos caracteres el cv. Caimanta y la accesión LA722, mostraron tener los valores promedios extremos más altos y más bajos. Para el resto de los caracteres, se obtuvieron individuos que tuvieron valores superiores o inferiores, a al menos alguno de estos parentales.

Figura 7: Análisis de conglomerados para la generación F₂ del HSC RIL18xRIL1

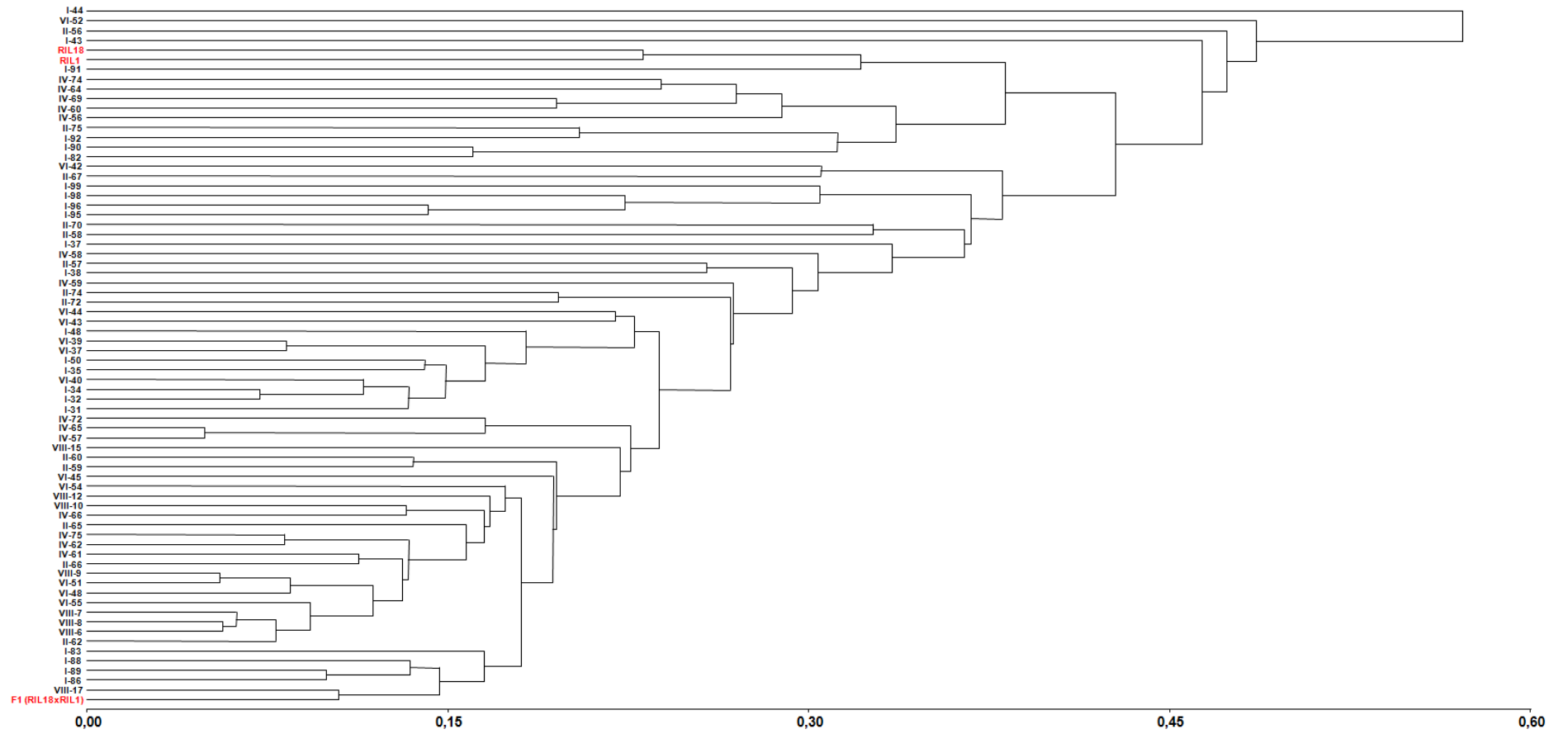


Tabla 3: Valores medios \pm error estándar para los 11 caracteres fenotípicos para la RIL1, RIL18, el HSC (RIL18xRIL1) y la generación F₂

	D	A	Fo	P	VP	F	L	a/b	SS	pH	AT
RIL1	3,53 \pm 0,07	3,07 \pm 0,06	0,87 \pm 0,01	23,64 \pm 1,06	17,55 \pm 0,95	53,60 \pm 1,30	40,05 \pm 0,41	1,09 \pm 0,04	7,10 \pm 0,22	4,78 \pm 0,02	0,33 \pm 0,003
RIL18	2,93 \pm 0,11	3,15 \pm 0,08	1,10 \pm 0,03	15,48 \pm 1,46	14,28 \pm 0,84	55,10 \pm 2,72	42,20 \pm 0,54	1,07 \pm 0,03	6,04 \pm 0,04	4,84 \pm 0,03	0,25 \pm 0,01
HSC (RIL18xRIL1)	2,74 \pm 0,05	2,64 \pm 0,05	0,97 \pm 0,01	12,45 \pm 0,55	13,72 \pm 0,60	49,00 \pm 2,57	40,48 \pm 0,38	1,08 \pm 0,05	7,38 \pm 0,17	5,04 \pm 0,06	0,32 \pm 0,01
F ₂ (*)	2,60 \pm 0,47	2,67 \pm 0,51	1,03 \pm 0,12	11,16 \pm 5,33	19,06 \pm 7,34	57,54 \pm 7,67	39,29 \pm 1,82	1,15 \pm 0,15	7,27 \pm 1,35	4,81 \pm 0,27	0,32 \pm 0,12

Referencias: (*): en F₂ se expresa el valor medio \pm el desvío estándar; **D:** diámetro; **A:** altura; **Fo:** índice de forma; **P:** peso; **VP:** vida poscosecha; **F:** firmeza; **L:** porcentaje de reflectancia; **a/b:** cociente de absorbancias; **SS:** sólidos solubles; **AT:** acidez titulable

Figura 8: RIL18 **(a)**, RIL1 **(b)**, el HSC entre ellas RIL18xRIL1 **(c)** y frutos de la generación F₂ **(d)**

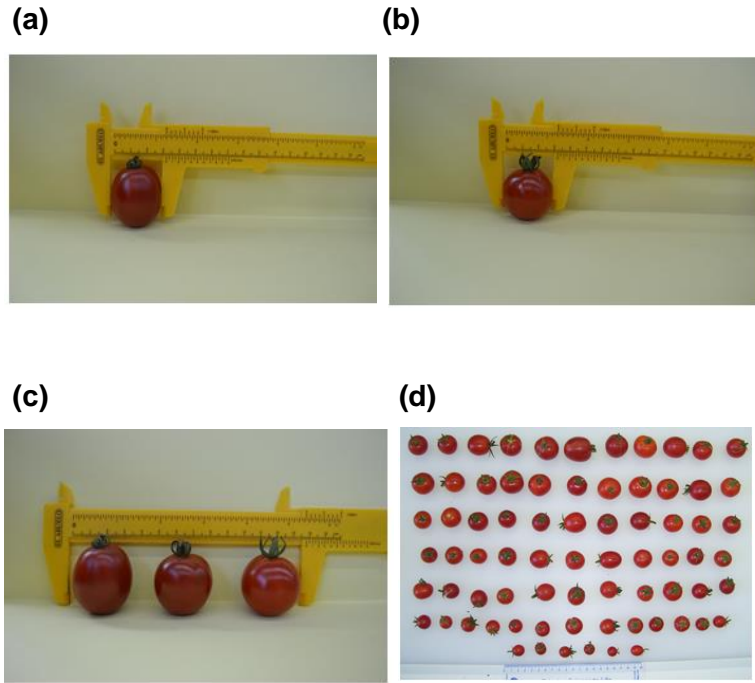
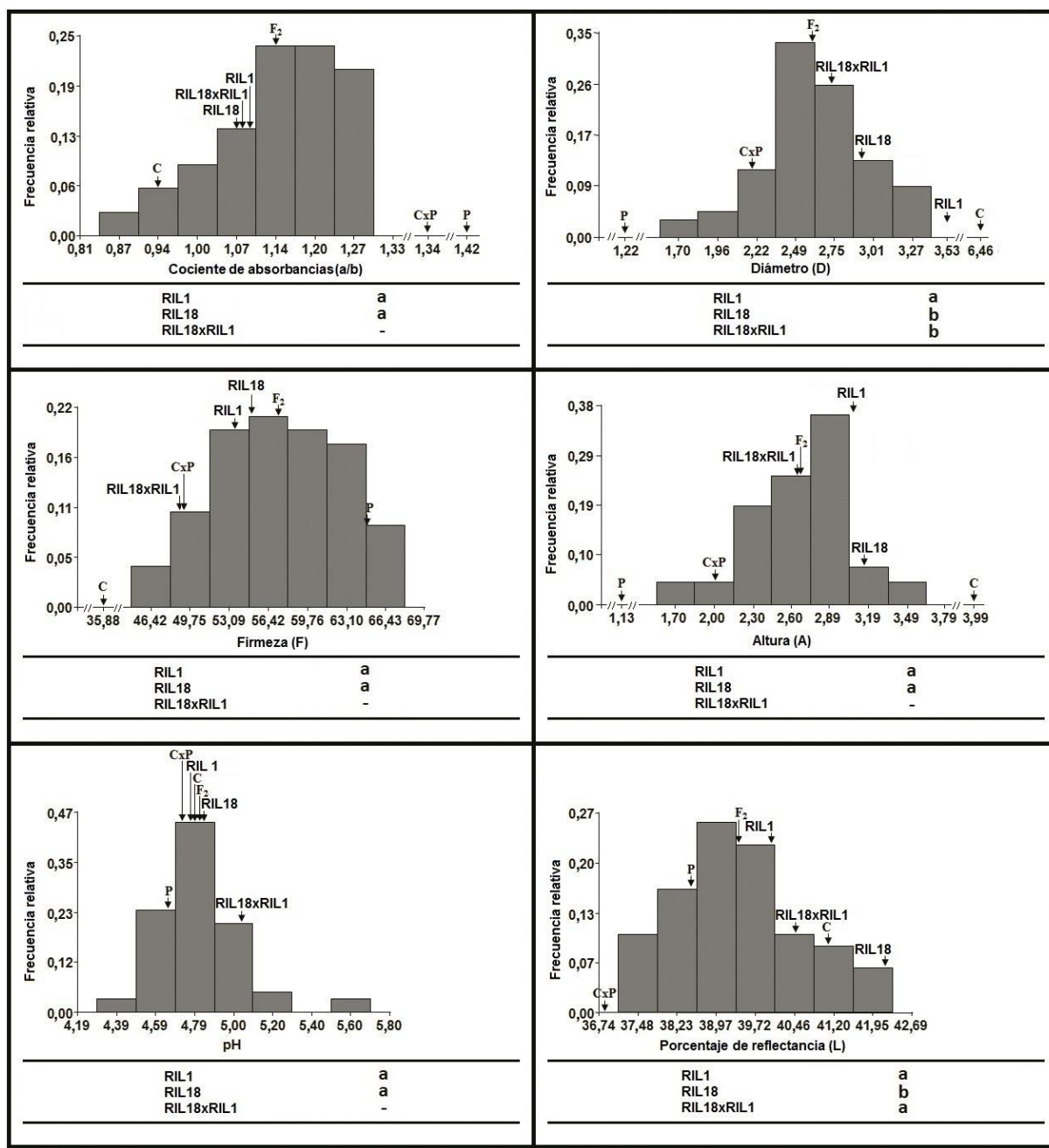
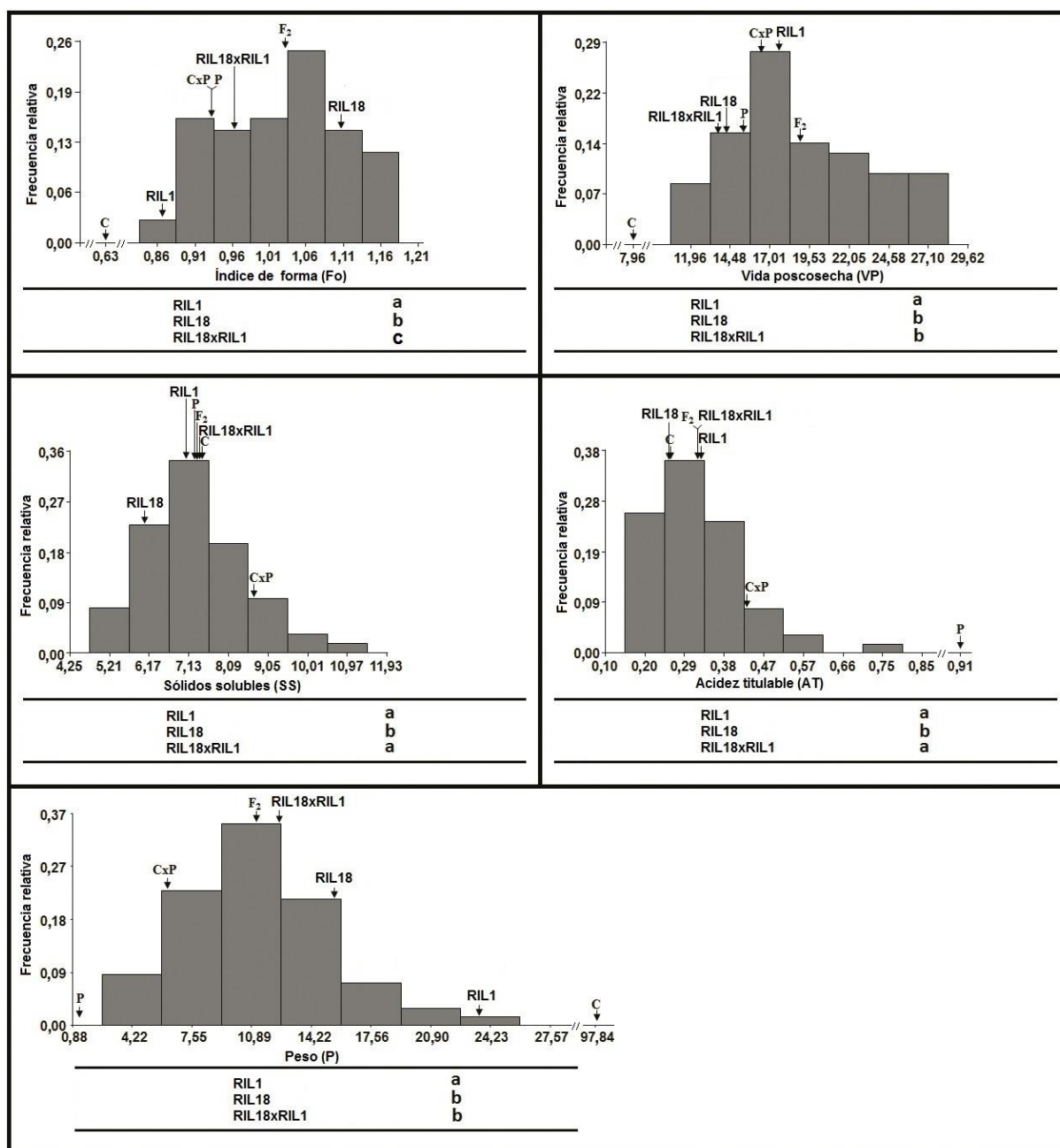


Figura 9: Histogramas para la población F₂ para los 11 caracteres fenotípicos



Referencias: **C**: *S. lycopersicum* cv. Caimanta; **P**: *S. pimpinellifolium* accesión LA722; **F₂**: generación segregante F₂ del HSC RIL18xRIL1; **a,b**: diferentes letras indican diferencias significativas (p<0,05).

Figura 9 (continuación): Histogramas para la población F₂ para los 11 caracteres fenotípicos



Referencias: C: *S. lycopersicum* cv. Caimanta; P: *S. pimpinellifolium* accesión LA722; F₂: generación segregante F₂ del HSC RIL18xRIL1; a,b,c: diferentes letras indican diferencias significativas (p<0,05).

El ACP aplicado a las 11 variables morfológicas mostró que las primeras dos componentes (CP) acumulaban un 50,80% de la variación (CP1= 30,20%, CP2= 20,60%) (Figura 10a). La CP1 estaba principalmente explicada por altura, peso y diámetro y la CP2 por los parámetros de color L y a/b, este último de manera negativa. El coeficiente de correlación cofenética fue de 0,81. Las primeras cuatro componentes explicaban el 77,50% de la variación. En las Tablas 4a y 4b se muestran los valores de los autovalores y autovectores para el ACP.

El ACoP utilizando las bandas producto de las seis combinaciones de cebadores y que ajustaron a la segregación mendeliana esperada mostró una alta variación (Figura 10b). Fueron necesarias las primeras 12 coordenadas para explicar el 79,10% de la variabilidad (Tabla 5a).

El ACP y el ACoP permitieron la realización del APG. Las primeras siete componentes explicaron más del 79% de la variabilidad (CP1 = 25,80%, CP2 = 17,20%, CP3 = 10,10%, CP4 = 8,50%, CP5 = 6,90%, CP6 = 5,60%, CP7 = 5,40%), logrando un consenso de 67,40% (Tabla 5b y Figura 11).

Tabla 4: Autovalores **(a)** y autovectores para las dos primeras componentes principales **(b)** para el ACP

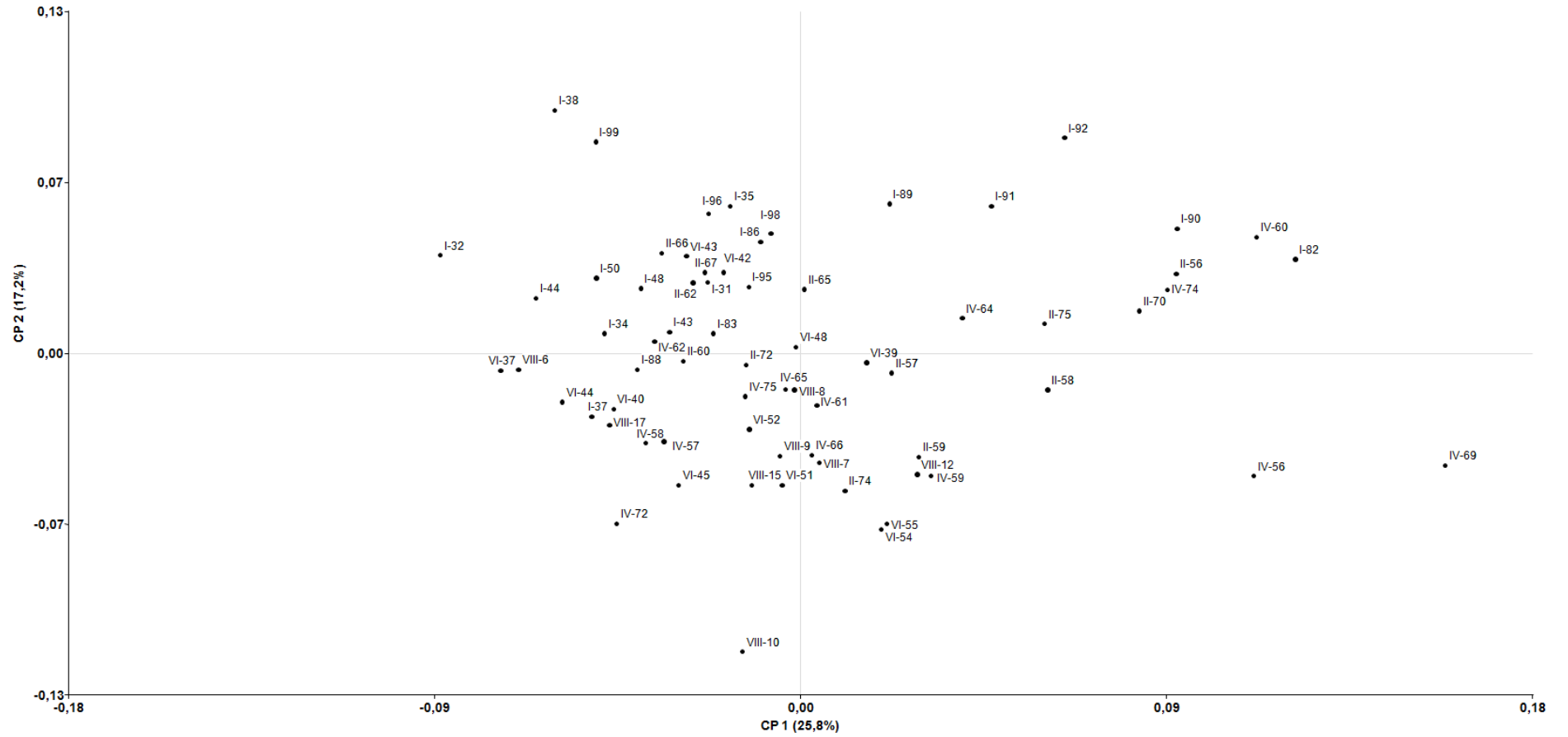
(a)				(b)		
Autovalores				Autovectores		
Lambda	Valor	Proporción	Proporción Acumulada	Variables	e1	e2
1	3,327	0,302	0,302	D	0,466	-0,076
2	2,261	0,206	0,508	A	0,501	-0,130
3	1,705	0,155	0,663	Fo	0,138	-0,113
4	1,237	0,112	0,775	P	0,485	-0,084
5	0,835	0,076	0,851	VP	0,203	-0,330
6	0,583	0,053	0,904	L	0,060	0,557
7	0,484	0,044	0,948	a/b	-0,246	-0,471
8	0,320	0,029	0,977	F	0,018	0,334
9	0,203	0,018	0,996	SS	-0,246	-0,388
10	0,043	0,0040	1	pH	0,140	-0,232
11	0,002	0,0002	1	AT	-0,304	-0,019

Referencias: **D:** diámetro; **A:** altura; **Fo:** índice de forma; **P:** peso; **VP:** vida poscosecha; **L:** porcentaje de reflectancia; **a/b:** cociente de absorbancias; **F:** firmeza; **SS:** sólidos solubles; **AT:** acidez titulable

Tabla 5: Primeros 46 autovalores correspondientes al ACoP **(a)** y autovalores para el APG **(b)**

(a)				(b)			
Autovalores				Autovalores			
Lambda	Valor	Proporción	Proporción Acumulada	Lambda	Valor	Proporción	Proporción Acumulada
1	3,627	0,315	0,315	1	0,174	0,258	0,258
2	0,985	0,086	0,401	2	0,116	0,172	0,430
3	0,834	0,072	0,473	3	0,068	0,101	0,531
4	0,731	0,063	0,537	4	0,057	0,085	0,616
5	0,549	0,048	0,584	5	0,046	0,069	0,685
6	0,434	0,038	0,622	6	0,037	0,056	0,740
7	0,423	0,037	0,659	7	0,036	0,054	0,794
8	0,392	0,034	0,693	8	0,029	0,044	0,838
9	0,371	0,032	0,725	9	0,020	0,029	0,867
10	0,314	0,027	0,752	10	0,017	0,025	0,891
11	0,240	0,021	0,773	11	0,011	0,016	0,907
12	0,208	0,018	0,791	12	0,009	0,013	0,920
13	0,163	0,014	0,805	13	0,007	0,010	0,931
14	0,140	0,012	0,818	14	0,007	0,010	0,941
15	0,138	0,012	0,830	15	0,006	0,008	0,949
16	0,118	0,010	0,840	16	0,005	0,008	0,957
17	0,106	0,009	0,849	17	0,004	0,005	0,962
18	0,100	0,009	0,858	18	0,003	0,005	0,967
19	0,097	0,008	0,866	19	0,003	0,004	0,971
20	0,083	0,007	0,873	20	0,003	0,004	0,975
21	0,079	0,007	0,880	21	0,002	0,003	0,979
22	0,074	0,006	0,887	22	0,002	0,003	0,982
23	0,069	0,006	0,893	23	0,002	0,003	0,985
24	0,067	0,006	0,898	24	0,002	0,003	0,988
25	0,065	0,006	0,904	25	0,002	0,003	0,991
26	0,064	0,006	0,910	26	0,002	0,003	0,993
27	0,060	0,005	0,915	27	0,002	0,002	0,996
28	0,060	0,005	0,920	28	0,002	0,002	0,998
29	0,056	0,005	0,925	29	0,001	0,002	1,000
30	0,052	0,005	0,929				
31	0,051	0,004	0,934				
32	0,050	0,004	0,938				
33	0,046	0,004	0,942				
34	0,043	0,004	0,946				
35	0,043	0,004	0,950				
36	0,042	0,004	0,953				
37	0,042	0,004	0,957				
38	0,038	0,003	0,960				
39	0,038	0,003	0,964				
40	0,037	0,003	0,967				
41	0,033	0,003	0,970				
42	0,030	0,003	0,972				
43	0,030	0,003	0,975				
44	0,028	0,002	0,977				
45	0,027	0,002	0,980				
46	0,025	0,002	0,982				

Figura 11: Gráfico de dos dimensiones para las dos primeras componentes (CP) para el APG



Caracterización molecular, fenotípica y consenso entre la diversidad molecular y la variación para caracteres cuantitativos en la generación segregante F₂ del HSC RIL1xRIL8

La caracterización molecular por perfiles de AFLP, utilizando las seis combinaciones seleccionadas mostró un total de 101 bandas, de las cuales 87 resultaron ser polimórficas (86,14%). El total de bandas relevadas y bandas polimórficas por combinación se presenta en la Tabla 6.

Tabla 6: Combinaciones de cebadores, bandas totales y bandas polimórficas

Combinación de cebadores (Código)	Bandas totales	Bandas polimórficas
F	11	10
H	10	5
J	16	15
HH	10	10
II	14	11
JJ	40	36
Total	101	87

De las 87 bandas polimórficas, 20 ajustaron a la segregación mendeliana esperada (22,99%).

Como resultado del análisis de conglomerado se obtuvo el agrupamiento que se observa en la Figura 12. En el mismo se puede observar un ordenamiento de los genotipos de la generación F₂. Como se puede observar en este cluster, la RIL8 y el HSC (RIL1xRIL8) se encuentran formando un grupo separado, mientras que la L1, se encuentra más distanciada de los mismos. El coeficiente de correlación cofenética fue de 0,93.

En cuanto a la caracterización fenotípica, los valores medios y su error estándar para la RIL1, RIL8, su HSC y la F₂ para los 11 caracteres de interés agronómico se puede observar en la Tabla 7. En la Figura 13, se pueden observar los frutos correspondientes a las RIL, su HSC y la generación segregante F₂. En la Figura 14, se muestran los histogramas para la población F₂ para los 11 caracteres fenotípicos y en los mismos se marcan los valores medios para los GUPC (*S. lycopersicum* cv. Caimanta, *S. pimpinellifolium* accesión LA722 y su F₁) y GUSC (RIL1, RIL8 y su HSC) y el valor medio de los individuos F₂. En la Figura 14, se puede observar que para los caracteres cociente de absorbancias (a/b), firmeza, pH, porcentaje de reflectancia (L), índice de forma, vida poscosecha, sólidos solubles y acidez titulable, hubo individuos de la generación F₂ cuyos valores promedios superaron, tanto por valores superiores o inferiores, a los valores

promedios de los parentales de los GUSC. En los casos de diámetro, altura y peso, no hubo individuos que superen al parental con los mayores valores promedios (RIL1). Al realizar esta misma comparación, pero teniendo en cuenta las medias de los parentales de los GUPC, no hubo individuos cuyos valores promedios hayan superado a los de los parentales, para los caracteres diámetro, altura, peso y firmeza. Para el resto de los caracteres, hubo individuos con valores promedios superiores o inferiores por lo menos a uno de los parentales.

Figura 12: Análisis de conglomerados para la generación F₂ del HSC RIL1xRIL8

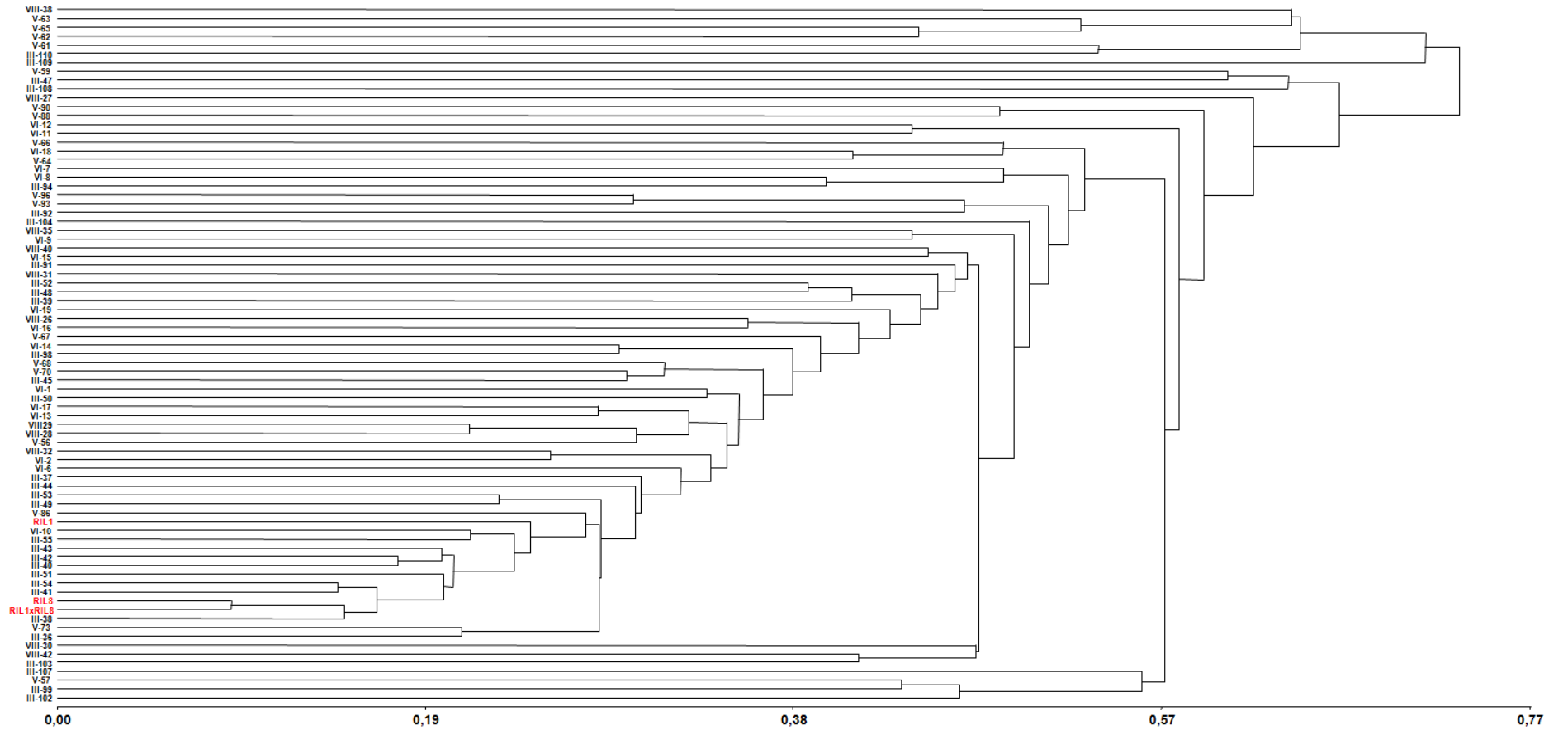


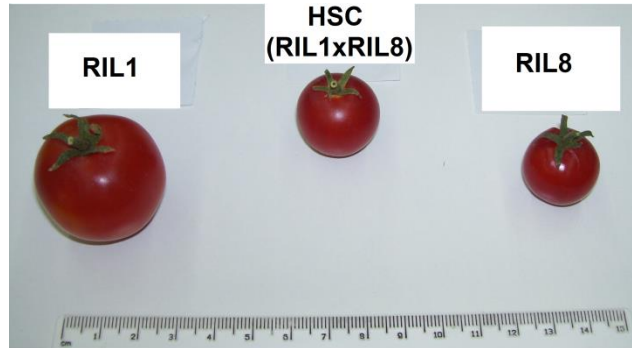
Tabla 7: Valores medios \pm error estándar para los 11 caracteres fenotípicos para la RIL1, RIL8, el HSC (RIL1xRIL8) y la generación F₂

	D	A	Fo	P	VP	F	L	a/b	SS	pH	AT
RIL1	3,53 \pm 0,07	3,07 \pm 0,06	0,87 \pm 0,01	23,64 \pm 1,06	17,55 \pm 0,95	53,60 \pm 1,30	40,05 \pm 0,41	1,09 \pm 0,04	7,10 \pm 0,22	4,78 \pm 0,02	0,33 \pm 0,003
RIL8	1,63 \pm 0,04	1,54 \pm 0,04	0,94 \pm 0,01	2,57 \pm 0,18	18,32 \pm 0,82	50,27 \pm 1,53	38,29 \pm 0,43	1,32 \pm 0,01	8,90 \pm 0,10	4,86 \pm 0,05	0,50 \pm 0,07
HSC (RIL1xRIL8)	2,22 \pm 0,04	2,11 \pm 0,04	0,97 \pm 0,01	6,37 \pm 0,26	18,93 \pm 0,57	57,42 \pm 2,31	38,05 \pm 0,34	1,32 \pm 0,03	9,68 \pm 0,05	4,91 \pm 0,02	0,42 \pm 0,004
F₂ (*)	1,98 \pm 0,33	1,88 \pm 0,30	0,95 \pm 0,07	4,76 \pm 2,55	17,52 \pm 7,10	53,55 \pm 7,19	38,42 \pm 1,85	1,20 \pm 0,16	7,83 \pm 1,52	4,79 \pm 0,22	0,44 \pm 0,17

Referencias: (*): en F₂ se expresa el valor medio \pm el desvío estándar; **D:** diámetro; **A:** altura; **Fo:** índice de forma; **P:** peso; **VP:** vida poscosecha; **F:** firmeza; **L:** porcentaje de reflectancia; **a/b:** cociente de absorbancias; **SS:** sólidos solubles; **AT:** acidez titulable

Figura 13: RIL1, el HSC entre ellas y la RIL8 **(a)** y frutos de la generación F₂ **(b)**

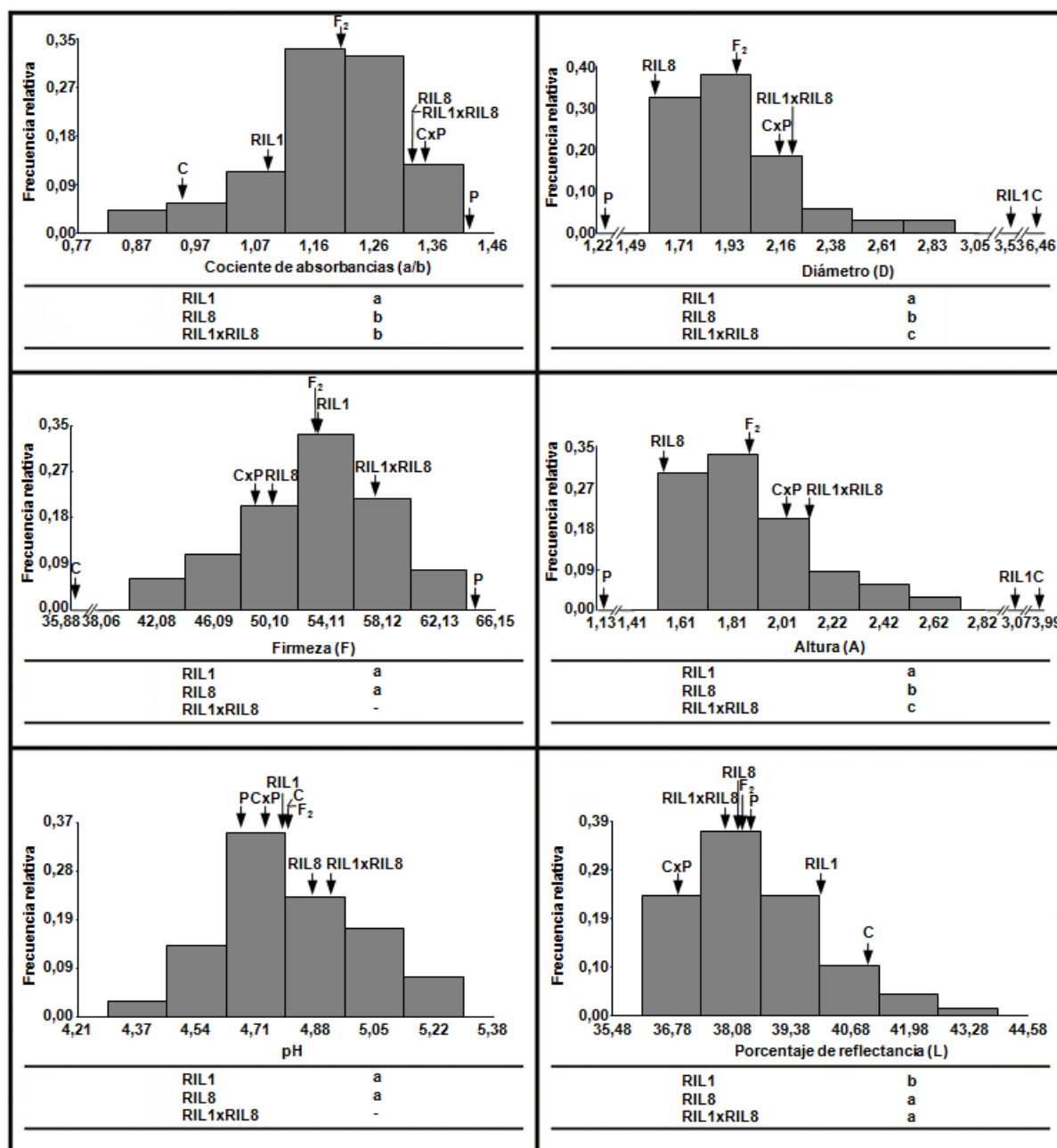
(a)



(b)

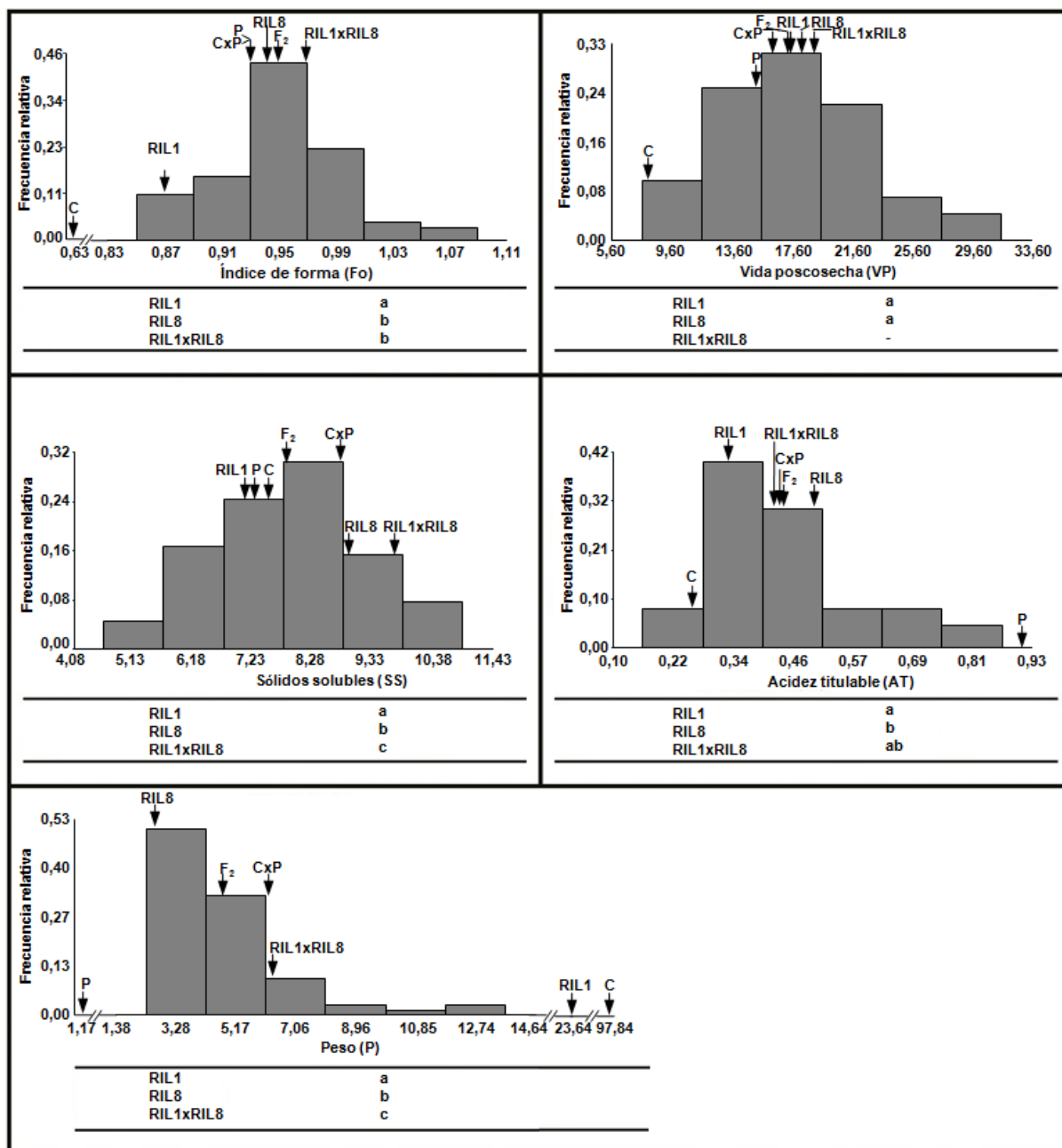


Figura 14: Histogramas para la población F₂ para los 11 caracteres fenotípicos



Referencias: C: *S. lycopersicum* cv. Caimanta; P: *S. pimpinellifolium* accesión LA722; F₂: generación segregante F₂ del HSC RIL1xRIL8; a,b,c: diferentes letras indican diferencias significativas (p<0,05)

Imagen 14 (continuación): Histogramas para la población F₂ para los 11 caracteres fenotípicos



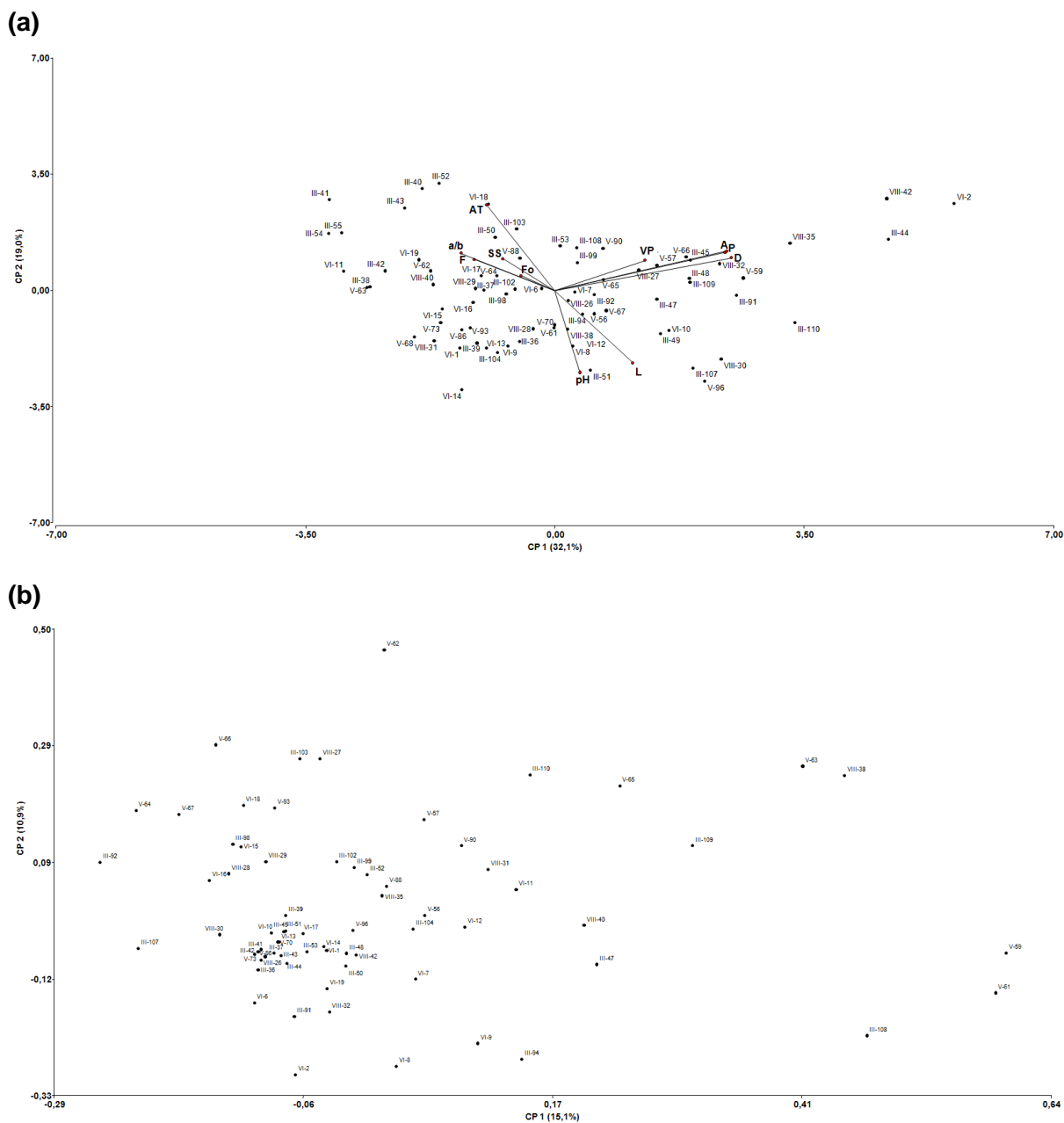
Referencias: C: *S. lycopersicum* cv. Caimanta; P: *S. pimpinellifolium* accesión LA722; F₂: generación segregante F₂ del HSC RIL1xRIL8; a,b,c: diferentes letras indican diferencias significativas (p<0,05)

El ACP aplicado a las 11 variables morfológicas mostró que las primeras dos componentes (CP) acumulaban un 51,10% de la variación (CP1= 32,10%, CP2= 19%) (Figura 15a). La CP1 estaba principalmente explicada por diámetro, altura y peso y la CP2 por acidez titulable y de manera negativa por pH y porcentaje de reflectancia (L). El coeficiente de correlación cofenética fue de 0,84. Las primeras cuatro componentes explicaban el 77,10% de la variación. En las Tablas 8a y 8b, se muestran los valores de los autovalores y autovectores.

El ACoP utilizando las bandas producto de las seis combinaciones de cebadores y que ajustaron a la segregación mendeliana esperada mostró una alta variación (Figura 15b). Fueron necesarias las primeras 13 coordenadas para explicar el 77,30% de la variabilidad (Tabla 9a).

El ACP y el ACoP permitieron la realización del APG. Las primeras ocho componentes explicaron más del 80% de la variabilidad (CP1 = 21,50%, CP2 = 13,20%, CP3 = 12,40%, CP4 = 10,50%, CP5 = 8,30%, CP6 = 7,70%, CP7 = 4,90%, CP8= 4%), logrando un consenso de 64,70% (Tabla 9b y Figura 16).

Figura 15: Gráfico de dos dimensiones para las dos primeras componentes (CP) para el ACP **(a)** y gráfico de dos dimensiones para las dos primeras coordenadas (CP) para el ACoP **(b)**



Referencias: VP: vida poscosecha; P: peso; F: firmeza; D: diámetro; A: altura; L: porcentaje de reflectancia; a/b: cociente de absorbancias; SS: sólidos solubles; AT: acidez titulable; Fo: índice de forma

Tabla 8: Autovalores (a) y autovectores para las dos primeras componentes (b) del ACP

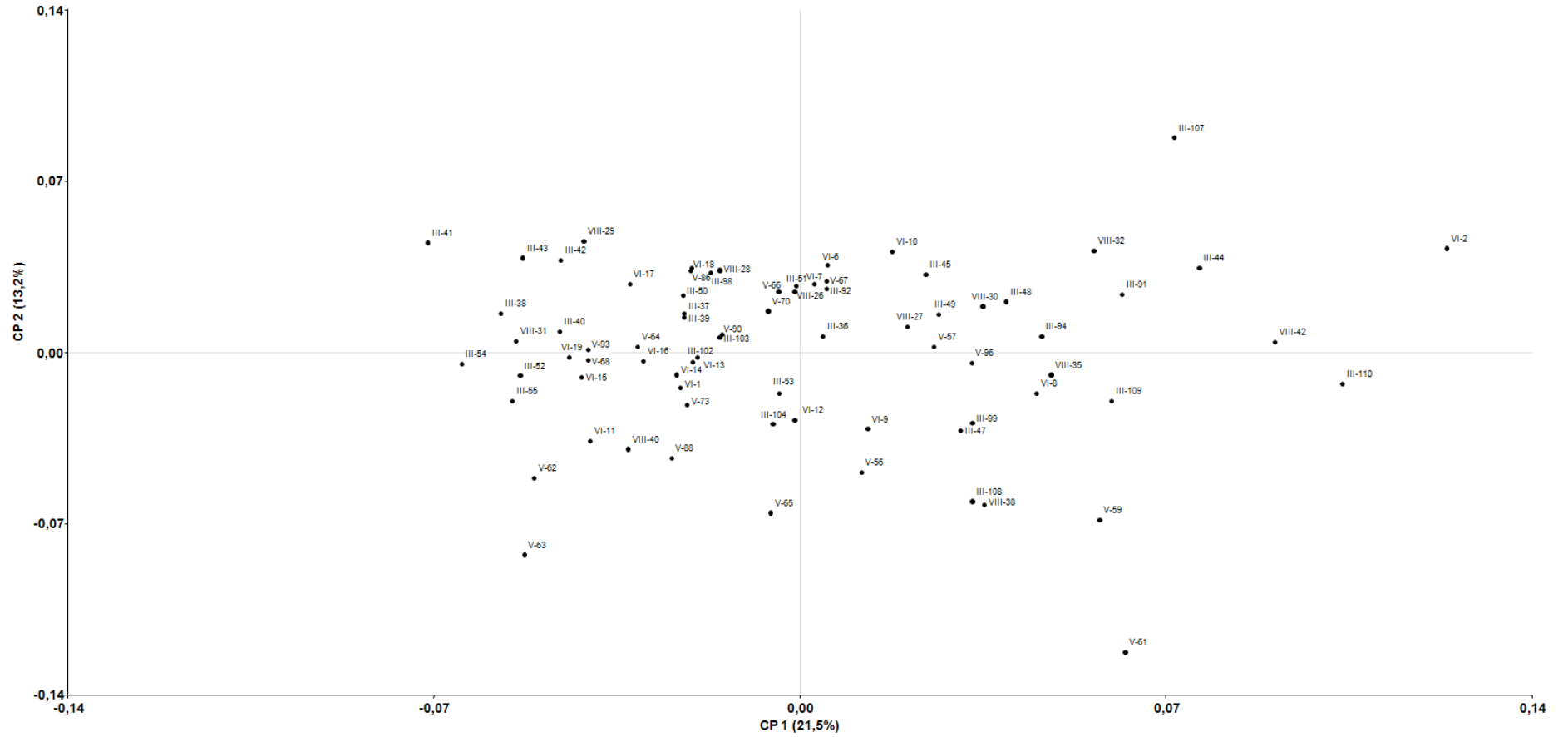
(a)				(b)		
Autovalores				Autovectores		
Lambda	Valor	Proporción	Proporción Acumulada	Variables	e1	e2
1	3,527	0,321	0,321	D	0,493	0,197
2	2,093	0,190	0,511	A	0,476	0,228
3	1,653	0,150	0,661	Fo	-0,094	0,085
4	1,210	0,110	0,771	P	0,481	0,234
5	1,010	0,092	0,863	VP	0,251	0,177
6	0,756	0,069	0,932	F	-0,224	0,186
7	0,371	0,034	0,966	L	0,218	-0,436
8	0,231	0,021	0,987	a/b	-0,261	0,222
9	0,123	0,011	0,998	AT	-0,191	0,513
10	0,024	0,002	1,000	pH	0,071	-0,493
11	0,001	0,0001	1,000	SS	-0,144	0,188

Referencias: **D:** diámetro; **A:** altura; **Fo:** índice de forma; **P:** peso; **VP:** vida poscosecha; **F:** firmeza; **L:** porcentaje de reflectancia; **a/b:** cociente de absorbancias; **AT:** acidez titulable; **SS:** sólidos solubles

Tabla 9: Primeros 52 autovalores correspondientes al ACoP **(a)** y autovalores para el APG **(b)**

(a)				(b)			
Autovalores				Autovalores			
Lambda	Valor	Proporción	Proporción Acumulada	Lambda	Valor	Proporción	Proporción Acumulada
1	2,174	0,151	0,151	1	0,139	0,215	0,215
2	1,568	0,109	0,260	2	0,086	0,132	0,347
3	1,431	0,099	0,359	3	0,080	0,124	0,471
4	1,115	0,077	0,437	4	0,068	0,105	0,576
5	0,877	0,061	0,497	5	0,053	0,083	0,659
6	0,763	0,053	0,550	6	0,050	0,077	0,736
7	0,648	0,045	0,595	7	0,032	0,049	0,785
8	0,554	0,038	0,634	8	0,026	0,040	0,825
9	0,545	0,038	0,672	9	0,023	0,036	0,861
10	0,445	0,031	0,703	10	0,017	0,027	0,888
11	0,420	0,029	0,732	11	0,015	0,023	0,911
12	0,351	0,024	0,756	12	0,012	0,019	0,930
13	0,246	0,017	0,773	13	0,010	0,016	0,946
14	0,231	0,016	0,789	14	0,008	0,012	0,959
15	0,220	0,015	0,805	15	0,006	0,010	0,969
16	0,200	0,014	0,819	16	0,005	0,008	0,977
17	0,166	0,011	0,830	17	0,004	0,007	0,984
18	0,159	0,011	0,841	18	0,004	0,006	0,990
19	0,128	0,009	0,850	19	0,003	0,005	0,995
20	0,121	0,008	0,858	20	0,003	0,005	1,000
21	0,084	0,006	0,864				
22	0,079	0,006	0,870				
23	0,076	0,005	0,875				
24	0,074	0,005	0,880				
25	0,073	0,005	0,885				
26	0,072	0,005	0,890				
27	0,070	0,005	0,895				
28	0,068	0,005	0,900				
29	0,066	0,005	0,904				
30	0,064	0,004	0,909				
31	0,063	0,004	0,913				
32	0,062	0,004	0,917				
33	0,060	0,004	0,922				
34	0,060	0,004	0,926				
35	0,056	0,004	0,930				
36	0,055	0,004	0,933				
37	0,054	0,004	0,937				
38	0,052	0,004	0,941				
39	0,051	0,004	0,944				
40	0,050	0,003	0,948				
41	0,048	0,003	0,951				
42	0,047	0,003	0,954				
43	0,045	0,003	0,958				
44	0,045	0,003	0,961				
45	0,043	0,003	0,964				
46	0,041	0,003	0,967				
47	0,041	0,003	0,969				
48	0,039	0,003	0,972				
49	0,037	0,003	0,975				
50	0,035	0,002	0,977				
51	0,034	0,002	0,979				
52	0,031	0,002	0,982				

Figura 16: Gráfico de dos dimensiones para las dos primeras componentes (CP) para el APG



Caracterización molecular, fenotípica y consenso entre la diversidad molecular y la variación para caracteres cuantitativos en la generación segregante F₂ del HSC RIL1xRIL5

La caracterización molecular por perfiles de AFLP, utilizando las seis combinaciones seleccionadas mostró un total de 137 bandas, de las cuales 75 resultaron ser polimórficas (54,74%). El total de bandas relevadas y bandas polimórficas por combinación, se presenta en la Tabla 10.

Tabla 10: Combinaciones de cebadores, bandas totales y bandas polimórficas

Combinación de cebadores (Código)	Bandas totales	Bandas polimórficas
F	15	12
H	12	11
J	15	11
HH	31	5
II	37	15
JJ	27	21
Total	137	75

De las 75 bandas polimórficas, 27 ajustaron a la segregación mendeliana esperada (36%).

Como resultado del análisis de conglomerado, se obtuvo el agrupamiento que se observa en la Figura 17. En el mismo se puede observar un ordenamiento de los genotipos de la generación F₂. Como se puede observar en el análisis del cluster, el genotipo III-65 se separa en una primera división del resto de los genotipos. El coeficiente de correlación cofenética fue de 0,82.

En cuanto a la caracterización fenotípica, los valores promedios y su error estándar para la RIL1, RIL5, su HSC y la F₂ para los 11 caracteres de interés agronómico se puede observar en la Tabla 11. En la Figura 18, se pueden observar los frutos correspondientes a las RIL, su HSC y la generación segregante F₂. En la Figura 19, se muestran los histogramas para la población F₂ para los 11 caracteres fenotípicos y en los mismos se marcan los valores promedios para los GUPC (*S. lycopersicum* cv. Caimanta, *S. pimpinellifolium* accesión LA722 y su F₁) y GUSC (RIL1, RIL5 y su HSC) y el valor promedio de los individuos F₂. En la Figura 19, se puede observar que, para todos los caracteres, con excepción de altura y peso, hubo individuos de la generación F₂ que superaron, tanto por valores superiores o inferiores, a los valores promedios de los parentales de los GUSC. Ni

para altura ni para peso, hubo individuos F_2 , con valores promedios que superen a la RIL de mayor valor promedio (RIL1). Al realizar esta misma comparación, pero teniendo en cuenta las medias de los parentales de los GUPC, para los caracteres diámetro, altura, peso y firmeza, no hubo individuos F_2 cuyos valores promedios superaran o fueran inferiores a los valores promedios de los parentales de los GUPC. Para el resto de los caracteres, hubo individuos con valores promedios superiores o inferiores, al menos, a uno de los parentales.

Figura 17: Análisis de conglomerados para la generación F₂ del HSC RIL1xRIL5

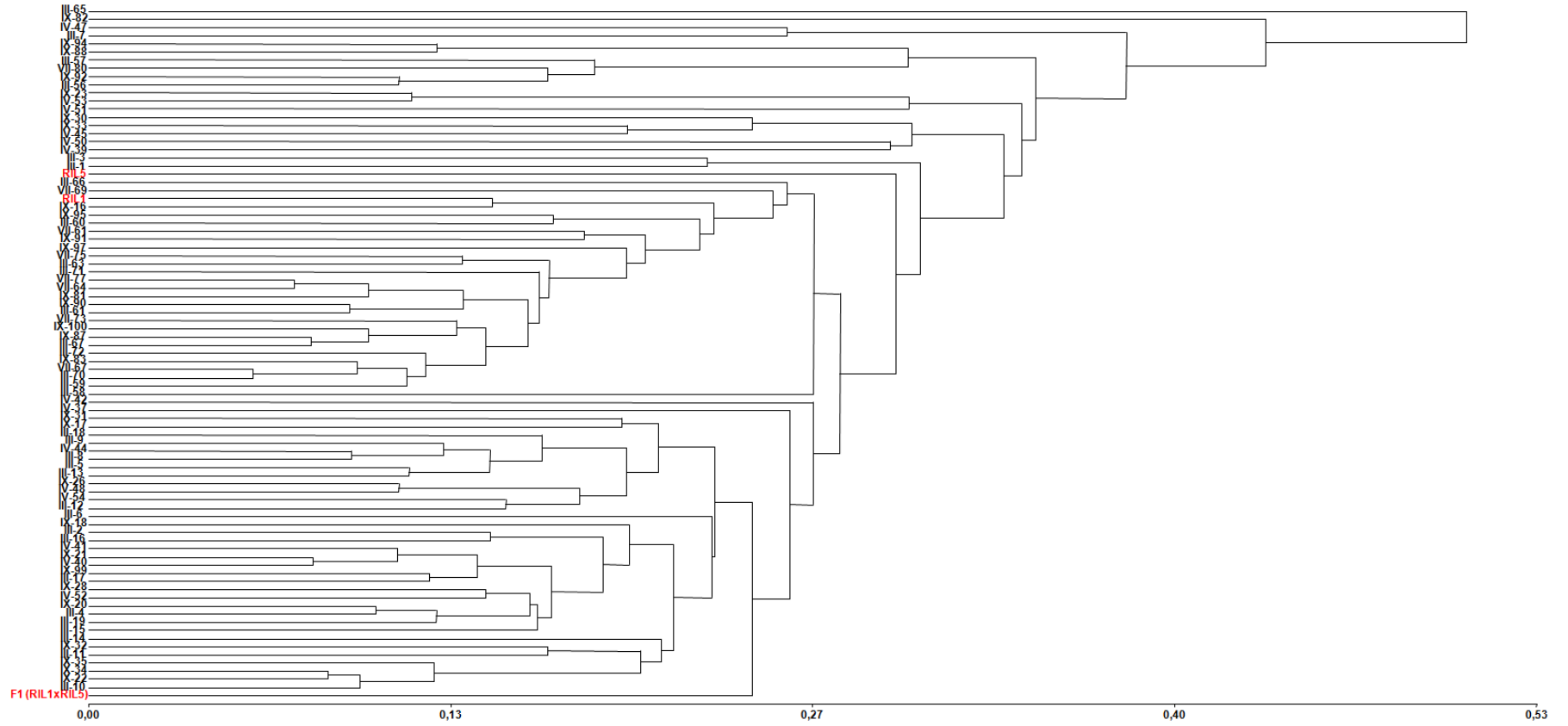


Tabla 11: Valores promedios \pm error estándar para los 11 caracteres fenotípicos para la RIL1, RIL5, el HSC (RIL1xRIL5) y la generación F₂

	D	A	Fo	P	VP	F	L	a/b	SS	pH	AT
RIL1	3,53 \pm 0,07	3,07 \pm 0,06	0,87 \pm 0,01	23,64 \pm 1,06	17,55 \pm 0,95	53,60 \pm 1,30	40,05 \pm 0,41	1,09 \pm 0,04	7,10 \pm 0,22	4,78 \pm 0,02	0,33 \pm 0,003
RIL5	3,26 \pm 0,14	2,70 \pm 0,09	0,84 \pm 0,01	19,99 \pm 2,37	16,35 \pm 1,18	48,56 \pm 1,34	38,41 \pm 0,49	1,24 \pm 0,02	8,20 \pm 0,12	4,76 \pm 0,01	0,40 \pm 0,02
HSC (RIL1xRIL5)	2,47 \pm 0,04	2,24 \pm 0,04	0,91 \pm 0,01	8,72 \pm 0,41	16,91 \pm 0,66	45,35 \pm 1,66	37,42 \pm 0,28	1,25 \pm 0,04	8,80 \pm 0,04	4,86 \pm 0,02	0,38 \pm 0,01
F₂ (*)	2,59 \pm 0,48	2,27 \pm 0,39	0,88 \pm 0,08	9,84 \pm 5,11	16,90 \pm 8,52	53,11 \pm 7,45	39,24 \pm 2,55	1,13 \pm 0,20	8,59 \pm 1,22	4,90 \pm 0,30	0,36 \pm 0,15

Referencias: (*): en F₂ se expresa el valor medio \pm el desvío estándar; **D**: diámetro; **A**: altura; **Fo**: índice de forma; **P**: peso; **VP**: vida poscosecha; **F**: firmeza; **L**: porcentaje de reflectancia; **a/b**: cociente de absorbancias; **SS**: sólidos solubles; **AT**: acidez titulable

Figura 18: RIL1, el HSC entre ellas y la RIL5 **(a)** y frutos de la generación F₂ **(b)**

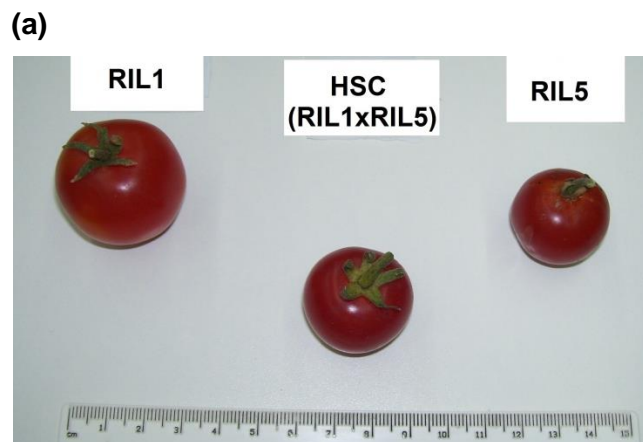
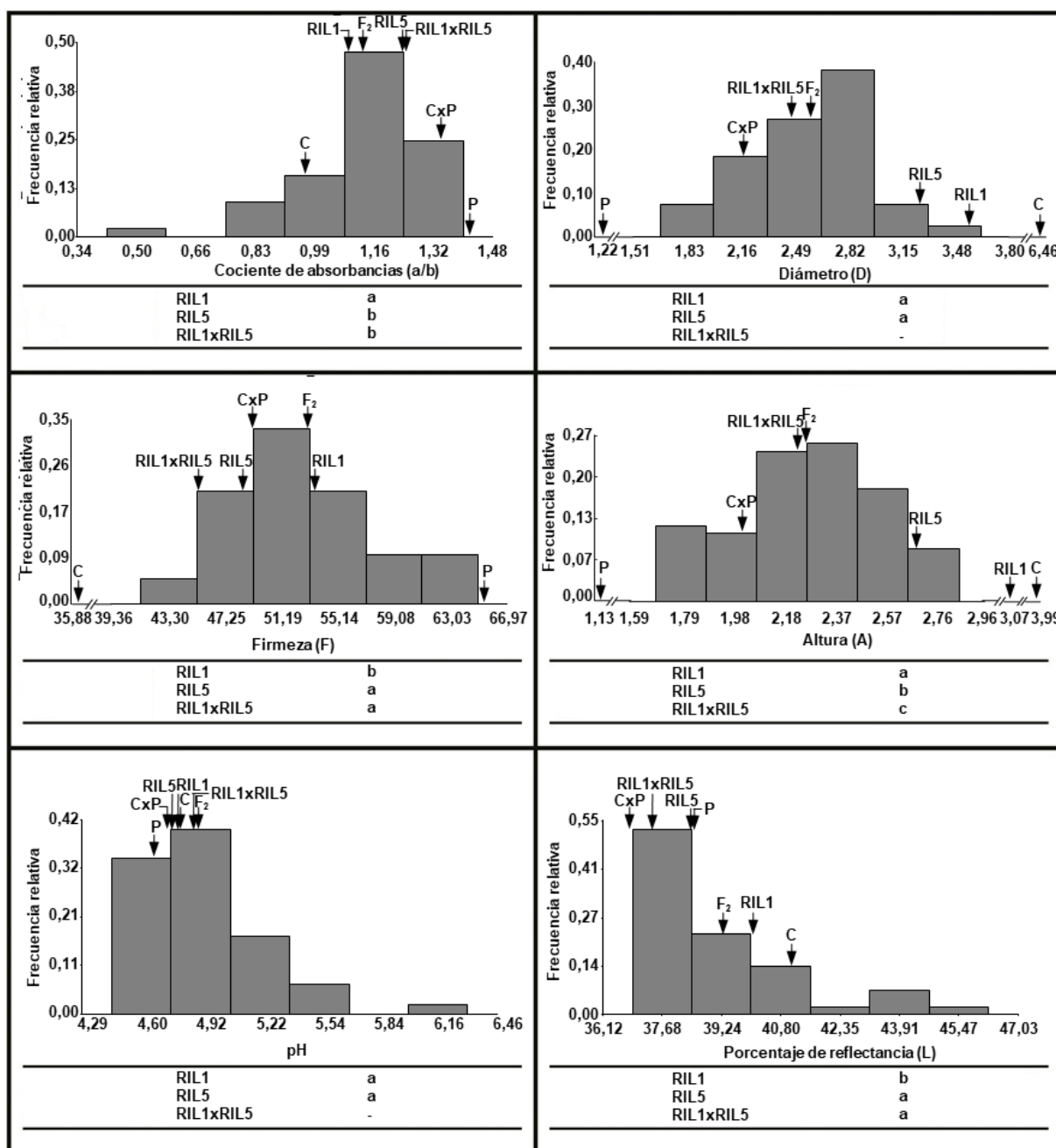
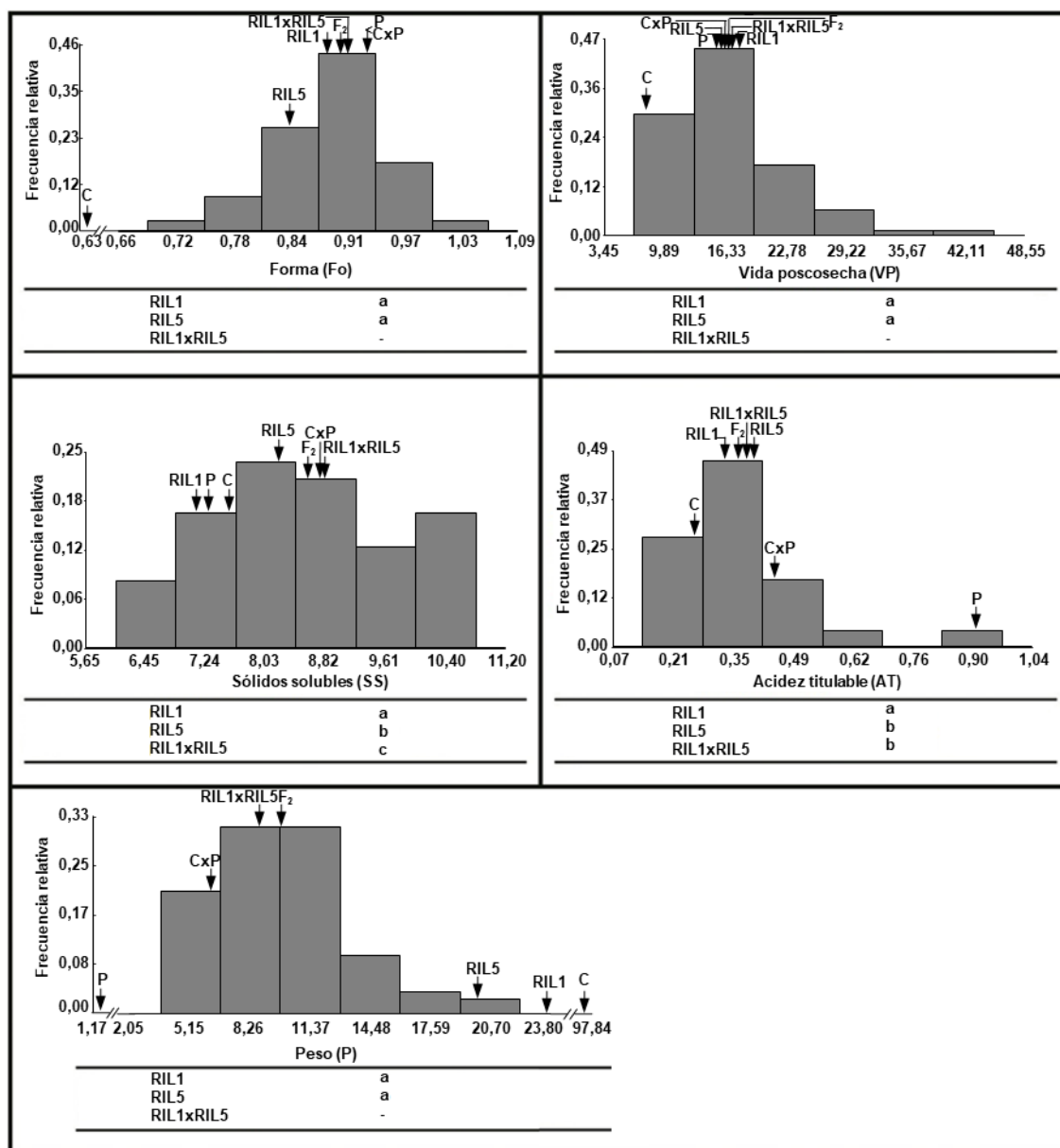


Figura 19: Histogramas para la población F₂ para los 11 caracteres fenotípicos



Referencias: C: *S. lycopersicum* cv. Caimanta; P: *S. pimpinellifolium* accesión LA722; F₂: generación segregante F₂ del HSC RIL1xRIL5; a,b,c: diferentes letras indican diferencias significativas (p<0,05)

Imagen 19 (continuación): Histogramas para la población F₂ para los 11 caracteres fenotípicos



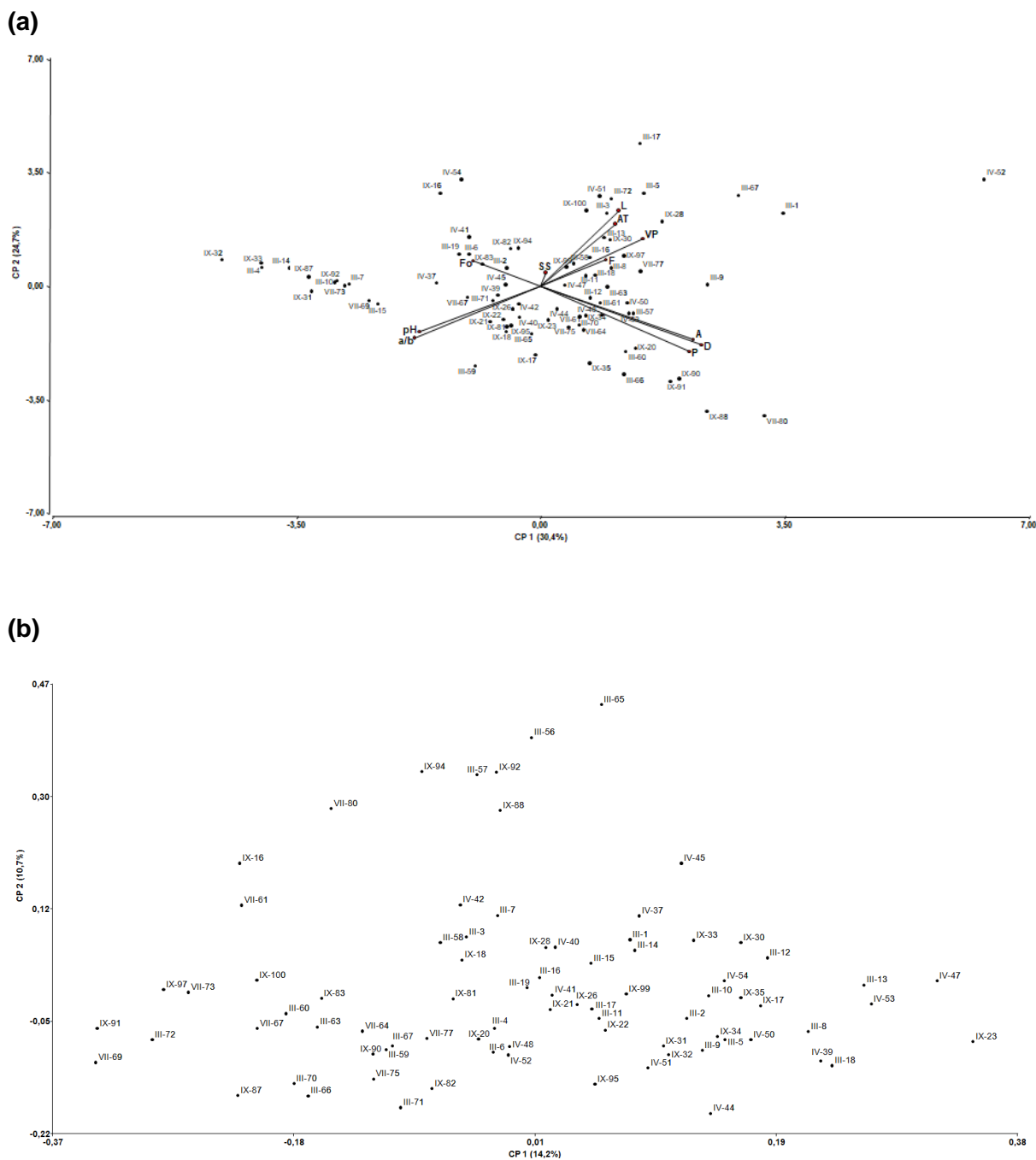
Referencias: C: *S. lycopersicum* cv. Caimanta; P: *S. pimpinellifolium* accesión LA722; F₂: generación segregante F₂ del HSC RIL1xRIL5; a,b,c: diferentes letras indican diferencias significativas (p<0,05)

El ACP aplicado a las 11 variables morfológicas mostró que las primeras dos componentes (CP) acumulaban más del 55% de la variación (CP1= 30,40%, CP2= 24,70%) (Figura 20a). La CP1 estaba principalmente explicada por diámetro, altura y peso y la CP2 por el porcentaje de reflectancia (L). El coeficiente de correlación cofenética fue de 0,87. Las primeras cuatro componentes explicaban el 80,80% de la variación. En las Tablas 12a y 12b se muestran los valores de los autovalores y autovectores.

El ACoP utilizando las bandas producto de las 6 combinaciones de cebadores y que ajustaron a la segregación mendeliana esperada mostró una alta variación (Figura 20b). Fueron necesarias las primeras 12 coordenadas para explicar el 70,60% de la variabilidad (Tabla 13a).

El ACP y el ACoP permitieron la realización del APG. Las primeras seis componentes explicaron el 72,90% de la variabilidad (CP1 = 18,50%, CP2 = 17,30%, CP3 = 13,30%, CP4 = 9,90%, CP5 = 7,40%, CP6 = 6,40%), logrando un consenso de 64,70% (Tabla 13b y Figura 21).

Figura 20: Gráfico de dos dimensiones para las dos primeras componentes (CP) **(a)** para el ACP **(b)** y gráfico de dos dimensiones para las dos primeras coordenadas (CP) para el ACoP **(b)**



Referencias: VP: vida poscosecha; P: peso; F: firmeza; D: diámetro; A: altura; L: porcentaje de reflectancia; a/b: cociente de absorbancias; SS: sólidos solubles; AT: acidez titulable; Fo: índice de forma

Tabla 12: Autovalores **(a)** y autovectores para las dos primeras componentes **(b)** en el ACP

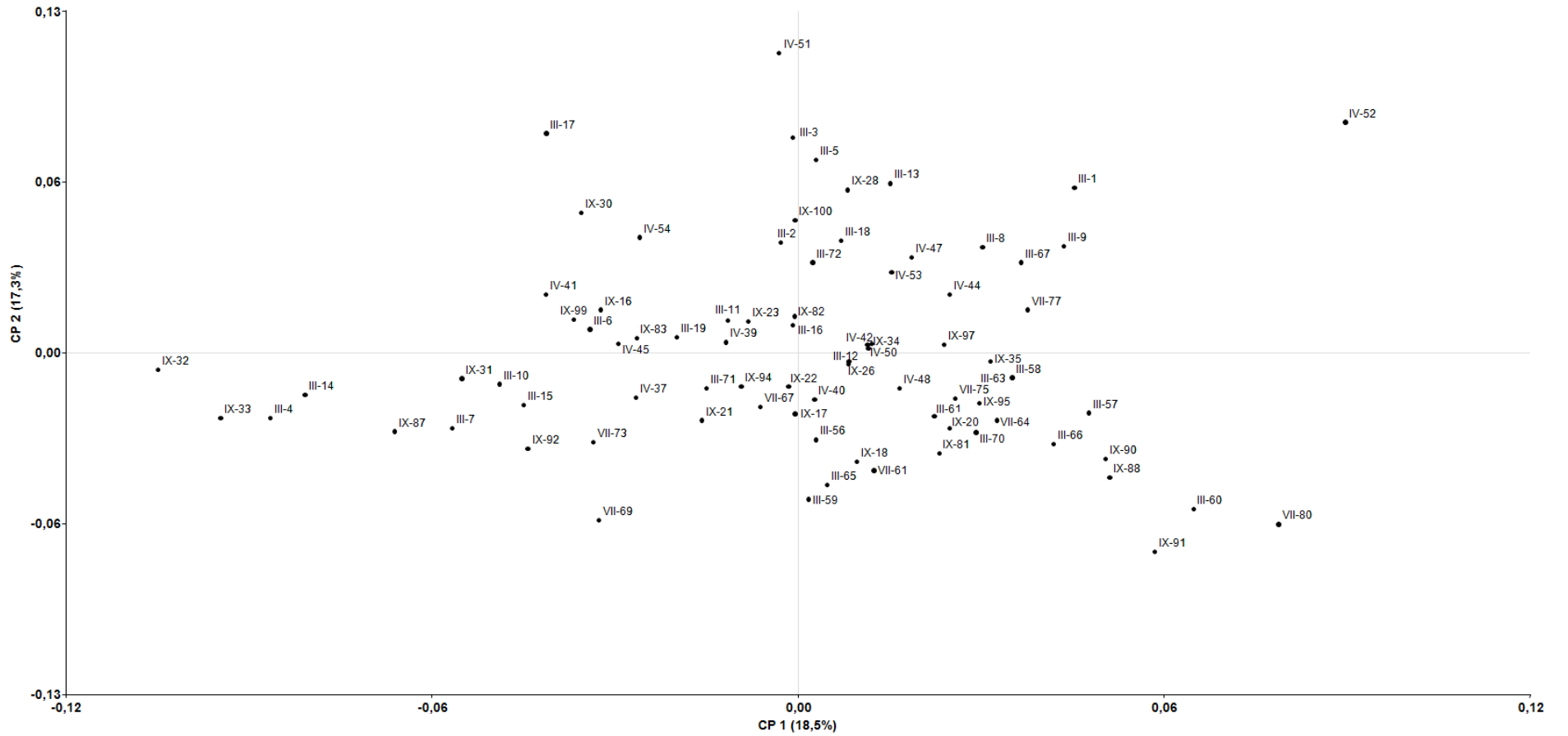
(a)				(b)		
Autovalores				Autovectores		
Lambda	Valor	Proporción	Proporción Acumulada	Variables	e1	e2
1	3,339	0,304	0,304	D	0,442	-0,348
2	2,712	0,247	0,550	A	0,418	-0,315
3	1,621	0,147	0,698	Fo	-0,187	0,151
4	1,219	0,111	0,808	P	0,408	-0,389
5	0,812	0,074	0,882	VP	0,281	0,276
6	0,548	0,050	0,932	F	0,178	0,152
7	0,399	0,036	0,968	L	0,214	0,446
8	0,227	0,021	0,989	a/b	-0,345	-0,305
9	0,084	0,008	0,996	SS	0,013	0,079
10	0,036	0,003	1,000	pH	-0,332	-0,271
11	0,003	0,0003	1,000	AT	0,206	0,367

Referencias: **D:** diámetro; **A:** altura; **Fo:** índice de forma; **P:** peso; **VP:** vida poscosecha; **F:** firmeza; **L:** porcentaje de reflectancia; **a/b:** cociente de absorbancias; **SS:** sólidos solubles; **AT:** acidez titulable

Tabla 13: Primeros 65 autovalores correspondientes al ACoP **(a)** y autovalores para el APG **(b)**

(a)				(b)			
Autovalores				Autovalores			
Lambda	Valor	Proporción	Proporción Acumulada	Lambda	Valor	Proporción	Proporción Acumulada
1	1,941	0,142	0,142	1	0,120	0,185	0,185
2	1,460	0,107	0,249	2	0,112	0,173	0,358
3	1,043	0,076	0,325	3	0,086	0,133	0,491
4	1,009	0,074	0,399	4	0,064	0,099	0,590
5	0,754	0,055	0,454	5	0,048	0,074	0,664
6	0,718	0,053	0,507	6	0,042	0,064	0,729
7	0,646	0,047	0,554	7	0,033	0,051	0,780
8	0,565	0,041	0,595	8	0,022	0,034	0,814
9	0,491	0,036	0,631	9	0,019	0,030	0,844
10	0,384	0,028	0,660	10	0,017	0,027	0,870
11	0,349	0,026	0,685	11	0,014	0,021	0,891
12	0,292	0,021	0,706	12	0,011	0,017	0,908
13	0,272	0,020	0,726	13	0,009	0,013	0,921
14	0,215	0,016	0,742	14	0,008	0,012	0,934
15	0,190	0,014	0,756	15	0,007	0,011	0,944
16	0,177	0,013	0,769	16	0,006	0,009	0,953
17	0,150	0,011	0,780	17	0,005	0,007	0,960
18	0,149	0,011	0,791	18	0,004	0,006	0,966
19	0,110	0,008	0,799	19	0,004	0,006	0,972
20	0,101	0,007	0,806	20	0,003	0,005	0,977
21	0,090	0,007	0,813	21	0,003	0,004	0,981
22	0,085	0,006	0,819	22	0,002	0,004	0,985
23	0,085	0,006	0,825	23	0,002	0,003	0,988
24	0,083	0,006	0,831	24	0,002	0,003	0,991
25	0,081	0,006	0,837	25	0,002	0,003	0,994
26	0,079	0,006	0,843	26	0,002	0,003	0,997
27	0,075	0,005	0,849	27	0,002	0,003	1,000
28	0,073	0,005	0,854				
29	0,070	0,005	0,859				
30	0,069	0,005	0,864				
31	0,069	0,005	0,869				
32	0,066	0,005	0,874				
33	0,064	0,005	0,879				
34	0,063	0,005	0,883				
35	0,063	0,005	0,888				
36	0,061	0,004	0,892				
37	0,058	0,004	0,897				
38	0,058	0,004	0,901				
39	0,057	0,004	0,905				
40	0,053	0,004	0,909				
41	0,051	0,004	0,913				
42	0,049	0,004	0,916				
43	0,049	0,004	0,920				
44	0,048	0,004	0,923				
45	0,048	0,004	0,927				
46	0,046	0,003	0,930				
47	0,046	0,003	0,934				
48	0,044	0,003	0,937				
49	0,044	0,003	0,940				
50	0,043	0,003	0,943				
51	0,042	0,003	0,946				
52	0,040	0,003	0,949				
53	0,040	0,003	0,952				
54	0,038	0,003	0,955				
55	0,037	0,003	0,958				
56	0,037	0,003	0,960				
57	0,036	0,003	0,963				
58	0,035	0,003	0,966				
59	0,033	0,002	0,968				
60	0,033	0,002	0,970				
61	0,031	0,002	0,973				
62	0,031	0,002	0,975				
63	0,030	0,002	0,977				
64	0,028	0,002	0,979				
65	0,026	0,002	0,981				

Figura 21: Gráfico de dos dimensiones para las dos primeras componentes (CP) para el análisis de APG



DISCUSIÓN

Los híbridos de segundo ciclo (HSC) se obtienen a partir del cruzamiento entre RIL derivadas de una generación F_2 producida por el cruzamiento de dos parentales homocigotas discrepantes para ciertos caracteres (Hill *et al.*, 2003). Debido a los procesos de recombinación tanto en zonas de genes relacionados a los caracteres de interés agronómico como en otras zonas, es de esperar que las generaciones segregantes de estos HSC muestren genotipos capaces de superar a las RIL o al HSC.

Los marcadores AFLP son una técnica basada en la amplificación selectiva por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de fragmentos restringidos del ADN genómico. Blears *et al.* (1998) indicaron que una de las principales ventajas de los marcadores AFLP es el número de *loci* detectados por reacción. Así, este tipo de marcadores permiten obtener una gran cantidad de información, con pocas combinaciones de cebadores, además de no ser necesario contar con la información del genoma de la especie.

En el caso de estas generaciones, el número de bandas relevadas utilizando las seis combinaciones de cebadores previamente selectas por presentar alto número de bandas y porcentaje de polimorfismo (Cachiarelli *et al.*, 2015), fue superior a 100 (HSC RIL18xRIL1: 110, HSC RIL1xRIL8 101 e HSC RIL1xRIL5: 137). A su vez, el porcentaje de bandas polimórficas reveladas fue superior al 54% en todos los casos. Esto estaría indicando que las combinaciones que previamente fueron selectas serían de utilidad para caracterizar las generaciones segregantes. Además, esto evidencia una alta variación molecular en las generaciones segregantes. Pereira da Costa *et al.* (2016), utilizando la generación segregante F_2 de un HSC y seis combinaciones de cebadores de AFLP, detectaron un porcentaje de polimorfismo del 67%. Liberatti *et al.* (2013), analizando seis RIL y tres HSC (tres de las RIL y uno de los HSC fueron utilizados en el presente trabajo) y cinco combinaciones de AFLP, obtuvieron que el porcentaje de polimorfismo fue, aproximadamente (considerando los tres HSC), del 36%.

En estas tres generaciones correspondientes a las F_2 de los tres HSC, el análisis de agrupamiento, permitió obtener un ordenamiento de los genotipos segregantes y de los materiales uniformes (RIL e HSC). En todos los casos, el coeficiente de correlación cofenética fue alto con valores superiores a 0,80. Este alto valor estaría indicando que durante el proceso no ha ocurrido una gran perturbación en lo que se refiere a la estructura original de los datos ya que, este coeficiente mide la correlación entre las distancias iniciales y las distancias finales (Sokal y Rohlf, 1962). Por otro lado, estos agrupamientos obtenidos estarían indicando la existencia de recombinación genética y alta diversidad genética entre

los individuos de la población segregante que pudo ser observada a través de las distancias que se encontraron.

La caracterización fenotípica de las generaciones segregantes F_2 de los tres HSC, permitió observar, que en cuanto a los caracteres relacionados a tamaño de fruto (diámetro, altura y peso) la F_2 del HSC RIL1xRIL8, fue la que presentó los menores valores. Cabe destacar que la RIL8 es entre las RIL utilizadas en este trabajo, la que presenta bajo valor de peso. Las otras dos generaciones F_2 (derivadas de los HSC RIL18XRIL1 y RIL1xRIL5) presentaron valores de diámetro, peso y altura de los frutos similares entre sí pero superiores a la generación F_2 del HSC RIL1xRIL8. En cuanto al carácter índice de forma, la F_2 del HSC RIL18xRIL1, fue la que presentó un valor promedio superior a uno, indicando que los frutos son ligeramente alargados. Esto sería esperable ya que la RIL18, es la única RIL que posee esta forma. Esta variación para los caracteres cuantitativos relacionados a calidad de fruto, se origina junto a una alta variación (o diversidad) molecular, como ya se comentó anteriormente.

En todas las generaciones segregantes evaluadas hubo individuos F_2 cuyos valores promedios superaron (de manera superior o inferior), al menos, a uno de los valores promedios de las RIL. Esto reforzaría la idea de que en las generaciones segregantes de los HSC puede generarse nueva variación fenotípica por recombinación de los alelos seleccionados y fijados en sus padres. Pereira da Costa *et al.* (2016), para un HSC de tomate, también encuentran para la mayoría de los caracteres evaluados, entre ellos diámetro, altura, índice de forma, peso, vida poscosecha, sólidos solubles, pH, acidez titulable, firmeza, entre otros, individuos de la generación F_2 cuyos valores superan (tanto en mayor valor o en menor valor) los valores promedios de, al menos, uno de los parentales RIL.

Las distintas herramientas multivariadas permiten conocer de un modo aproximado y de una manera más amplia, las diferentes estructuras de las poblaciones. Respecto al consenso entre ambas caracterizaciones, en el ACP, en las tres generaciones fueron necesarias las primeras cuatro componentes (CP) para explicar cerca del 80% de la variabilidad. Las primeras dos CP mostraron un porcentaje cercano al 50%. En todas las generaciones, la CP1 estuvo explicada por los caracteres diámetro, altura y peso (en diferente proporción en cada generación), lo que indicaría que estas variables son las responsables de explicar la mayor variabilidad. En lo referido a la CP2, fue más variable, aunque en las tres generaciones la variable que más explicó esta componente fue el parámetro de color L. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Pratta *et al.* (2011a), donde utilizando 16 RIL (entre ellas las cuatro utilizadas en la presente Tesis), y

marcadores AFLP, obtienen que las dos primeras CP explican el 62% de la variabilidad fenotípica y que las mismas están explicadas principalmente por peso, diámetro y altura (CP1) y por índice de forma y el parámetro de color L (CP2).

Al realizar el ACoP utilizando la información molecular de bandas que ajustaron a la segregación mendeliana, para obtener el 80% de la variabilidad se necesitaron 12 o más coordenadas. Para explicar un porcentaje similar, fueron necesarias, más coordenadas en el ACoP que de componentes en el ACP, y esto se debió a la mayor variabilidad existente a nivel molecular que fenotípico.

El APG se basa en la reducción de dimensionalidad de los datos, obtenida mediante el ACP y el ACoP, permitiendo realizar una interpretación de la estructura de la variación de los datos. Al unir la información de ambos análisis, el valor consenso obtenido fue de 67,40% para la F₂ del HSC RIL18xRIL1 y de 64,70% para las otras dos generaciones F₂ de los otros dos HSC. Mahuad *et al.* (2013) encontraron un 75% de consenso entre 11 caracteres cuantitativos relacionados a calidad de fruto en tomate e información molecular usando marcadores de tipo SRAP (polimorfismos de amplificación de secuencias relacionadas) para 18 genotipos uniformes (entre ellos diez híbridos de segundo ciclo, cinco RIL y los parentales de esas RIL) sugiriendo que el APG permite verificar el consenso entre la variabilidad de caracteres fenotípicos y marcadores moleculares. Por otro lado, Bramardi *et al.* (2005) demostraron que el APG fue la técnica más precisa para agrupar algunas accesiones.

Cabe destacar que estas generaciones segregantes F₂, derivadas de HSC, fueron obtenidas mediante el cruzamiento de RIL que sufrieron un proceso de selección, pero a pesar de este continuo proceso, aún existe una alta diversidad genética y una gran variación para los caracteres cuantitativos. La correlación entre la diversidad morfológica y molecular indicaría la presencia de desequilibrio de ligamiento entre marcadores moleculares y los genes que controlan esos caracteres fenotípicos según postula Baranger *et al.* (2004). Las técnicas multivariadas aplicadas a estas variables para las tres generaciones F₂ son una aproximación valiosa para la detección de asociación entre la evaluación fenotípica y molecular en estos materiales genéticos y por lo tanto ameritan un análisis para la detección de los posibles QTLs involucrados.

CAPÍTULO II

En este Capítulo se aborda el Objetivo Específico 2: Estimar parámetros genéticos y detectar QTLs para caracteres de calidad de fruto en las tres generaciones segregantes caracterizadas a fin de seleccionar entre ellas una población base que permita iniciar un nuevo programa de mejoramiento.

Para cumplir con este objetivo se llevaron a cabo las siguientes actividades:

1. Estimación de parámetros genéticos de los caracteres que definen la calidad en los frutos en las tres generaciones F_2 de los HSC: RIL18xRIL1, RIL1xRIL8 y RIL1xRIL5.
2. Detección de QTLs asociados a calidad de fruto utilizando marcadores AFLP y validación de estos QTLs mediante su presencia simultánea en las tres generaciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

En este Capítulo el material vegetal estuvo compuesto por todos los genotipos uniformes de segundo ciclo (GUSC) y sus generaciones segregantes, que fueron evaluados fenotípicamente y molecularmente en el Capítulo anterior.

Métodos

Estimación de parámetros genéticos

La normalidad para todos los caracteres se evaluó en los progenitores y el híbrido de segundo ciclo (HSC) y F_2 (filial) con la prueba de Shapiro-Wilk (Shapiro y Wilk, 1965). Las comparaciones entre los valores medios de los genotipos uniformes (progenitores e HSC) se realizaron por ANOVA, utilizando el test de Tukey. Estos análisis fueron realizados mediante el software estadístico InfoStat versión 2016 (Di Rienzo *et al.*, 2016). Para los caracteres en que se presentaron diferencias entre los genotipos uniformes, se calculó el grado de dominancia (d/a). La heredabilidad en sentido amplio (H^2), también conocida como GDG (grado de determinación genética), se estimó siguiendo la metodología de Mather y Jinks (1971) con modificaciones (Kearsey y Pooni, 1996). También, se calcularon las correlaciones entre las variables fenotípicas, utilizando el coeficiente de correlación de Spearman (Conover, 1999).

Detección de QTLs

La evaluación de la asociación de bandas que ajustaron a la segregación mendeliana esperada con los caracteres cuantitativos se realizó mediante ANOVA a un criterio de clasificación, con el fin de identificar los QTLs (*loci* de caracteres cuantitativos) (Tanksley, 1993, Collard *et al.*, 2005). Para ello, la normalidad de cada carácter fue verificada sólo para la generación F_2 mediante la prueba de Shapiro-Wilk (Shapiro y Wilk, 1965) y se utilizó la prueba de χ^2 para evaluar la segregación mendeliana de cada banda polimórfica (3:1 por ser marcador dominante).

Los fragmentos que asociaron a más de un carácter se consideraron como marcadores con efectos pleiotrópicos (van der Knaap y Tanksley, 2003; Pratta *et al.* 2011a).

Finalmente, para cada combinación de fragmentos asociados a un mismo carácter, se realizó la prueba de χ^2 para probar la hipótesis de segregación independiente y se aplicó un análisis factorial de ANOVA para detectar interacciones epistáticas entre los pares de bandas que segregaron independientemente (Tanksley, 1993, Collard *et al.*, 2005). Todos los análisis fueron realizados mediante el software estadístico InfoStat versión 2016 (Di Rienzo *et al.*, 2016).

Validación de QTLs detectados

Para realizar la validación, se compararon los QTLs detectados en las tres generaciones segregantes de los HSC. Se consideró como QTL validado, aquel que se presentó simultáneamente en las tres generaciones (Pereira da Costa *et al.*, 2013).

RESULTADOS

Estimación de parámetros genéticos

Para el HSC RIL18xRIL1, todos los caracteres tuvieron una distribución que ajusta a una normal. Se encontraron diferencias significativas entre ambas RIL (líneas endocriadas recombinantes) para los caracteres diámetro, índice de forma, peso, vida poscosecha, porcentaje de reflectancia (L), sólidos solubles y acidez titulable (Tabla 1). Por lo tanto, el grado de dominancia (d/a), se estimó para estos siete caracteres.

Se observó dominancia completa para todos los caracteres, a excepción del índice de forma, donde la acción génica fue aditividad.

Los valores de H^2 para el HSC RIL18xRIL1 se puede observar en la Tabla 2. Los caracteres diámetro, altura, índice de forma y peso presentaron, de acuerdo a lo indicado por la bibliografía (Rodríguez *et al.*, 2008), valores medios de H^2 . Es de destacar que para estos dos últimos caracteres, los valores de H^2 fueron los más bajos de esta generación. Los mayores valores de H^2 se observaron para los caracteres firmeza, ambos parámetros de color (L y a/b), vida poscosecha y los atributos bioquímicos (pH, sólidos solubles y acidez titulable).

Tabla 1: Caracteres, medias, error estándar, d/a y acción génica para el HSC RIL18xRIL1

	D	A	Fo	P	VP	F	L	a/b	SS	pH	AT
RIL1	3,53± 0,07 a	3,07± 0,06 a	0,87± 0,01 a	23,64± 1,06 a	17,55± 0,95 a	53,60± 1,30 a	40,05± 0,41 a	1,09± 0,04 a	7,10± 0,22 a	4,78± 0,02 a	0,33± 0,0032 a
RIL18	2,93± 0,11 b	3,15± 0,08 a	1,10± 0,03 b	15,48± 1,46 b	14,28± 0,84 b	55,10± 2,72 a	42,20± 0,54 b	1,07± 0,03 a	6,04± 0,04 b	4,84± 0,03 a	0,25± 0,01 b
HSC (RIL18xRIL1)	2,74± 0,05 b	2,64± 0,05	0,97± 0,01 c	12,45± 0,55 b	13,72± 0,60 b	49,00± 2,57	40,48± 0,38 a	1,08± 0,05	7,38± 0,17 a	5,04± 0,06	0,32± 0,01 a
F ₂ (*)	2,60± 0,47	2,67± 0,51	1,03± 0,12	11,16± 5,33	19,06± 7,34	57,54± 7,67	39,29± 1,82	1,15± 0,15	7,27± 1,35	4,81± 0,27	0,32± 0,12
Diferencia entre RIL1 y RIL18	**	ns	**	**	*	ns	**	ns	**	ns	**
d/a	-1	nc	0	-1	-1	nc	-1	nc	1	nc	1
Acción Génica	Dominancia completa (RIL18)	nc	Aditividad pura	Dominancia completa (RIL18)	Dominancia completa (RIL18)	nc	Dominancia completa (RIL1)	nc	Dominancia completa (RIL1)	nc	Dominancia completa (RIL1)

Referencias: (*): en F₂ se presenta el desvío estándar; **D:** diámetro; **A:** altura; **Fo:** índice de forma; **P:** peso; **VP:** vida poscosecha; **F:** firmeza; **L:** porcentaje de reflectancia; **a/b:** cociente de absorbancias; **SS:** sólidos solubles; **AT:** acidez titulable; **a, b, c:** diferentes letras indican diferencias significativas; ****:** diferencia significativa p<0,01; *****: diferencia significativa p<0,05; **ns:** diferencia no significativa, **nc:** no se calculó por no existir diferencias significativas entre ambos padres

Tabla 2: Valores de H² para la generación F₂ del HSC RIL18xRIL1

Carácter	σ^2A	σ^2G	σ^2F	H ²
D	0,251	0,130	0,381	0,34
A	0,211	0,171	0,382	0,45
P	39,829	15,650	55,479	0,28
Fo	0,014	0,005	0,019	0,26
VP	30,033	38,457	68,490	0,56
F	47,593	55,564	103,157	0,54
a/b	0,017	0,019	0,036	0,53
L	2,023	3,131	5,154	0,61
pH	0,008	0,066	0,074	0,89
SS	0,111	1,709	1,820	0,94
AT	0,001	0,018	0,019	0,95

Referencias: D: diámetro; A: altura; Fo: índice de forma; P: peso; VP: vida poscosecha; F: firmeza; a/b: cociente de absorbancias; L: porcentaje de reflectancia; SS: sólidos solubles; AT: acidez titulable; σ^2A : varianza ambiental; σ^2G : varianza genética; σ^2F : varianza fenotípica; H²: heredabilidad en sentido amplio

En la Tabla 3 se pueden observar las correlaciones entre variables fenotípicas.

Tabla 3: Coeficientes de correlación de Spearman y valores de probabilidad para todas las variables fenotípicas

	D	A	Fo	P	VP	L	a/b	F	SS	pH	AT
D	1,000	0,000	0,340	0,000	0,050	1,000	0,120	0,930	0,140	0,320	0,160
A	0,770	1,000	0,000	0,000	0,001	0,640	0,100	0,940	0,070	0,100	0,010
Fo	-0,120	0,500	1,000	0,800	0,050	0,620	0,550	0,880	0,780	0,220	0,070
P	0,960	0,850	0,030	1,000	0,010	0,980	0,040	0,960	0,160	0,260	0,120
VP	0,230	0,400	0,230	0,310	1,000	0,001	0,400	0,860	0,270	0,250	0,830
L	0,001	-0,060	-0,060	-0,003	-0,410	1,000	0,000	0,050	0,004	0,140	0,960
a/b	-0,190	-0,210	-0,070	-0,260	0,110	-0,580	1,000	0,180	0,000	0,970	0,020
F	-0,010	-0,010	-0,020	-0,010	-0,020	0,240	-0,170	1,000	0,120	0,002	0,410
SS	-0,190	-0,230	-0,040	-0,180	0,140	-0,370	0,550	-0,200	1,000	0,780	0,001
pH	0,130	0,210	0,160	0,140	0,150	-0,190	-0,010	-0,390	0,040	1,000	0,000
AT	-0,180	-0,340	-0,230	-0,200	-0,030	-0,010	0,310	0,110	0,430	-0,520	1,000

Referencias: D: diámetro; A: altura; Fo: índice de forma; P: peso; VP: vida poscosecha; L: porcentaje de reflectancia; a/b: cociente de absorbancias; F: firmeza; SS: sólidos solubles; AT: acidez titulable

Por debajo de la diagonal amarilla se observan los valores del coeficiente de correlación de Spearman, mientras que por encima de dicha diagonal se encuentran los valores de probabilidad asociada a la prueba de hipótesis de correlación nula. Se puede observar que se obtuvieron valores altos de correlación (resaltado en color celeste) para diámetro y altura, diámetro y peso, altura e índice de forma, altura y peso, L y a/b (negativa), sólidos solubles y a/b y pH y acidez titulable (negativa). Todos los valores de probabilidad resultaron ser significativos (resaltado en color naranja).

Para el HSC RIL1xRIL8, también todos los caracteres se ajustaron a la distribución normal. Se encontraron diferencias significativas entre ambas RIL para los caracteres diámetro, altura, índice de forma, peso, sólidos solubles, acidez titulable y ambos caracteres relacionados a color (L y a/b) (Tabla 4). Por lo tanto, el grado de dominancia (d/a) se estimó para estos ocho caracteres.

Se presentó dominancia completa de la RIL8 para los atributos índice de forma y ambos caracteres de color. Para diámetro, altura y peso, se encontró dominancia parcial de RIL8. El carácter sólidos solubles presentó sobredominancia, y el carácter acidez titulable, aditividad pura.

Los valores de H^2 para el HSC RIL1xRIL8 se puede observar en la Tabla 5. El carácter peso fue el que presentó el valor más bajo de H^2 . Valores medios presentaron los caracteres diámetro y altura, mientras que los mayores valores de H^2 se dieron para los caracteres firmeza, vida poscosecha, ambos parámetros de color (L y a/b) y los atributos bioquímicos pH, sólidos solubles y acidez titulable.

Tabla 4: Caracteres, medias, error estándar, d/a y acción génica para el HSC RIL1xRIL8

	D	A	Fo	P	VP	F	L	a/b	SS	pH	AT
RIL1	3,53± 0,07 a	3,07± 0,06 a	0,87± 0,01 a	23,64± 1,06 a	17,55± 0,95 a	53,60± 1,30 a	40,05± 0,41 a	1,09± 0,04 a	7,10± 0,22 a	4,78± 0,02 a	0,33± 0,003 a
RIL8	1,63± 0,04 b	1,54± 0,04 b	0,94± 0,01 b	2,57± 0,18 b	18,32± 0,82 a	50,27± 1,53 a	38,29± 0,43 b	1,32± 0,01 b	8,90± 0,10 b	4,86± 0,05 a	0,50± 0,07 b
HSC (RIL1xRIL8)	2,22± 0,04 c	2,11± 0,04 c	0,97± 0,01 b	6,37± 0,26 c	18,93± 0,57	57,42± 2,31	38,05± 0,34 b	1,32± 0,03 b	9,68± 0,05 c	4,91± 0,02	0,42± 0,004 ab
F ₂ (*)	1,98± 0,33	1,88± 0,30	0,95± 0,07	4,76± 2,55	17,52± 7,10	53,55± 7,19	38,42± 1,85	1,20± 0,16	7,83± 1,52	4,79± 0,22	0,44± 0,17
Diferencia entre RIL1 y RIL8	**	**	**	**	ns	ns	*	**	*	ns	**
d/a	-0,36	-0,25	1	-0,60	nc	nc	-1	1	1,87	nc	0
Acción Génica	Dominancia parcial (RIL8)	Dominancia parcial (RIL8)	Dominancia completa (RIL8)	Dominancia parcial (RIL8)	nc	nc	Dominancia completa (RIL8)	Dominancia completa (RIL8)	Sobredominancia	nc	Aditividad pura

Referencias: **D:** diámetro; **A:** altura; **Fo:** índice de forma; **P:** peso; **VP:** vida poscosecha; **F:** firmeza; **L:** porcentaje de reflectancia; **a/b:** cociente de absorbancias; **SS:** sólidos solubles; **AT:** acidez titulable; **(*):** en F₂ se presenta el desvío estándar; **a, b, c:** diferentes letras indican diferencias significativas; ****:** diferencia significativa p<0,01; *****: diferencia significativa p<0,05; **ns:** diferencia no significativa, **nc:** no se calculó por no existir diferencias significativas entre ambos padres

Tabla 5: Valores de H^2 para la generación F_2 del HSC RIL1xRIL8

Carácter	σ^2A	σ^2G	σ^2F	H^2
D	0,119	0,069	0,188	0,37
A	0,110	0,054	0,164	0,33
P	15,865	2,573	18,438	0,14
Fo	0,008	0,002	0,010	0,20
VP	27,399	37,118	64,517	0,58
F	26,190	48,839	75,029	0,65
a/b	0,011	0,019	0,030	0,63
L	1,599	3,253	4,852	0,67
pH	0,002	0,046	0,048	0,96
SS	0,118	2,149	2,267	0,95
AT	0,001	0,027	0,028	0,96

Referencias: D: diámetro; A: altura; P: peso; Fo: índice de forma; VP: vida poscosecha; F: firmeza; a/b: cociente de absorbancias; L: porcentaje de reflectancia; SS: sólidos solubles; AT: acidez titulable; σ^2A : varianza ambiental; σ^2G : varianza genética; σ^2F : varianza fenotípica; H^2 : heredabilidad en sentido amplio

Las correlaciones entre variables fenotípicas, se pueden observar en la Tabla 6.

Tabla 6: Coeficientes de correlación de Spearman y valores de probabilidad para todas las variables fenotípicas

	D	A	Fo	P	VP	F	L	a/b	AT	pH	SS
D	1,000	0,000	0,010	0,000	0,001	0,140	0,090	0,010	0,440	0,730	0,050
A	0,900	1,000	0,360	0,000	0,000	0,280	0,080	0,003	0,590	0,880	0,150
Fo	-0,290	0,110	1,000	0,140	0,500	0,240	0,710	0,700	0,500	0,310	0,150
P	0,980	0,940	-0,180	1,000	0,000	0,150	0,050	0,010	0,530	0,860	0,070
VP	0,400	0,440	0,080	0,420	1,000	0,980	0,330	0,040	0,410	0,860	0,080
F	-0,190	-0,140	0,150	-0,190	-0,003	1,000	0,030	0,890	0,080	0,000	0,020
L	0,210	0,220	-0,050	0,240	-0,120	-0,280	1,000	0,000	0,040	0,080	0,004
a/b	-0,320	-0,360	0,050	-0,340	-0,250	0,020	-0,560	1,000	0,470	0,400	0,001
AT	-0,110	-0,070	0,090	-0,090	-0,110	0,230	-0,280	0,100	1,000	0,000	0,010
pH	0,050	0,020	-0,130	0,020	0,020	-0,460	0,220	0,110	-0,660	1,000	0,720
SS	-0,250	-0,190	0,190	-0,240	-0,230	-0,300	-0,350	0,410	0,330	0,040	1,000

Referencias: D: diámetro; A: altura; Fo: índice de forma; P: peso; VP: vida poscosecha; F: firmeza; L: porcentaje de reflectancia; a/b: cociente de absorbancias; AT: acidez titulable; SS: sólidos solubles

Se puede observar que se obtuvieron valores altos de correlación (resaltado en color celeste) para diámetro y altura, diámetro y peso, altura y peso, L y a/b (negativa) y pH y acidez titulable (negativa). Todos los valores de probabilidad resultaron ser significativos (resaltado en color naranja).

Para el último HSC, RIL1xRIL5, también todos los caracteres se ajustaron a una distribución normal. Se encontraron diferencias significativas entre ambas RIL para los caracteres altura, firmeza, ambos parámetros de color (L y a/b) y los parámetros bioquímicos sólidos solubles y acidez titulable (Tabla 7). Hubo dominancia completa de la RIL5 para los atributos firmeza, ambos parámetros de color (L y a/b) y acidez titulable. Presentaron sobredominancia los caracteres sólidos solubles y altura.

Los valores de H^2 para el HSC RIL1xRIL5 se pueden observar en la Tabla 8. El carácter peso fue el que presentó el valor más bajo de H^2 (0,15). Valores medios presentaron los caracteres diámetro, altura e índice de forma, mientras que los mayores valores para H^2 se dieron para los caracteres firmeza, vida poscosecha, ambos parámetros de color (L y a/b) y los atributos bioquímicos pH, sólidos solubles y acidez titulable.

Tabla 7: Caracteres, medias, error estándar, d/a y acción génica para el HSC RIL1xRIL5

	D	A	Fo	P	VP	F	L	a/b	SS	pH	AT
RIL1	3,53± 0,07 a	3,07± 0,06 a	0,87± 0,01 a	23,64± 1,06 a	17,55± 0,95 a	53,60± 1,30 a	40,05± 0,41 a	1,09± 0,04 a	7,10± 0,22 a	4,78± 0,02 a	0,33± 0,003 a
RIL5	3,26± 0,14 a	2,70± 0,09 b	0,84± 0,01 a	19,99± 2,37 a	16,35± 1,18 a	48,56± 1,34 b	38,41± 0,49 b	1,24± 0,02 b	8,20± 0,12 b	4,76± 0,01 a	0,40± 0,02 b
HSC (RIL1xRIL5)	2,47± 0,04	2,24± 0,04 c	0,91± 0,01	8,72± 0,41	16,91± 0,66	45,35± 1,66 b	37,42± 0,28 b	1,25± 0,04 b	8,80± 0,04 c	4,86± 0,02	0,38± 0,01 b
F ₂ (*)	2,59± 0,48	2,27± 0,39	0,88± 0,08	9,84± 5,11	16,90± 8,52	53,11± 7,45	39,24± 2,55	1,13± 0,20	8,59± 1,22	4,90± 0,30	0,36± 0,15
Diferencia entre RIL1 y RIL5	ns	**	ns	ns	ns	*	*	**	*	ns	*
d/a	nc	-3,61	nc	nc	nc	-1	-1	1	2,09	nc	1
Acción Génica	nc	Sobredominancia	nc	nc	nc	Dominancia completa (RIL5)	Dominancia completa (RIL5)	Dominancia completa (RIL5)	Sobredominancia	nc	Dominancia completa (RIL5)

Referencias: **D:** diámetro; **A:** altura; **Fo:** índice de forma; **P:** peso; **VP:** vida poscosecha; **F:** firmeza; **L:** porcentaje de reflectancia; **a/b:** cociente de absorbancias; **SS:** sólidos solubles; **AT:** acidez titulable; **(*):** en F₂ se presenta el desvío estándar; **a, b, c:** diferentes letras indican diferencias significativas; ****:** diferencia significativa p<0,01; ***:** diferencia significativa p<0,05; **ns:** diferencia no significativa, **nc:** no se calculó por no existir diferencias significativas entre ambos padres

Tabla 8: Valores de H² para la generación F₂ del HSC RIL1xRIL5

Carácter	σ^2A	σ^2G	σ^2F	H ²
D	0,299	0,144	0,443	0,33
A	0,185	0,104	0,289	0,36
P	65,466	11,453	76,919	0,15
Fo	0,011	0,005	0,016	0,31
VP	40,406	54,567	94,973	0,57
F	20,008	50,890	70,898	0,72
a/b	0,013	0,037	0,050	0,74
L	1,623	6,036	7,659	0,79
pH	0,002	0,086	0,088	0,98
SS	0,083	1,376	1,459	0,94
AT	0,001	0,021	0,022	0,95

Referencias: D: diámetro; A: altura; P: peso; Fo: índice de forma; VP: vida poscosecha; F: firmeza; a/b: cociente de absorbancias; L: porcentaje de reflectancia; SS: sólidos solubles; AT: acidez titulable; σ^2A : varianza ambiental; σ^2G : varianza genética; σ^2F : varianza fenotípica; H²: heredabilidad en sentido amplio

En cuanto las correlaciones entre variables fenotípicas se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9: coeficientes de correlación de Spearman y valores de probabilidad para todas las variables fenotípicas

	D	A	Fo	P	VP	F	L	a/b	SS	pH	AT
D	1,000	0,000	0,000	0,000	0,440	0,720	0,460	0,410	0,470	0,940	0,890
A	0,870	1,000	0,660	0,000	0,120	0,320	0,440	0,350	0,640	0,980	0,890
Fo	-0,460	-0,050	1,000	0,010	0,570	0,070	1,000	0,810	0,060	0,840	0,680
P	0,960	0,930	-0,310	1,000	0,590	0,730	0,150	0,560	0,790	0,660	0,680
VP	0,090	0,180	0,060	0,060	1,000	0,020	0,110	0,040	0,240	0,030	0,030
F	-0,060	0,160	0,280	0,050	0,370	1,000	0,700	0,600	0,430	0,510	0,680
L	-0,110	-0,120	0,000	-0,220	0,250	0,060	1,000	0,000	0,220	0,030	0,010
a/b	-0,130	-0,140	0,040	-0,090	-0,310	-0,090	-0,680	1,000	0,100	0,010	0,030
SS	0,110	-0,070	-0,280	0,040	0,170	0,130	-0,190	0,260	1,000	0,830	0,280
pH	0,010	-0,004	0,030	0,070	-0,310	-0,110	-0,340	0,390	0,030	1,000	0,000
AT	0,020	-0,020	-0,060	-0,060	0,310	-0,070	0,400	-0,330	0,160	-0,850	1,000

Referencias: D: diámetro; A: altura; Fo: índice de forma; P: peso; VP: vida poscosecha; L: porcentaje de reflectancia; a/b: cociente de absorbancias; F: firmeza; SS: sólidos solubles; AT: acidez titulable

Se puede observar que se obtuvieron valores altos de correlación (resaltado en color celeste) para diámetro y altura, diámetro y peso, altura y peso, L y a/b (negativa) y pH y acidez titulable (negativa). Todos los valores de probabilidad resultaron ser significativos (resaltado en color naranja).

Detección de QTLs

Considerando sólo los datos de la generación segregante, en la cual se realizó la detección de QTLs, para la F₂ del HSC RIL18xRIL1, todos los caracteres resultaron ser normales, a excepción de pH, a/b, acidez titulable y vida poscosecha. Los últimos dos caracteres se transformaron usando la función Log₁₀, mientras que a/b se transformó usando la función potencia 2. Para pH, no se encontró una función que mediante su transformación permita la normalidad de los datos, por lo que, para detectar asociaciones entre el carácter y el polimorfismo molecular, se usó el método no paramétrico de Kruskal-Wallis. Se detectaron un total de 28 QTLs: seis para altura, cinco para diámetro, tres para sólidos solubles y pH, dos para peso, vida poscosecha, acidez titulable y firmeza y uno para los dos parámetros relacionados a color (L y a/b) e índice de forma, respectivamente (Tabla 10). Los QTLs asociados a sólidos solubles (249F y 283F) y a vida poscosecha (183II) resultaron ser los que presentaron mayor porcentaje de varianza fenotípica explicada por el efecto del fragmento (R²), cuyos valores fueron de 0,18, 0,15 y 0,15 respectivamente.

Se encontraron ocho marcadores con efecto pleiotrópico: 271J resultó asociado a peso, diámetro y altura, 435II a altura y diámetro, 201H a diámetro, peso y pH, 359J a los dos parámetros relacionados a color: L y a/b, 283F y 249F, a sólidos solubles y acidez titulable, 277J a altura y firmeza, y 293H a índice de forma y firmeza (Tabla 10).

Respecto a la detección de efectos epistáticos, 20 pares de fragmentos asociados a un mismo carácter segregaron de manera independiente. Los fragmentos 277J y 435 II asociados a altura resultaron ser independientes, mientras que para ese mismo carácter los fragmentos 277J y 271J resultaron no ser independientes. En ninguno de los casos la interacción fue significativa (en el caso de pH este análisis no se realizó pues el método de Kruskal-Wallis no permite evaluar la interacción), lo cual estaría indicando que no existe epistasis y la acción génica *interloci* predominante sería la aditividad.

Tabla 10: Carácter, fragmento asociado al carácter, significado, R² y efecto del fragmento para la generación F₂ del HSC RIL18xRIL1

Caracter	Fragmento	Significado (p-valor)	R ²	Efecto del fragmento (\bar{X})	
				Presencia	Ausencia
A	277J	0,040	0,07	2,46	2,71
	271J	0,019	0,09	2,38	2,70
	435II	0,008	0,11	2,59	2,90
	282II	0,016	0,09	2,59	2,87
	236II	0,017	0,09	2,59	2,86
	232II	0,029	0,07	2,60	2,85
D	271J	0,020	0,09	2,35	2,64
	435II	0,041	0,06	2,55	2,77
	201H	0,007	0,11	2,68	2,41
	468JJ	0,017	0,09	2,66	2,41
	213JJ	0,026	0,08	2,64	2,36
SS	283F	0,002	0,15	7,82	6,81
	249F	0,001	0,18	7,79	6,69
	246F	0,009	0,11	7,62	6,68
pH	363F	0,033	(¹)	4,78	4,90
	201H	0,026	(¹)	4,85	4,74
	137H	0,008	(¹)	4,84	4,69
P	271J	0,029	0,08	8,50	11,44
	201H	0,036	0,07	11,90	9,38
Fo	293H	0,040	0,07	1,00	1,05
VP	183II	0,001	0,15	16,07	19,75
	376H	0,007	0,11	20,56	17,71
AT	283F	0,014	0,10	0,36	0,28
	249F	0,045	0,07	0,35	0,28
F	277J	0,034	0,07	59,99	56,54
	293H	0,045	0,06	56,31	58,88
L	359J	0,012	0,10	39,26	40,22
a/b	359J	0,004	0,13	1,16	1,06

Referencias: A: altura; D: diámetro; SS: sólidos solubles; P: peso; Fo: índice de forma; VP: vida poscosecha; AT: acidez titulable; F: firmeza; L: porcentaje de reflectancia; a/b: cociente de absorbancias; R²: proporción de varianza fenotípica para cada carácter explicada por el efecto del fragmento; (¹): calculado por Kruskal-Wallis

Para la generación segregante F₂ del HSC RIL1xRIL8, los caracteres índice de forma, vida poscosecha, firmeza, pH y sólidos solubles fueron normales. Los caracteres acidez titulable, porcentaje de reflectancia (L), diámetro, altura y peso fueron transformados utilizando la función de Log₁₀ y el cociente de absorbancias (a/b) fue transformado utilizando la potencia 2.

Se detectaron un total de 15 QTLs: tres para diámetro, altura y peso, dos para índice de forma y sólidos solubles y uno para firmeza y parámetro L, respectivamente (Tabla 11). Los QTLs asociados a índice de forma (160JJ y 231JJ) fueron los que presentaron los valores más altos de R² (0,18 y 0,13 respectivamente).

Tabla 11: Carácter, fragmento asociado al carácter, significado, R² y efecto del fragmento para la generación F₂ del HSC RIL1xRIL8

Caracter	Fragmento	Significado (p-valor)	R ²	Efecto del fragmento (\bar{X})	
				Presencia	Ausencia
A	139J	0,030	0,08	1,84	2,01
	106J	0,008	0,12	1,85	2,07
	119JJ	0,020	0,08	2,04	1,85
D	139J	0,013	0,11	1,93	2,13
	106J	0,007	0,13	1,94	2,19
	119JJ	0,027	0,07	2,15	1,95
SS	106J	0,029	0,09	8,13	7,21
	142JJ	0,040	0,07	7,26	8,04
P	139J	0,018	0,10	4,37	5,94
	106J	0,007	0,13	4,50	6,23
	119JJ	0,029	0,07	6,13	4,28
Fo	160JJ	0,0002	0,18	0,99	0,94
	231JJ	0,001	0,15	0,96	0,92
F	103J	0,010	0,11	53,60	48,57
L	106J	0,010	0,11	38,23	39,35

Referencias: A: altura; D: diámetro; SS: sólidos solubles; P: peso; Fo: índice de forma; F: firmeza; L: porcentaje de reflectancia; R²: proporción de varianza fenotípica para cada carácter explicada por el efecto del fragmento

Presentaron efectos pleiotrópicos tres marcadores. El fragmento 139J asoció a diámetro, altura y peso, mientras que 106J se halló asociado a los caracteres diámetro, altura, peso, sólidos solubles y porcentaje de reflectancia (L) y 119JJ asoció a diámetro, altura y peso.

Segregaron de manera independiente ocho pares de fragmentos asociados a un mismo carácter (por ejemplo, para el carácter diámetro, los fragmentos 139J y 106J resultaron ser no independientes, mientras que, para el mismo carácter, las bandas 139J y 119JJ resultaron ser independientes). Nuevamente, en ninguno de los casos la interacción fue significativa, detectándose aditividad *interloci*.

Para la generación F₂ del HSC RIL1xRIL5, diámetro, altura, índice de forma, firmeza y sólidos solubles tuvieron distribución normal. Peso, vida poscosecha y acidez titulable fueron transformados utilizando la función de Log₁₀ y el cociente de absorbancias (a/b) fue transformado utilizando la potencia 3. Para pH y porcentaje de reflectancia (L), no se encontró una función que mediante su transformación permita la normalidad de los datos, por lo que se usó el método no paramétrico de Kruskal-Wallis. Cabe recordar, que los caracteres que resultaron ser normales, variaron de aquellos presentados en la estimación de los parámetros genéticos, porque como ya se mencionó, en este caso la normalidad se evaluó teniendo en cuenta los valores medios de cada planta.

Se detectaron un total de 26 QTLs: siete para acidez titulable, cuatro para índice de forma, tres para diámetro, altura y peso y dos para vida poscosecha, pH y porcentaje de reflectancia (L) (Tabla 12). Los QTLs asociados a acidez titulable (148J y 332F) fueron los que presentaron mayor R². El primero tuvo un valor de 0,24 y el segundo de 0,15.

En cuanto a los efectos pleiotrópicos, seis marcadores se encontraron asociados a más de un carácter. Se observó que la banda 303II estuvo asociada a diámetro, altura, peso e índice de forma, 148II a diámetro, índice de forma, peso y acidez titulable, 102HH a diámetro, altura y peso, 332F a altura, acidez titulable y porcentaje de reflectancia (L), 148J a índice de forma, acidez titulable y pH y 251II a acidez titulable y porcentaje de reflectancia (L).

Segregaron de manera independiente 25 pares de fragmentos asociados a un mismo carácter (por ejemplo, para el carácter altura, los fragmentos 332F y 303II resultaron ser no independientes, mientras que para el mismo carácter, las bandas 332F y 102HH resultaron ser independientes). En ninguno de los casos la interacción fue significativa (en los casos de pH y porcentaje de reflectancia, como se describiera previamente, este análisis no se hizo pues el método de Kruskal-Wallis no permite evaluar la interacción).

Tabla 12: Carácter, fragmento asociado al carácter, significado, R² y efecto del fragmento para la generación F₂ del HSC RIL1xRIL5

Caracter	Fragmento	Significado (p-valor)	R ²	Efecto del fragmento (\bar{X})	
				Presencia	Ausencia
A	332F	0,038	0,05	2,37	2,23
	303II	0,022	0,06	2,31	2,11
	102HH	0,026	0,06	2,31	2,16
D	303II	0,007	0,09	2,63	2,33
	148II	0,013	0,07	2,54	2,81
	102HH	0,025	0,07	2,64	2,44
P	303II	0,005	0,10	10,26	7,51
	148II	0,025	0,06	9,38	12,16
	102HH	0,023	0,07	10,33	8,33
Fo	303II	0,041	0,05	0,88	0,92
	148II	0,042	0,05	0,89	0,86
	148J	0,017	0,07	0,90	0,86
	500HH	0,037	0,06	0,90	0,87
VP	155II	0,009	0,08	18,20	14,21
	142II	0,016	0,07	20,68	16,21
L	332F	0,038	(¹)	38,29	39,70
	251II	0,006	(¹)	38,74	41,25
pH	140II	0,013	(¹)	4,98	4,74
	148J	0,013	(¹)	4,99	4,73
AT	470F	0,037	0,09	0,38	0,26
	332F	0,006	0,15	0,27	0,40
	340H	0,023	0,11	0,39	0,28
	251II	0,031	0,10	0,34	0,47
	148II	0,033	0,10	0,38	0,27
	184J	0,011	0,14	0,24	0,38
	148J	0,001	0,24	0,32	0,49

Referencias: **A:** altura; **D:** diámetro; **P:** peso; **Fo:** índice de forma; **Fo:** índice de forma; **VP:** vida poscosecha; **L:** porcentaje de reflectancia; **AT:** acidez titulable; **R²:** proporción de varianza fenotípica para cada carácter explicada por el efecto del fragmento; (¹): calculado por Kruskal-Wallis.

Validación de QTL detectados

Para la validación de los QTLs detectados en las tres generaciones segregantes para los 11 caracteres relacionados a calidad de fruto, se buscaron fragmentos de AFLP que estuvieran asociados consistentemente a un mismo atributo en al menos dos de las F₂ de HSC bajo estudio. Si bien se pudo detectar un amplio número de fragmentos asociados a todos los caracteres evaluados, ninguno de ellos fue compartido entre las generaciones. Esto indica que, de acuerdo a la metodología propuesta por Pereira da Costa *et al.* (2013), en estas generaciones, no se pudieron validar los QTLs encontrados.

DISCUSIÓN

En el presente Capítulo se realizó la estimación de parámetros genéticos según la metodología de la Genética cuantitativa clásica y en base a los marcadores generados se procedió a la detección y validación de QTLs en las generaciones segregantes F₂ de los tres HSC.

En relación al grado de dominancia (d/a) Kearsey y Pooni (1996) indican que es un modo de estimar en que forma las frecuencias génicas influyen en la media del carácter en una población bajo estudio. En los cruzamientos biparentales entre líneas puras, el d/a , da una idea de qué acciones génicas se presentan en promedio en ese contexto genético, generado por la combinación de genes de ambos padres. En los materiales evaluados en esta Tesis, si bien en general predominó la dominancia completa (en el HSC RIL18xRIL1 para diámetro, peso, vida poscosecha, entre otros, para el HSC RIL1xRIL8 para índice de forma, y ambos parámetros de color, y para el HSC RIL1xRIL5 para firmeza, acidez titulable y ambos parámetros de color), también se observó dominancia parcial, aunque solo en el HSC RIL1xRIL8 para los caracteres diámetro, altura y peso y sobredominancia en los HSC RIL1xRIL5 y RIL1xRIL8 para los caracteres altura sólo para el primer HSC y sólidos solubles para los dos HSC. Además de estas acciones génicas no aditivas, fue posible detectar aditividad pura en los HSC RIL18xRIL1 y RIL1xRIL8 para los caracteres índice de forma para el primer caso y acidez titulable para el segundo. A su vez, en las tres generaciones, hubo caracteres para los cuales no se pudo calcular el grado de dominancia (d/a), ya que la diferencia entre los parentales fue no significativa. En consecuencia, el grado de dominancia fue variable entre generaciones y entre caracteres evaluados. Esto podría indicar que los genes originales presentes en los parentales de las RIL (*Solanum lycopersicum* cultivar (cv.) Caimanta y *S. pimpinellifolium* accesión LA722), se dispersaron entre ellas en forma diferenciada durante el proceso de selección agonística-divergente aplicado para su obtención. Esta sucesión de procesos, selección/recombinación, ha permitido obtener genotipos conformados con nuevas acciones génicas, aun cuando todos los HSC comparten un progenitor común como es la RIL1. Resultados similares obtienen Liberatti *et al.* (2013), utilizando tres HSC de tomate, y once caracteres fenotípicos, concluyendo que la acción génica más predominante fue la no aditividad ($d/a \neq 0$) sea esta dominancia completa, dominancia parcial y sobredominancia, mientras que la aditividad se presentó en pocos casos. También, Pereira da Costa *et al.* (2009), estudiando *S. lycopersicum* cv. Caimanta y la accesión LA722 de *S. pimpinellifolium* para los caracteres vida poscosecha y peso,

evidenciaron la presencia de dominancia completa de Caimanta para el primer carácter y de dominancia parcial de LA722 para el segundo.

Para los caracteres cuantitativos, la heredabilidad es una de las estimaciones más importantes y expresa, en el caso de la H^2 , la proporción de la variancia fenotípica total que es atribuible a la variación entre los genotipos (Falconer y Mackay, 1996). Por lo tanto, resulta del cociente entre la variancia genética total (incluyendo varianza aditiva y no aditiva: de la dominancia y epistática) sobre la variancia fenotípica (Fehr, 1987), indicando así cuánta variancia genética existe proporcionalmente a la fenotípica para los caracteres bajo estudio. Caracteres con valores medios a altos de este parámetro genético tienen mayores posibilidades de ser mejorados genéticamente, ya sea por selección artificial (si consideramos la heredabilidad en sentido estricto (h^2)) o por aprovechamiento de la heterosis (si la variancia genética no aditiva es considerable). Cabe destacar que para decidir entonces entre ambas estrategias es necesario estimar la h^2 , es decir, particionar la varianza genética en sus componentes aditivo y no aditivo. En este Capítulo, debido al material vegetal empleado, solo fue posible estimar la H^2 , en consecuencia, la variación fenotípica se desglosó en variación genética y variación ambiental. Así, mientras más alto sea el efecto de la variación ambiental sobre un carácter, menor será su heredabilidad (Tanskley, 1993). En este trabajo, se observó de manera general que en las tres generaciones segregantes, los valores más altos los tuvieron los caracteres bioquímicos (pH, sólidos solubles y acidez titulable en distinto orden de acuerdo al HSC evaluado), mientras que el menor valor lo presentó en los tres casos el carácter peso (junto con el índice de forma en el caso de la generación F_2 del HSC RIL18xRIL1). Al respecto, cabe destacar que las estimaciones de la heredabilidad para los caracteres que fueron objeto de la selección divergente-antagonística (peso y vida poscosecha) a partir de los cuáles se originaron las RIL, fueron opuestas entre generaciones de primer ciclo y de segundo ciclo. O sea, en la F_2 producto del cruzamiento entre los parentales de las RIL (cv. Caimanta y LA722), se presentaron valores estimados de heredabilidad medios a altos para peso y medios a bajos para vida poscosecha (Pereira da Costa *et al.* 2009), mientras que en el caso de las tres generaciones F_2 de segundo ciclo (resultados de la presente Tesis), fue lo inverso: valores estimados para vida poscosecha altos y bajos para peso. Esto se podría relacionar al mayor rango de variación presente para peso en el cruzamiento original entre cv. Caimanta y LA722, ya que estos materiales de primer ciclo tuvieron los valores extremos para este carácter como se discutió en el Capítulo anterior. De hecho, en ninguno de los materiales de segundo ciclo, incluyendo las cuatro RIL, los tres HSC y sus generaciones segregantes, se presentaron valores de peso inferiores a LA722 ni superiores al cv.

Caimanta. Por este motivo, las heredabilidades para peso, como medidas de la relación varianza genética sobre varianza fenotípica, fueron mayores en los materiales de primer ciclo. Para el carácter peso, los diferentes *loci* descritos para este carácter, segregan de manera distinta en las tres poblaciones, ya que en todas las poblaciones la heredabilidad tuvo valores bajos, mientras que los grados de dominancia fueron variables. Esto podría estar explicando que, respecto a este carácter, ninguno de los QTLs se encuentre compartido entre las tres poblaciones y por lo tanto no pudieron ser validados. En cambio, para el carácter vida poscosecha se observa un mayor rango de variación en los materiales de segundo ciclo en relación al cv. Caimanta, LA722 y su F₁ (filial 1) interespecífica, lo que explicaría una mayor heredabilidad en los HSC en relación a la F₂ del cruzamiento que originó el primer ciclo (Pereira da Costa *et al.*, 2009). Por otro lado, Pereira da Costa *et al.*, (2016), obtienen para un HSC de tomate, los mayores valores de heredabilidad en sentido amplio para los caracteres sólidos solubles, acidez titulable y pH. Para estos caracteres, se podrían haber fijado más rápidamente pocos genes de acción mendeliana que aportan menor variabilidad; en cambio para vida poscosecha existiría un mayor número de genes con acciones individuales pequeñas, contribuyendo a una mayor variabilidad.

Como ya se mencionó, en las tres generaciones hubo caracteres para los cuales no se pudo calcular el grado de dominancia (d/a), ya que la diferencia entre los parentales fue no significativa. Tales casos fueron para los caracteres altura, firmeza, cociente de absorbancias (a/b) y pH para el HSC RIL18xRIL1, firmeza, vida poscosecha y pH para el HSC RIL1xRIL8 y diámetro, peso, índice de forma, vida poscosecha y pH para el HSC RIL1xRIL5. Sin embargo, para la mayoría de estos casos los valores de heredabilidad estimados fueron de medios a altos (con excepción del carácter peso para el HSC RIL1xRIL5). Esta observación reforzaría la idea planteada previamente acerca de la fijación diferencial de alelos aportados por los progenitores de las RIL, manifestando éstas un fenotipo similar pero debida a diferencias alélicas en distintos *loci* involucrados en el carácter. La recombinación de alelos que estas líneas contribuyen a sus correspondientes generaciones segregantes, provocaría la existencia de varianza genética, puesta en evidencia por los valores estimados de heredabilidades.

Dado que los QTLs son regiones del genoma que contienen genes asociados con un carácter cuantitativo determinado, su análisis se basa en el principio de detectar asociaciones entre el genotipo, a través de marcadores definidos y el fenotipo observable (Collard *et al.*, 2005). Se pudieron detectar QTLs para las tres generaciones y para la mayoría de los caracteres. La generación F₂ del HSC RIL18xRIL1, fue la única que presentó QTLs asociados a todos los atributos fenotípicos, mientras que para la generación F₂ del

HSC RIL1xRIL5 se pudieron detectar QTLs para ocho de los caracteres y en el caso de la F₂ para el HSC RIL1xRIL8 se hallaron QTLs para siete caracteres. En cuanto al número total de QTLs detectados, se presentó la misma tendencia que la expresada anteriormente. La generación F₂ del HSC RIL18xRIL1 fue la que presentó el mayor número de QTLs detectados (28), seguida por la generación F₂ del HSC RIL1xRIL5 (26) y en menor número la generación F₂ del HSC RIL1xRIL8 (15). En general, el número de QTLs detectados en las tres generaciones fue elevado. Esto es coincidente con los resultados obtenidos en el Capítulo I, donde las asociaciones obtenidas entre la información fenotípica y molecular, realizada a través del Análisis de Procrustes Generalizado (APG) fue alta (superior al 64%) en todas las generaciones. Pereira da Costa *et al.*, (2016), en un HSC de tomate, utilizando AFLP, detectaron 13 QTLs para diferentes caracteres asociados a calidad de fruto, entre ellos, sólidos solubles, acidez titulable, pH, vida poscosecha y firmeza. Por otro lado, Pratta *et al.*, (2011b), detectaron un total de 21 QTLs utilizando 16 RIL de tomate, y marcadores AFLP, obteniendo el mayor número de QTLs para los caracteres diámetro, peso y altura. Estos resultados son coincidentes con los de la presente Tesis.

El mayor valor de proporción de variancia fenotípica explicada por un fragmento lo presentó el HSC RIL1xRIL5 para el carácter acidez titulable. Estas RIL mostraron muy pocas diferencias fenotípicas entre sí. En el caso de los HSC RIL18xRIL1 y RIL1xRIL8, no difirieron para cuatro de los once caracteres (a/b, firmeza, altura y pH) y en el caso del otro HSC, no presentaron diferencias entre RIL para tres de los caracteres (firmeza, pH y vida poscosecha).

Al comparar el número de QTLs detectados por carácter y la heredabilidad estimada, se concluye que en general los caracteres que mostraron tener mayor heredabilidad, no fueron aquellos para los cuáles se detectaron mayor número de QTLs, con la excepción de la generación F₂ del HSC RIL1xRIL5 donde para el carácter acidez titulable, cuya heredabilidad fue de 0,95, se detectaron siete QTLs. Esto podría deberse a que, si bien los caracteres presentan valores de heredabilidad medios o altos, las zonas del genoma exploradas por las combinaciones de AFLP selectas, no estarían en las zonas correspondientes a los caracteres evaluados. Por esto, sería necesario utilizar otra clase de marcadores para lograr detectar QTLs.

La ocurrencia de una banda asociada con uno o más caracteres puede ser explicada por efectos pleiotrópicos o por un fuerte ligamiento entre dos o más QTLs subyacentes a estos caracteres diferentes (Kearsey y Pooni, 1996). En el presente Capítulo al no disponer de un mapa genético, se considerarán como efectos pleiotrópicos.

Al analizar los efectos pleiotrópicos, se observó que todos los HSC tuvieron fragmentos que asociaron a diámetro, altura y peso. Estos efectos pleiotrópicos observados para varios marcadores en las tres generaciones, podrían explicar las correlaciones fenotípicas significativas entre estos caracteres. Lippman y Tanksley (2001), utilizando un cruzamiento entre *Lycopersicon esculentum* var. Giant Heirloom (actualmente conocido como *S. lycopersicum*) y *L. pimpinellifolium* accesión LA1589 (actualmente *S. pimpinellifolium*) y utilizando marcadores RFLP (polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción), encontraron que casi todos los QTLs para longitud y diámetro del fruto se localizaron en regiones del genoma que contenían QTLs mayores para peso del fruto. Pratta *et al.* (2011b), realizando una caracterización fenotípica y molecular de 16 RIL (entre ellas, las tres utilizadas en la presente Tesis), y utilizando marcadores AFLP, encontraron cinco fragmentos con efectos pleiotrópicos para peso, altura y diámetro. Pereira da Costa *et al.* (2013) en generaciones de retrocruzas entre *S. lycopersicum* cv. Caimanta y LA722 de *S. pimpinellifolium*, encontraron también estas asociaciones utilizando SSR. Estas relaciones serían lógicas porque a medida que aumenta el peso del fruto, se corresponde con un incremento en los valores de altura y diámetro del fruto (Lippman y Tanksley, 2001). Por otro lado, en el HSC RIL18xRIL1 hubo fragmentos con efectos pleiotrópicos para sólidos solubles y acidez titulable. También, se obtuvieron los mismos resultados para ambos parámetros de color (L y a/b). Estas asociaciones también fueron detectadas por Pereira da Costa *et al.* (2013). Cabe destacar que la pleiotropía podría explicar en estos casos las correlaciones fenotípicas altas y significativas que se encontraron en esta población.

La epistasis, fue reconocida en 1909 por Bateson (Bateson, 1909), y se usa para describir la situación en la cual la acción de un *locus* enmascara los efectos alélicos de otro *locus* (Bocianowski, 2013). La identificación de QTLs y de sus efectos (principales y epistáticos) son esenciales para el desarrollo de una eficiente selección asistida por marcadores (MAS), dirigida a mejorar la eficiencia en el mejoramiento (Govindaraj *et al.*, 2009). Una implicación directa de la epistasis es que los efectos de los QTLs de único *locus* son en su mayoría dependientes de los genotipos de otros *loci*, y el efecto de un QTL a veces puede ser modificado por los genotipos de otras regiones genómicas. Por lo tanto, cualquier intento de utilizar QTLs en programas de mejoramiento tiene que tener en cuenta estos efectos epistáticos (Bocianowski, 2013).

En el presente trabajo no se encontraron interacciones epistáticas entre QTLs en ninguno de los tres HSC analizados.

La validación de QTLs consiste en confirmar la posición y el efecto del QTL, verificar ese QTL en poblaciones independientes y evaluarlo en diferentes trasfondos genéticos

(Collard y Mackill, 2008). En otras palabras, la validación del marcador consiste en evaluar la confiabilidad de esos marcadores para predecir el fenotipo (Collard *et al.*, 2005). Anteriormente, se asumía que la mayoría de marcadores asociados con un QTL en estudios de mapeo eran directamente utilizables para realizar MAS. Sin embargo, más recientemente se ha aceptado ampliamente la necesidad de la confirmación o validación del QTL (Langridge *et al.*, 2001). Muchos QTLs detectados y mapeados, luego “desaparecen” en la validación. Estos QTLs pudieron haber sido específicos de cada cruzamiento, estar sujetos a efectos de interacción genotipo-ambiente o bien ser ilusorios, los cuales se pueden haber dado por efecto de poblaciones pequeñas, error en la determinación del fenotipo o limitaciones en el análisis de QTLs.

Por ello, en el presente trabajo, uno de los objetivos propuestos fue la validación de QTLs, mediante comparación de las tres generaciones analizadas. Sin embargo, no se pudo determinar la validación de ningún QTL. Esto podría deberse, a como ya se expresó anteriormente, que en cada generación se produjo una fijación diferencial de alelos de cada uno de los progenitores. Liberatti (2011) a través de la caracterización fenotípica y molecular utilizando AFLP de dos poblaciones F_2 derivadas de HSC, validó solo dos QTLs.

Por otro lado, el método utilizado para la detección de QTLs, fue el de análisis de único punto. Para este análisis no se requiere tener un mapa de ligamiento completo (Collard *et al.*, 2005). Por lo tanto, al no disponer del mapa genético de la población, posiblemente algunos QTLs detectados estén localizados en las mismas regiones del genoma, pero sin poder evidenciarse. Cambiaso (2017), encuentra, para cruzamientos recíprocos entre *S. lycopersicum* cv. Caimanta y *S. pimpinellifolium* accesión LA722, QTLs para un mismo carácter marcados por diferentes amplicones, pero que al mapearlos se ubicaban en regiones cromosómicas cercanas. Por otro lado, la ausencia de efectos epistáticos permite la selección de QTLs de manera individual (debido a que uno no afecta la acción del otro), pero al no haber sido posible validar los QTLs, esta utilidad queda limitada a la generación para la cual fueron detectados.

Como síntesis del presente Capítulo, en las tres generaciones segregantes estudiadas se pudo observar la presencia de diferentes modos de acción génica y de variancia genética para todos los caracteres. Además, se pudieron detectar marcadores asociados a los caracteres de interés agronómico relacionados a calidad de fruto, estimar sus efectos individuales, pleiotrópicos e interacciones. Los resultados obtenidos son coincidentes con los obtenidos en el Capítulo anterior, en el que la exploración del consenso entre las caracterizaciones fenotípica y molecular por el APG tuvieron valores superiores al 60%. Cabe destacar que la generación F_2 del HSC RIL18xRIL1, fue la que presentó mayor

número de QTLs detectados y a su vez, fue la única generación F_2 que presentó marcadores asociados a todos los atributos fenotípicos evaluados. También las medias fenotípicas de la generación F_2 para peso y vida poscosecha, fueron las mayores de las tres generaciones de los tres HSC. Esta media supera a valores de la F_1 (CxP) para ambos caracteres. Por otro lado, este HSC es el único en el cual uno de sus progenitores es de forma piriforme. Si bien las tres F_2 recombinan genes aportados por los progenitores de primer ciclo (cv. Caimanta y LA722), la selección y recombinación realizadas durante el proceso de obtención de las RIL originó en cada uno de estos nuevos genotipos homocigotas diferentes contextos (o *backgrounds*) genéticos. Como indican Portin y Wilkins (2017), un mismo gen puede tener diferentes manifestaciones fenotípicas en diferentes individuos debido al contexto genético particular de cada uno de ellos. Este hecho justificaría, desde un punto de vista de la Genética básica, las diferencias entre la F_2 del HSC RIL18xRIL1 y las otras dos. También, desde el punto de vista de la Genética aplicada al Mejoramiento Vegetal, justificaría seleccionar esta F_2 para iniciar un nuevo ciclo de selección/recombinación. Estos fundamentos con base científica, sumados a que, como se mencionó en la Introducción, las líneas progenitoras de esta F_2 se encuentran inscriptas en el Instituto Nacional de la Semilla (INASE), condujeron a que esta generación fuera seleccionada para hacer una caracterización molecular más exhaustiva y derivación de familias F_3 , puntos que se desarrollarán en los Capítulos siguientes.

CAPÍTULO III

En este Capítulo se aborda el Objetivo Específico 3: Incrementar la precisión de la caracterización molecular y fenotípica en la generación segregante seleccionada mediante marcadores moleculares SSR y la obtención de su generación F₃.

Para cumplir con este objetivo se llevaron a cabo las siguientes actividades:

1. Caracterización de la generación F₂ proveniente del HSC RIL18xRIL1 utilizando marcadores microsatélites y detección de QTLs asociados a caracteres de interés agronómico.
2. Obtención y caracterización fenotípica de familias F₃ obtenidas de individuos F₂ del HSC RIL18xRIL1.
3. Estimación de la heredabilidad en sentido estricto de los caracteres de interés agronómico mediante el método de Regresión Progenie F₃ - Progenitor F₂.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

En este Capítulo, se caracterizó por marcadores moleculares microsatélites (SSR) a la generación segregante F₂ (filial 2) del híbrido de segundo ciclo (HSC) RIL18xRIL1, población ya descrita en Capítulo I. A partir de la selección de individuos de esta generación combinando información molecular y fenotípica, se obtuvieron familias F₃ (filial 3) según se describe a continuación, en el apartado Métodos.

Métodos

Caracterización molecular por perfiles de SSR y detección de QTLs

La caracterización molecular se llevó a cabo utilizando 12 marcadores SSR (Tabla 1).

Tabla 1: Código y cebadores de las combinaciones de SSR

Cebador	Codificación	Cromosoma	Ubicación física ^(*)	Cebador izquierdo	Cebador derecho
SSR 009	A	1	93	CCCTTTGCAAGTTCTTCTTCA	TTCATGAGCCAACATAGGAGG
SSR 288	B	1	96,9	TCTTCATCGTCCTCCTCCTG	TCGTGGGAATTTGTTAACCC
SSR 310	C	4	42,7	TTTACAGGCTGTCGCTTCT	GCGATGAGGATGACATTGAG
SSR 111	D	3	59,5	TTTGCTGCTATACTGCTGACA	TTCTCCCTTCCATCAGTCT
SSR 063	E	8	61,1	GCTTCGGCCATACTGATACG	CCACAACAATTCCATCTCA
SSR 450	F	4	48	AATGAAGAACCATTCCGCAC	ACATGAGCCAATGAACCTC
EP 1061	G	11	55,1	GTTCTACGTAAGATTCATG	TCAGGTTAGTGTCCATGCAG
SSR 162	H	5	65,4	GCTCTCTACAAGTGGAACTTTCTC	CAACAGCCAGGAACAAGGAT
SSR 327	I	8	52,5	TCAGGATCAGGAGCAGGAGT	TGGACTTGTTCCATGAACCC
SSR 038	J	8	61,4	GTTTCTATAGCTGAAACTCAACCTG	GGGTTTCATCAAATCTACCATCA
SSR 276	K	7	7,3	CGACGGAGTACTTCGCATTT	CTCCGGCAAGAGTGAACATT
SSR 596	L	10	2,8	TTCCGATAAAGCAATCCACC	TCGATTGTGTACCAACGTCC

Referencias: (*): ubicación física teniendo en cuenta la versión del mapa SL2.5

La reacción de PCR (reacción en cadena de la polimerasa), para cada muestra de ADN genómico a amplificar consistió en:

- 2 microlitros (µl) de Buffer 10X
- 0,8 µl de dNTP 5 milimolar (mM)
- 1 µl de cloruro de magnesio (MgCl₂) 50 mM
- 0,2 µl cebador derecho 10 µM
- 0,2 µl cebador izquierdo 10 µM
- 0,2 µl enzima Taq Polimerasa 5 unidades/ microlitro (u/µl)

- agua destilada para PCR

Se utilizó el siguiente protocolo de amplificación: 1 minuto a 94 °C, siete ciclos de: 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 58 °C - 52 °C (disminuyendo de a 1 °C por ciclo) y dos minutos a 72 °C, 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 52 °C y dos minutos a 72 °C y 5 minutos a 72 °C.

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

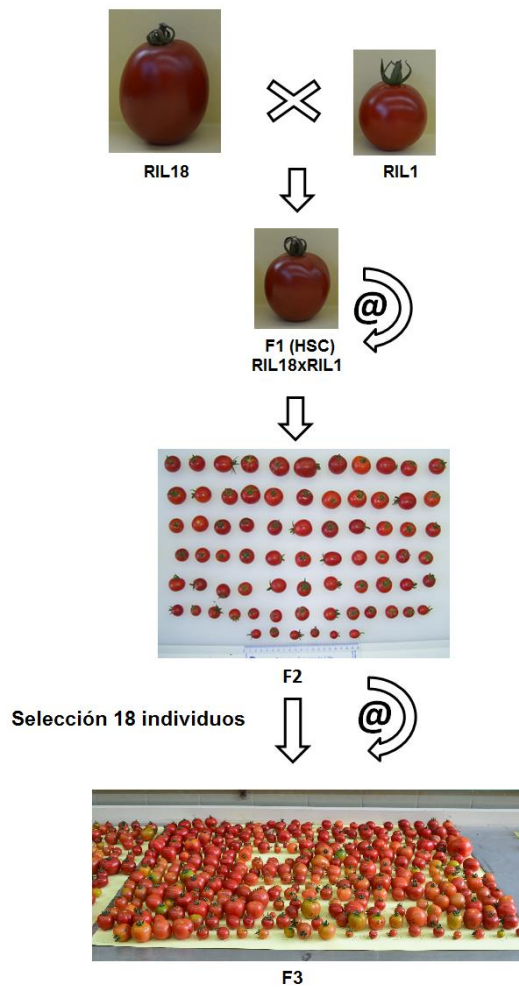
Como fue mencionado previamente, la caracterización fenotípica de esta generación segregante ya fue descrita en el Capítulo I (*Caracterización fenotípica por caracteres asociados a calidad de los frutos*). Para evaluar la asociación de bandas que ajustaron a la segregación mendeliana esperada con los caracteres cuantitativos, se realizó el análisis de único punto (ANOVA a un criterio de clasificación) para identificar QTLs (*loci* de caracteres cuantitativos) de interés agronómico. Para ello, se utilizó la prueba de χ^2 para evaluar la segregación mendeliana de cada banda polimórfica (1:2:1 para los SSR que tuvieron el comportamiento codominante esperado, y 3:1 para aquellos cuyo comportamiento fue dominante). Luego, para cada combinación de fragmentos asociados a un mismo carácter, se realizó la prueba de χ^2 para probar la hipótesis de segregación independiente y se aplicó un análisis factorial de ANOVA para detectar interacciones entre los pares de bandas que segregaron independientemente. Por ser los SSR marcadores de tipo codominante, se calcularon los grados de dominancia (d/a) para cada QTL detectado (Collard *et al.*, 2005).

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software InfoStat versión Estudiantil 2016 (Di Rienzo *et al.*, 2016).

Obtención y caracterización fenotípica de familias F₃ provenientes de individuos F₂ y estimación de la heredabilidad

Se utilizó una población de 198 individuos F₃, provenientes de 18 individuos F₂, seleccionados de la generación segregante del HSC RIL18xRIL1. En la Figura 1 se puede observar la obtención de la generación F₃.

Figura 1: Diagrama de obtención de la generación F₃, producto de la selección y autofecundación de individuo F₂ del HSC RIL18xRIL1



Para la selección de los individuos de la generación F₂ que originaron las familias F₃, se utilizaron dos criterios de selección. Por un lado, un "criterio molecular", donde se seleccionaron aquellos individuos F₂ con mayor cantidad de marcadores del tipo SSR al estado heterocigota, para poder en el mediano plazo evaluar la segregación de los mismos

en las familias F₃ derivadas. Por otro lado, se siguió un "criterio fenotípico", donde se seleccionaron, aquellos individuos con valores fenotípicos medios extremos para vida poscosecha y peso, ya que ambos caracteres fueron los utilizados durante el proceso de obtención de las RIL (líneas endocriadas recombinantes), y también valores medios máximos para el índice de forma, ya que esta población mostraba marcadas diferencias entre la forma de ambas líneas.

Los 18 individuos F₂ que se seleccionaron para obtener las familias F₃ fueron los siguientes:

- Criterio molecular: los individuos F₂ seleccionados por presentar la mayor cantidad de marcadores SSR al estado heterocigota según Masso (2012), fueron: I-50, I-82, I-89, II-58, II-72, IV-58, IV-61, IV-65, IV-69, IV-75, VI-42, VIII-6, VIII-10, VIII-9 y VIII-12. Aunque el individuo IV-69 no poseía el valor de acidez titulable en la generación F₂, fue seleccionado igualmente debido al alto de número de marcadores SSR al estado heterocigota.

- Criterio fenotípico: el individuo que poseía el valor fenotípico promedio máximo para vida poscosecha fue el II-66 (28,36 días (d)). Para el carácter peso, el individuo con el valor promedio máximo fue el I-99 (25,90 gramos (g)). En lo referente al carácter índice de forma, se eligió el individuo I-42 por poseer el mayor valor medio para índice de forma (1,22).

Se pre-germinaron unas 20 semillas de cada individuo F₂ en placas de Petri con papel de filtro y adecuado contenido de humedad. Las mismas se mantuvieron en cámara con temperatura controlada a 24°C, hasta la emergencia de la radícula (Figura 2 y 3). Posteriormente, fueron trasplantadas a macetas pequeñas y mantenidas en un invernadero vidriado hasta tener unas 10-15 hojas verdaderas desplegadas (Figura 4). Las macetas contenían una mezcla de tierra y perlita, para facilitar la aireación de la mezcla. Luego se trasplantaron a invernadero, pero directamente a tierra. El surco se encontraba cubierto con una tela plástica (mulch). El suelo del invernadero se había previamente abonado con cama de pollo (Figura 5). Se trasplantaron un total de 11 plantas por familia, las cuales se agruparon en bloques de cinco y seis plantas. Estos bloques fueron distribuidos en los surcos del invernadero al azar. También se incorporaron los padres de las RIL (*Solanum lycopersicum* cultivar (cv.) Caimanta y la accesión LA722 de *S. pimpinellifolium*), las RIL y su HSC como testigo. En el caso de los genotipos uniformes se sembraron un total de nueve plantas (agrupadas en bloques de cuatro y cinco plantas). La distancia entre plantas fue de 30 centímetros (cm).

Los caracteres evaluados y su forma de medición son los mismos que los descritos en el Capítulo I (*Caracterización fenotípica por caracteres asociados a calidad de los frutos*).

Figura 2: Placas de Petri con las semillas dispuestas sobre el papel de filtro húmedo para el pre-germinado de la semilla

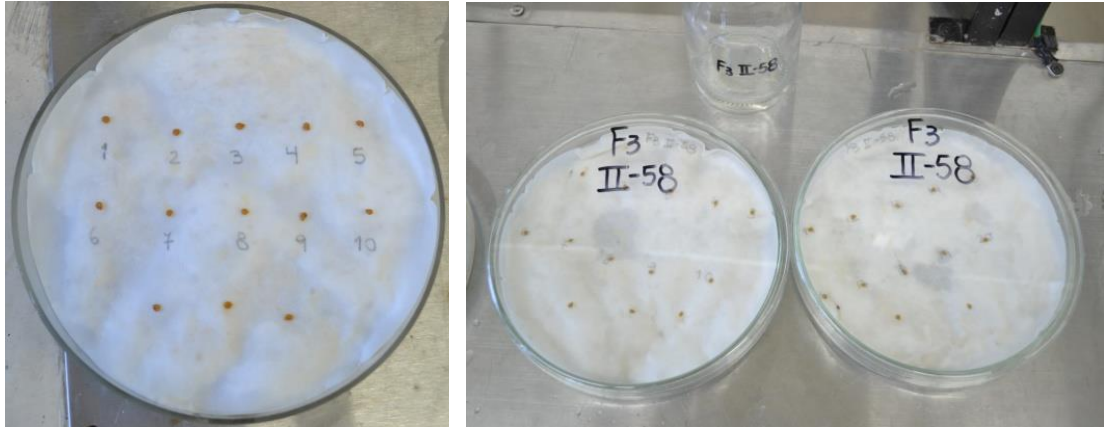


Figura 3: Placas de Petri dispuestas en las estanterías de la cámara de germinado



Figura 4: Trasplante a macetas pequeñas y crecimiento en invernadero vidriado**Figura 5:** Plantas trasplantadas a invernadero, a suelo directo

Para calcular la heredabilidad (h^2) en la generación F_3 , se utilizó el método de Regresión Progenie F_3 - Progenitor F_2 (RPP). De acuerdo a las modificaciones para especies autógamas, a los coeficientes de regresión entre generaciones que presentaron un valor p significativo, se los multiplica por $2/3$ para obtener el respectivo valor de h^2 del carácter analizado (Kearsey y Pooni, 1996).

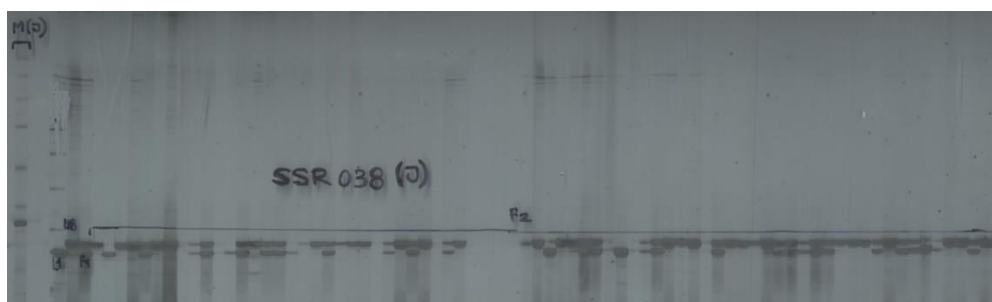
RESULTADOS

Caracterización molecular por perfiles de SSR y detección de QTLs

De los 12 SSR, 11 de ellos resultaron ser polimórficos, siendo el porcentaje de polimorfismo de 91,67%. En la Figura 6, se puede observar un fragmento de un gel de poliacrilamida.

De los 11 marcadores polimórficos, seis de ellos ajustaron a la segregación mendeliana esperada (54,54%). Los marcadores que ajustaron fueron el SSR288 (B), SSR276 (K), SSR596 (L), SSR162 (H), SSR310 (C) y EP1061 (G). Cabe destacar que la mayoría de estos SSR tal como se espera resultaron tener un comportamiento codominante, mientras que algunos resultaron ser dominantes (SSR063 (E), SSR596 (L), SSR009 (A) y SSR162 (H)).

Figura 6: Fragmento de gel de poliacrilamida para el SSR038 (J)



Referencias: **M(J):** marcador molecular (la banda más intensa corresponde a 250pb); **L1:** RIL1; **L18:** RIL18; **F₁:** HSC RIL18xRIL1; **F₂:** individuos F₂

Se detectaron un total de siete QTLs. Se detectaron dos QTLs para el cociente de absorbancias (a/b) y un QTL para los caracteres peso, vida poscosecha, porcentaje de reflectancia (L), sólidos solubles y acidez titulable (Tabla 3).

En cuanto a los efectos pleiotrópicos, se observó que el SSR288 (B) asoció a vida poscosecha y cociente de absorbancias (a/b), el SSR596 a ambos parámetros de color (L y a/b) y el EP1061 a sólidos solubles y acidez titulable.

Sólo se probó la segregación independiente del único par de microsatélites que asoció a un mismo carácter (SSR596 y SSR288), el cual resultó independiente y cuya interacción no fue significativa.

Tabla 3: Carácter fenotípico, microsatélites, significado y R²

Caracter	Microsatélite	Significado (p-valor)	R ²
P	SSR310	0,017	0,17
VP	SSR288	0,032	0,13
L	SSR596	0,025	0,07
a/b	SSR596	0,011	0,10
	SSR288	0,006	0,19
SS	EP1061	0,030	0,15
AT	EP1061	0,041	0,14

Referencias: **P:** peso; **VP:** vida poscosecha; **L:** porcentaje de reflectancia; **a/b:** cociente de absorbancias; **SS:** sólidos solubles; **AT:** acidez titulable; **R²:** proporción de varianza fenotípica para cada carácter que puede ser explicada por el efecto del fragmento

Por otro lado, se calculó el grado de dominancia para los QTLs detectados (Tabla 4).

Tabla 4: Grado de dominancia (d/a) para los QTLs detectados

Caracter	Microsatélite	Efecto del fragmento (\bar{X})			Grado dominancia QTL (d/a)
		Homocigota (alelo de mayor PM)	Heterocigota	Homocigota (alelo de menor PM)	
P	SSR310	11,89 ^{ab}	9,74 ^a	13,59 ^b	Sobredominancia negativa
VP	SSR288	21,27 ^a	19,49 ^{ab}	16,73 ^b	Aditividad pura
a/b	SSR288	1,14 ^a	1,17 ^b	1,06 ^{ab}	Sobredominancia positiva
SS	EP1061	6,52 ^a	7,30 ^{ab}	7,67 ^b	Aditividad pura
AT	EP1061	0,27 ^a	0,30 ^{ab}	0,36 ^b	Aditividad pura

Referencias: **P:** peso; **VP:** vida poscosecha; **a/b:** cociente de absorbancias; **SS:** sólidos solubles; **AT:** acidez titulable; **PM:** peso molecular; **a,b,ab:** diferentes letras indican diferencias significativas con el test de Tukey ($\alpha:0,05$)

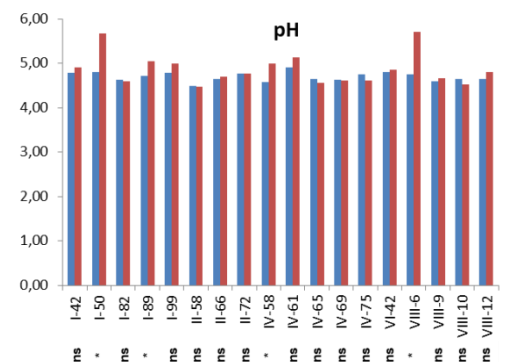
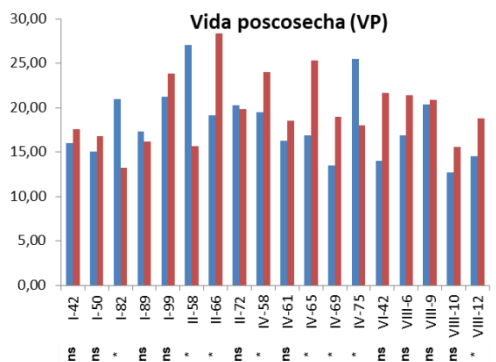
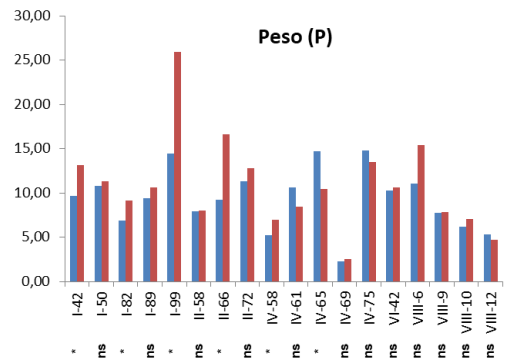
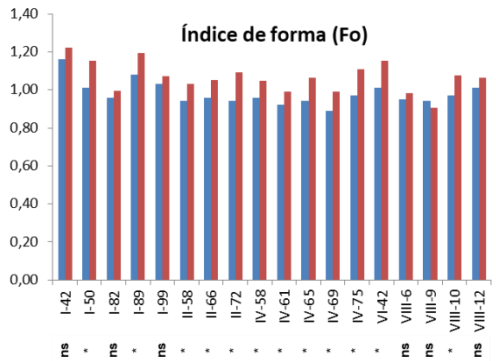
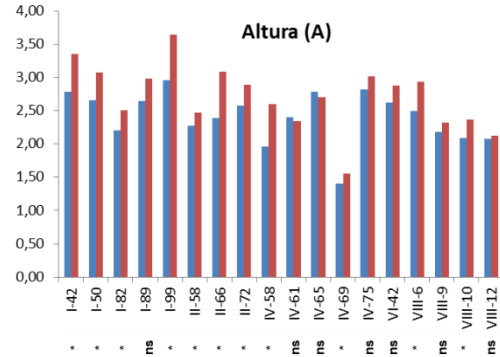
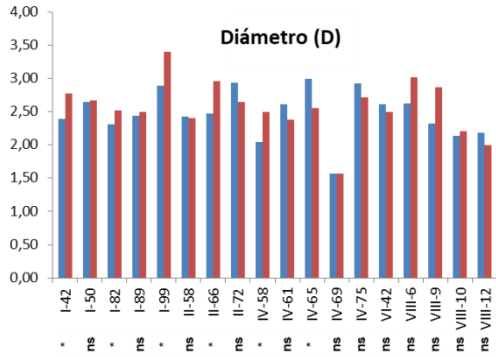
Para los casos de vida poscosecha (SSR288), sólidos solubles (EP1061) y acidez titulable (EP1061), las medias de los heterocigotas resultaron ser intermedias a ambos homocigotas, interpretándose como un grado de aditividad pura. Para los casos de los caracteres peso (asociado al SSR310) y cociente de absorbancias (a/b, asociado al SSR288), presentaron sobredominancia, negativa para el primer caso y positiva para el segundo, ya que la media de los heterocigotas fue inferior a ambos homocigotas y superior a ambos homocigotas, respectivamente.

Obtención y caracterización fenotípica de familias F₃ provenientes de individuos F₂ y estimación de la heredabilidad mediante RPP

Se obtuvieron las 18 familias F₃ provenientes de los individuos F₂. En la Figura 7 se pueden observar como variaron los caracteres a través de los individuos F₂ y familias F₃, y la detección de diferencias significativas entre ambas generaciones.

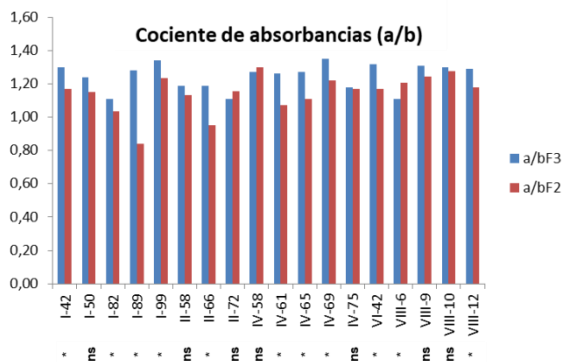
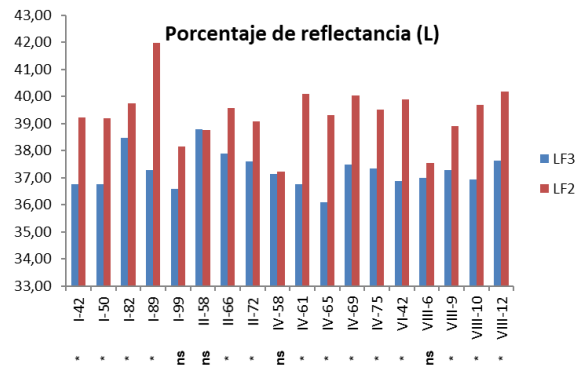
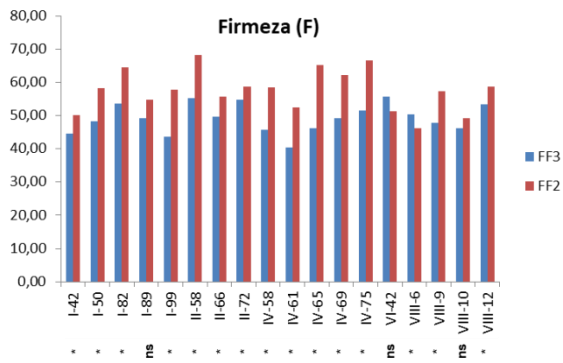
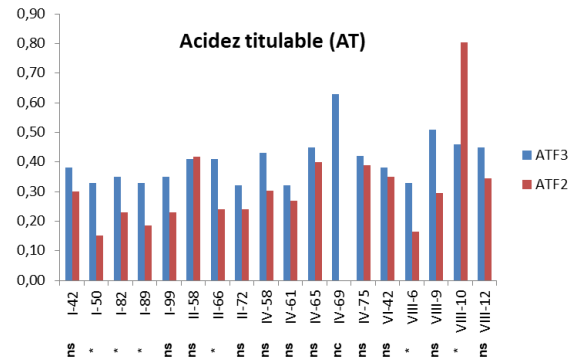
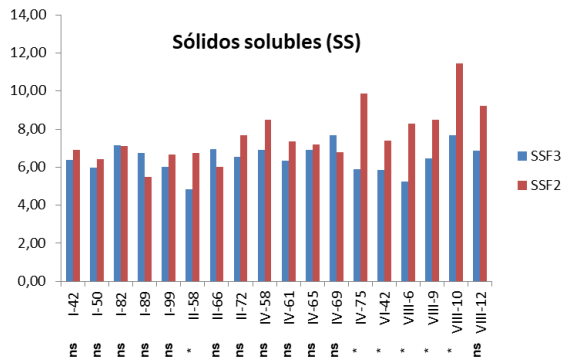
En general, los valores promedios en los individuos F₂ fueron superiores a los de las familias F₃. En relación a diámetro, pocos individuos F₂ y familias F₃ mostraron diferencias significativas. En lo referente al carácter altura, se observó, que en general los promedios de los individuos F₂, fueron superiores a los promedios de las familias F₃ derivadas y se obtuvieron una mayor cantidad de individuos F₂ y familias F₃ que diferían de manera significativa. Estas diferencias en altura, se reflejan, en el carácter índice de forma, donde se observa la tendencia de valores más altos para los promedios de individuos F₂. En este punto cabe destacar, que el individuo seleccionado por poseer el índice de forma más elevado (I-42), fue el que presentó el mayor valor en F₃. Al evaluar el carácter peso, se presentaron pocas diferencias entre los promedios de individuos F₂ y familias F₃. El individuo seleccionado por poseer el mayor peso promedio en la generación F₂ (I-99), resultó no tener el mayor valor promedio en la familia F₃, aunque se ubicó entre las primeras tres familias de mayor peso. Otro de los caracteres fenotípicos que se utilizó para seleccionar los individuos que dieron origen a las familias F₃ fue vida poscosecha. Este carácter fue más variable al evaluar su relación entre los individuos F₂ y familias F₃. El individuo seleccionado por poseer la mayor vida poscosecha en F₂ (II-66), no tuvo el mismo comportamiento en F₃ (ya que presentó un valor promedio de vida poscosecha intermedio a los mayores y menores valores). En cuanto a firmeza, fue el carácter que presentó la mayor cantidad de diferencias significativas entre individuos F₂ y familias F₃, presentándose la tendencia de mayores valores en F₂. Al realizar el análisis de los caracteres bioquímicos (pH, sólidos solubles y acidez titulable), presentaron pocas diferencias entre los promedios de individuos F₂ y familias F₃.

Imagen 7: Gráficos comparativos para los individuos F₂ y familias F₃



Referencias: ns: no significativo; *: diferencia significativa (p<0,05)

Imagen 7 (continuación): Gráficos comparativos para los individuos F₂ y familias F₃



Referencias: ns: no significativo; nc: no se calculó, ya que este individuo no poseía el dato fenotípico en la generación F₂; *: diferencia significativa (p<0,05)

Si evaluamos cada uno de ellos por separado, pH fue el que se mantuvo con valores promedios más estables entre individuos F_2 y familias F_3 ; el carácter sólidos solubles también mantuvo la misma tendencia, aunque con más diferencias entre individuos y familias; y en el caso de acidez titulable, si bien se mantuvo la tendencia de más estabilidad al comparar los valores promedios, fue, junto con uno de los parámetros de color (a/b), un carácter que presentó en general valores superiores para las familias F_3 . En cuanto a los parámetros de color, el cociente de absorbancias (a/b), como se mencionó anteriormente, presentó en la mayoría de los casos valores superiores de promedios de las familias F_3 , con respecto a los promedios de los individuos F_2 . En lo referente al porcentaje de reflectancia (L), presentó mayores diferencias significativas entre individuos F_2 y familias F_3 , siendo los valores superiores en casi todos los casos para los promedios de los individuos F_2 .

En la Tabla 6, se muestran los resultados obtenidos para la estimación de la heredabilidad utilizando el método de RPP para todos los caracteres fenotípicos.

Tabla 6: Valores de h^2 calculada mediante RPP para todos los caracteres fenotípicos

Carácter	RPP
	$h^2 \pm EE$
D	0,41 \pm 0,16 **
A	0,46 \pm 0,09 **
Fo	0,43 \pm 0,12 **
P	0,33 \pm 0,11 **
VP	ns
F	ns
L	ns
a/b	ns
pH	0,11 \pm 0,06 *
SS	ns
AT	0,15 \pm 0,08 *

Referencias: D: diámetro; A: altura; Fo: índice de forma; P: peso; VP: vida poscosecha; F: firmeza; L: porcentaje de reflectancia; a/b: cociente de absorbancias; SS: sólidos solubles; AT: acidez titulable; RPP: regresión progenie F_3 -progenitor F_2 ; h^2 : heredabilidad; EE: error estándar; ns: no significativo; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$

A través de la estimación de la heredabilidad mediante el método de RPP, se obtuvieron valores significativos medios de heredabilidad para los caracteres altura, índice de forma, diámetro y peso. Los caracteres vida poscosecha, ambos parámetros de color (a/b y L), firmeza y sólidos solubles resultaron ser no significativos, indicando la ausencia de varianza aditiva para estos caracteres en este contexto genético.

DISCUSIÓN

Como se concluyó en el Capítulo II, se seleccionó la generación segregante F_2 del HSC RIL18xRIL1 por sus características fenotípicas promisorias. Es por ello, que se decidió avanzar en el estudio y caracterización de este contexto genético y obtener la generación F_3 .

La caracterización mediante marcadores SSR, permitió incorporar nueva información, ya que éstos, a diferencia de los marcadores AFLP, son codominantes, pudiéndose distinguir el heterocigota, y a su vez se conoce el cromosoma en el cual se encuentran y su ubicación en el mismo.

Utilizando 12 marcadores SSR, cuatro de ellos asociaron, al menos, a un carácter fenotípico, detectándose un total de siete QTLs y efectos pleiotrópicos. Comparando con resultados anteriores del equipo de trabajo, Pereira da Costa *et al.* (2013) utilizaron los mismos marcadores SSR en poblaciones retrocruzas (BC1: primera retrocruza, BC1S1: primera retrocruza seguida de autofecundación y BC2: segunda retrocruza) producto del cruzamiento entre *S. lycopersicum* cv. Caimanta y *S. pimpinellifolium* accesión LA722 (usando como padre recurrente al cultivar Caimanta) para asociar a caracteres de interés agronómico relacionados a calidad de fruto. En relación al SSR 288, Pereira da Costa *et al.* (2013), lo encontraron asociado a pH (BC1 y BC1S1 (planta VII-51)), a sólidos solubles (BC1S1 (planta VII-51)) y a vida poscosecha, cociente a/b y firmeza (BC1S1 (planta VII-91)). En relación al SSR 310, no lo encuentran asociado a ningún carácter en ninguna generación. En relación al SSR 596, lo encontraron asociado a diámetro (BC1), a altura (BC1, BC1S1 (planta VII-51), BC2), a peso (BC1), a vida poscosecha (BC1S1 (planta VII-51) y BC2) y a firmeza (BC2). Por último, el SSR EP1061 se encontró, en la generación BC1S1 (planta VII-91), asociado a altura, índice de forma y firmeza.

Se encontraron efectos pleiotrópicos para los caracteres diámetro y peso, para vida poscosecha y cociente de absorbancias (a/b) y para los caracteres bioquímicos sólidos solubles y acidez titulable. Pratta *et al.* (2011b) realizando una caracterización fenotípica y molecular de 16 RIL (entre ellas las tres utilizadas en la presente Tesis), y utilizando marcadores AFLP, encontraron cinco fragmentos con efectos pleiotrópicos para peso y diámetro. Pereira da Costa *et al.* (2013) en generaciones de retrocruzas entre *S. lycopersicum* cv. Caimanta y LA722 de *S. pimpinellifolium*, encontraron también estas asociaciones utilizando SSR. También, hallaron SSR asociados a sólidos solubles y acidez titulable y a vida poscosecha y cociente de absorbancias (a/b).

Como ya se discutió en el Capítulo II, la epistasis, fue reconocida en 1909 por Bateson (Bateson, 1909), para describir la situación en la cual la acción de un *locus* enmascara los

efectos alélicos de otro *locus* (Bocianowski, 2013). En el presente trabajo no se encontraron interacciones epistáticas entre QTLs. Esto estaría indicando la posibilidad de realizar la selección de estos QTLs, si se hubieran validado, para su uso en el mejoramiento, sin que uno de ellos esté afectando la acción de otro para un carácter.

Al utilizar marcadores de tipo SSR, se pudieron validar dos QTLs, ya que, el microsatélite SSR288 se encontró asociado a los caracteres vida poscosecha y cociente de absorbancias (*a/b*) en la generación segregante F_2 del HSC RIL18xRIL1, mientras que, este mismo marcador fue encontrado por Pereira da Costa *et al.* (2013) asociado a los mismos caracteres en la BC1S1 (planta VII-91). En cuanto a este QTL, Pereira da Costa *et al.* (2013) encuentran valores de R^2 más elevados que los hallados en esta Tesis. Esto se debería al contexto genético, el cual es más homogéneo en las retrocruzas seguida de autofecundación. Por otro lado, este diferente contexto genético hace que las acciones génicas sean diferentes a las halladas por Pereira da Costa *et al.* (2013) respecto a las de la presente Tesis.

En el Capítulo II no fue posible la validación de QTLs usando marcadores de tipo AFLP, por lo que, se podría suponer que dada su naturaleza dominante y no específica a un cromosoma, no es una técnica robusta para poder concretar la validación de QTLs. Cabe destacar que al poder validar QTLs tanto para vida poscosecha como para el cociente de absorbancias (*a/b*), se empieza a evidenciar la posibilidad de utilizarlos para poder realizar una selección asistida por marcadores (MAS). Langridge *et al.* (2001) y Xu y Crouch (2008) indican que la identificación de marcadores ligados a un carácter de importancia es el primer paso para su aplicación en un programa de mejoramiento. Establecen la existencia de varios pasos luego de identificar un marcador para que el mismo sea utilizado en un programa de mejoramiento. Entre ellos la validación del marcador es un punto clave. Collard y Mackill (2008) plantean entre los puntos claves para realizar la MAS la validación de los marcadores y QTLs.

Al contar con marcadores de tipo codominantes, se puede calcular el grado de dominancia de los QTLs detectados. Se obtuvo aditividad pura (heterocigotas intermedios a ambos homocigotas) para tres de los seis caracteres: vida poscosecha (SSR288), sólidos solubles (EP1061) y acidez titulable (EP1061). Así, por ejemplo, en el caso de vida poscosecha, se podrían seleccionar los individuos que son homocigotas para el marcador SSR288 y que poseen el alelo de mayor peso molecular, ya que son los que presentaron una vida poscosecha más prolongada.

La obtención de familias F_3 , provenientes de individuos F_2 , seleccionados utilizando diferentes criterios moleculares y fenotípicos, permite evaluar el comportamiento a nivel

fenotípico, y en un futuro, cuando se caractericen molecularmente estas familias F_3 , poder validar los QTLs detectados en la generación F_2 .

Como ya se comentó en los resultados, al analizar de manera general y teniendo en cuenta todos los caracteres, los individuos F_2 presentaron valores promedios superiores para la mayoría de los caracteres que las familias F_3 . Esto se podría deber, tal vez, al aumento de la homocigosis y consiguiente depresión por endocría. A su vez, también estos cambios de valores se pudieron haber originado por la selección ejercida de manera artificial, lo cual resulta en una selección no representativa y sesgada de la población F_2 . Los caracteres que presentaron menos diferencias significativas entre los valores medios de los individuos F_2 y las familias F_3 , fueron todos los caracteres bioquímicos: pH, sólidos solubles y acidez titulable, y los caracteres de morfología externa del fruto: diámetro y peso. Se podría decir que estos caracteres fueron más conservados a través de las generaciones. Los caracteres que más diferencias significativas tuvieron entre los promedios de individuos F_2 y familias F_3 , fueron firmeza, porcentaje de reflectancia (L) e índice de forma. Estas diferencias observadas entre los promedios de los individuos y familias, podría deberse en buena parte a variaciones ambientales, ya que a través del valor promedio familiar y sus desviaciones es posible estimar los efectos genéticos y ambientales. A su vez, al evaluar el grado de dominancia (d/a) que fueron presentados en el Capítulo II, se observó que para diámetro, peso, vida poscosecha, y porcentaje de reflectancia (L), el d/a fue de dominancia completa hacia los menores valores. Esto podría explicar que, a medida que se avanza en las generaciones (de F_2 a F_3), los valores sean menores, ya que su valor medio tiende a disminuir por efecto de la endocría y la consiguiente pérdida de variabilidad por falta de heterocigosis. En el caso de acidez titulable, se presentó dominancia completa hacia los mayores valores, y, al explorar las generaciones F_2 y F_3 , se observó que, las familias F_3 , presentaron valores superiores a los valores medios de los individuos F_2 . Del mismo modo, para sólidos solubles, también se presentó el mismo grado de dominancia pero sin corresponderse con los valores obtenidos en F_2 y F_3 , tal vez por una mayor influencia ambiental.

La información fenotípica de ambas generaciones permite calcular la regresión de los promedios familiares en la generación F_3 con respecto a las plantas F_2 de las cuales derivaron (Mariotti y Collavino, 2014). En especies autóгамas, la estimación independiente de varianza aditiva y varianza no aditiva se dificulta debido a la diferente contribución relativa que ambas realizan a la varianza genética. El método de RPP estima proporcionalmente un mayor porcentaje de varianza aditiva. En consecuencia, estas estimaciones no son coincidentes con los conceptos clásicos de heredabilidad en sentido

amplio o en sentido estricto. Al evaluar los resultados obtenidos, la regresión no fue significativa para vida poscosecha, firmeza, ambos parámetros de color y sólidos solubles. Los mayores valores de regresión se obtuvieron para altura (0,46), peso (0,43), diámetro (0,41) e índice de forma (0,33), teniendo valores similares a los obtenidos en el Capítulo II. Mientras que los menores valores se obtuvieron para los caracteres de pH (0,11) y acidez titulable (0,15). Rodríguez *et al.* (2006) estimaron la heredabilidad por RPP entre la generación F_3 - F_2 , obtenidas de los cruzamientos entre el cultivar Caimanta de *S. lycopersicum* y LA722 de *S. pimpinellifolium*, y obtuvieron también una regresión no significativa para vida poscosecha y un valor de 0,29 para peso. Al comparar la estimación de la heredabilidad (H^2 o GDG) en F_2 y la estimación mediante RPP en F_3 , los mayores valores obtenidos mediante RPP, se corresponde con los caracteres que tuvieron la menor heredabilidad en F_2 . La misma situación sucedió con los valores de pH y sólidos solubles, los cuáles presentaron en F_2 los mayores valores de H^2 , mientras que por la RPP presentaron los menores valores. Esto podría deberse a que, al momento de calcular el GDG se utilizan los datos provenientes de ambos parentales, HSC y todas las plantas de la generación F_2 , mientras que en la RPP solo se utilizan los datos de aquellas plantas de las cuales se derivaron familias F_3 , originando un sesgo.

Para concluir, a través de este Capítulo, se logró avanzar en una caracterización más exhaustiva de la generación segregante F_2 del HSC RIL18xRIL1. Además, se pudo obtener la generación F_3 lo que permitió conocer los valores medios fenotípicos de las familias de los individuos seleccionados y dar inicio a un nuevo programa de mejoramiento genético asistido por marcadores moleculares. Si bien los marcadores SSR son más informativos en cuanto a que se dispone de su ubicación cromosómica y son codominantes, se propone continuar con la caracterización de esta población segregante, utilizando marcadores más específicos y, a su vez, desarrollados basándose en las secuencias de los parentales de primer ciclo. Esta actividad se desarrollará en el Capítulo siguiente.

CAPÍTULO IV

En este Capítulo se aborda el Objetivo Específico 4: Desarrollar marcadores moleculares específicos para la población base seleccionada basados en la secuencia de los progenitores y construir los mapas físico y genético correspondientes.

Para cumplir con este objetivo se llevaron a cabo las siguientes actividades:

1. Caracterización de la generación F_2 proveniente del HSC ToUNR18xToUNR1 utilizando marcadores del tipo SNP utilizando la técnica de HRM.
2. Elaboración de los mapas físicos y genéticos de la población segregante F_2 .

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

La caracterización se realizó sobre la generación segregante F₂ (filial 2) del híbrido de segundo ciclo (HSC) RIL18xRIL1. La obtención de los materiales ya fue descrita en Capítulo I.

Métodos

Detección de SNP utilizando la técnica de HRM

La técnica de HRM (Fusión de Alta Resolución) permite discriminar los alelos de cada SNP (polimorfismo de nucleótido simple) detectando la diferencia de temperatura de fusión entre los diferentes fragmentos de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) amplificados para cada alelo. El procedimiento consiste en la amplificación del fragmento de interés mediante PCR en presencia de un colorante fluorescente específico de ADN de cadena doble y que se une de forma saturante al ADN, esto es, que se unan tantas moléculas de colorante como sitios de unión tenga la cadena de ADN. De manera muy sintética, el proceso del HRM consiste en subir gradualmente la temperatura, lo que va originando la desnaturalización del fragmento de ADN, lo que a su vez ocasiona la pérdida de fluorescencia, que es medida a intervalos de temperatura muy cortos (de 0,5°C a un rango entre 0,008°C a 0,2°C), haciendo así más precisas las curvas de fusión obtenidas. De esta forma es posible distinguir dos productos de PCR, o amplicones, que difieran en único SNP siempre que dicho cambio sea un cambio de un par GC (guanina - citosina) por un par AT (adenina - timina) o viceversa.

Cabe destacar que esta actividad fue llevada a cabo en la Universidad de Almería (Almería, España), bajo una beca de estancias cortas doctorales en el Reino de España otorgada por el programa Bec.Ar (URL: <https://www.argentina.gob.ar/becar>) desde el Ministerio de Modernización. La duración de la misma fue de 6 meses durante el año 2016.

Diseño de cebadores

La Cátedra de Genética disponía de las secuencias del genoma entero de ambos progenitores de las RIL (líneas endocriadas recombinantes): *Solanum lycopersicum* cultivar

(cv.) Caimanta y *S. pimpinellifolium* accesión LA722. Las mismas fueron obtenidas por el Dr. (Ing. Agr.) Vladimir Cambiaso durante una estancia doctoral (programa Bec.Ar) en la Universidad de Ohio (Ohio, Estados Unidos de América) (Cambiaso *et al.*, 2015). Por lo que el diseño de los cebadores se realizó utilizando la secuencia de dichos genotipos parentales de las RIL.

A continuación, se describe la metodología utilizada para el diseño de cebadores.

i. Búsqueda de la ubicación física donde diseñar los cebadores

Con el fin de seleccionar SNP que estuviesen distribuidos uniformemente por los 12 cromosomas de tomate se realizó una comparación entre un mapa físico y un mapa genético de tomate de los depositados en la página SGN (Sol Genomics Network). Para ello se utilizó la herramienta de comparación de mapas (Comparative Map Viewer) de la pestaña herramientas (Tools). El mapa físico tomado como referencia fue “Kasuzo and SolCAP markers” basado en la secuencia de Heinz 1706, y como mapa genético “EXPEN 2012”, basado en el cruzamiento entre el cultivar MoneyMaker de *S. lycopersicum* y la accesión LA0716 de *S. pennellii*. La selección de dichos mapas estuvo fundamentada en el alto número de marcadores que comparten. De esta manera, se seleccionaron SNP localizados en ubicaciones físicas que cubrían la totalidad del mapa genético de cada uno de los 12 cromosomas de la especie.

ii. Diseño de los cebadores

Una vez determinada la ubicación física donde se iban a localizar los marcadores, se procedió al diseño de los mismos. Los SNP seleccionados también debían cumplir con la condición que el cambio de base nitrogenada implique diferente número de uniones puente de hidrógeno en la complementariedad: sea T por C o G, A por C o G, C por A o T y G por A o T (dejando descartados los cambios A por T, T por A, C por G y G por C).

Otro criterio de selección fue la elección de SNP que contasen con suficiente profundidad de cobertura, definida como el número de veces que la base en cuestión fue leída en esa posición durante el proceso de secuenciación. Para el genotipo que poseía la base igual que la secuencia de referencia (Heinz 1706), la mínima profundidad de cobertura fue de diez, mientras que para el genotipo que poseía la secuencia alternativa a la referencia, la mínima cobertura tolerada fue de 20.

Utilizando la página de SGN, también se chequeó que en la región seleccionada para el amplicón no correspondiese a una región repetida o con alto número de copias en el genoma de tomate. Para ello en la pestaña herramientas (Tools), se seleccionó la opción de navegador del genoma (Genome Browser) y allí se utilizó la sección de elementos repetitivos (Repetitive Elements). De esta forma se seleccionaron los SNP de regiones

únicas en el genoma de tomate. Cabe destacar que la versión de mapa utilizado de SGN fue la SL2.5 ITAG2.4. Por último, se comprobó que los SNP seleccionados ya habían sido previamente identificados en los dos genotipos más similares al cv. Caimanta y a la accesión LA722 presentes en la base de datos “Tomato 360 Variants SL2.5”.

Para cada SNP seleccionado se diseñaron cebadores que lo flanqueaban mediante el software Primer3 (URL: <http://bioinfo.ut.ee/primer3/>). Posteriormente, los cebadores y el amplicón que generarían fueron chequeados mediante la opción BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), para corroborar que fuesen de copia única en el genoma de tomate y que dicha región fuese la región de interés que contenía el SNP. Para ello, utilizando la página de SGN, a través de la pestaña herramientas (Tools), se seleccionó la opción BLAST y se seleccionaron los siguientes parámetros:

- Categoría (Categories): Genoma de tomate SL2.50 (Tomato Genome (SL2.50)).
- Base de datos (Database): Cromosomas Genoma de Tomate (Tomato Genome Chromosomes (build SL2.5))

La longitud de los amplicones fue variable, procurando que la óptima fuese de 150 pares de bases (pb), tratando que el polimorfismo o SNP se encuentre lo más centrado posible en el amplicón.

Chequeo del polimorfismo

No fue posible comprobar la presencia de los SNP seleccionados en el ADN de las RIL18 y RIL1, ya que aunque dichos ADN habían sido purificados con el mismo método, se habían purificado en distintos experimentos de extracción y las correspondientes amplificaciones originaban curvas de fusión con parámetros ligeramente distintos que alteraban los posteriores análisis. Por ello, se procedió al chequeo del polimorfismo tanto en los genotipos parentales donde se diseñaron los cebadores, como en un *bulk* de ADN mezcla de todos los individuos de la F₂, puesto que todos estos ADN habían sido purificados simultáneamente.

De esta manera se pudo determinar cuáles de las regiones de cada cromosoma se encontraban segregando y cuáles ya se han fijado. Cabe destacar y recordar que el origen de la población segregante F₂ fue a partir de la autofecundación de un HSC producto del cruzamiento entre dos RIL selectas (ambas eran de alto peso y larga vida poscosecha). Al tener los genotipos, se pudo determinar si esas regiones no segregantes se correspondían con ADN del parental *S. lycopersicum* cv. Caimanta o del parental *S. pimpinellifolium* accesión LA722.

Aquellos marcadores que resultaron polimórficos en el *bulk* de la F₂, fueron evaluados individualmente en todos los genotipos de la F₂. Tanto las características de los genotipos *S. lycopersicum* cv. Caimanta o *S. pimpinellifolium* accesión LA722, características de las RIL y el método de obtención de las mismas ya fueron descriptos.

Amplificación selectiva para HRM, escaneo de las placas y análisis de las fluorescencias

La amplificación se llevó a cabo, en un termociclador Eppendorf- Mastercycler ® pro (vapo-protect). Se utilizaron unas placas específicas para el equipo de HRM. En la Figura 1 se muestra una de ellas.

Figura 1: Placas utilizadas para la técnica de HRM



La mezcla inicial (máster mix) para la PCR fue a siguiente (por muestra):

- 5 microlitros (μ l) HotShot diamond™ Mastermix
- 1 μ l agua para PCR autoclavada
- 1 μ l cebador derecho
- 1 μ l cebador reverso
- 1 μ l colorante fluorescente LCGreen Plus+

El volumen final fue de 9 μ l por muestra, a la cual se le agregó 1 μ l de ADN. La concentración del ADN debe ser de 5 nanogramos/microlitro (ng/ μ l).

La concentración de ambos cebadores fue de 10 micromolar (μ M).

Una vez distribuida toda la mezcla inicial en la placa y posterior agregado del ADN, se colocaron 15 μ l de aceite mineral para PCR en cada pocillo de la placa y se centrifugó por 2 minutos a 3700 revoluciones por minuto (rpm).

El programa de PCR fue el siguiente: 1 ciclo de 4 minutos a 94 °C, 40 ciclos de 15 segundos a 94 °C, 30 segundos a 62 °C y 40 segundos a 72 °C, 1 ciclo de 1 minuto a 94 °C y finalmente mantenimiento a 30 °C.

Una vez terminada la amplificación, se colocó la placa en el escáner de fluorescencia (Light Scanner Idaho Technologies Inc.). El procedimiento del equipo consta de una primera etapa de calentamiento. Cuando la temperatura llega a 65°C, se genera una imagen donde se podrá observar la cantidad de fluorescencia en cada pocillo.

A medida que va aumentando la temperatura se van graficando las curvas de fluorescencia. Una vez escaneadas las placas, las mismas se podrán guardar a temperatura ambiente envueltas en papel aluminio (protegidas de la luz, ya que el colorante es sensible a la luz). Las mismas se podrán volver a escanear las veces necesarias, por un periodo prolongado de tiempo.

El análisis se llevó a cabo utilizando el software provisto por el equipo (Light Scanner Software with Call-IT2.0). Dicho software analiza las curvas de fusión y, dependiendo de los parámetros de cada curva, las asigna a genotipos concretos.

Chequeo de amplicones mediante secuenciación

Se seleccionaron tres amplicones para comprobar mediante secuenciación que las determinaciones de los genotipos realizados eran correctas.

i. PCR de pre-secuenciación:

Cuando se realiza una reacción de secuenciación, el ADN molde debe estar en concentración suficiente para que la reacción sea exitosa y pueda ser analizada. Esta amplificación luego se purificará y será el molde para la reacción de secuenciación.

La mezcla inicial para esta reacción de pre-secuenciación fue la siguiente:

- 19,6 µl de agua para PCR
- 3,0 µl de buffer 10x (sin Cloruro de Magnesio (MgCl₂))
- 2,4 µl de dNTPs en concentración 2,5 µM
- 1,8 µl de MgCl₂ (50 milimolar (mM))
- 1 µl cebador derecho (10 µM)
- 1 µl cebador reverso (10 µM)
- 0,2 µl Taq (5 unidades/microlitro (u/µl))
- 1 µl ADN (10 ng/µl)

Su volumen final fue de 30 µl.

El programa de PCR utilizado para la pre-secuenciación, fue el siguiente: 1 ciclo de 4 minutos a 94°C, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C y 1 minuto por kilobase (kb) a 72°C, 1 ciclo de 5 minutos a 72°C y 1 ciclo de mantenimiento a 22°C.

ii. Purificación de PCR:

La purificación de la PCR se llevó a cabo utilizando un kit de purificación comercial de Sigma (GenElute™ PCR Clean-Up Kit). El procedimiento se realizó de manera exacta a como lo describe el Boletín Técnico del producto. El protocolo se puede descargar del siguiente enlace (URL):

<http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/na1020bul.pdf>

iii. PCR de secuenciación:

Los amplicones purificados fueron secuenciados realizando la siguiente reacción:

- 1,5 µl del producto de PCR purificado
- 1 µl de cebador directo o reverso (10 µM)
- 1,5 µl de Big Dye Sequencing Buffer
- 5 µl de agua para PCR
- 1 µl de Ready Reaction Mix

El volumen final fue de 10 µl.

El programa de amplificación para secuenciación fue el siguiente: 1 ciclo de 1 minuto a 96 °C, 25 ciclos de 10 segundos a 96 °C, 5 segundos a 50 °C y 4 minutos a 60 °C y 1 ciclo de mantenimiento a 4 °C.

iv. Precipitación de la PCR de secuenciación y resuspensión:

Para llevar a cabo la precipitación, a cada tubo se le añadió 1 µl de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) a 125 mM y 1 µl de acetato de sodio a 3 molar (M) pH 5,2. Posteriormente se le agregaron 25 µl de etanol 100% y la mezcla se dejó a temperatura ambiente pero cubierta de la luz por un tiempo de 15 minutos. Transcurrido ese tiempo la mezcla se centrifugó a 14000 rpm durante 15 minutos y se eliminó el sobrenadante. El pellet que contenía los productos de la reacción de secuenciación fue lavado mediante la adición de 35 µl de etanol 70%. Después de mezclar bien, el ADN fue precipitado de nuevo mediante centrifugación por un tiempo de 10 minutos y se eliminó el sobrenadante. Los pellets se secaron dejando los tubos abiertos en una campana extractora de gases (siempre al resguardo de la luz). La resuspensión se llevó a cabo colocando 10 µl de formamida en cada tubo. Las muestras se desnaturalizaron durante 5 min a 94 °C antes de ser separadas mediante electroforesis capilar en un secuenciador ABIPRISM 3500 de los Servicios Técnicos de la Universidad de Almería.

Construcción y graficado del mapa genético

Para la construcción del mapa genético se utilizó el software JoinMap 4. La información de los marcadores fue asignada a los grupos de ligamiento usando un valor de LOD de 3. La función de Kosambi fue utilizada para el cálculo de las distancias entre marcadores (Kosambi, 1944). Para graficar el mapa se utilizó el software Map Chart 2.3.

Caracterización fenotípica mediante caracteres relacionados a calidad de fruto

La caracterización fenotípica ya fue descrita en el Capítulo I (*Caracterización fenotípica por caracteres asociados a calidad de los frutos*).

Detección de QTLs para caracteres de interés agronómico relacionados a fruto

El mapeo de los QTLs (*loci* de caracteres cuantitativos) hace posible comprender la arquitectura genética que poseen los caracteres complejos que generalmente son responsables de los factores de rendimiento en los cultivares.

Las regiones candidatas de QTLs para los caracteres fenotípicos aquí evaluados fueron identificadas utilizando un software de licencia libre: QGene 4.3.10. También, se estimó el grado de dominancia de cada QTL detectado. Para determinar el LOD (logaritmo de probabilidades) umbral por carácter se utilizó un test de permutaciones usando 1000 iteraciones (en: Análisis de QTLs, Mapeo de QTLs, Re-muestreo, Permutaciones) y con un nivel de significancia de 0,05. Luego se utilizó la técnica de mapeo por intervalo simple (SIM) (en: Análisis de QTLs, Mapeo por Intervalo Simple (Simple IM)). El intervalo de escaneo fue de 0,1centimorgans (cM).

Para graficar los QTLs putativos, se utilizó el software QGene y se hicieron modificaciones con un software de edición de imágenes.

RESULTADOS

Se diseñaron un total de 113 marcadores distribuidos a lo largo de los 12 cromosomas (Tabla 1). También se utilizaron 17 marcadores (tipo SNP) que el grupo de investigación de la Universidad de Almería había mapeado previamente (Capel *et al.*, 2015). Por lo tanto, el total de marcadores utilizados fue de 130. El número de marcadores utilizados y distancia física entre los mismos por cromosoma se puede observar en la Tabla 2.

El número promedio de marcadores utilizados por cromosoma fue de 11. Cabe destacar que en algunos cromosomas el número de marcadores utilizados fue mayor, debido a una combinación entre longitud de los mismos y relación entre el mapa físico y genético.

Dado que todos los cebadores fueron diseñados para amplificar SNP previamente detectados entre las secuencias de *S. lycopersicum* cv. Caimanta y la accesión LA722 de *S. pimpinellifolium*, los correspondientes marcadores fueron polimórficos en el ADN de estos parentales. Sin embargo, como la población segregante F_2 se generó del cruzamiento de dos líneas RIL, no todos los marcadores fueron informativos en la población segregante F_2 , puesto que los marcadores localizados en las regiones de idéntico genotipo entre las líneas RIL no estaba segregando en la población F_2 .

Por ello, del total de los 130 marcadores analizados, únicamente 79 (61%) segregaron en los individuos de la población F_2 (dos de estos marcadores no se utilizaron luego para la elaboración del mapa genético). Cabe destacar que este porcentaje era esperable, ya que ambas RIL fueron seleccionadas bajo los mismos criterios, esto es, frutos de alto peso (comparado a la media de las RIL) y larga vida poscosecha y deberían compartir grandes porciones de los genomas de sus parentales. En la Figura 2 se puede observar el análisis de un SNP (SLCr2_31Mb) mediante el software para toda la población F_2 .

Algunos de los marcadores SNP analizados, en concreto los marcadores SLCr11_51(J), SLCr9_65Mb y SLCr9_66 Mb, fueron seleccionados para confirmar los distintos genotipos mediante secuenciación. En la Figura 3, se puede observar un fragmento de las secuencias del marcador SLCr11_51(J). En los tres marcadores las secuencias obtenidas confirmaron los genotipos obtenidos mediante HRM. En el recuadro en color rojo se marca el polimorfismo, el cual se correspondía con una T para Caimanta, Moneymaker y 26, una C para LA722, To937 y 48. En el caso de 19, el genotipo es heterocigota (aunque en la imagen marca C o T) y se observan las curvas típicas de individuos heterocigotas (curvas superpuestas).

Tabla 1: Nombre del marcador, ubicación cromosómica, polimorfismo y secuencias de los cebadores (izquierdo y derecho)

Nombre marcador	Cromosoma	Polimorfismo		Cebador izquierdo	Cebador derecho
		Alelo Caimanta	Alelo LA722		
SLCr1-0Mb	1	G	A*	ATCTCCTTTGGCAGCCTCTT	GCTGATTGATGATGTGGGCT
SLCr1-2Mb	1	T	C*	TGATGTTTGGCAGGAGATT	CAACAGATCACCACGCTACC
Cr1-3.1MbCCS ^(UAL)	1	T	C*	TCAACCTTAGTTAATATTCTCATCGAA	TTCAACCTTTGCTCAACTCG
SLCr1-7Mb	1	A	C*	GCGAGTGTGCCATTAGAAAATC	TGCAGAGACTATTGCATCACC
Cr1-16MbCCS ^(UAL)	1	T	C*	CTCTTTTCTCTCGCTCTTTCAA	TGAAATGTACAAAAACAGCAGA
SLCr1-7-30.26Mb	1	A	G*	AGAGGTTACATTGACGTTTAC	TGTCAACATCAAGAGGAACGTG
SLCr1-67Mb	1	A	G*	AAAAGCACAGAAGGCCTCG	TGTCAATTTCCCTTTCCCGTTCT
SLCr1-72.3Mb	1	T	C*	AGGTGAAACTCATCCACACCA	GGCTCCCTTTTTCATGTCTC
Cr1-70CCS.77Mb ^(UAL)	1	A	G*	AAACCCAAAACCTAATCTGGA	CCGTCTCATACATCGTCAAT
SLCr1-80Mb	1	C	T*	GGGGCATCTGTAAAGCTATG	TGGACTGACTGGGTGGTTTT
SLCr1-82Mb	1	A	G*	GACATACTTCTCTTCCACT	GTGCGTGATAAAGGTGCTCA
SLCr1-83.4Mb	1	A	G*	CAGAAGTTCGGAGCCCAGTA	TGAAATTCGTTGCTCTACCATCA
PC119-84Mb	1	G	A*	TTAACCCGCTTCTTCAACGG	GCAGCAATCGAAACCTCCA
SLCr1-85.5Mb	1	T	C*	CAGGCTCGGATGCTGATCTA	TAGCTTTTCATTTTCTCATGTGCA
SLCr1-87Mb	1	C	T*	AACGCGGAATTAATTGCCCA	GTAACTTTCAGAGGAGCGCC
SLCr1-91.5Mb	1	T	C*	AGCACCAGATTCCGTTGGG	TCAACTCCATCTGTACCCTTTT
SLCr2-3.7Mb	2	C	T*	TGTTGCCTCCACATCCCAAT	CCACTGTCACCTTTTGCTGC
SLCr2-28Mb	2	T*	G	GGGTATGAGGGATTGGTTTTT	GGGCTTTTCTTACCACAAATGC
SLCr2-31Mb	2	C*	T	TGGACATGGCAATAAATGACG	GCAACACGCTCTTCCATTCA
SLCr2-36Mb	2	C	T*	CCATGTTCTTACTCATTGCGT	TGTATGCTAGATGGTGGTCACT
SLCr2-38Mb	2	T	G*	CAGAGTTGCTTAAACCTGCC	TGTATCCAATGAAACTACAACCG
SLCr2-40(2)Mb	2	C	T*	CAGTTATGGGTGCTGGTGT	ACAGGGAGTTCAACTGGAATC
SLCr2-42Mb	2	C	T*	CAGAATGTAGCACCACCACC	CTTGAATAGTGCCTGCCCC
SLCr2-44(2)Mb	2	A	G*	GCTAAGCCGCAATGGTCT	CTCTTGTTCATCCGAGCTCG
SLCr2-48Mb	2	G	A*	CCCCTTACGACGCTCAGC	CAAGGACCAGGAACATGCTG
fw2.2-52Mb	2	A	C*	CACCCGTTAAATAGGACATTGT	GGGGCAGATACATAGTGAGGA
SLCr3-0Mb	3	G	A*	AGTTCTGTGTTGGCGAGTTG	TGACCTCTCAAATGTGTAAGCA
SLCr3-1Mb	3	G	T*	TGCCCTCAGAAAATCGACCT	TCAGTGTACAGCTTGTCCA
SNP3_11.7Mb ^(UAL)	3	C	T*	ATTGAGCAAGCATCCCAA	ACAAAAATCTGCGATAAACTCACA
SLCr3-10Mb	3	T	C*	TTAGAGTTCTATTGGGTGCC	CACGCTCCACCTCTCAACTA
SLCr3-51.9Mb	3	T	C*	CGACTTCCGTGGCTTATTCT	TGGTAAAAATGCTGACGTGG
SLCr3-53Mb	3	G	A*	GCAGCTTAGAGAAAACATACTTCG	CCATAGTTACTGGGGCCGTA
SLCr3-55Mb	3	A*	G	TCTGTAGCAGCAAACTCATATGCA	TGTGTGCTCTCTTCAAAT
SLCr3-59Mb	3	G	A*	ACAAGCAATTCCTCTCGACC	CTCAGAGTGAAGCAGGTTCA
SLCr3-62Mb	3	T	C*	AGCAAGTTGGGTCTGACAAA	TGCAGAAAAGAAAAGGACATGG
SNP3_Betain(2).63.8Mb ^(UAL)	3	A	G*	CAGGGAGAAACATGACAACG	CGGATTTCCCTCTGTCATAA
PC033.70Mb	3	C	T*	TGGCTGATTTTATGTGCAAAATTGG	TCCGGCTGCATATTCAATTGA
Cr4-T2.0Mb ^(UAL)	4	A	G*	AGAGTAAGAGGTTCCCCCTCA	TGCAAGACCATGATACCCTATC
SLCr4-2Mb	4	G	T*	CAATCCAACAGAAAGATCCTCCA	TGTTGCCTTAACTATTTGTGGC
U225200-3.88Mb ^(UAL)	4	G	A	GCCACGATCAGGTTCTGTA	CAAAAGATTGAAATTCCACTCAA
SLCr4-5-55.30Mb	4	A	G*	TGTTGCCACCAGTTAGAGT	AGAGAGGATGCTGGTGATCG
Cr4-53CCS.54Mb ^(UAL)	4	A	G*	GAACCAAGGGGATAGCTTCA	TTGACCTAGTCTACTGTGGAG
SLCr4-60Mb	4	G	A*	CGAAGAAGCTGTGAACCTCA	TTCTTTTCTATCATCAGCCTCT
SLCr4-62Mb	4	T	C*	GCAGCATAAAGACAGACTCC	AAGAGGCCCATATGTGACCG
SLCr5-1.9Mb	5	C	T*	CGTTTGCCGTGGTTGACTAT	GGTACTTCTTTTGTGTACGAA
SLCr5-3Mb	5	A	C*	TACTAGCTGAGAGACCGGAC	AGGAGATTTGGACCTTGG
SLCr5-4Mb	5	C	T*	TGAACTCAGGTACAAGGCGT	AGTCATTCCTTTATTCGCG
SLCr5-30Mb	5	C	T*	GTACCACAGCACAAAGGGC	AGTGCACCATACCTATCCACA
PC049.62Mb	5	G	A*	CTTGCTTGAATTTGCTTACCTCA	AAAACAGGGGAAGTGAACACAG
SLCr5-63Mb	5	G	A*	TCAACTCAGTCTCCCATGCCA	TGAGTGAACATGAGTCCCTGTG
SLCr6-0Mb	6	T	C*	ACGAATCAACTGCAAGAAACCT	ACGTTGGTTGACAGTCTCTT
SLCr6-3.6Mb	6	G	A*	GGTGACTCAGCATCTCATTCA	ATCTGTACCTTTGTGTACTGACA
Cr6-10CCS.14Mb ^(UAL)	6	T	G*	TTTCAATTCCTTTCTTCCACCA	GAGGTGGGTACATGCAATGG
Cr6-20CCS.23.6Mb ^(UAL)	6	T	C*	ATCAACAATCGCCGAGAGTC	AACGCAATTTGCTTCCCAAC
6_Ca_Cal(2).35.6Mb ^(UAL)	6	C	T*	TTGCGATACCAACCTCTTCTC	TGCGCCAGTAGCTGATAAAA
SLCr6-37.8Mb	6	T	C*	TGCTTTCTTTCTTTGTTCCCC	GGTGTGAGAAAATTTGGTATCC
SLCr6-40Mb	6	C	T*	TCCTCGTTTCCATTTTGTATCTCT	GGATACTTTGTACAACTGCCTCA
SLCr6-42Mb	6	C	T*	TGACGGATGAATGAGTGGT	GCTTCGGGGTAAGAGTGAGT
6_Ca_Ret(2).42.5Mb ^(UAL)	6	A	G*	ACCACGAATTCACGCCAAC	TATTATTGGCCGGTTGCTTC
SLCr6-43.3Mb	6	T	C*	ACCAGGTGATAAGCCTCTAAGT	CACCTTAGCTCTCATGGTTTCA
SLCr6-44Mb	6	T	C*	GCGGGGATTCATACGCTTGG	CCCGACTTAAATATGCCTTCCA
SLCr6-45Mb	6	C	A*	GTCATACACAACATCATAGCCCT	ACAATTTCCAGGTGAATCGG
SLCr6-50Mb	6	G	A*	TTGACGCCCTCATTGTTGGT	CACTAGATGACCAGGCCCTCG

Referencias: (A,T,C,G)*: indica quien posee el polimorfismo alternativo a la referencia. Ejemplo SLCr6-50Mb: Alelo Caimanta G, Alelo LA722 A*: indica que Caimanta posee la misma base (G) que la encontrada en la referencia (Heinz1706), mientras que LA722, para esa posición posee una base alternativa (A); ^(UAL): cebadores brindados por el laboratorio de la Universidad de Almería; **A:** adenina; **T:** timina; **C:** citosina; **G:** guanina.

Tabla 1 (continuación): Nombre del marcador, ubicación cromosómica, polimorfismo y secuencias de los cebadores (izquierdo y derecho)

Nombre marcador	Cromosoma	Polimorfismo		Cebador izquierdo	Cebador derecho
		Alelo Caimanta	Alelo LA722		
SLCr7-0(2)Mb	7	T	C*	TGCTGTTTTATGCTATCAGCCA	ATGCCAAGTGTAGTGC
Cr7-1.3CCS.1.3Mb ^(UAL)	7	G	T*	CGACGATGACCATGGAGAAT	CACTATCCCATTCAAGCCAAT
SLCr7-4Mb	7	T	C*	TGGTCATCTCCTCGTACAACA	CTCCTTGAGATGGAACCGTC
SLCr7-6Mb	7	A	G*	ACCATTGAGAGCATACATACTGC	GCAGCCGTGACTGAATACCG
PC185- 7.9Mb	7	A	G*	TGTCGTTGCTTTTCTTCCA	GTTACTCACCCTGGGTGAG
SLCr7-24Mb	7	G	A*	CGGTCAAAGTTGGAGTGCA	CGCTGAATGGTGGGTAAGT
U222756-51Mb ^(UAL)	7	G	T*	TCCAAGCTAGAATAAAGAGCATGG	GCACAGATTCTCGCCCTCTA
Cr7-57CCS. 59.7Mb ^(UAL)	7	G	A*	CAACTGGGGATGATAGGTCCA	GATCGAGCTTCGGTTTTTCC
SLCr7-64Mb	7	A	C*	CATCAGAGGGTGGGGACTTC	AGTGTGCTCCAATAAAACCCC
SLCr7-65Mb	7	T	G*	TGGCTAAGTCACTTCCAGCT	CAAGTGGTAAATAAAGCAGGC
SLCr7-66Mb	7	G	A*	AGTGTCTGATGATGGGACTCT	ACACGAGCCACATTAAATGCC
SLCr8-1Mb	8	A	G*	TGCAGTCACCATGGTTCTCT	AGCAGTCTTATGTTAGGCCAA
SLCr8-2Mb	8	G	A*	CCCCAGATCAACAACACCT	CCTACTGGCCGACGATAAGA
SLCr8-4Mb	8	T	C*	CCACCAAGGGCAATCTCAGA	GCATCTGTTTTCCCTCAT
SLCr8-20Mb	8	C	T*	CACACAAAAGAGGTCTGTGCA	GCCGATGATAGCGCTGTAGA
SLCr8-56Mb	8	A	G*	ACTGACATGCTTAGTCACTTCTGC	TCCTTGAGAAGATTGGTTCAGT
SLCr8-57Mb	8	A	G*	TCCTTCTCTTTTCTGTATGGT	ATCAATGGGGAGAGGTTAACAG
SLCr8-58Mb	8	T	C*	CGTCGATTCTCAATGTTGCT	CCACAACAACAGCACTGC
SLCr8-60Mb	8	A	G*	GTATCGGAATTGACTCCACACA	TCATTGCATCAGTGATCAACAT
SLCr8-62Mb	8	A	G*	ACTTTTGAGACCAGCTTCTCG	TGTTTGTGAAATCTGTCACGTG
SLCr8-62.1Mb	8	C	T*	GCTGAATCTCATTACAGGGAGC	CACCTGTACATGCTGCTCAC
SLCr8-63Mb	8	T	C*	ACATGCTTCTATCTCCCTCTG	ACAGCATTCCATTAGAGAGACT
SLCr8-64Mb	8	C	A*	TGCACGTAGGATCCTTCAACA	ATTCTTCTCCATGCCACT
SLCr8-64.1Mb	8	A	G*	CCAAGTTCACGTTACCTGTTTC	TTTTCGAGTTTGGAAACCTGC
SLCr9-0Mb	9	G	A*	TTGAAGTCTGAGAAGAGCT	AGAATCTAAGGTTTGGAGGTGGT
SLCr9-2Mb	9	C	T*	ATCCCTCTCGAGCTCCTGTA	TCACAAAGCCGTTACAAGACA
SLCr9-3.6Mb	9	C	T*	CGGAATGATAAGCCTGTCCGG	TGCTTGACATCAGTTGCATT
SLCr9-34Mb	9	T	C*	GGGACATGTTGGTTACACA	TGCCCTTTTTCTCCCTTACA
SLCr9-60Mb	9	A	C*	CCACAACCAGCTTCTCTATC	GAATGAGTCTGTGGCAATTG
SLCr9-62Mb	9	C	T*	ACTGTGTGAAGTACGTTTGAAGA	GGCTTACAGATTGGCATCA
SLCr9-64Mb	9	G	T*	AGACAACCTCGATGCTTATGTACA	GTGTACTTTTTCTTGGCTCCA
SLCr9-65Mb	9	T	C*	TGGTTTTGGCTTATTGGTTTCA	ACTGTCATAAACCAAGGCCA
SLCr9-66Mb	9	T	C*	TGTGGCATTGTTTTCTCACAGA	AACATAGGAACATAGCTGCCA
SLCr9-67Mb	9	A	G*	ATGCCCTCCATTCCGTAGAG	AGGGTCGGTTTGTCTACTCT
SLCr9-68Mb	9	G	A*	TCCAACGTTTTGCTGAAATTTGT	ACCCTAGTCTCAGCTCTTG
SLCr10-0Mb	10	C	T*	TGATTGTTGCCTACTGAAGACT	ACAAGATGCTATGTACACAGTCA
SLCr10-0.6Mb	10	T	C*	TGAAGACACACCAACCCCT	ACAAGGGGTCACGATCTGAT
SLCr10-2.6Mb	10	C	A*	TGCCAGCATTCAACCTGATA	ACTTATGTTGCTCGGATACTACA
SLCr10-5Mb	10	A	G*	CCGGAGAAAGAGGTGAATTACA	GGAAAGAACAAAAGGGTGAAGA
SLCr10-27Mb	10	A	C*	GCAAGAGACAAAATTTGGAAGGG	CCAATTTCAAGCACCTCACCC
SLCr10-59Mb	10	A	C*	ACGGTTAGACATGGTTGAGTT	AGCAAGGAGTGAAGTAACTGAA
SLCr10-60Mb	10	T	G*	TGACTCTTGATCCTGGGTGT	TGAACAGCTTCGATCCTCTCA
SLCr10-63Mb	10	G	A*	GGAACCTCCCTGCTGAAATAACA	CTTGGTAGTACAGTTGCTATCA
SLCr10-65Mb	10	C	T*	ACATTCCTCCATTTCCTATTGC	CATGTTTATCAAGTGGACCA
SLCr11-0Mb	11	C	T*	AGTGGTATAGGTGGGAGGACT	TCTGAGCCGTCTGATTTGATC
SLCr11-1Mb	11	C	T*	CTGTGTAAAGACGGTAACCACT	TGCTCAACAAGAACCTCAAGA
SLCr11-2Mb	11	C	T*	ACAATCACACTTCCCTGTCTCG	CAGAATTCGATCGACGTGAGA
SLCr11-3Mb	11	T	C*	TCACTCAAGTCAGGATAGATTGC	ACACTTCATCTACCAGCGGAT
SLCr11-4Mb	11	T	C*	TTCTCAATGAAGCTGCGAAAG	CTAGAAGTCGAGGTTTCCGG
SLCr11-5Mb	11	T	C*	ATGTTTTGAAGTGAAGTACTAGGTG	TGGGAAAGGAGTGAAGGAGTT
SLCr11-7Mb	11	A	G*	TGAGTTACCAATCTTAAAGTCC	TCTACAGTCCACGTTTCT
SLCr11-32Mb	11	A	G*	TGGTCCCCAATCTTCTGTC	AGGAAAGCATAAACTTCTGGGG
SLCr11-48Mb	11	C	T*	CAGCAGTTAAGTGGGGTCC	TTTGGGGACACACATTCAGA
SLCr11-50Mb	11	C	T*	TGCATTGTCAAGTTCAACATTCA	CTGCTTCTACATACAGGGTGG
SLCr11-51(J)Mb	11	T	C*	TCAATGAAGCAACTCACAAAA	TCCAGCCATACCTCCAAGAC
SLCr11-52Mb	11	T	G*	ACAAGAGAAGCCATTGTCTTAA	AGTACCACATGAACATTGCCA
SLCr11-54Mb	11	A	G*	AGATAGGACCTCTGTACTACTG	GGGAACCTCTCAAGAAATGGA
ChCr11_4.54.7Mb ^(UAL)	11	C	T*	ACCGTGAACCCACCAAGAC	TGTTGAGGACGACGCAATAG
T11_F5R5-56Mb ^(UAL)	11	C	T*	AGGGTGATCCTGATTGTCCA	TCAACCATGAACATTATTCCAAA
SLCr12-0Mb	12	C	T*	TGGTACGCTGAGTTAGTAGCT	TTCTTGAGAGGACAGCATTATCT
SLCr12-2.4Mb	12	C	T*	AATTTGTTTCTGTCGCAAGCCA	TCGGGAATAATTCAATTTTCAGGC
SLCr12-3Mb	12	A	G*	CCAGTGTCTTAGAGATTGTGAGT	AAAAATTTCTGCACACATCACCT
SLCr12-4Mb	12	T	C*	TGTTGTGGATTACTGCATGACT	TGGCAAGATTTTACACCCAATGA
SLCr12-29Mb	12	A	C*	GCACCTATCGATCTCTGCT	ACATCCCTCTGTTACACATC
SLCr12-48Mb	12	A	G*	TGCATAATTTACTACTGCCGCT	TTGTACAGGTCATCTCTCTCCTC
SLCr12-62Mb	12	A	G*	AGACAGGAATGAAGGGGAGC	AAAAATCTTGAGGCTTCTACCC
SLCr12-65Mb	12	G	T*	CGGTGAAATCCCGTGAAGTG	AAGCTCTCCGAACCTACCAT

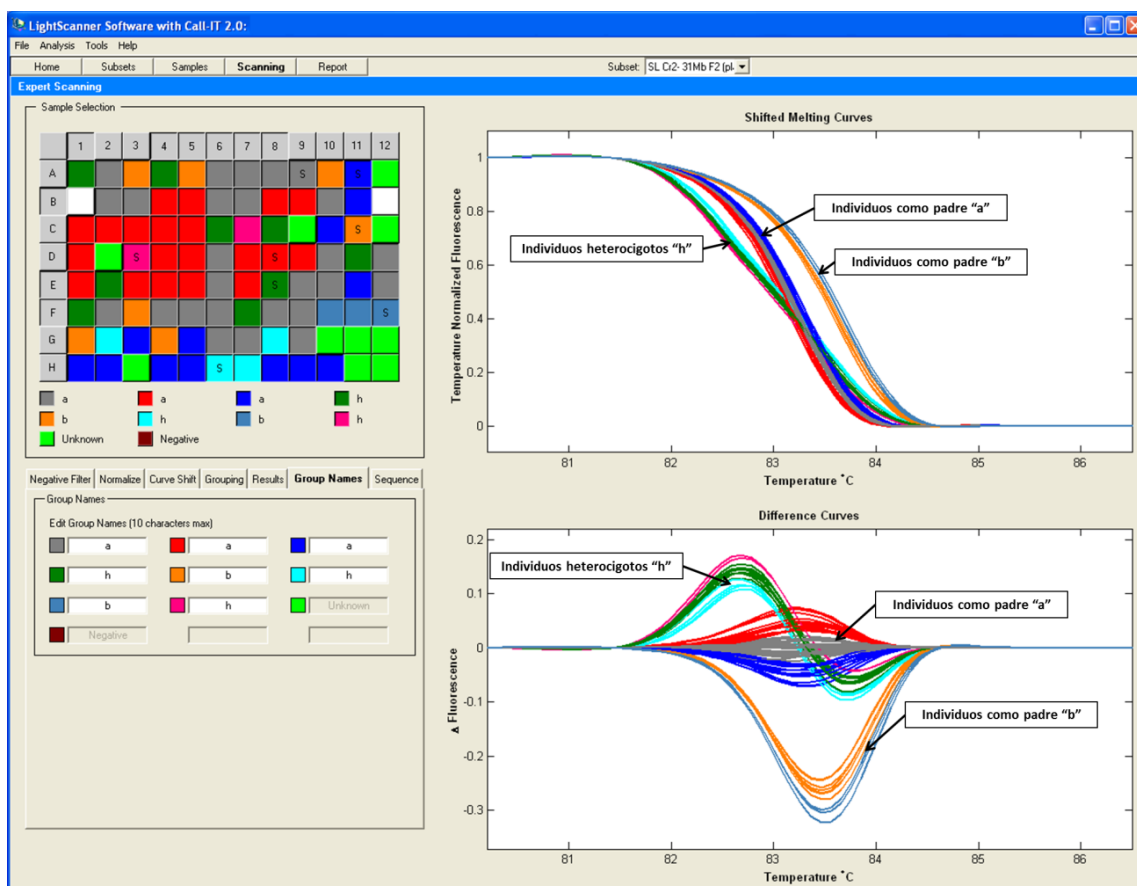
Referencias: (A,T,C,G)*: indica quien posee el polimorfismo alternativo a la referencia. Ejemplo SLCr12-65Mb: Alelo Caimanta G, Alelo LA722 T*, indica que Caimanta posee la misma base (G) que la encontrada en la referencia (Heinz1706), mientras que LA722, para esa posición posee una base alternativa (T); ^(UAL): cebadores brindados por el laboratorio de la Universidad de Almería; **A:** adenina; **T:** timina; **C:** citosina; **G:** guanina.

Tabla 2: Número de marcadores utilizados y distancia física entre marcadores por cromosoma

Cromosoma 1		Cromosoma 2		Cromosoma 3		Cromosoma 4		Cromosoma 5		Cromosoma 6	
Marcador	Distancia (*)	Marcador	Distancia (*)	Marcador	Distancia (*)	Marcador	Distancia (*)	Marcador	Distancia (*)	Marcador	Distancia (*)
SLCr1-0Mb		SLCr2- 3.7Mb		SL Cr3- 0Mb		Cr4-T2.0Mb		SLCr5-1.9Mb		SLCr6-0Mb	
SLCr1-2Mb	2,0	SLCr2- 28Mb	24,3	SL Cr3- 1Mb	1,0	SLCr4-2Mb	2,0	SLCr5-3Mb	1,1	SLCr6-3.6Mb	3,6
Cr1-3.1MbCCS	1,1	SLCr2- 31Mb	3,0	SNP3_ 11. 7Mb	6,0	U225200. 3.88Mb	1,9	SLCr5-4Mb	1,0	Cr6-10CCS. 14Mb	10,4
SLCr1-7Mb	3,9	SLCr2- 36Mb	5,0	SL Cr3- 10Mb	3,0	SLCr4-5-55. 30.3Mb	26,4	SLCr5-30Mb	26,0	Cr6-20CCS. 23.6Mb	9,6
Cr1-16MbCCS	9,0	SLCr2- 38Mb	2,0	SL Cr3- 51.9Mb	41,9	Cr4-53CCS. 54Mb	23,7	PC049. 62Mb	32,0	6_Ca_Cal(2). 35.6Mb	12,0
SLCr1-7-30.26Mb	10,0	SLCr2- 40(2)Mb	2,0	SL Cr3- 53Mb	1,1	SLCr4-60Mb	6,0	SLCr5-63Mb	1,0	SLCr6-37.8Mb	2,2
SLCr1-67Mb	41,0	SLCr2- 42Mb	2,0	SL Cr3- 55Mb	2,0	SLCr4-62Mb	2,0			SLCr6-40Mb	2,2
SLCr1-72.3Mb	5,3	SLCr2- 44(2)Mb	2,0	SL Cr3- 59Mb	4,0					SLCr6-42Mb	2,0
Cr1-70CCS.77Mb	4,7	SLCr2- 48Mb	4,0	SL Cr3- 62Mb	3,0					6_Ca_Ret(2). 42.5Mb	0,5
SLCr1-80Mb	3,0	fw2.2-52Mb	4,0	SNP3_Betain(2).63.8Mb	1,8					SLCr6-43.3Mb	0,8
SLCr1-82Mb	2,0			PC033 (70Mb)	6,2					SLCr6-44Mb	0,7
SLCr1-83.4Mb	1,4									SLCr6-45Mb	1,0
PC119-84Mb	0,6									SLCr6-50Mb	5,0
SLCr1-85.5Mb	1,5										
SLCr1-87Mb	1,5										
SLCr1-91.5Mb	4,5										
Distancia promedio: 6,1 Desvío estándar: 10,1 Total marcadores: 16		Distancia promedio:5,4 Desvío estándar: 7,2 Total marcadores: 10		Distancia promedio: 7 Desvío estándar: 12,4 Total marcadores: 11		Distancia promedio: 10,3 Desvío estándar: 11,5 Total marcadores: 7		Distancia promedio: 12,2 Desvío estándar: 15,5 Total marcadores: 6		Distancia promedio: 4,2 Desvío estándar: 4,2 Total marcadores: 13	
Cromosoma 7		Cromosoma 8		Cromosoma 9		Cromosoma 10		Cromosoma 11		Cromosoma 12	
Marcador	Distancia (*)	Marcador	Distancia (*)	Marcador	Distancia (*)	Marcador	Distancia (*)	Marcador	Distancia (*)	Marcador	Distancia (*)
SLCr7-0(2)Mb		SLCr8-1Mb		SLCr9- 0Mb		SLCr10- 0Mb		SLCr11- 0Mb		SLCr12- 0Mb	
Cr7-1.3CCS. 1.3Mb	1,3	SLCr8-2Mb	1,0	SLCr9- 2Mb	2,0	SLCr10- 0.6Mb	0,6	SLCr11- 1Mb	1	SLCr12- 2.4Mb	2,4
SLCr7-4Mb	2,7	SLCr8-4Mb	2,0	SLCr9- 3.6Mb	1,6	SLCr10- 2.6Mb	2,0	SLCr11- 2Mb	1,0	SLCr12- 3Mb	0,6
SLCr7-6Mb	2,0	SLCr8-20Mb	16,0	SLCr9- 34Mb	30,4	SLCr10- 5Mb	2,4	SLCr11- 3Mb	1,0	SLCr12- 4Mb	1,0
PC185. 7.9Mb	1,9	SLCr8-56Mb	36,0	SLCr9- 60Mb	26,0	SLCr10- 27Mb	22,0	SLCr11- 4Mb	1,0	SLCr12- 29Mb	25,0
SLCr7-24Mb	16,1	SLCr8-57Mb	1,0	SLCr9- 62Mb	2,0	SLCr10- 59Mb	32,0	SLCr11- 5Mb	1,0	SLCr12- 48Mb	19,0
U222756. 51Mb	27,0	SLCr8-58Mb	1,0	SLCr9- 64Mb	2,0	SLCr10- 60Mb	1,0	SLCr11- 7Mb	2,0	SLCr12- 62Mb	14,0
Cr7-57CCS. 59.7Mb	8,7	SLCr8-60Mb	2,0	SLCr9- 65Mb	1,0	SLCr10- 63Mb	3,0	SLCr11- 32Mb	25,0	SLCr12- 65Mb	3,0
SLCr7-64Mb	4,3	SLCr8-62Mb	2,0	SLCr9- 66Mb	1,0	SLCr10- 65Mb	2,0	SLCr11- 48Mb	16,0		
SLCr7-65Mb	1,0	SLCr8-62.1Mb	0,1	SLCr9- 67Mb	1,0			SLCr11- 50Mb	2,0		
SLCr7-66Mb	1,0	SLCr8-63Mb	0,9	SLCr9- 68Mb	1,0			SLCr11- 51(J)Mb	1,0		
		SLCr8-64Mb	1,0					SLCr11- 52Mb	1,0		
		SLCr8-64.1Mb	0,1					SLCr11- 54Mb	2,0		
								ChCr11_ 4.54.7Mb	0,7		
								T11_F5R5.56Mb	1,3		
Distancia promedio: 6,6 Desvío estándar: 8,6 Total marcadores: 11		Distancia promedio: 5,3 Desvío estándar: 10,6 Total marcadores: 13		Distancia promedio: 6,8 Desvío estándar: 11,3 Total marcadores: 11		Distancia promedio: 8,1 Desvío estándar: 12,0 Total marcadores: 9		Distancia promedio: 4,0 Desvío estándar: 7,2 Total marcadores: 15		Distancia promedio: 9,3 Desvío estándar: 10,0 Total marcadores: 8	

Referencias: (*) distancia física entre marcador superior e inferior

Figura 2: Imagen del software para el análisis de uno de los marcadores SNP (SLCr2_31Mb)



Referencias: **a:** alelo de *S. lycopersicum* cv. Caimanta; **b:** alelo de *S. pimpinellifolium* accesión LA722; **h:** alelo heterocigota

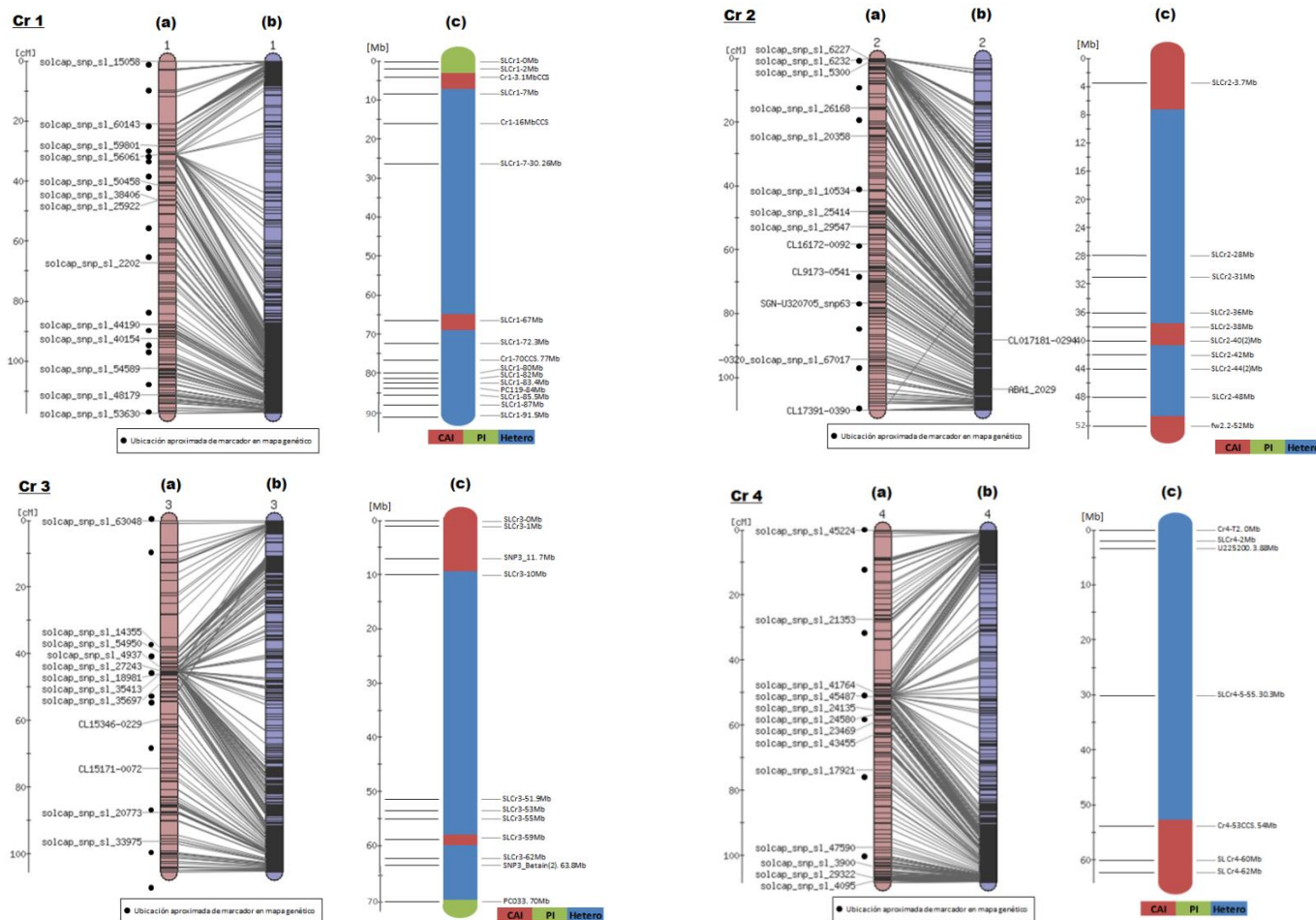
Figura 3: Captura de pantalla de las secuencias bajo estudio



Referencias: **Consensus:** secuencia consenso; **Coverage, Strands:** Cobertura, Hebras; **CaiR, PiR, ToR, MMR, 26Ra, 48Rb, 19Rh:** R significa “reverse” (cebador reverso); **Cai:** *S. lycopersicum* cv. Caimanta; **Pi:** *S. pimpinellifolium* accesión LA722; **To:** *S. pimpinellifolium* accesión To937; **MM:** *S. lycopersicum* cv. Moneymaker; **26a, 48b y 19h:** genotipos de la generación F₂; **CaiF, PiF, ToF, MMF, 26Fa, 48Fb y 19Fh:** ídem descripción anterior, solo que F significa “forward”.

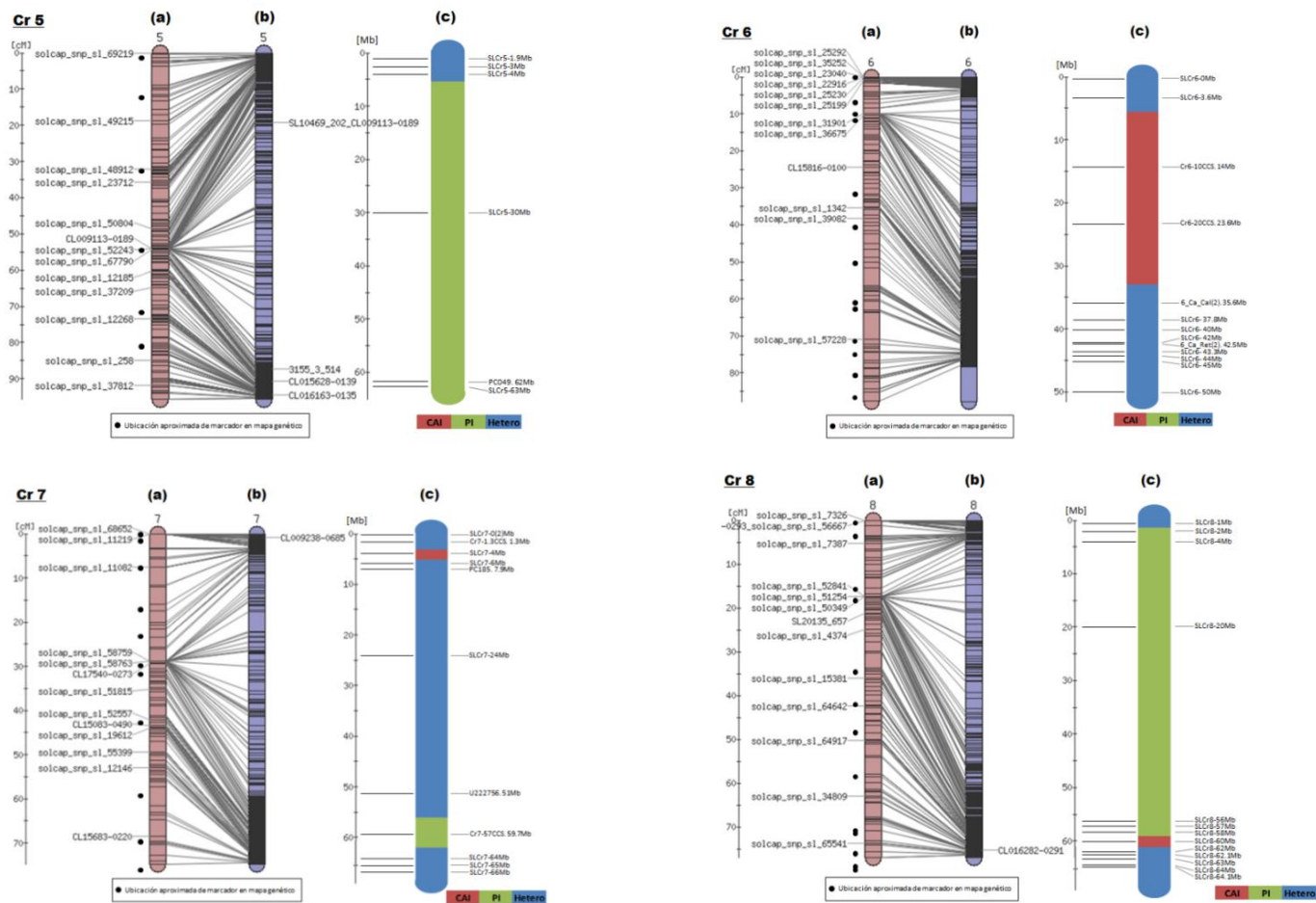
Con los datos obtenidos del genotipo de la población F₂ se pudo generar un mapa físico construido a partir de las regiones segregantes y no segregantes de dicha población (Figura 4). Cabe destacar que todos los cromosomas mostraban regiones segregantes y regiones fijadas en distinto número y origen. Así, por ejemplo, los cromosomas 2, 4, 6, 10 y 12 mostraron regiones no segregantes como el progenitor Caimanta, para los cromosomas 5, 9 y 11, las regiones no segregantes fueron solo como el parental LA722 y el resto de los cromosomas, 1, 3, 7 y 8, presentaron regiones no segregantes como ambos progenitores testigos.

Figura 4: Mapas de referencia genético (a) y físico (b) y mapa físico (c) para la población en estudio para los 12 cromosomas.



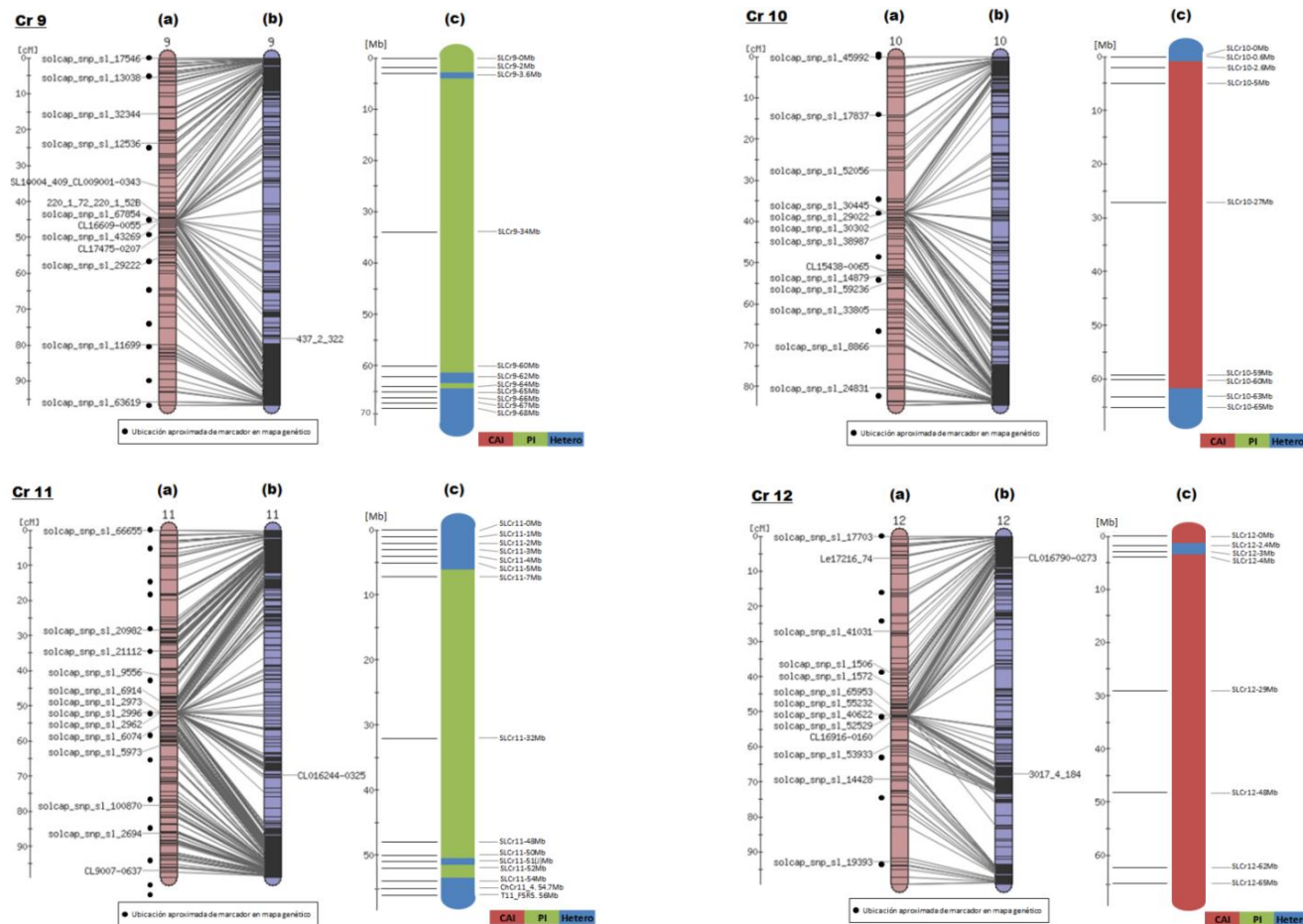
Referencias: puntos negros: ubicación aproximada del marcador en mapa genético; color rojo: región no segregante como *S. lycopersicum* cv. Caimanta; color verde: región no segregante como *S. pimpinellifolium* LA722; color celeste: región segregante.

Figura 4 (continuación): Mapas de referencia genético (a) y físico (b) y mapa físico (c) para la población en estudio para los 12 cromosomas.



Referencias: puntos negros: ubicación aproximada del marcador en mapa genético; color rojo: región no segregante como *S. lycopersicum* cv. Caimanta; color verde: región no segregante como *S. pimpinellifolium* LA722; color celeste: región segregante.

Figura 4 (continuación): Mapas de referencia genético (a) y físico (b) y mapa físico (c) para la población en estudio para los 12 cromosomas.



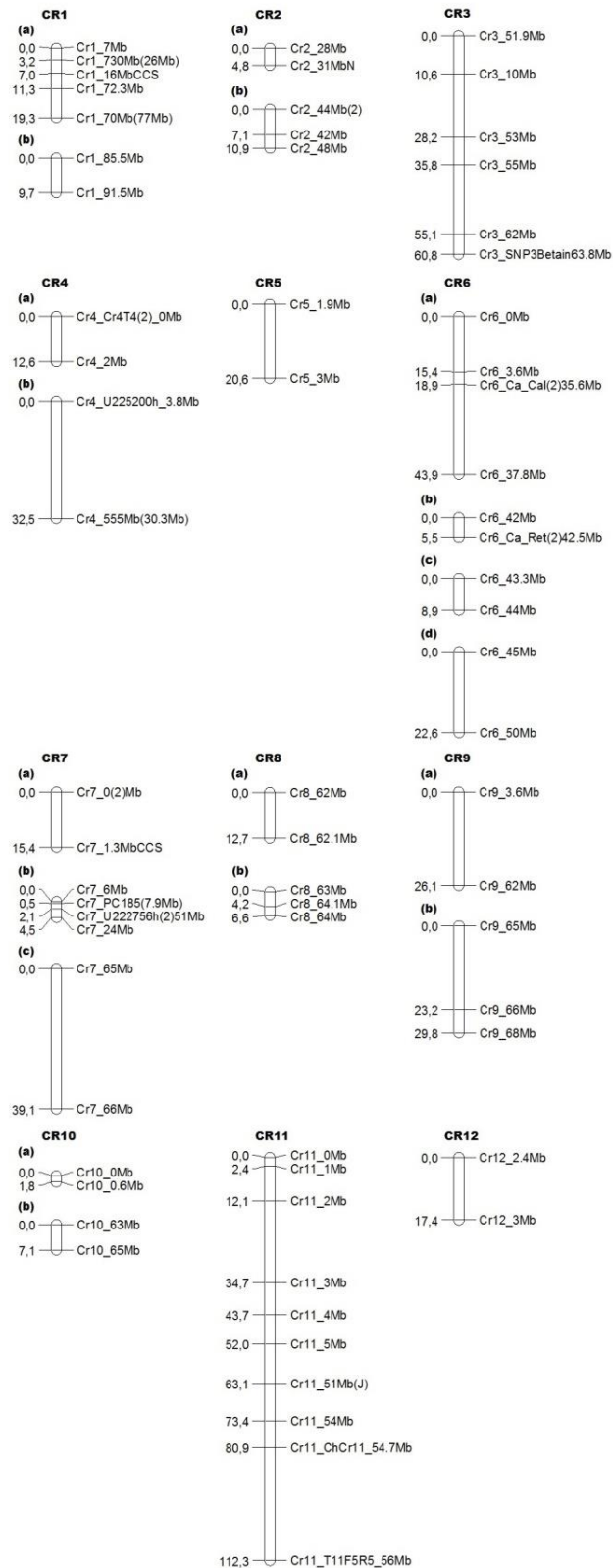
Referencias: puntos negros: ubicación aproximada del marcador en mapa genético; color rojo: región no segregante como *S. lycopersicum* cv. Caimanta; color verde: región no segregante como *S. pimpinellifolium* LA722; color celeste: región segregante.

Los marcadores que resultaron segregantes, se utilizaron para caracterizar molecularmente los individuos de la población F_2 . Los resultados obtenidos nos permitieron elaborar un mapa genético de esta población. El mapa, que se puede observar en la Figura 5, contiene 68 de los 77 marcadores utilizados en los individuos F_2 . Los marcadores no incluidos en el mapa probablemente corresponden a regiones en las que hay distorsión en la segregación o que, con los parámetros genéticos considerados, el programa utilizado no los consideraba como ligados con ninguno de los distintos grupos de ligamiento generados, que se pueden observar en la Figura 5. De los cromosomas 3, 5, 11 y 12 se generó un único grupo de ligamiento. Del resto de los cromosomas se obtuvieron dos grupos de ligamiento (cromosomas 1, 2, 4, 8, 9 y 10), tres grupos de ligamiento (cromosoma 7) o cuatro grupos de ligamiento que se obtuvieron del cromosoma 6.

Si bien se han obtenido 23 grupos de ligamiento de los 12 cromosomas de tomate, este resultado era esperable porque hay cromosomas, tal como el 10, de los que, por el mapa físico, conocemos que únicamente segrega en la población los telómeros. Generar un único grupo de estos cromosomas resultará imposible aun cuando se incremente el número de marcadores polimórficos de esos cromosomas.

Por el contrario, hay cromosomas como el 4 y el 6 cuyos mapas físicos muestra una y dos regiones segregantes, respectivamente, y se han obtenido dos y cuatro grupos de ligamiento respectivamente. En estos dos casos cabe esperar que la identificación de nuevos marcadores polimórficos de esos cromosomas permita generar nuevos grupos de ligamiento más saturados y cuyo número se corresponda con el número de porciones del cromosoma que segrega en el mapa físico.

Figura 5: Mapa genético obtenido para la población F₂ utilizando los marcadores polimórficos



El mapa genético obtenido fue utilizado para la identificación de QTLs que controlen la herencia de caracteres de interés agronómico caracterizados en la población. En primer lugar, se evaluó la normalidad de datos de los caracteres y todos resultaron ser normales, con excepción de acidez titulable y pH, los cuales fueron transformados mediante funciones conocidas. A continuación, mediante el programa QGene, se obtuvieron los valores de LOD umbral utilizando el test de permutación correspondiente a cada carácter con una significancia 0,05. Los valores de LOD correspondientes a cada carácter se presentan en la Tabla 3.

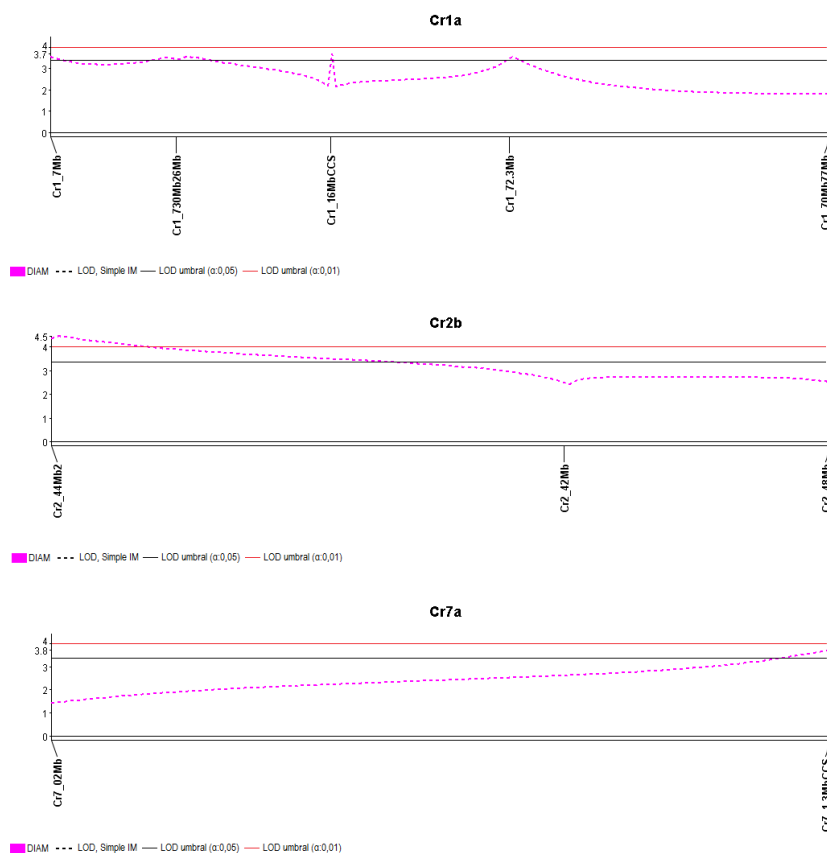
Tabla 3: Valores de LOD por carácter obtenidos por el test de permutación con una significancia de 0,05

Carácter	LOD (α: 0,05)
D	3,4
A	3,4
Fo	3,4
P	3,4
VP	3,4
AT	3,5
SS	3,5
L	3,4
a/b	3,4
F	3,3
pH	3,4

Referencias: **D:** diámetro; **A:** altura; **Fo:** índice de forma; **P:** peso; **VP:** vida poscosecha; **AT:** acidez titulable; **SS:** sólidos solubles; **L:** porcentaje de reflectancia; **a/b:** cociente de absorbancias; **F:** firmeza

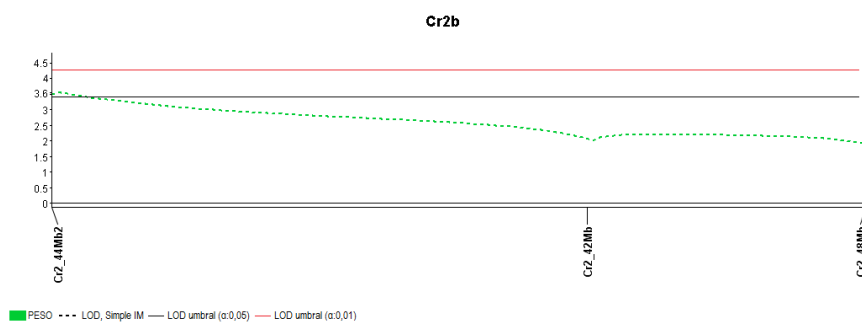
Se detectaron QTLs para tres de los 11 caracteres analizados. Así, para diámetro (Figura 6) se detecta un QTL, en el cromosoma 1a, entre los marcadores SLCr1_7Mb ubicado a 0cM y SLCr1_72.3Mb ubicado a 11,3cM, observándose el pico máximo de LOD en el marcador SLCr1_16MbCCS, cuyo R^2 o porcentaje de la varianza explicado, es de 17,9%. Otro QTL para el mismo carácter se encontró en el cromosoma 2b, en el intervalo comprendido entre los marcadores SLCr2_44Mb(2) ubicado a 0cM y el marcador SLCr2_42Mb ubicado a 7,1cM, teniendo el pico máximo sobre el primer marcador, cuyo valor de R^2 fue de 20,7%. Un último QTL para este carácter se detectó en el cromosoma 7a, entre los marcadores SLCr7_0(2)Mb y el marcador SLCr7_1.3Mb ubicado a 15,4cM, presentando el pico máximo en este último marcador, con un valor de R^2 de 18,1%.

Figura 6: Gráficos de los QTLs identificados para diámetro



Para el carácter peso (Figura 7), se detectó un QTL en el cromosoma 2b, entre los marcadores SLCr2_44(2)Mb ubicado a 0cM y el marcador SLCr2_42Mb ubicado a 7,1cM. El pico máximo de LOD se ubica sobre el primer marcador, cuyo R^2 es de 17,1%.

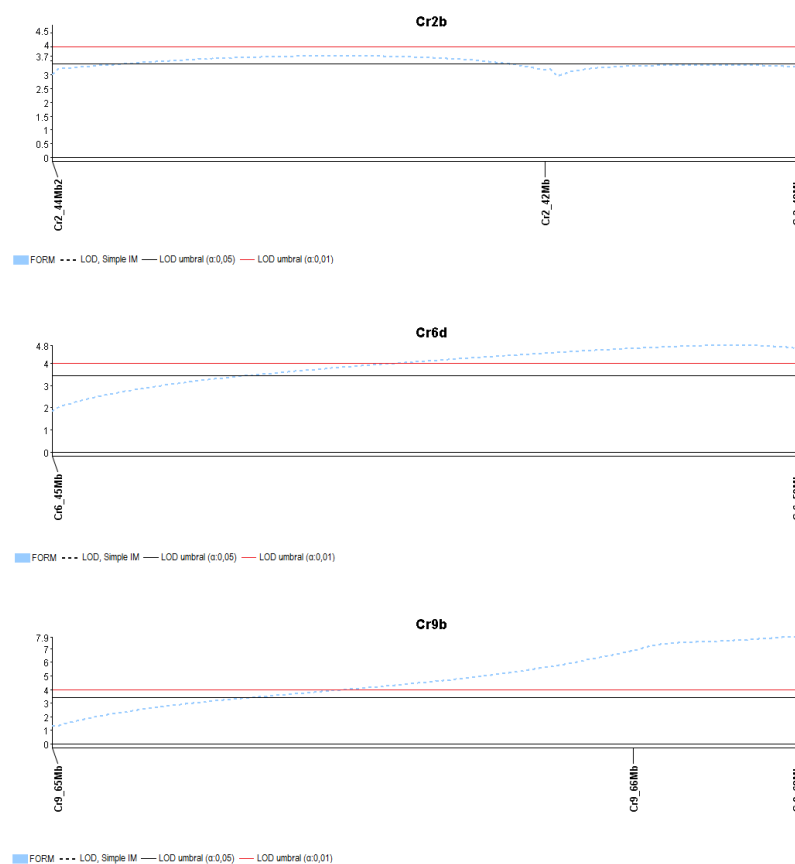
Figura 7: Gráfico del QTL identificado para peso



Por último, para el carácter índice de forma de los frutos (Figura 8), se detectaron tres QTLs, los cuales se detallan a continuación. Uno en el cromosoma 2b, entre los marcadores SLCr2_44(2)Mb ubicado a 0cM y el marcador SLCr2_42Mb ubicado a 7,1cM. El pico máximo se encuentra entre los dos marcadores, aproximadamente a una distancia de 4cM. El R^2 de los marcadores más cercanos fueron 14,9% (SLCr2_44(2)Mb) y de 15,8% (SLCr2_42Mb). Otro QTL, se detecta en el cromosoma 6d, entre los marcadores SLCr6_45Mb ubicado a 0cM y el marcador SLCr6_50Mb ubicado a 22.5cM. El pico máximo de LOD se ubicó aproximadamente a los 20,3cM, estando muy próximo al marcador SLCr6_50Mb, cuyo R^2 fue de 21,9%. El QTL de mayor peso, para este carácter se presentó en el cromosoma 9b. El mismo está comprendido entre los marcadores SLCr9_65Mb ubicado a 0cM y el marcador SLCr9_68Mb ubicado a 29,8cM. El pico máximo de LOD se presenta sobre el marcador SLCr9_68Mb, cuyo R^2 es de 34,1%.

Resultados muy similares a los descritos fueron obtenidos utilizando otro programa de mapeo de QTLs.

Figura 8: Gráficos de los QTLs para índice de forma



En cuanto al grado de dominancia de los QTLs detectados, se pueden observar en la Tabla 4.

Tabla 4: Efecto aditivo y dominante para cada QTL detectado

Carácter	Marcador	Efecto aditivo	Efecto dominancia
D	SLCr1_16MbCCS	0,098	-0,032
	SLCr2_44(2)Mb	0,225	ns
	SLCr7_1.3Mb	0,187	-0,180
P	SLCr2_44(2)Mb	2,428	ns
Fo	SLCr2_42Mb*	-0,045	ns
	SLCr2_44(2)Mb*	-0,031	0,037
	SLCr6_50Mb	-0,053	ns
	SLCr9_68Mb	0,047	-0,054

Referencias: **D:** diámetro; **P:** peso; **Fo:** índice de forma; * marcadores más cercanos al QTL detectado.

Diámetro y peso presentaron efecto aditivo, donde Caimanta aportó los alelos que suman (ambos con el marcador SLCr2_44(2)Mb). Por otro lado, dos QTLs para índice de forma, presentaron solo efecto aditivo, pero donde la accesión de LA722 aportó los alelos que suman (SLCr2_42Mb y SLCr6_50Mb). Presentó sobredominancia de los menores valores el QTL de diámetro marcado por el SNP SLCr1_16MbCCS. Por último, el resto de los QTLs presentaron dominancia de la accesión LA722.

DISCUSIÓN

Las técnicas de secuenciación permiten en la actualidad conocer los genomas a un costo relativamente bajo y con gran rapidez. En un programa de mejoramiento vegetal, este avance permite que, comparando las secuencias de dos o más progenitores, se puedan desarrollar marcadores altamente informativos para determinar el genotipo de las poblaciones segregantes derivadas de su cruzamiento.

La cátedra de Genética ha obtenido la secuenciación de los genotipos parentales de las RIL: el cultivar argentino *S. lycopersicum* cv. Caimanta y la especie silvestre *S. pimpinellifolium* accesión LA722.

A partir de la secuencia de los genomas de *S. lycopersicum* cv. Caimanta y *S. pimpinellifolium* accesión LA722 fue posible identificar 130 SNP dispersos por los 12 cromosomas de la especie cultivada. Esos SNP pudieron ser utilizados mediante HRM, una técnica muy rápida y eficiente, en el ADN de esos genotipos para confirmar su presencia. De los citados 130 marcadores, 79 (61%) segregaron en los individuos de la población segregante F_2 RIL18xRIL1. Cabe destacar que este porcentaje es esperable, ya que la citada población F_2 no es descendiente del cruzamiento original entre *S. lycopersicum* cv. Caimanta y *S. pimpinellifolium* accesión LA722, genotipos en los que identificaron los SNP, sino del cruce de dos plantas de una población de RIL generada de dicho cruce. Además, hay que considerar el hecho de que ambas RIL fueron seleccionadas bajo los mismos criterios de frutos de alto peso (comparado a la media de las RIL) y larga vida poscosecha. Por ello era esperable encontrar regiones que se mantuvieran igual a alguno de los progenitores. Si bien esta población (F_2 de RIL selectas) no es la población ideal para mapeo, habida cuenta que la misma está segregando para distintos caracteres de interés agronómico (Capítulos I, II y III), en dicha población se podrían identificar nuevos determinantes genéticos responsables de los caracteres que muestran segregación en dicha población. La caracterización mediante marcadores HRM evidenció gran cantidad de regiones segregantes. Mediante un recuento utilizando el mapa físico de esta F_2 se estimó que las regiones no segregantes fueron levemente superior al 50% (24% correspondientes al parental Caimanta y un 30% se correspondió al parental LA722), mientras que el porcentaje de regiones segregantes fue de unos puntos por debajo del 50% (46% de regiones segregantes). Esto indica que las líneas progenitoras (RIL18 y RIL1) comparten un 54% de su genoma difiriendo en el 46% restante.

Además, se pudo establecer dentro del mapa, las regiones no segregantes y cuyos alelos fueron fijados de cada uno de los parentales. Esta información es inédita y de gran

importancia para este grupo de trabajo, ya que no se disponía de un mapa genético para alguna de las generaciones segregantes de los HSC.

Cabe destacar que, si bien, se obtuvieron 23 grupos de ligamiento, siendo 12 el número de cromosoma de tomate, en algunos cromosomas con más saturación de marcadores, se podrían llegar a unir los diferentes fragmentos de los cromosomas. En este punto, habría que destacar dos cuestiones, las cuales se desarrollaran a continuación.

Por un lado, la selección de la ubicación física de los marcadores SNP, como se explicó anteriormente, fue basada en un mapa en el cual el genotipo cultivado, si bien no era *S. lycopersicum* cv. Caimanta, era otro cultivar de *S. lycopersicum* (Heinz 1706), pero en el caso de la especie silvestre, no fue *S. pimpinellifolium*, sino una accesión de *S. pennellii*. Si bien la mayor parte de los marcadores diseñados han podido ser localizados en el mapa genético, cabe la posibilidad de que alguno de los marcadores no mapeados sea debido al distinto origen de las poblaciones de mapeo utilizadas en cada caso. La posibilidad de incorporar a futuro los marcadores SSR o AFLP o diseñar algunos en regiones específicas, serían una estrategia válida para poder unir grupos de ligamiento. Por otro lado, en algunas regiones, tal vez esta unión no sea posible, ya que la existencia de grandes regiones no segregantes no lo permitan.

De cualquier modo, el mapa genético generado ha permitido mapear algunos de los caracteres de interés agronómico caracterizados en la población segregante F_2 . Teniendo en cuenta el modo de herencia descrito para estos caracteres, se utilizó una aproximación de mapeo de QTL. Para ello, el primer lugar hay que calcular el valor LOD umbral, que en la mayoría de los trabajos, se decide utilizar un LOD umbral definido por el investigador basándose en la bibliografía existente o en un valor común para todos los caracteres. En este trabajo se decidió trabajar con el LOD umbral calculado de forma individual para cada carácter, que se obtuvo mediante el test de permutaciones, como ya se explicó en la sección materiales y métodos.

En el presente trabajo, se detectaron mediante SIM, QTLs para tres de los 11 caracteres analizados: diámetro, peso e índice de forma del fruto. El tamaño y la forma del fruto son los dos factores principales que determinan el rendimiento, calidad y aceptabilidad por parte del consumidor en la mayoría de los cultivos (Grandillo *et al.*, 1999).

La elaboración de este mapa de la generación F_2 del HSC, permitió la detección de QTLs por medio del SIM, una manera más precisa, comparando con el método de único punto utilizado con los marcadores AFLP y SSR en los Capítulos anteriores.

Como planteo a futuro, se piensa en la elaboración de un mapa donde se integre toda la información de los marcadores AFLP presentados en los Capítulos I y II, y también,

marcadores SRAP (polimorfismos de amplificación de secuencias relacionadas), obtenidos en esta misma población F_2 por Mahuad (2013), utilizando como referencia los marcadores SNP y SSR utilizados en este trabajo y de los cuales se conoce su ubicación.

En relación a los QTLs detectados, cabe destacar que para el carácter diámetro, Masso (2012) utilizando el mismo material y mediante SSR, detectó en la generación F_2 , dos QTLs para diámetro, uno de ellos ubicado en el cromosoma 3 y otro en el cromosoma 2 (SSR032). La ubicación física de este último fue cercana a los 45,8 Mb. Teniendo en cuenta, que el pico máximo se evidenció en el marcador cercano en 44Mb, saturando o incorporando nuevos marcadores a la región, se podría establecer con mayor precisión la vinculación de las dos zonas y marcadores. También, en un trabajo futuro se podrían incorporar ambos marcadores en un mismo análisis. Pereira da Costa *et al.* (2013) utilizando generaciones de retrocruzas (BC1, BC1S1 y BC2) con los cultivares *S. lycopersicum* cv. Caimanta y *S. pimpinellifolium* accesión LA722, detectaron marcadores SSR asociados a diámetro en los cromosomas 1 (SSR220060, SSR095), 3 (SSR320), 7 (SSR045), 8 (SSR063, SSR038), 9 (SSR110 (presentado como 034), SSR070), 10 (SSR318, SSR596), 11 (SSRG036) y 12 (SSRH301). Ninguno de dichos está ubicado cercano a las ubicaciones de los QTLs encontrados en este trabajo mediante SNP.

Para el carácter peso, en este trabajo se detectó un SSR asociado a peso, pero el mismo estuvo ubicado en el cromosoma 4. Masso (2012) detectó un QTL para este carácter cuantitativo, pero en el cromosoma 3. Pereira da Costa *et al.* (2013), en el trabajo mencionado en el párrafo anterior, detectaron para peso SSR ubicados en los cromosomas 1 (SSR220060, SSR095), 2 (SSR295), 3 (SSR320), 7 (SSR045), 8 (SSR038), 9 (SSR110 (presentado como 034), SSR070), 10 (SSR318, SSR596), 11 (SSRG036) y 12 (SSRH301). El SSR ubicado en cromosoma 2, no compartió ubicación con el SNP asociado a peso.

Para el carácter índice de forma, en la presente Tesis, con los SSR utilizados (Capítulo III), no se detectaron QTLs asociados a este atributo. Para este carácter, Masso (2012) no detectó QTLs para la generación F_2 , aunque si se detectó dos QTLs, en los cromosomas 5 y 11, para una retrocruza obtenida utilizando las mismas RIL. Pereira da Costa *et al.* (2013), encontraron siete SSR asociados a índice de forma. Los mismos se encontraron en los cromosomas 6 (SSR128), 7 (SSR286, SSR045), 8 (SSR038), 9 (SSR110 (presentado como 034), SSR070) y 11 (SSR1061). El SSR128 correspondiente al cromosoma 6, se ubicó a los 37,6Mb aproximadamente, no correspondiéndose con la ubicación del QTL encontrado en este trabajo mediante mapeo de SNP. En el caso del cromosoma 9, el SSR070, se encuentra ubicado en la parte superior del cromosoma (3,6Mb aproximadamente), no coincidiendo con la ubicación encontrada mediante SNP en este trabajo. Mientras que el

SSR110 (presentado como 034), se ubica en la parte final del cromosoma, pero a los 64,2Mb.

La comparación con otros trabajos publicados y basados en otras poblaciones producto de otros cruzamientos biparentales, no serían tan precisas, como lo es, al comparar con generaciones segregantes de este HSC o poblaciones derivadas de los parentales que le dieron origen a las RIL, pero es una manera de verificar los QTLs detectados.

Para el carácter diámetro, Lippman y Tanksley (2001), utilizando una población F_2 , obtenida mediante el cruzamiento de *Lycopersicon esculentum* variedad Giant Heirloom (actualmente *S. lycopersicum*) y *L. pimpinellifolium* accesión LA1589 (actualmente *S. pimpinellifolium*), usando marcadores del tipo RFLP (polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción) y CAPS (secuencia polimórfica amplificada y cortada), detectan QTLs en los cromosomas 1, 2, 3, 4, 7 y 11. Tanto en el cromosoma 1, 2 y 7, la ubicación física de los mismos no coincidió con la encontrada en la presente Tesis.

En cuanto al carácter peso, Capel *et al.* (2015), utilizando una población de RIL derivadas de un cruzamiento entre *S. lycopersicum* cv. MoneyMaker y la accesión To937 de *S. pimpinellifolium*, encontraron siete QTLs asociados a peso. Uno de ellos se localizó en el cromosoma 2, y fue el correspondiente al gen *fw2.2*, con el mayor efecto (14,2%). En el presente trabajo, se diseñaron dos pares de cebadores para poder amplificar un polimorfismo entre Caimanta y la accesión LA722, ubicada sobre el gen *fw2.2*. Sin embargo, la generación segregante F_2 resultó ser monomórfica para el gen *fw2.2* puesto que los parentales RIL estaban ambos fijados para los alelos de Caimanta. Como ya se mencionó, teniendo en cuenta el promedio de peso de todas las RIL, tanto la RIL1, como la RIL18, ambas habían resultado ser de alto peso. Otros trabajos también encuentran QTLs asociados a peso, aunque en ninguno de ellos, los que se ubican en el cromosoma 2, corresponden a la ubicación física del presente trabajo (Fulton *et al.*, 1997; Bernacchi *et al.*, 1998; Lippman y Tanksley, 2001; van der Knaap y Tanksley, 2003).

Cabe destacar que, para el carácter índice de forma, dos *loci* mayores “*SUN*” y “*OVATE*” controlan el índice de forma de fruto (Gonzalo y van der Knaap, 2008). Del mismo modo Brewer *et al.* (2007) proponen que los *loci* mayores que han sido identificados por contribuir a la elongación de la forma del fruto son “*SUN*”, “*OVATE*” y *fs 8.1*. El *locus* “*SUN*” se encuentra en el cromosoma 7, mientras que el gen “*OVATE*” se posiciona en el cromosoma 2 y el QTL *fs8.1* fue identificado en el cromosoma 8.

En el caso de los QTLs detectados para índice de forma en este trabajo, los mismos se encontraron en el cromosoma 2, 6 y 9. Pero si se aumenta el nivel de significancia (α =

0,01) del análisis, solo los QTLs de cromosoma 6 y 9 son los detectados. Aún más, el QTL del cromosoma 9 posee un R^2 más elevado que el resto de los QTLs (cerca al 15% (Cr2) y al 22% (Cr6)), llegando a un porcentaje de 34,1%. Fulton *et al.* (1997) utilizando marcadores moleculares en una población BC obtenida mediante el cruzamiento de *L. esculentum* E6203 (actualmente *S. lycopersicum*) y la variedad silvestre *L. peruvianum* accesión LA1706 (actualmente *S. peruvianum*), utilizando E6203 como recurrente, detectan para forma QTLs en los cromosomas 1, 2, 6, 7, 8, 9, 10 y 12. En el cromosoma 2, la ubicación (cerca a 54,6Mb) no coincide con la encontrada en este trabajo. En lo referido al cromosoma 6, el QTL *fs6.1* se detectó en una ubicación cercana a 49,2 Mb y le otorgan la obtención del fruto alargado. Este QTL *fs6.1* se encuentra en una posición física cercana al QTL del cromosoma 6 identificado en este trabajo. En lo referido al cromosoma 9, el QTL *fs9.1*, se detectó en la ubicación cercana a 33Mb. Bernacchi *et al.* (1998), mediante RFLP y una población BC producto del cruzamiento entre el cultivar (y utilizado como padre recurrente) *L. esculentum* cv. E6203 (actualmente *S. lycopersicum*) y la variedad silvestre *L. hirsutum* E6203 (actualmente *S. habrochaites*) accesión LA1777, detectan QTLs en los cromosomas 2, 3, 7, 8, 9, 10, 11 y 12. En el cromosoma 2 no se encontró en la ubicación coincidente a este trabajo. En el caso del cromosoma 9, el QTL *fs9.1* fue detectado en una ubicación cercana a 71Mb. Del mismo modo, van der Knaap y Tanksley (2003), utilizando una población F_2 proveniente del cruzamiento entre *L. esculentum* cv. Yellow Stuffer E6203 (actualmente *S. lycopersicum*) y la accesión LA1589 de *L. pimpinellifolium* E6203 (actualmente *S. pimpinellifolium*), detectan QTLs para forma en el cromosoma 6 y 9. En relación al cromosoma 6, el máximo LOD se presenta en la ubicación aproximada de 40,4Mb. En el caso del cromosoma 9, el QTL obtenido *fs9.2*, presentó su mayor LOD en una ubicación aproximada a 66,1 Mb. Por otro lado, Brewer *et al.* (2007) en una población F_2 obtenida del cruzamiento entre *S. lycopersicum* cv. Banana Leg y *S. pimpinellifolium* accesión LA 1589, encuentran QTLs asociados a índice de forma en los cromosomas 2, 6, 7 y 8, pero ni en el cromosoma 2 (*fs2.b*) ni en el cromosoma 6 (*fs6.2*), se ubicaron en ubicaciones físicas cercanas a las de los QTLs detectados en este trabajo.

Puede concluirse por tanto que la caracterización realizada con SNP diseñados a partir de las secuencias de los genotipos parentales, ha permitido elaborar un mapa físico y un mapa genético de la población segregante F_2 descendientes del cruzamiento de dos líneas RIL procedentes del cruce *S. lycopersicum* cv. Caimanta y *S. pimpinellifolium* accesión LA722. El mapa genético generado ha permitido identificar QTLs para los caracteres diámetro, peso e índice de forma de los frutos. Si bien alguno de los QTLs identificados están en posiciones similares a las de QTLs previamente descritos para esos

mismos caracteres, la mayoría de QTL son nuevos y no habían podido ser identificados en otros trabajos. Este resultado indica que la población F₂ RIL18xRIL1 no es la ideal para la generación de un mapa genético de tomate, pero si para identificar nuevos QTLs que controlen la herencia de caracteres de interés agronómico en tomate.

CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES FINALES

El modelo utilizado de los híbridos de segundo ciclo (HSC) en este trabajo ha posibilitado observar las segregaciones en tres generaciones donde la variabilidad pudo ser evaluada en nivel molecular y fenotípico.

La utilización de marcadores AFLP (polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados), permitió determinar la presencia de una alta variabilidad molecular en las poblaciones ya que, el porcentaje de polimorfismo fue superior al 54% en todas las poblaciones siendo también verificada a nivel fenotípico pues, en todas las poblaciones se encontraron individuos que superaron a las RIL (líneas endocriadas recombinantes) parentales para la mayoría de los caracteres. Por otro lado, la utilización de marcadores AFLP, permitió obtener un amplio número de bandas, que superó a las 100 en todos los casos.

Al comparar la información fenotípica y molecular, se obtuvo en todas las poblaciones derivadas de los tres HSC, que el consenso obtenido entre ambas fue alto (en todos los casos se superó al 64%). Este elevado consenso justificaría la detección de QTLs (*loci* de caracteres cuantitativos), en todas las poblaciones. Mahuad *et al.* (2013) encontraron un 75% de consenso entre 11 caracteres cuantitativos relacionados a calidad de fruto en tomate e información molecular usando marcadores de tipo SRAP (polimorfismos de amplificación de secuencias relacionadas) para 18 genotipos uniformes (entre ellos diez híbridos de segundo ciclo, cinco RIL y los parentales de esas RIL) sugiriendo que el Análisis de Procrustes Generalizado permite verificar el consenso entre la variabilidad de caracteres fenotípicos y marcadores moleculares. Esta diferencia en los porcentajes obtenidos, se puede deber al diferente tipo de material utilizado.

Esto se pudo corroborar ya que, se pudieron detectar un total 83 QTLs, teniendo en cuenta las tres generaciones F₂ (filial 2) de los tres HSC y teniendo en cuenta todos los marcadores. Estos QTLs se encontraron asociados a la mayoría de los caracteres relacionados a la calidad del fruto. Sólo dos de ellos, pudieron ser validados (SSR288 asociado a vida poscosecha y cociente de absorbancias a/b), ya que además de detectarse en una de las poblaciones F₂ de esta Tesis, fueron encontrados por Pereira da Costa *et al.* (2013) asociado a los mismos caracteres en una BC1S1 (autofecundación de la retrocruza 1). Los dos QTLs validados tienen un R² (proporción de varianza fenotípica para cada carácter explicada por el efecto del fragmento) de 0,13 (vida poscosecha) y de 0,19 (para cociente de absorbancias a/b), valores levemente por debajo de los encontrados por Pereira da Costa *et al.* (2013).

El grado de dominancia (d/a) fue variable entre generaciones y entre caracteres evaluados. Esto podría indicar que los genes originales presentes en los parentales de las RIL (*Solanum lycopersicum* cultivar Caimanta y *S. pimpinellifolium* accesión LA722), se dispersaron entre ellas en forma diferenciada durante el proceso de selección agonística-divergente mediante el cual se obtuvieron, haciendo que cada cruzamiento analizado en esta Tesis presente sus propias acciones génicas, aun cuando comparten la RIL1 como progenitor común. Esto se verificó con los diferentes d/a encontrados entre los distintos HSC evaluados en esta Tesis para un mismo carácter.

Los resultados obtenidos en las estimaciones de la heredabilidad en sentido amplio (H^2) indicaron de manera general, que, en las tres generaciones segregantes, los valores más altos los tuvieron los caracteres bioquímicos de calidad (pH, sólidos solubles y acidez titulable en distinto orden de acuerdo al HSC evaluado), mientras que el menor valor lo presentó en los tres casos el carácter peso.

Al analizar los efectos pleiotrópicos, se observó que todos los HSC tuvieron fragmentos o bandas que asociaron a más de un carácter. Parte de estas asociaciones podrían explicar las correlaciones fenotípicas que fueron observadas en los diferentes HSC.

A su vez, la ausencia de efectos epistáticos en todas las generaciones segregantes F_2 de todos los HSC, permite la selección de QTLs de manera individual (debido a que uno no afecta la acción del otro). Esto es posible de aplicar a los QTLs validados, mientras que, para los otros, esta utilidad queda limitada a la generación para la cual fueron detectados.

Debido a los datos moleculares obtenidos en la generación segregante F_2 del HSC RIL18xRIL1 (mayor número de QTLs detectados por AFLP y única generación F_2 que presentó marcadores AFLP asociados a todos los caracteres, además que sus R^2 fueron relativamente altos y similares en todas las generaciones), sumado las características fenotípicas de la generación F_2 (mayores valores medios para peso y vida poscosecha de las tres generaciones de los tres HSC y único HSC en el cual uno de sus progenitores es de forma piriforme) y que, como ya se mencionó, ambas líneas se encuentran inscritas en el Instituto Nacional de la Semilla (INASE), ésta generación F_2 fue seleccionada para realizar una caracterización molecular más exhaustiva y derivación de familias F_3 (filial 3).

Así es como se evidencia, que los diferentes marcadores de ADN utilizados brindan diferentes tipos de información y utilidades. Como se expuso, los marcadores AFLP permiten evaluar el genoma entero y no se necesita conocer la secuencia *a priori* (Bleas *et al.*, 1998). Además, proveen un elevado número de bandas, con solo pocas combinaciones de cebadores. En este trabajo, las seis combinaciones de cebadores utilizadas, permitieron detectar un mayor número de QTLs (28, 15 o 26 de acuerdo a la F_2 del HSC), aunque

ninguno de ellos pudo ser validado. El análisis de único punto no requiere disponer de un mapa de ligamiento completo (Collard *et al.*, 2005), mientras que, para los microsatélites (SSR), es necesario conocer la región flanqueante al mismo, conociendo así ubicación y cromosoma en el cual se encuentran. En este caso con 12 combinaciones de cebadores, se pudieron detectar un total de siete QTLs. En relación a los AFLP, el número de QTLs detectado en relación al número de combinaciones utilizadas fue mayor que en el caso de los SSR. Pero en estos últimos, dado el conocimiento de su ubicación en el genoma, se pudieron validar dos de ellos.

En relación a los marcadores SNP (polimorfismo de nucleótido simple), los mismos fueron diseñados basados en las secuencias de los parentales de las RIL. Utilizando 130 combinaciones de cebadores, se pudieron detectar un total de siete QTLs. La técnica de SNP es de alta precisión, y es posible que el bajo número de QTLs detectados se deba al LOD (logaritmo de las probabilidades) más restrictivo que se usó. Si bien, la bibliografía propone un LOD de 2,4 que representaría un valor de $p < 0,001$ (Grandillo y Tanksley, 1996), en la presente Tesis se decidió calcular el valor de LOD basándose en el test de permutaciones (metodología aplicada en Salinas *et al.*, 2013; Capel *et al.*, 2015), en la cual, a través de las iteraciones se reasigna cada valor fenotípico a un nuevo individuo, mientras que se mantiene el mapa genético del individuo. Esta metodología es sugerida, ya que, hay muchos factores que varían entre experimentos (tales como tamaño de la muestra, tamaño del genoma, densidad del mapa genético, datos faltantes, entre otros) y que pueden afectar en la determinación del valor umbral apropiado (Churchill y Doerge, 1994).

Por otro lado, en relación al número de QTLs detectados las técnicas utilizadas para la detección de QTLs, como ya se mencionó, fueron el método de único punto (AFLP y SSR) e intervalo simple (SNP). Cabe destacar que, a través del método de único punto, de acuerdo a Collard *et al.* (2005), se detectan QTLs en forma eficiente cuando la distancia al marcador es menor a 15 centimorgans (cM). Por lo tanto, la aplicación de una técnica molecular como el AFLP, que permite relevar una gran proporción del genoma, maximizaría la posibilidad de detectar QTLs por el método de único punto.

En esta Tesis se usaron distintos tipos de marcadores, cada uno con sus características, ventajas y desventajas. Como ya se mencionó, los AFLP son multi-*loci*, permiten obtener un alto perfil de polimorfismo, son dominantes y no específicos de la secuencia. A su vez, tanto los SSR como los SNP, son uni-*locus*, codominantes y se requiere conocer la secuencia. En el caso de los SNP, constituyen aproximadamente el 90% de la variación genética en un organismo. Los marcadores SSR y SNP, además de ser más

precisos y conocer su ubicación en el genoma, permitieron, dada su naturaleza codominante, el cálculo de la acción génica del QTL.

Además de la detección de QTLs, la caracterización realizada con SNP, permitió elaborar un mapa físico y un mapa genético de la población segregante F_2 . Se pudo obtener un mapa genético con 23 grupos de ligamiento. Dado que el número de cromosomas del tomate es de 12, con una mayor saturación de marcadores tal vez se podrían llegar a unir los diferentes fragmentos de los cromosomas, aunque sólo en algunas regiones.

De cualquier modo, la elaboración de este mapa, permitió establecer las regiones no segregantes cuyos alelos pertenecientes a cada uno de los parentales fueron fijados. Esta información es inédita y de gran importancia para este grupo de trabajo, ya que no se disponía de un mapa genético de ninguna de las generaciones segregantes de los HSC.

El avance en generaciones sobre la F_2 del HSC RIL18xRIL1, permitió conocer fenotípicamente la estructura de la población. En general, los valores promedios en los individuos F_2 fueron superiores a los de las familias F_3 . Los caracteres bioquímicos (pH, sólidos solubles y acidez titulable) y los de morfología externa (diámetro y peso) presentaron menos diferencias significativas entre los valores promedios de los individuos F_2 y las familias F_3 , es decir, fueron más conservados a través de las generaciones. Por otro lado, firmeza, porcentaje de reflectancia (L) e índice de forma, presentaron más diferencias significativas entre los promedios de individuos F_2 y familias F_3 .

Como planteo a futuro, se piensa en la elaboración de un mapa donde se integre toda la información de los marcadores AFLP presentados en los Capítulos I y II, y también, marcadores SRAP, obtenidos en esta misma población F_2 por Mahuad (2013), utilizando como referencia los marcadores SNP y SSR utilizados en este trabajo y de los cuales se conoce su ubicación. También, se plantea la caracterización fenotípica y molecular por AFLP de generaciones segregantes provenientes de otros HSC derivados de la población de RIL a fin de validar los QTLs detectados.

La magnitud de la asociación entre la variabilidad molecular y la fenotípica, es un criterio válido para seleccionar poblaciones bases derivadas de los híbridos de segundo ciclo. Por lo tanto, la información obtenida en estas generaciones tempranas puede contribuir a diseñar eficientemente un programa de mejoramiento a partir de la variabilidad genética presente en la población base seleccionada.

A modo de conclusión general, a través de la caracterización fenotípica y molecular con los diferentes tipos de marcadores de ADN utilizados (AFLP, SSR y SNP) se pudo corroborar que los HSC presentan combinaciones genotípicas favorables entre los genes que fueron seleccionados en generaciones previas. En las generaciones segregantes de los

HSC, estas nuevas combinaciones originaron variabilidad genética en el nivel molecular y fenotípico, evidenciada en un alto nivel de polimorfismo en los perfiles de AFLP y en una amplitud de la variancia genética para caracteres como vida poscosecha (comparado a los valores obtenidos en las RIL), acidez titulable, sólidos solubles y pH. La similitud entre los valores de H^2 para estos caracteres en las diferentes generaciones segregantes evidencia la conservación de la proporción de variancia genotípica en relación a la variancia fenotípica, independientemente de cuales regiones genómicas estén asociadas a la expresión de dichos caracteres en cada contexto genético. En concordancia, se identificaron nuevos QTLs mediante diferentes marcadores moleculares y fue posible validar algunos de ellos (identificados por marcadores SSR) que también fueron previamente detectados e informados en otras generaciones relacionadas. La magnitud de la asociación entre la variabilidad molecular y la fenotípica fue un criterio válido para seleccionar la generación segregante del HSC RIL18xRIL1, fundando una nueva población base a partir de la cual se inició un nuevo ciclo de selección. El uso de la información obtenida en estas generaciones tempranas (H^2 , h^2 , d/a , correlaciones, detección de QTLs, magnitud de sus efectos, entre otros), contribuyó a seleccionar individuos dentro de la población base seleccionada en forma eficiente pues en las familias F_3 derivadas de ellas se detectó variabilidad genética para muchos de los caracteres bajo estudio. Esto permitirá iniciar un nuevo programa de mejoramiento genético.

BIBLIOGRAFÍA

Baranger, A.; Aubert, G.; Arnau, G.; Lainé, A.L.; Deniot, G.; Potier, J.; Weinachter, C.; Lejeune-Hénaut, I.; Lallemand, J.; Burstin, J. 2004. Genetic diversity within *Pisum sativum* using protein-and PCR-based markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 108: 1309-1321.

Bateson, W. 1909. *Mendel's principles of heredity*. Cambridge University Press, Cambridge. Pp: 396.

Bernacchi, D.; Beck-Bunn, T.; Eshed, Y.; Lopez, J.; Petiard, V.; Uhlig, J.; Zamir, D.; Tanksley, S. 1998. Advanced backcross QTL analysis in tomato. I. Identification of QTLs for traits of agronomic importance from *Lycopersicon hirsutum*. *Theoretical and Applied Genetics*. 97: 381-397.

Bernardo, R. 2008. Molecular markers and selection for complex traits in plants: learning from the last 20 years. *Crop Science*. 48: 1649-1664.

Blanca, J.; Cañizares, J.; Cordero, L.; Pascual, L.; Díez, M.J.; Nuez, F. 2012. Variation revealed by SNP genotyping and morphology provides insight into the origin of the tomato. *PLoS ONE*. 7(10): e48198.

Blanca, J.; Montero-Pau, J.; Sauvage, C.; Bauchet, G.; Illa, E.; Díez, M.J.; Francis, D.; Causse, M.; van der Knaap, E.; Cañizares, J. 2015. Genomic variation in tomato, from wild ancestors to contemporary breeding accessions. *BMC Genomics*. 16: 257 (Pp 19).

Blears, M.J.; De Grandis, S.A.; Lee, H.; Trevors, J.T. 1998. Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its applications. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 21: 99-114.

Bocianowski, J. 2013. Epistasis interaction of QTL effects as a genetic parameter influencing estimation of the genetic additive effect. *Genetics and Molecular Biology*. 36(1): 93-100.

Boletín Oficial de la República Argentina. 2013. Año CXXI. Número 32.615. Pp: 60.

Bramardi, S.J.; Bernet, G.P.; Asíns, M.J.; Carbonell, E. A. 2005. Simultaneous agronomic and molecular characterization of genotypes via the Generalised Procrustes Analysis: an application to Cucumber. *Crop Science*. 45: 1603-1609.

Brewer, M.T.; Moyseenko, J.B.; Monforte, A.J.; van der Knaap, E. 2007. Morphological variation in tomato: a comprehensive study of quantitative trait loci controlling fruit shape and development. *Journal of Experimental Botany*. 58(6): 1339-1349.

Cachiarelli, P.; Cabodevila, V.; Pantuso, F.S.; Pratta, G.R. 2015. Segregación y recombinación genética en las generaciones segregantes de un híbrido de segundo ciclo de tomate. *Revista de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. Universidad de Morón*. 13: 25-38.

Cambiaso V.; Pereira da Costa, J.H.; Rodríguez, G.R.; Pratta, G.R.; Picardi, L.A.; Francis, D.M.; Zorzoli, R. 2015. Polimorfismo en la secuencia genómica completa entre un cultivar argentino y una especie silvestre de tomate (*Solanum* SPP.). *Actas del XLIV Congreso Argentino de Genética. Journal of Basic & Applied Genetics*. 26 (1): 178 (Suplemento).

Cambiaso, V. 2017. Construcción de un mapa y detección de *QTLs* asociados a la vida poscosecha y calidad de los frutos en un cruzamiento interespecífico de tomate. Tesis presentada para optar al grado de Doctor en Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Rosario.

Capel, C.; Fernández del Carmen, A.; Alba, J.M.; Lima-Silva, V.; Hernández-Gras, F.; Salinas, M.; Boronat, A.; Angosto, T.; Botella, M.A.; Fernández-Muñoz, R.; Granell, A.; Capel, J.; Lozano, R. 2015. Wide-genome QTL mapping of fruit quality traits in a tomato RIL population derived from the wild-relative species *Solanum pimpinellifolium* L. *Theoretical and Applied Genetics*. 128: 2019-2035.

Censo Nacional Agropecuario (CNA). 2008.

URL: http://www.indec.gov.ar/nivel4_default.asp?id_tema_1=3&id_tema_2=8&id_tema_3=87

Chamarro Lapuerta, J. 2001. Capítulo 2: Anatomía y Fisiología de la planta. Pp. 43-91. En: *El cultivo de tomate* (Obra coordinada y dirigida por Fernando Nuez). Editorial Mundi-Prensa, España (reimpresión).

- Churchill, G.A.; Doerge, R.W. 1994. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* 138: 963-971
- Collard, B.C.Y.; Jahufer, M.Z.Z.; Brouwer, J.B.; Pang, E.C.K. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica*. 142: 169-196.
- Collard, B.C.Y.; Mackill, D.J. 2008. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 363: 557-572.
- Conover, W.J. 1999. *Practical nonparametric statistics*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Corominas J. 1987. *Breve diccionario etimológico de la lengua castellana*. Editorial Gredos S.A, Madrid, España. Pp 628.
- de Toledo, J.F.F.; Pooni, H.S.; Jinks, J.L. 1984. Predicting the properties of second cycle hybrids produced by intercrossing random samples of recombinant inbred lines. *Heredity*. 53(2): 283-292.
- de Vicente, M.C.; Tanksley, S.D. 1993. QTL analysis of transgressive segregation in an interspecific tomato cross. *Genetics* 134: 585-596.
- Diez Niclos, M.J. 2001. Capítulo 3: Tipos varietales. Pp: 93-129. En: *El cultivo de tomate* (Obra coordinada y dirigida por Fernando Nuez). Editorial Mundi-Prensa, España (reimpresión).
- Di Rienzo, J.A.; Casanoves, F.; Balzarini, M.G.; Gonzalez, L.; Tablada, M.; Robledo, C.W. *InfoStat versión 2016*. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL: <http://www.infostat.com.ar>
- Falconer D.S.; Mackay T.F.C. 1996. *Introduction to quantitative genetics*. Longman Group Ltd., Edinburgh Gate England. Pp: 184-201.

FAOSTAT. 2014.

URL: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>

Fehr, W.R. 1987. Principles of cultivar development. Macmillan Publishing Company. Pp: 534.

Ferratto, J.A.; Grasso, R.; Longo, A.; Ortiz Mackinson, M.; Mondino, M.C. 2009. Censo 2008 del cinturón hortícola de Rosario. Publicación Miscelánea N° 46. Estación Experimental Agropecuaria INTA Oliveros. Pp: 17.

Forster, B.P.; Heberle-Bors, E.; Kasha, K.J.; Touraev, A. 2007. The resurgence of haploids in higher plants. TRENDS in Plant Science. 12(8): 368-375.

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

Giovannoni, J.J. 2004. Genetic regulation of fruit development and ripening. The Plant Cell. 16: S170-S180. Suplemento.

Gonzalo, M.J.; van der Knaap, E. 2008. A comparative analysis into the genetic bases of morphology in tomato varieties exhibiting elongated fruit shape. Theoretical and Applied Genetics. 116: 647-656.

Govindaraj, P.; Vinod, K.K.; Arumugachamy, S.; Maheswaran, M. 2009. Analysing genetic control of cooked grain traits and gelatinization temperature in a double haploid population of rice by quantitative trait loci mapping. Euphytica. 166: 165-176.

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

Grasso, R.; Mondino, M.C.; Ortiz Mackinson, M.; Vita Larriou, E.; Longo, A.; Ferratto, J.A. 2013. Censo 2012 del cinturón hortícola de Rosario. Publicación Miscelánea N° 50. Estación Experimental Agropecuaria INTA Oliveros. Centro Regional Santa Fe. Pp: 36.

Gupta, P.K.; Rustgi, S.; Mir, R.R. 2008. Array-based high-throughput DNA markers for crop improvement. *Heredity*. 101: 5-18.

Hedde, L.; López, E.; González, C. 1984. Del "Tomatl" a la manzana del amor. Pequeña historia del tomate. *Horticultura: Revista de industria, distribución y socioeconomía hortícola: frutas, hortalizas, flores, plantas, árboles ornamentales y viveros*. 13: 25-30.

Hill, J.; Lethenborg, P.; Li, P.W.; Rahman, M.H.; Sørensen, H.; Sørensen, J.C. 2003. Inheritance of progoitrin and total aliphatic glucosinolates in oilseed rape (*Brassica napus* L). *Euphytica*. 134:179-187.

Hirakawa, H.; Shirasawa, K.; Ohyama, A.; Fukuoka, H.; Aoki, K.; Rothan, C.; Sato, S.; Isobe, S.; Tabata, S. 2013. Genome-wide SNP genotyping to infer the effects on gene functions in tomato. *DNA Research*. 20(3): 221-233.

Kearsey M.J.; Pooni, H.S. 1996. The genetical analysis of quantitative traits. Editorial: Chapman and Hall.

Kosambi, D.D. 1944. The estimation of map distances from recombination values. *Annals of Eugenics*. 12: 172-175.

Langridge, P.; Lagudah, E.S.; Holton, T.A.; Appels, R.; Sharp, P.J.; Chalmers, K.J. 2001. Trends in genetic and genome analyses in wheat: a review. *Australian Journal of Agricultural Research*. 52: 1043-1077.

Liberatti, D.R. 2011. Variabilidad genética en líneas recombinantes de *Solanum* obtenidas con un cruzamiento interespecífico: Identificación de las combinaciones génicas favorables para caracteres de interés agronómico. Tesis para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Rosario.

Liberatti, D.R.; Rodriguez, G.R.; Zorzoli, R.; Pratta, G.R. 2013. Tomato second cycle hybrids differ from parents at three levels of genetic variation. *International Journal of Plant Breeding*. 7(1): 1-6.

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

Mahuad, S.L.; Pratta, G.R.; Rodriguez, G.R.; Zorzoli, R.; Picardi, L.A. 2013. Preservation of *Solanum pimpinellifolium* genomic fragments in recombinant genotypes improved the fruit quality of tomato. *Journal of Genetics*. 92(2): 195-203.

Mariotti, J.A.; Collavino, N.G. 2014. Capítulo 3: Efectos genéticos y ambientales sobre las varianzas poblacionales. Pp: 63-93. En: Los caracteres cuantitativos en la mejora genética de los cultivos. 1ª edición. Buenos aires: orientación Gráfica Editora.

Martínez, M.C.; Helguera, M.; Carrera, A. 2010. Capítulo 5: Marcadores Moleculares. Pp: 70-85. En: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Editores: Levitus, G.; Echenique, V.; Rubinstein, C.; Hopp, E.; Mroginski, L. Ediciones: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).

Martínez-Flórez, S.; González-Gallego, J.; Culebras, J.M.; Tuñón, M.J. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*. 17(6): 271-278.

Masso, Y. 2012. Detección de QTLs en las generaciones segregantes de un híbrido de segundo ciclo de tomate (*Solanum lycopersicum*). Trabajo de tesis para optar al título de Licenciada en Genética. Universidad de Morón.

Mather, K.; Jinks, J.L. 1971. *Biometrical genetics*. Chapman and Hall. Londres.

Meli, V.S.; Ghosh, S.; Prabha, T.N.; Chakraborty, N.; Chakraborty, S.; Datta, A. 2010. Enhancement of fruit shelf life by suppressing *N*-glycan processing enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*. 107(6): 2413-2418.

Miao, L.; Shou, S.; Cai, J.; Jiang, F.; Zhu, Z.; Li, H. 2009. Identification of two AFLP markers linked to bacterial wilt resistance in tomato and conversion to SCAR markers. *Molecular Biology Reports*. 36: 479-486.

Ministerio de Agroindustria (Subsecretaría de Mercados Agropecuarios, Presidencia de la Nación). 2016. Informe: Perfil del tomate 2016. 1-26.

URL:http://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/ss_mercados_agropecuarios/areas/hortalizas/archivos/000030_Informes/000997_Perfil%20de%20tomate%202016.pdf

Ministerio de Agroindustria (Subsecretaría de Mercados Agropecuarios, Presidencia de la Nación). 2017. Informe: Mercado externo del tomate. 1-8.

URL:https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/ss_mercados_agropecuarios/areas/hortalizas/archivos/000030_Informes/000994_Informe%20del%20Mercado%20Externo%20del%20Tomate%20-%202017.pdf

Nuez, F.; Prohens, J.; Blanca, J.M. 2004. Relationships, origin, and diversity of Galápagos tomatoes: implications for the conservation of natural populations. *American Journal of Botany*. 91(1): 86-99.

Peralta, I.E.; Spooner, D.M. 2000. Classification of wild tomatoes: a review. *Kurtziana*. 28(1): 45-54.

Peralta, I.E.; Spooner, D.M.; Knapp, S. 2008. Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (*Solanum* sect. *Lycopersicoides*, sect. *Juglandifolia*, sect. *Lycopersicon*; *Solanaceae*). *Systematic Botany Monographs*. 84:1-186.

Pereira da Costa, J.H.; Martínez, V.A.; Rodríguez, G.R.; Pratta, G.R.; Zorzoli, R. 2009. Influencia de genes exóticos sobre la vida en estantería y el peso del fruto de tomate. *Agriscientia*. 26(1): 7-13.

Pereira da Costa, J.H.; Rodríguez, G.R.; Pratta, G.R.; Picardi, L.A.; Zorzoli, R. 2013. QTL detection for fruit shelf life and quality traits across segregating populations of tomato. *Scientia Horticulturae*. 156: 47-53.

Pereira da Costa, J.H.; Rodríguez, G.R.; Liberatti, D.R.; Mahuad, S.L.; Marchionni Basté, E.; Picardi, L.A.; Zorzoli, R.; Pratta, G.R. 2016. Tomato second cycle hybrids as a source of genetic variability for fruit quality traits. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. 16: 289-297.

-
- Pérez Trueba, G. 2003. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 22(1): 48-57.
- Portin, P.; Wilkins, A. 2017. The evolving definition of the term “gene”. *Genetics*. 205: 1353-1364.
- Pratta, G.; Zorzoli, R.; Picardi, L.A. 1996. Evaluación de caracteres de interés agronómico en especies del género *Lycopersicon*. *Horticultura Argentina*. 15(39): 25-32.
- Pratta, G.; Cánepa, L.N.; Zorzoli, R.; Picardi, L. 2003 (a). Efecto del germoplasma silvestre sobre caracteres de interés agronómicos en híbridos intra e interespecíficos del género *Lycopersicon*. *Revista de Investigaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias - UNR - Año3*. 3: 99-107.
- Pratta, G.; Zorzoli, R.; Picardi, L.A. 2003 (b). Diallel análisis of production traits among domestic, exotic and mutant germplasms of *Lycopersicon*. *Genetics and Molecular Research*. 2(2): 206-213.
- Pratta, G.R.; Zorzoli, R.; Picardi, L.A.; Valle, E.M. 2006. Variability for the *in vitro* culture response in tomato recombinant inbred lines. *Biologia Plantarum*. 50(3): 421-424.
- Pratta, G.R.; Rodríguez, G.R.; Zorzoli, R.; Valle, E.M.; Picardi, L.A. 2011 (a). Molecular markers detect stable genomic regions underlying tomato fruit shelf life and weight. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. 11: 157-164.
- Pratta, G.R.; Rodríguez, G.R.; Zorzoli, R.; Valle, E.M.; Picardi, L.A. 2011 (b). Phenotypic and molecular characterization of selected tomato recombinant inbred lines derived from the cross *Solanum lycopersicum* x *S. pimpinellifolium*. *Journal of Genetics*. 90(2): 229-237.
- Raiola, A.; Rigano, M.M.; Calafiore, R.; Frusciante, L.; Barone, A. 2014. Enhancing the health-promoting effects of tomato fruit for biofortified food. Hindawi Publishing Corporation. *Mediators of Inflammation*. Volume 2014, Article ID 139873. Pp: 16.

Rodríguez, G.R.; Pratta, G.R.; Zorzoli, R.; Picardi, L.A. 2006. Recombinant lines obtained from an interspecific cross between *Lycopersicon* species selected by fruit weight and fruit shelf life. *Journal of the American Society for Horticulture Science*. 131(5): 651-656.

Rodríguez, J.; Álvarez, M.; Moya, C.; Plana, D.; Dueñas, F.; Lescay, E.; Rodríguez, S. 2008. Evaluación de la heterosis y heredabilidad en híbridos cubanos de tomate (*Solanum lycopersicum*). *Cultivos Tropicales*. 29(3): 63-68.

Rodríguez, G.R.; Pereira da Costa, J.H.; Pratta, G.R.; Zorzoli, R.; Picardi, L.A. 2013. Recursos genéticos y genómicos para mejorar la calidad del fruto en tomate. *Revista Agromensajes de la Facultad*. 35: 30-36.

Salinas, M.; Capel, C.; Alba, J.M.; Mora, B.; Cuartero, J.; Fernández-Muñoz, R.; Lozano, R.; Capel, J. 2013. Genetic mapping of two QTL from the wild tomato *Solanum pimpinellifolium* L. controlling resistance against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). *Theoretical and Applied Genetics*. 126(1): 83-92.

Scripsema, N.K.; Hu, D-N.; Rosen, R.B. 2015. Lutein, zeaxanthin, and meso-zeaxanthin in the clinical management of eye disease. Hindawi Publishing Corporation. *Journal of Ophthalmology*. Volume 2015, Article ID 865179. Pp: 13.

Shapiro, S.S; Wilk, M.B. 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*. 52(3-4): 591-611.

Sim, S-C.; Van Deynze, A.; Stoffel, K.; Douches, D.S.; Zarka, D.; Ganai, M.W.; Chetelat, R.T.; Hutton, S.F.; Scott, J.W.; Gardner, R.G.; Panthee, D.R.; Mutschler, M.; Myers, J.R.; Francis, D.M. 2012. High-density SNP genotyping of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) reveals patterns of genetic variation due to breeding. *PLoS ONE*. 7(9): e45520.

Singh, B.D.; Singh, A.K. 2015. Marker- assisted plant breeding: principles and practices. Springer.

Sokal, R.R.; Rohlf, F.J. 1962. The Comparison of Dendrograms by Objective Methods. *Taxon*. 11(2): 33-40.

Sol Genomics Network (SGN).

URL: www.solgenomics.net

Story, E.N.; Kopec, R.E.; Schwartz, S.J; Harris, G.K. 2010. An update on the health effects of tomato lycopene. *Annual Review of Food Science and Technology*. 1: 1- 24.

Tanksley, S.D. 1993. Mapping polygenes. *Annual Review of Genetics*. 27: 205-233.

The Tomato Genome Consortium. 2012. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* 485: 635-641.

Thomas, C.M.; Vos, P.; Zabeau, M.; Jones, D.A.; Norcott, K.A.; Chadwick, B.P.; Jones, J.D.G. 1995. Identification of amplified restriction fragment polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum*. *The Plant Journal*. 8(5): 785-794.

van der Knaap, E.; Tanksley, S.D. 2003. The making of a bell pepper-shaped tomato fruit: identification of loci controlling fruit morphology in Yellow Stuffer tomato. *Theoretical and Applied Genetics*. 107: 139-147.

Varshney, R.K.; Nayak, S.N.; May, G.D.; Jackson, S.A. 2009. Next-generation sequencing technologies and their implications for crop genetics and breeding. *Trends in Biotechnology*. 27(9): 522-530.

Winter, P.; Kahl, G. 1995. Molecular marker technologies for plant improvement. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 11(4): 438-448.

Xu, Y.; Crouch, J.H. 2008. Marker-assisted selection in plant breeding: from publications to practice. *Crop Science*. 48: 391-407.

Zapata, L.M.; Gerard, L.; Davies, C.; Schwab, M. del C. 2007. Estudio de los componentes antioxidantes y actividad antioxidante en tomates. *Ciencia, Docencia y Tecnología* N° 35, Año XVIII: 173-193.

Zorzoli, R.; Pratta, G.R.; Picardi, L.A. 1998. Efecto de los mutantes *nor* y *rin* y de genes silvestres sobre características del fruto en *Lycopersicon*. *Mendeliana*. 13(1): 12-19.