



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

Facultad de Ciencias Agrarias

**CONSTRUCCIÓN DE UN MAPA Y DETECCIÓN DE
QTLs ASOCIADOS A LA VIDA POSCOSECHA Y
CALIDAD DE LOS FRUTOS EN UN CRUZAMIENTO
INTERESPECÍFICO DE TOMATE**

Ing. Agr. Vladimir Cambiaso

Tesis presentada para optar al grado de

Doctor en Ciencias Agrarias

Directora: Ing. Agr. (Dra.) Roxana Zorzoli

Co-director: Ing. Agr. (Dr.) Guillermo R. Pratta

Co-director: Ing. Agr. (Dr.) Gustavo R. Rodríguez

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**

Vladimir Cambiaso

Ingeniero Agrónomo – Facultad de Ciencias Agrarias UNR.

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 del 2012 y Noviembre del 2016, bajo la dirección de la Ing. Agr. (Dra.) Roxana Zorzoli.

Ing. Agr. Vladimir Cambiaso
Nombre y firma del Doctorando

Ing. Agr. (Dra.) Roxana Zorzoli
Nombre y firma del Director

Ing. Agr. (Dr.) Guillermo R. Pratta
Nombre y firma del Co-director

Ing. Agr. (Dr.) Gustavo R. Rodríguez
Nombre y firma del Co-director

Defendida: 16 de Marzo de 2017.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a la Dra. Roxana Zorzoli por haberme dirigido en la realización de este trabajo y por transmitirme su pasión, pero por sobre todas las cosas le quiero agradecer el apoyo incondicional que me ha brindado mucho más allá de lo meramente académico.

A mis Co-Directores, el Dr. Guillermo Pratta por sus precisas correcciones y sugerencias durante toda la elaboración de la tesis y el Dr. Gustavo Rodríguez por su inagotable paciencia, dedicación y apoyo para acompañarme durante todo el doctorado.

A los integrantes de la Cátedra de Genética de la Facultad de Ciencias Agrarias (UNR): a la Dra. Liliana Picardi por estimular constantemente mi espíritu crítico y por el enriquecedor intercambio de ideas y de lecturas compartido; a los Ing. Agr. (MSc) Graciela Nestares y Fernando López Anido por permitirme colaborar y aprender de su experiencia en la Docencia.

A todos mis compañeros de la Sala de Becarios por los momentos compartidos y el grato ambiente de trabajo generado, pero en especial a Javier, Marianela y Gisela por acompañarme durante todo el doctorado y por haberme guiado y enseñado a trabajar en el laboratorio.

A todos los ayudantes de la Cátedra de Genética que colaboraron con mi trabajo de tesis: Daniela, Ezequiel, Dana, Antonella, Franco y Paula.

Al personal no docente de la Sección Horticultura del Campo Experimental “José F. Villarino”: Florida, Ramón, Toni y Hernán, por su contribución en la realización de los ensayos.

Al Dr. David Francis y a todo su grupo de trabajo: Elizabet, Deb, Marcela, Eka y Troy por abrirme las puertas de su laboratorio y de sus hogares para que mi experiencia en el exterior resulte inmejorable.

A mis familiares y amigos por el apoyo brindado durante toda mi carrera, pero en especial a mis padres y hermanos que me permitieron y estimularon a seguir estudiando y a mi esposa que día a día comparte, valora y disfruta a mi lado del camino elegido.

Al CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas) por haber financiado mi carrera de posgrado y a los responsables del programa BEC.AR por haberme otorgado una beca de formación en el exterior.

Para Pichi y Dorys,

PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS

EFFECTOS RECÍPROCOS PARA CARACTERES DE CALIDAD DE FRUTO EN HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS DE TOMATE. Cambiaso, V.; Cingolani, D.R.; Pereira da Costa, J.H.; Rodríguez, G.R.; Pratta, G.R.; Picardi, L.A.; Zorzoli, R. Journal of Basic & Applied Genetics, Suppl. Vol. 24 (1), pág. 179, 2013. ([http://www.sag.org.ar/jbag/V.XXIV_2013_Suppl\(1\).pdf](http://www.sag.org.ar/jbag/V.XXIV_2013_Suppl(1).pdf))

CARACTERES MORFOLÓGICOS DE FRUTO EN LOS HÍBRIDOS RECÍPROCOS DE UN CRUZAMIENTO INTERESPECÍFICO DE TOMATE. Cambiaso, V.; Cingolani, D.R.; Bettinsoli, A.; Bottero, F.I.; Green, G.Y.; Zorzoli, R.; Rodríguez, G.R. Publicación Periódica Anual de la Asociación Civil Sociedad de Biología de Rosario, Vol. 1 (1), pág. 38, 2013. (http://www.sbr.org.ar/Libros/libro_resumenes_2013.pdf)

EVALUACIÓN DE CARACTERES ASOCIADOS AL PROCESO DE DOMESTICACIÓN EN UN CRUZAMIENTO INTERESPECÍFICO DE TOMATE. Cambiaso, V.; Rodríguez, G.R.; Pratta, G.R.; Zorzoli, R. Publicación Periódica Anual de la Asociación Civil Sociedad de Biología de Rosario, Vol. 1 (1), pág. 30, 2013. (http://www.sbr.org.ar/Libros/libro_resumenes_2013.pdf)

EFFECTOS CITOPASMÁTICOS SOBRE CARACTERES DE CALIDAD DE FRUTO EN LAS GENERACIONES F_1 Y F_2 DE UN CRUZAMIENTO INTERESPECÍFICO DE TOMATE. Cambiaso V.; Rodríguez, G.R.; Pereira da Costa J.H.; Cingolani, D.R.; Pratta, G.R.; Picardi, L.A.; Zorzoli, R. Horticultura Argentina, Vol. 33 (82), pág. 45, 2014. (<http://www.horticulturaar.com.ar/publicaciones-27.htm>).

POLIMORFISMO EN LA SECUENCIA GENÓMICA COMPLETA ENTRE UN CULTIVAR ARGENTINO Y UNA ESPECIE SILVESTRE DE TOMATE (SOLANUM SPP.).Cambiaso V.; Pereira da Costa J.H.; Rodríguez G.R.; Pratta G.R.; Picardi L.A.; Francis D.M.; Zorzoli R. Journal of Basic & Applied Genetics, Suppl. Vol. 26 (1), pág. 178, 2015. (http://congreso2015.sag.org.ar/wp_content/uploads/2015/09/VXXVI_Issue1_2015_09092015.pdf). Trabajo seleccionado para exposición oral en XLIV Congreso Argentino de Genética del 13 al 16 de septiembre de 2015, Mar del Plata.

ÍNDICE

	Pág.
Agradecimientos	
Publicaciones y Presentaciones a Congresos	
Índice	1
Abreviaturas y Símbolos	2
Resumen	3
Abstract	5
Introducción	6
Hipótesis y Objetivo General	13
Capítulo I: Caracterización fenotípica y genómica de los progenitores del.....	14
cruzamiento interespecífico y análisis de la variabilidad genética	
Objetivos Específicos	15
Materiales y Métodos	16
Resultados	23
Discusión.....	31
Conclusiones Parciales	34
Capítulo II: Caracterización fenotípica y estimación de efectos recíprocos en	35
generaciones F_1 y F_2	
Objetivos Específicos	36
Materiales y Métodos	37
Resultados	39
Discusión.....	43
Conclusiones Parciales	45
Capítulo III: Caracterización genotípica con marcadores moleculares de ADN.....	46
para la construcción de mapas de ligamiento genético en poblaciones F_2	
Objetivos Específicos	47
Materiales y Métodos	48
Resultados	54
Discusión.....	72
Conclusiones Parciales	74
Capítulo IV: Identificación de regiones genómicas asociadas a caracteres de.....	75
calidad de frutos en poblaciones F_2 recíprocas	
Objetivos Específicos	76
Materiales y Métodos	77
Resultados	79
Discusión.....	85
Conclusiones Parciales	87
Consideraciones Finales	88
Conclusión General	90
Bibliografía	91

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

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

AT: acidez titulable

CAPS: *Cleaved Amplified Polymorphic Sequences* o secuencias polimórficas amplificadas y cortadas

CC: genotipo homocigota para los alelos aportados por Caimanta

cM: centimorgan

CP: genotipo heterocigota para alelos aportados por Caimanta y LA722

GDG: grado de determinación genética

InDel: inserciones/deleciones

L: porcentaje de reflectancia

LOD: *Logarithm Of Odds* o logaritmo de probabilidades

pb: pares de bases

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

PP: genotipo homocigota para los alelos aportados por LA722

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

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

SS: sólidos solubles

SSR: *Simple Sequence Repeat* o repetición de secuencia simple

VP: vida poscosecha

RESUMEN

En el cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) la calidad de los frutos juega un rol muy importante tanto en la elección de los cultivares por parte de los productores como en la demanda del producto obtenido por parte de los consumidores, siendo la prolongación de la vida poscosecha de los frutos un carácter altamente apreciado para la comercialización en fresco. El objetivo de este trabajo fue localizar en mapas de ligamiento contruidos a partir de cruzamientos recíprocos entre el cultivar nacional Caimanta (C) de la especie *S. lycopersicum* L. y la accesión LA722 (P) de la especie silvestre *S. pimpinellifolium* L., QTL (*Quantitative Trait Loci*, o *loci* de caracteres cuantitativos) de larga vida poscosecha y otros caracteres que hacen a la calidad del fruto. Se evaluó el polimorfismo entre los progenitores para los caracteres fenotípicos. También se analizó el polimorfismo total a nivel de ADN entre los progenitores de los cruzamientos a través de la secuenciación de sus genomas. Se evidenciaron diferencias significativas entre los progenitores para todos los caracteres fenotípicos analizados y se detectaron 1.398.056 polimorfismos de tipo *SNP* (*Single Nucleotide Polymorphism* o polimorfismos de nucleótido simple) e InDel (inserciones/delecciones) distribuidos en los 12 cromosomas. Los polimorfismos de tipo *SNP* también fueron utilizados para comparar ambos genotipos con un conjunto de 35 cultivares representativos de la amplia variabilidad dentro del germoplasma cultivado de tomate. Un total de 229 *SNP* distribuidos en todo el genoma, se usaron para realizar la caracterización genotípica de los 37 materiales y mediante un análisis de conglomerados se logró agrupar a la accesión LA722 junto con los cultivares de tamaño pequeño y al cultivar Caimanta junto con genotipos clasificados como materiales modernos para consumo en fresco y para procesamiento industrial. Invertiendo la función sexual (macho o hembra) de los progenitores se obtuvieron las generaciones F_1 recíprocas (F_1 CxP y F_1 PxP) y por autofecundación se lograron las poblaciones F_2 (F_2 CxP y F_2 PxP). Se evaluaron fenotípicamente diez plantas de cada F_1 y 120 de cada F_2 con el objetivo de estimar efectos recíprocos para caracteres de calidad de fruto. Se demostró la existencia de efectos recíprocos en la determinación de algunos caracteres de calidad de fruto, tales como peso, diámetro, altura y vida poscosecha tanto en las generaciones F_1 como en las F_2 . Se desarrollaron 183 marcadores moleculares de ADN para, junto a otros marcadores disponibles, caracterizar genotípicamente ambas poblaciones F_2 y construir dos mapas de ligamiento. La longitud total del mapa de ligamiento obtenido para la F_2 CxP fue de 1.495,6 centimorgan (cM) con una distancia promedio entre dos marcadores consecutivos de 10,3 cM y una distancia máxima de 43,8 cM, mientras que para la F_2 PxP fue de 1.424,4 cM con una distancia promedio entre dos marcadores

consecutivos de 13,7 cM y una distancia máxima de 49,3 cM. A partir de la obtención de los mapas se realizó la detección de *QTL* mediante el mapeo por intervalos. En la población F_2 CxP se detectó un *QTL* en el cromosoma 11 para vida poscosecha y 15 *QTL* asociados a otros caracteres de calidad de fruto. En la población F_2 PxC se detectaron dos *QTL* para vida poscosecha, uno en el cromosoma 3 y otro en el 5 y 31 *QTL* asociados a otros caracteres de calidad de fruto. En ambas poblaciones solo se detectaron asociaciones a las mismas regiones cromosómicas para los caracteres: diámetro y peso de fruto en el cromosoma 1 (en una región cercana al *QTL fw1.2*); número de lóculos, diámetro y forma de fruto en el cromosoma 11 (en una región cercana al gen *FAS*) y para el parámetro L de color de fruto en el cromosoma 7 (en una región cercana al *QTL fc7.1* y al *L*.7F*). Todos los demás *QTL* detectados fueron exclusivos de una u otra población F_2 confirmando que según la dirección del cruzamiento inicial distintas regiones cromosómicas toman relevancia en la determinación de los caracteres de calidad de fruto evaluados. Los resultados obtenidos demuestran que se detectaron diferentes *QTL* asociados a la vida poscosecha y a caracteres de calidad de fruto en poblaciones F_2 recíprocas obtenidas a partir del cruzamiento entre el cultivar Caimanta y la accesión silvestre LA722.

ABSTRACT

Construction of a linkage map and detection of QTL associated with fruit shelf life and other quality traits in an interspecific cross of tomato

The tomato fruit quality is relevant for both farmers and consumers. Fruit shelf life is an important trait for tomato fresh market varieties. The aim of this research was to develop genetic linkage maps of tomato segregating populations, obtained from the reciprocal cross between the Argentinean cultivar Caimanta (C) of *Solanum lycopersicum* L. and the LA722 (P) accession of the wild species *S. pimpinellifolium* L., and localize QTL for fruit shelf life and others fruit quality traits. Phenotypic and genotypic polymorphism was evaluated between C and P. Statistical differences were found for all the phenotypic evaluated traits between C and P. Genotypic polymorphism was determinate based on whole genome sequences comparisons. A total of 1,398,056 DNA polymorphisms (SNP and InDel) were detected between them. In order to relate C and P to cultivated tomato diversity, a set of 35 tomato varieties were genotypic characterized using 229 SNP and a cluster analysis were performed. The sexual function of both parent lines was inverted during the crosses to obtain reciprocal F_1 ($F_1C \times P$ and $F_1P \times C$) and F_2 ($F_2C \times P$ and $F_2P \times C$) generations. A phenotypic evaluation for quality traits were performed using ten plants of each F_1 and 120 of each F_2 . Reciprocal effects were found in F_1 and F_2 generations for diameter, height, fruit weight and shelf life. The length of both maps were similar, 1,495 centiMorgan (cM) with an average distance between markers of 10.3 cM for the F_2 C $\times$ P map and 1,424 cM with an average distance between markers of 13.7 cM for the F_2 P $\times$ C map. The composite interval mapping method for QTL detection was used. Most of the detected QTL were exclusive for each F_2 , showing that depending on the direction of the initial cross different regions in the genome become more relevant in the determination of fruit quality traits. One QTL for fruit shelf life on chromosome 11 and 15 QTL for other fruit quality traits were detected in the $F_2C \times P$. Two QTL for fruit shelf life on chromosome 3 and 5 and 31 QTL for other fruit quality traits were detected in the $F_2P \times C$. Only three genome regions were associated with the same traits in both F_2 populations. Different genomics areas associated with shelf life and others fruit quality traits were found in linkage maps developed using reciprocal F_2 populations derived from the cross between Caimanta and LA722.

INTRODUCCIÓN

El tomate cultivado (*Solanum lycopersicum* L.) es una hortaliza de gran importancia en la Argentina por su consumo, por el valor económico de la producción y por la superficie dedicada a su cultivo ya que representa el 0,6% de la superficie cultivada mundial. Se cultiva tanto en los cinturones hortícolas de las principales ciudades de Argentina como en zonas de producción especializada y es la especie que mayor superficie ocupa en la producción bajo invernadero (Ferratto et al. 2006). Según los últimos datos publicados por el Ministerio de Agricultura de la Nación, en el país se producen cerca de 1.050.000 toneladas de tomate al año de las cuales el 70% se destina al consumo en fresco y el resto al procesamiento industrial (http://www.minagri.gob.ar/dimeagro/hortalizas/productos/prod_hort.php).

En la Región Centro de nuestro país, formada por las provincias de Córdoba y Santa Fe, las áreas ocupadas con cultivos comerciales de hortalizas se estiman en 600.000 hectáreas que generan una producción de 10.500.000 toneladas. Sobre las márgenes del río Paraná y los alrededores de Rosario, zona de influencia de la Facultad de Ciencias Agrarias (FCA) de la Universidad Nacional de Rosario (UNR), se localiza el Cinturón Hortícola de Rosario, que se destaca no solo por el volumen de su comercialización, sino también por la producción de hortalizas y área sembrada que ocupa 5.043 has. En esta área, todo el tomate producido se destina al consumo en fresco y se lo cultiva principalmente bajo invernadero. A su vez, el Cinturón Hortícola de Rosario, abastece no solo el mercado local sino que su producción llega a las ciudades de Santa Fe, Córdoba y Buenos Aires por lo que constituye una zona de relevancia a nivel nacional. La importancia de la horticultura dentro del departamento Rosario radica también en que, dependiendo del año, representa del 34 al 52% del PBI agropecuario. A su vez, requiere un alto empleo de mano de obra convirtiéndose en una importante fuente de trabajo (INTA 2005). Un importante cambio en la procedencia de la mano de obra ha ocurrido en los últimos años al incrementarse el porcentaje proveniente de Bolivia alcanzado en el año 2012 un 43% del total. En, los tres cultivos con mayor importancia desde el punto de vista de los ingresos brutos fueron papa, lechuga y tomate pero esta situación ha cambiado en los últimos años y en el 2012 si bien el cultivo de papa mantuvo el liderazgo, la acelga ocupó el segundo lugar desplazando a la lechuga al tercero. Y en cuanto al tomate, se produjo una fuerte disminución de la producción local llevando al cultivo al séptimo lugar representando el 5,5% de los ingresos brutos de los productos hortícolas. Debido al riesgo y a los elevados costos de producción de cultivos como el tomate, los productores han ido remplazando este y otros cultivos tradicionales por verduras de hoja. Los principales costos en la producción de tomate son la contratación de mano de obra para llevar a cabo las labores culturales que

requiere y la compra de semillas híbridas. A pesar de que el tomate es una especie autógama se comercializan semillas híbridas por su vigor y rendimiento aunque el costo de obtención y por lo tanto el precio de venta son elevados.

El tomate es diploide en su constitución genética, con un número básico de 12 cromosomas, un genoma de tamaño pequeño y un corto ciclo de cultivo. Estas características biológicas junto a la disponibilidad de recursos genéticos y bases de datos con información genómica y posgenómica lo convierten en uno de los cultivos modelos más efectivos para el mejoramiento. Se conocen 13 especies de tomate pertenecientes al género *Solanum* sección *Lycopersicon*, 12 especies silvestres (entre ellas *S. pimpinellifolium* L.) y una especie cultivada; todas diploides con igual número de cromosomas (Peralta et al. 2008). Las especies silvestres crecen como maleza en su centro de origen, definido por la región Andina de América del Sur comprendida entre Ecuador y el norte de Chile. El tomate fue domesticado por las culturas precolombinas en dos etapas con dos centros independientes, la primera fue en Perú y Ecuador y la segunda en la región de la península de Yucatán en México (Blanca et al. 2012; 2015). Después de la llegada de los conquistadores españoles a América, el tomate fue llevado de México a Europa y luego se dispersó al resto del mundo.

En el tomate, la calidad de los frutos juega un rol muy importante tanto en la elección de los cultivares por parte de los productores como en la demanda del producto obtenido por parte de los consumidores. La calidad está dada por todas las características y atributos de un producto, en este caso los frutos de tomate, que se adecuen y satisfagan los requerimientos de la demanda. Los tomates son cosechados en diferentes estados de madurez. El estado de madurez a cosecha debe ser tal que asegure una adecuada conservación del producto. El momento de cosecha en nuestro país es al estado verde maduro o pintón, estado en el cual se detectan visualmente los primeros síntomas de acumulación de carotenoides (Giovannoni 2004). Cosechar el fruto en estados incipientes de madurez permite un margen adecuado para la manipulación en la cosecha, embalaje, transporte y llegada al consumidor sin problemas graves de exceso de madurez. Sin embargo, al cosechar frutos verde maduros, se reduce su calidad debido a que los procesos fisiológicos normales son alterados.

En los programas de mejora del cultivo la selección por mayor producción y la resistencia a enfermedades ha descuidado algunas de las características relacionadas con la calidad del fruto de tomate (madurez, frescura, aroma, sabor, etc.) condición cada vez más buscada por los consumidores (Tandon et al. 2000). Si bien el tacto y la vista hacen a la elección inicial de los frutos por parte del consumidor (atributos externos), su aceptación

final es el resultado de un balance entre los componentes del sabor y aroma (atributos internos) así como también de la consistencia de la pulpa y del color (Angosto Trillo et al. 2001). Los principales componentes del sabor del fruto son los azúcares y ácidos, mientras que los compuestos volátiles hacen al aroma. El compuesto carotenoide responsable del color rojo del fruto es el licopeno, el cuál presenta propiedades antioxidantes que convierten al tomate en un alimento nutraceutico capaz de prevenir enfermedades coronarias y cancerígenas (Blum et al. 2005).

Un carácter de fundamental importancia, altamente apreciado para la comercialización en fresco, es la prolongación de la vida poscosecha de los frutos. Las pérdidas poscosecha de frutas y hortalizas en los países en desarrollo representan casi el 50 % de lo producido (Meli et al. 2010). La obtención de frutos de tomate con larga vida poscosecha estuvo hasta el momento limitada a la introgresión de genes mutantes para la maduración *nor* (*non ripening*), *rin* (*ripening inhibitor*), *alc* (*alcohaca*) y *Nr* (*never ripe*) en fondos genéticos élitos a través de técnicas convencionales de mejoramiento, o a la transformación de diferentes materiales con el constructo anti-sentido de la poligalacturonasa (Smith et al. 1988). Ambas estrategias han sido objeto de fuertes debates, cuestionándose por diferentes motivos su verdadera utilidad socio-económica (Bartoszewski et al. 2003).

El mejoramiento genético de cualquier especie puede ir acompañada de la pérdida de variabilidad debido a la desaparición de genotipos completos, de *loci* génicos o de alelos de un gen (Esquinas-Alcazar 1987). Esta erosión genética es provocada principalmente por la alta presión de selección ejercida por el hombre para lograr el fenotipo deseado. El uso de especies silvestres emparentadas con el cultivo puede revertir esta situación (McCouch et al. 2013). En tomate, diversos autores han realizado estudios sobre la posibilidad de que la mejora en la calidad de los frutos podría lograrse con la incorporación de genes provenientes de germoplasma silvestre. Gur y Zamir (2004) sostienen que la biodiversidad presente en el tomate es una fuente subexplotada que puede enriquecer la base genética del cultivo con alelos nuevos que mejoren la productividad, calidad y adaptación. La especie silvestre *S. pimpinellifolium* L. se caracteriza por presentar frutos de menor tamaño y peso que los cultivares comerciales, pero de alta calidad nutritiva, ya que posee una mayor concentración de vitamina C y azúcares solubles (principalmente glucosa y fructosa) y un elevado contenido en materia seca total (Zuriaga et al. 2009). En condiciones naturales, esta especie mantiene las propiedades organolépticas del fruto durante más largo tiempo, lo que constituye un valor de interés fitotécnico para el carácter vida poscosecha de los frutos. Se ha demostrado que los frutos de algunas accesiones silvestres de *S. lycopersicum* var.

cerasiforme (Dunal) Spooner, G.J. Anderson y R.K. Jansen y *S. pimpinellifolium* L. tienen mayor vida poscosecha que los cultivares comerciales de tomate y menor que los genotipos homocigotas para los mutantes de madurez del fruto *nor* y *rin* de *S. lycopersicum* L. (Pratta et al. 1996; Zorzoli et al. 1998; Rodríguez et al. 2006a; Rodríguez et al. 2010).

Mediante el uso de marcadores moleculares es posible estimar con suficiente precisión el número, tipo y magnitud de los efectos génicos involucrados en la determinación de un carácter cuantitativo, así como las interacciones entre los diferentes *QTL* (*quantitative trait loci*, o *loci* de caracteres cuantitativos) y su localización en el mapa cromosómico de la especie (Tanksley 1993). El genoma del tomate ha sido caracterizado por una amplia gama de marcadores de ADN (Frary et al. 2005; Carelli et al. 2006). Varias características del fruto fueron asociadas a marcadores moleculares (Tanksley et al. 1996; Grandillo y Tanksley 1996; Bernacchi et al. 1998; Fulton et al. 2000; Causse et al. 2001; Gonzalo y van der Knaap 2008). Estos autores señalaron la importancia de los marcadores moleculares para identificar genes de interés agronómico en especies cuyos fenotipos son en principio indeseables desde un punto de vista productivo y para romper el ligamiento entre los genes silvestres favorables y los desfavorables. Si bien existen diferentes métodos para la detección de *QTL*, el mapeo por intervalos es el más recomendado ya que permite analizar las regiones genómicas entre pares de marcadores adyacentes ligados a lo largo de todo el mapa (Lander y Botstein 1989) a diferencia de métodos como el de un solo punto (Tanksley 1993) en el que se evalúa el efecto de cada marcador por separado. A su vez el mapeo por intervalos permite obtener un perfil de los sitios más probables de localización de los *QTL* en el mapa de ligamiento a partir del cálculo del logaritmo de probabilidades (*LOD*, *Logarithm Of Odds*) (Collard et al. 2005). Por su parte, el método de detección de *QTL* por intervalos compuestos se considera que es más preciso y eficaz debido a que no solo evalúa el efecto de pares de marcadores ligados sino que además incluye en el análisis el efecto de otros marcadores que afectan el carácter bajo estudio al incorporarlos como cofactores de una regresión lineal (Collard et al. 2005). Respecto a las poblaciones sobre las cuáles aplicar marcadores moleculares, lo más apropiado para localizar dichos *QTL* en el mapa cromosómico es a través de las generaciones segregantes tempranas. Dado que pueden encontrarse alteraciones importantes para el desarrollo de un programa de mejoramiento entre mapas contruidos a partir de diferentes progenitores, debido a inversiones, deleciones, translocaciones, etc. propias de cada material vegetal, es recomendable cuando sea posible, la elaboración del mapa para cada tipo de cruzamiento particular. El primer mapa de ligamiento genético de alta densidad en tomate fue publicado por Tanksley et al. en el año 1992 a partir de 67 plantas F_2 obtenidas a partir del cruzamiento interespecífico entre

el cultivar VF36-Tm2a de *S. lycopersicum* L. y la accesión LA716 de *S. pennellii* Correll, utilizando polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (*RFLP*, *Restriction Fragment Length Polymorphism*). Con el avance de la biología molecular, nuevos tipos de marcadores se han ido desarrollando y una gran cantidad de mapas de ligamiento genético han sido publicados utilizando diferentes poblaciones de mapeo e incrementando notablemente la densidad de marcadores (Saliba-Colombani et al. 2000; Gonzalo y van der Knaap 2008; Sim et al. 2012a).

La existencia de efectos recíprocos en la determinación de caracteres cuantitativos ha sido detectada en cultivos como el tabaco (Pollak 1991) y el rábano (Nakamura y Stanton 1989) aunque poco se sabe de las bases genéticas que lo causan. Estos efectos resultan aún más determinantes en los cultivos en los que se comercializa semilla híbrida como el arroz y el maíz para los cuales también se han informado efectos recíprocos en caracteres de interés agronómico (Tao et al. 2004; Tang et al. 2013). En tomate Smith et al. (2008) detectaron efectos recíprocos en la absorción de agua en frutos. A pesar de estos antecedentes pocos esfuerzos se han hecho para evaluar si la dirección del cruzamiento genera diferencias significativas en otras características cuantitativas en el híbrido y si este efecto se mantiene en generaciones más avanzadas. A nivel fenotípico las evaluaciones de efectos recíprocos en tomate se han limitado a generaciones F_1 . A nivel molecular no se han obtenido mapas de ligamiento genético a partir de poblaciones recíprocas ya que todos los mapas publicados hasta el momento se lograron a partir de poblaciones en las que se utilizó como progenitor femenino al genotipo cultivado (Tanksley et al. 1992; Chen et al. 1999; Saliba-Colombani et al. 2000; Foolad 2007; Gonzalo y van der Knaap 2008; Sim et al. 2012a). A su vez todas las detecciones de *QTL* en tomate también fueron realizadas en poblaciones obtenidas a partir de cruzamientos en los que el genotipo cultivado fue utilizado como progenitor femenino (Bernacchi et al. 1998; Chen et al. 1999; Causse et al. 2001; Gonzalo y van der Knaap 2008; Pratta et al. 2011a; Pereira da Costa et al. 2013) impidiendo evaluar si la dirección en la que se realizó el cruzamiento influye en la relevancia que toman diferentes regiones del genoma en la determinación de caracteres cuantitativos.

A partir de la secuenciación del cultivar Heinz 1706 y la construcción de un genoma de referencia en tomate (The Tomato Genome Consortium 2012), se encuentran disponibles públicamente secuencias genómicas que pueden usarse como referencia para el desarrollo de marcadores polimórficos. Polimorfismos del tipo InDel (inserciones/delecciones) detectados en la comparación del genoma de referencia y la accesión LA1589 de *S. pimpinellifolium* (The Tomato Genome Consortium 2012) están distribuidos en todo el genoma de tomate y alcanzan el número de 9.478 de los cuales 2.272 ya han sido validados

por Yang et al. (2014) mediante el desarrollo y la amplificación de marcadores moleculares basados en la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (*PCR, Polymerase Chain Reaction*). Además hasta la fecha se han llevado a cabo dos grandes proyectos de resecuenciado de genomas de tomate (The 100 Tomato Genome Sequencing Consortium et al. 2014; Lin et al. 2014) alineando respecto del genoma de referencia más de 400 accesiones de tomate tanto de especies silvestres como cultivadas. Toda la información genómica del tomate y de otras especies pertenecientes a la familia de las Solanáceas se encuentra almacenada y disponible públicamente en el sitio de Internet de la red genómica de Solanáceas (*The Sol Genomics Network*, <http://solgenomics.net>; Mueller et al. 2005; Fernandez-Pozo et al. 2015). Este sitio fue creado para almacenar información genómica y fenotípica de cultivos como el tomate, papa, pimiento, berenjena y tabaco, pero también provee herramientas bioinformáticas para estudios genómicos y de mejoramiento vegetal.

La disponibilidad de información genómica en tomate y el avance en técnicas moleculares han favorecido y facilitado el desarrollo de marcadores y la construcción de mapas de ligamiento genético. La utilización de un cultivar de tomate argentino como progenitor en poblaciones de mapeo no ha sido reportada hasta la fecha así como tampoco se ha evaluado la presencia de efectos recíprocos en la determinación de caracteres cuantitativos de interés agronómico. Los cruzamientos con especies silvestres permiten enriquecer la base genética de los genotipos cultivados y su participación como progenitores en poblaciones de mapeo brinda la posibilidad de localizar regiones genómicas que contribuyen a mejorar caracteres de calidad de fruto. El grupo de investigación de la Cátedra de Genética de la FCA – UNR ha realizado cruzamientos entre genotipos silvestres y cultivados con el objetivo de mejorar la vida poscosecha y otros caracteres de calidad de fruto en tomate. A partir del cruzamiento entre el cultivar argentino Caimanta de *S. lycopersicum* L. y la accesión silvestre LA722 de *S. pimpinellifolium* L. este grupo de investigación realizó un programa de selección divergente – antagónica para peso y vida poscosecha de los frutos obteniendo como resultado 18 cultivares o *RIL (Recombinant Inbred Lines* o líneas endocriadas recombinantes) discrepantes para el peso, la vida poscosecha y otros atributos que hacen a la calidad de los frutos (Rodríguez et al. 2006 a y b). Estas *RIL* fueron caracterizadas fenotípica y molecularmente con marcadores *AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism* o polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados) detectándose una amplia variabilidad genética y molecular para todos los caracteres de calidad de fruto evaluados (Pratta et al. 2011 a y b). La diversidad genética existente entre los progenitores de este cruzamiento impulsó la implementación de un proceso de introgresión, basado en el método de retrocruzas asistidas por marcadores tipo

SSR (*Simple Sequence Repeat* o repetición de secuencia simple), de genes silvestres de la accesión LA722 hacia el cultivar argentino Caimanta con el fin de obtener líneas casi isogénicas (*NIL*, *Near Isogenics Lines*) con mejor comportamiento para caracteres de interés agronómico. Tanto en las *RIL* como en las generaciones de retrocruzadas se detectaron asociaciones entre los caracteres de calidad de fruto evaluados y los marcadores de ADN (*AFLP* y *SSR*) utilizados en la caracterización molecular (Pratta et al. 2011 a y b; Pereira da Costa et al. 2013).

La construcción de mapas de ligamiento genético a partir del cruzamiento recíproco entre Caimanta y LA722 permitirá por un lado localizar las regiones genómicas asociadas a caracteres de interés y profundizar el análisis sobre el efecto causado por estas regiones. Permitirá además y por primera vez en el cultivo de tomate evaluar la existencia de efectos recíprocos tanto a nivel fenotípico como molecular.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Existen regiones genómicas de la accesión LA722 de *Solanum pimpinellifolium* L. que prolongan la vida poscosecha y mejoran otros caracteres de calidad de fruto. Estas regiones genómicas tienen efectos diferenciales en la determinación fenotípica de los caracteres de calidad de fruto en poblaciones derivadas de cruzamientos recíprocos con el cultivar Caimanta de *S. lycopersicum* L.

OBJETIVO GENERAL

Localizar en mapas de ligamiento contruidos a partir de cruzamientos recíprocos entre un cultivar nacional y una accesión silvestre, *QTL* de larga vida poscosecha y otros caracteres que hacen a la calidad del fruto.

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

Capítulo I: Caracterización fenotípica y genómica de los progenitores del cruzamiento interespecífico y análisis de la variabilidad genética.

Capítulo II: Caracterización fenotípica y estimación de efectos recíprocos en generaciones F_1 y F_2 .

Capítulo III: Caracterización genotípica con marcadores moleculares de ADN para la construcción de mapas de ligamiento genético en poblaciones F_2 .

Capítulo IV: Identificación de regiones genómicas asociadas a caracteres de calidad de frutos en poblaciones F_2 recíprocas.

CAPÍTULO I
CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENÓMICA DE LOS PROGENITORES DEL
CRUZAMIENTO INTERESPECÍFICO Y ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD
GENÉTICA

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

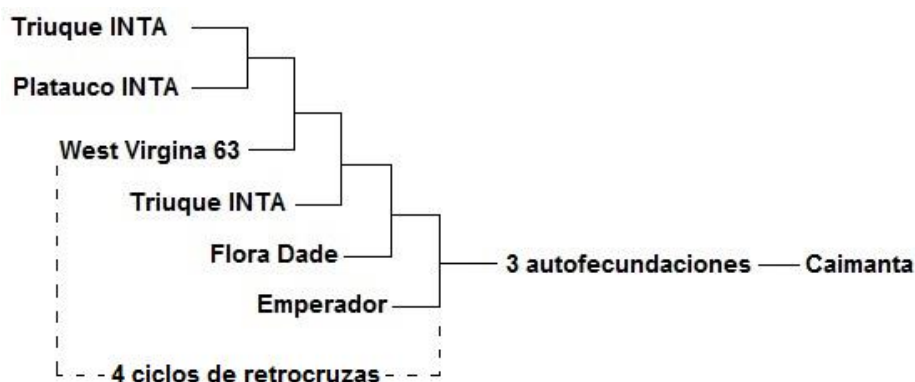
- Caracterizar fenotípica y genómicamente el cultivar Caimanta de *S. lycopersicum* L. y la accesión LA722 de *S. pimpinellifolium* L.
- Comparar el polimorfismo genómico de ambos progenitores con el existente en el germoplasma del tomate cultivado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

Los progenitores del cruzamiento fueron el cultivar Caimanta de *Solanum lycopersicum* L. y la accesión LA722 de la especie silvestre *S. pimpinellifolium* L. Caimanta es un cultivar para consumo en fresco desarrollado a partir del año 1977 en la Estación Experimental INTA Cerrillos, Salta, Argentina, siguiendo para su obtención el método de retrocruza con selección genealógica. Tal como se observa en la Figura I-1, la genealogía de Caimanta parte de un cruzamiento entre dos cultivares locales el Triuque INTA y Platauco INTA. Posteriormente se suceden cuatro ciclos de retrocruzas contra los cultivares: West Virginia 63, Triuque INTA, Flora Dade y Emperador; finalizando el proceso de obtención con tres generaciones de autofecundación. El cultivar Caimanta presenta una muy buena sanidad general siendo resistente al virus del mosaico del tabaco (gen Tm-2), a la raza 1 (gen I) de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) y al tizón temprano del tomate causado por *Alternaria solani* (Ell and Mart). Las plantas son compactas, con hábito de crecimiento determinado y los frutos son achatados (mayor diámetro que altura) con un peso promedio de $98,5 \pm 9,9$ g y una vida poscosecha de $9,7 \pm 0,9$ días (Rodríguez et al. 2006a). Por su parte, la especie silvestre *S. pimpinellifolium* L. se caracteriza por presentar frutos de menor tamaño y peso que los cultivares comerciales, pero de alta calidad nutritiva, ya que posee una mayor concentración de vitamina C y azúcares solubles (principalmente glucosa y fructosa) y un elevado contenido en materia seca total (Zuriaga et al. 2009). La accesión LA722 de *S. pimpinellifolium* L. fue recolectada en 1959 en Trujillo, La Libertad, Perú y presenta plantas con crecimiento indeterminado, un elevado número de flores por inflorescencia y frutos redondos y pequeños con un peso promedio de $0,9 \pm 0,1$ g y una vida poscosecha de $18,7 \pm 0,4$ días (Rodríguez et al. 2006a).

Figura I-1: Esquema representativo de la genealogía del cultivar Caimanta de *Solanum lycopersicum* obtenido en la Estación Experimental INTA Cerrillos, Salta, Argentina.



Caracterización fenotípica

La siembra del cultivar Caimanta y la accesión LA722 se realizó en bandejas de germinación de 72 celdas de 55 cm³ utilizando el sustrato N°1 de Dynamics (www.dynamicscompost.com.ar). A los 45 días de realizada la siembra se procedió con el trasplante al invernadero manteniendo un diseño completamente aleatorizado con una distancia entre plantas de 35 cm y un distancia entre surcos de 1 m. Las plantas fueron regadas por goteo diariamente durante todo el ciclo de cultivo variando la cantidad de agua suministrada en función de la demanda ambiental y del tamaño de las plantas con el objetivo de evitar estrés hídrico. Se sembraron 10 plantas de cada progenitor y se cosecharon para el posterior análisis fenotípico un total aproximado de 400 frutos. De cada genotipo se cosecharon diez frutos por

planta en estado pintón (cuando el 10% de la superficie del fruto vira hacia el color de madurez) y se evaluaron los siguientes caracteres: peso (en g), diámetro (en cm), altura (en cm), forma (cociente entre la altura y el diámetro) y vida poscosecha (VP), expresada como los días transcurridos desde la cosecha hasta el inicio del ablandamiento del fruto. Para evaluar este último carácter los frutos fueron

Figura I-2: Frutos almacenados para evaluación de vida poscosecha.



almacenados a $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ en una estantería como se muestra en la Figura I-2. Siguiendo la metodología propuesta por Schuelter et al. (2002) los frutos fueron examinados tres veces por semana descartando aquellos comercialmente inaceptables por mostrar arrugamiento o excesivo ablandamiento. Se cosecharon también de cada planta seis frutos en estado rojo maduro a los cuales se les midió la firmeza con un durómetro manual tipo Shore A Durofel y el color con un cromámetro MINOLTA CR400, a través del porcentaje de reflectancia (L), variando desde 0 para negros a 100 para blancos y el cociente a/b, siendo “a” la absorbancia a longitudes de onda de 540 nm y “b” la absorbancia a longitudes de onda de 675 nm. Estos mismos frutos fueron cortados transversalmente determinando el número de lóculos (N° lóculos). Se obtuvo jugo a partir del pericarpio de frutos cosechados en estado rojo maduro y se evaluaron los siguientes caracteres: contenido en sólidos solubles (SS en

°Brix), medido con un refractómetro manual; acidez, medida a través del pH del jugo homogeneizado y de la acidez titulable (AT en gramos de ácido cítrico/100 gramos de jugo).

Análisis estadístico

Se evaluó para todas las variables medidas en ambos genotipos la distribución normal mediante la prueba propuesta por Shapiro y Wilk (1965). Se compararon los valores medios entre genotipos mediante una prueba *t Student (t)*. Cuando las variables no presentaron una distribución normal se realizó la prueba no paramétrica propuesta por Kruskal y Wallis (1952).

Extracción y cuantificación de ADN para secuenciación

Se extrajo ADN de hojas jóvenes utilizando un *Kit* comercial (Wizard® Genomic DNA Purification Kit from Promega®, Madison, WI, EEUU). La extracción de ADN se realizó a partir de 40 mg de tejido foliar homogeneizado con pilón en presencia de N₂ líquido hasta pulverizar por completo la muestra de tejido, momento en el cuál se adicionaron 600 µl de una solución de lisis nuclear provista en el *Kit* y se agitó durante 3 segundos. Posteriormente se procedió a incubar las muestras durante 15 minutos en un baño termostatzado a 65 °C. Para eliminar el ARN presente en las muestras se agregaron 3 µl de ARNasa y se incubaron a 37 °C por 15 minutos. Luego se eliminaron las proteínas al precipitarlas mediante una solución provista en el *Kit* y centrifugarlas a 13.000 rpm durante 3 minutos. El sobrenadante obtenido fue trasvasado a un tubo de 1,5 ml con 600 µl de isopropanol a temperatura ambiente y se agitó suavemente antes de centrifugar a 13.000 rpm durante 1 minuto. Posteriormente se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó con una solución de 70 % v/v de etanol. Finalmente se volvió a centrifugar a 13.000 rpm durante 1 minuto y el pellet obtenido se dejó secar a temperatura ambiente por 15 minutos para luego resuspenderlo en 100 µl de buffer TE (10 mM Tris pH 7,4 y 1 mM EDTA pH 8,0).

La cantidad y calidad de ADN extraído se evaluó en geles de agarosa al 1 % p/v teñidos con SYBR® Safe (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA, EEUU) por comparación con un estándar de ADN del fago *lambda* y mediante espectrofotometría.

Secuenciación y alineado de genomas

Para realizar la caracterización genómica de ambos progenitores se enviaron muestras de ADN (concentración 50 ng/ul) de cada genotipo al Centro de Acceso a la Tecnología del Genoma o GTAC (Universidad de Washington, Saint Louis, Missouri, EE.UU) para ser secuenciadas en una misma línea mediante un equipo Illumina HiSeq 2500. Se

utilizó la ecuación propuesta por Lander y Waterman (1988) para calcular la profundidad de cobertura esperada:

$$\text{Profundidad de Cobertura} = \frac{(\text{N}^\circ \text{ de Líneas} \times 150 \text{ millones Lecturas} \times 202 \text{ pb por Lectura})}{(\text{Tamaño del genoma en pb} \times \text{N}^\circ \text{ de Muestras})}$$

La secuencia completa de ambos genomas se logró a partir de fragmentos de 500 pares de bases (pb) de los cuales se obtuvieron lecturas apareadas de 101 pb comenzado por extremos opuestos de cada fragmento (2x101 *paired end reads*). Los archivos en formato *FASTQ* (formato de archivos con datos de secuenciación y calidad) obtenidos luego de la secuenciación fueron sometidos a evaluaciones de calidad mediante la versión 0.11.4 del programa *FASTQC* (Andrews 2010). Ambas secuencias obtenidas fueron alineadas respecto a la versión SL2.50 del genoma de referencia en tomate del cultivar Heinz 1706 (The Tomato Genome Consortium 2012), disponible en el sitio de Internet de la red de Solanáceas (https://solgenomics.net/organism/Solanum_lycopersicum/genome), mediante la herramienta *bowtie2* (Langmead y Salzberg 2012). Utilizando el paquete de herramientas *SAMtools* (Li et al. 2009) y *Picard* (<http://picard.sourceforge.net>) se organizaron, clasificaron, indexaron y convirtieron los archivos de secuencias al formato *BAM* (*Binary Alignment Map*, archivo que contiene la información de secuencia alineada en formato binario). Para evitar la detección de falsos *SNP* (*Single Nucleotide Polymorphism* o polimorfismos de nucleótido simple) se llevó a cabo un realineamiento localizado alrededor de inserciones o deleciones de gran tamaño mediante herramientas del programa *GATK* (McKenna et al. 2010; DePristo et al. 2011). La versión 2.0.2 del programa *Qualimap* (García-Alcalde et al. 2012) fue utilizada para analizar los archivos de secuencias tipo *BAM* obtenidos al finalizar el proceso de alineado de los genomas. Finalmente las listas de polimorfismos de tipo *SNP* e *InDel* (inserciones/deleciones) entre los dos genomas alineados a la misma referencia, fueron logradas mediante el uso de la herramienta “*HaplotypeCaller*” del programa *GATK* (McKenna et al. 2010; DePristo et al. 2011) obteniendo como resultado archivos de formato *VCF* (*Variant Call Format*, formato de archivos de texto utilizado para almacenar las variaciones detectadas en la comparación de secuencias).

Comparación de genomas completos

Para comparar de manera completa los dos genomas secuenciados, se calculó mediante un algoritmo de programación escrito en el lenguaje *Python* la densidad de *SNP*. El algoritmo utilizado permitió contar en archivos de formato *VCF*, que contienen los polimorfismos detectados, la cantidad de *SNP* cada 10 kilobases (kb) para cada uno de los

genomas alineados al mismo genoma de referencia. Para visualizar la densidad de *SNP* detectada respecto del genoma de referencia para cada genotipo a lo largo de todo genoma, se realizaron gráficos para cada cromosoma mediante el paquete “*ggplot2*” (Wickham 2009) del programa R (R Core Team 2014).

Análisis de la variabilidad genética

Para determinar la variabilidad existente entre los dos genotipos utilizados como progenitores del cruzamiento inicial de este trabajo y otros cultivares de tomate que cubren una amplia variabilidad genética, se llevó a cabo un análisis de conglomerados con datos genotípicos obtenidos a partir de una caracterización con polimorfismos de tipo *SNP*. Se seleccionaron un total de 35 cultivares de dos proyectos de re-secuenciación de genomas en tomate. Del proyecto de re-secuenciación de 150 genomas de tomate llevado a cabo por la Universidad y Centro de Investigación de Wageningen, Holanda, se seleccionaron 24 cultivares con el objetivo de cubrir toda la variabilidad genética encontrada en la sección *Lycopersicon* (The 100 Tomato Genome Sequencing Consortium 2014). Del proyecto de re-secuenciación de 360 genomas de tomate llevado a cabo por el Instituto de Genómica Agrícola de Shenzhen, China, se seleccionaron 11 genotipos clasificados como cultivares para consumo en fresco por Lin et al. (2014). Los cultivares Ailsa Craig, Rutgers y Marmande fueron utilizados como control, dado que los tres fueron secuenciados en ambos proyectos. En la Tabla I-1 se presenta una lista de los materiales seleccionados de los diferentes proyectos de secuenciación en la cual se detalla el nombre y la especie de cada cultivar, una clasificación por tipo de cultivar y por tamaño de fruto y la identificación proporcionada por los autores de cada proyecto de re-secuenciación de los cultivares secuenciados. La clasificación por tipo de cultivar y por tamaño de fruto se realizó a partir de los datos publicados de cada uno de los cultivares seleccionados. De esta manera se los clasificó según el tipo de cultivar en seis categorías: silvestre (genotipos que pertenecen a especies silvestres de tomate), cherry (cultivares con frutos de tamaño pequeño), criollo (cultivares no comerciales), tradicional (cultivares tradicionalmente comerciales), para procesado (cultivares modernos destinados al procesado) y consumo en fresco (cultivares modernos destinados al consumo en fresco). La clasificación por tamaño de fruto contó con tres categorías: pequeño, intermedio y grande. El navegador genómico JBROWSE 1.11.5 (Skinner et al. 2009) y el programa IGV 2.3 (Robinson et al. 2011) fueron usados para visualizar y contar los polimorfismos detectados entre los 35 cultivares seleccionados y los dos genotipos secuenciados en este trabajo respectivamente. Un total de 229 *SNP* localizados en regiones no codificantes a lo largo de todo el genoma fueron seleccionados para realizar la caracterización genotípica. Utilizando como referencia el mapa genético

EXPEN 2000 (Fulton et al. 2002) se logró una separación aproximada entre marcadores de 6 cM. La información genotípica generada fue utilizada para realizar un análisis de conglomerados con los 37 genotipos mediante el paquete estadístico “pvclust” (Suzuki y Shimodaira 2006) del programa R (R Core Team 2014) que permite llevar a cabo el método de re-muestreo denominado *bootstrapping* de múltiples escalas para calcular los valores de p de cada grupo obtenido como resultado de la agrupación jerárquica. El conglomerado jerárquico se llevó a cabo realizando 1.000 re-muestreos utilizando la medida de distancia “Manhattan” (distancia absoluta entre dos vectores) y el método de aglomeración “ward.D2”, el cuál implementa correctamente los criterios de agrupamiento planteados por Ward (1963) como lo demuestran Murtagh y Legendre (2014).

Tabla I-1: Genotipos seleccionados de diferentes proyectos de re-secuenciación. Número (N°), nombre y especie de cada cultivar, clasificación por tipo de cultivar y por tamaño de fruto e identificación de los cultivares secuenciados.

N°	Nombre del Cultivar	Especie	Tipo de Cultivar	Tamaño de Fruto	Identificación del Cultivar
1*	Alisa Craig	<i>S. lycopersicum</i>	Tradicional	Intermedio	N020212 / EA00240_EA01101
2*	Rutgers	<i>S. lycopersicum</i>	Tradicional	Grande	EA00465
3*	Galina	<i>S. lycopersicum</i>	Criollo	Intermedio	EA00325
4*	John's Big Orange	<i>S. lycopersicum</i>	Para procesado	Grande	EA00371
5*	Sonata	<i>S. lycopersicum</i>	Criollo	Intermedio	LYC 1969 / EA02724
6*	Cross Country	<i>S. lycopersicum</i>	Para procesado	Grande	LYC 3897_T 1662 / EA03701
7*	LYC3340	<i>S. lycopersicum</i>	Cherry	Pequeño	LYC 3340_T 1039 / EA03306
8*	LYC3153	<i>S. lycopersicum</i>	Para procesado	Grande	LYC 3153_T 825 / EA03221
9*	LYC3155	<i>S. lycopersicum</i>	Criollo	Grande	LYC 3155_T 828 / EA03222
10*	PI129097	<i>S. lycopersicum</i>	Cherry	Pequeño	PI 129097 / EA04710
11*	Polish Joe	<i>S. lycopersicum</i>	Criollo	Grande	EA00157
12*	Cal J TM VF	<i>S. lycopersicum</i>	Para procesado	Grande	CGN20815 / EA02054
13*	Anto	<i>S. lycopersicum</i>	Para procesado	Grande	V710092 / EA01835
14*	Belmonte	<i>S. lycopersicum</i>	Para procesado	Grande	SG 16 / EA00892
15*	PI311117	<i>S. lycopersicum</i>	Cherry	Pequeño	PI 311117 / EA05701
16*	LA0113	<i>S. lycopersicum</i>	Cherry	Pequeño	LA0113 / EA00526
17*	ES 58 Heinz	<i>S. lycopersicum</i>	Para procesado	Grande	LYC 1410 / EA02655
18*	Large Red Cherry	<i>S. lycopersicum</i>	Para procesado	Grande	TR00018
19*	Porter	<i>S. lycopersicum</i>	Para procesado	Intermedio	EA00940
20*	Dixy Golden Giant	<i>S. lycopersicum</i>	Criollo	Grande	TR00020
21*	Marmande VFA	<i>S. lycopersicum</i>	Tradicional	Grande	TR00022
22*	Thessaloniki	<i>S. lycopersicum</i>	Criollo	Grande	TR00023
23*	Watermelon Beefsteak	<i>S. lycopersicum</i>	Criollo	Grande	EA01640
24*	LA1479	<i>S. lycopersicum</i>	Cherry	Pequeño	LA1479 / TR00028
25**	Ailsa Craig	<i>S. lycopersicum</i>	Tradicional	Intermedio	LA2838A / TS-9
26**	N739	<i>S. lycopersicum</i>	Consumo en fresco	Grande	TS-74
27**	NC EBR-6	<i>S. lycopersicum</i>	Consumo en fresco	Grande	LA3846 / TS-121
28**	Rutgers	<i>S. lycopersicum</i>	Tradicional	Grande	LA1090 / TS-122
29**	Severianin	<i>S. lycopersicum</i>	Consumo en fresco	Grande	LA2413 / TS-130
30**	Marmande	<i>S. lycopersicum</i>	Tradicional	Grande	LA1504 / TS-163
31**	B-L-35	<i>S. lycopersicum</i>	Consumo en fresco	Intermedio	LA4347 / TS-185
32**	Prince Borghese	<i>S. lycopersicum</i>	Consumo en fresco	Intermedio	LA0089 / TS-206
33**	Flora Dade	<i>S. lycopersicum</i>	Consumo en fresco	Grande	LA3242 / TS-212
34**	Platense	<i>S. lycopersicum</i>	Consumo en fresco	Grande	LA3243 / TS-237
35**	Rio Grande	<i>S. lycopersicum</i>	Para procesado	Grande	LA3343 / TS-263#
36***	Caimanta	<i>S. lycopersicum</i>	Consumo en fresco	Grande	Caimanta
37***	LA722	<i>S. pimpinellifolium</i>	Silvestre	Pequeño	LA722

* Material del proyecto de re-secuenciación de 150 genomas (The 100 Tomato Genome Sequencing Consortium 2014)

** Material del proyecto de re-secuenciación de 360 genomas (Lin et al. 2014)

*** Material secuenciado en este trabajo

En negrita: genotipos progenitores

Con fondo gris: materiales utilizados como control

RESULTADOS

Caracterización fenotípica

En la Tabla I-2 se muestran los resultados obtenidos en la caracterización fenotípica del cultivar Caimanta y la accesión LA722 presentándose los valores medios y errores estándares para cada genotipo. Para todas las variables estudiadas hubo diferencias significativas entre los progenitores. Se diferenciaron claramente en características relacionadas con la forma y tamaño de los frutos y también en las que hacen a la calidad de los mismos, destacándose en este caso las diferencias existentes para el contenido de sólidos solubles y la acidez titulable.

Tabla I-2: Valor medio y error estándar de caracteres fenotípicos evaluados en el cultivar Caimanta y en la accesión LA722.

Variable ^y	Caimanta	LA722
Diámetro	7,42 ± 0,23 a	1,29 ± 0,03 b
Altura	5,31 ± 0,14 a	1,18 ± 0,02 b
Forma	0,72 ± 0,01 b	0,91 ± 0,01 a
Peso	163,54 ± 13,20 a	1,21 ± 0,06 b
VP	8,92 ± 0,59 b	11,08 ± 0,46 a
a/b	0,62 ± 0,05 b	1,36 ± 0,03 a
L	45,40 ± 1,48 a	38,72 ± 0,32 b
Nº Lóculos	7,89 ± 0,89 a	2,07 ± 0,05 b
Firmeza	51,91 ± 2,37 b	58,98 ± 0,93 a
SS	4,46 ± 0,18 b	7,52 ± 0,18 a
pH	4,69 ± 0,09 a	4,29 ± 0,05 b
AT	0,32 ± 0,01 b	1,02 ± 0,08 a

Letras diferentes indican diferencias significativas al 1% ($p < 0,01$).

^y Diámetro (cm); Altura (cm); Forma (altura/ diámetro); Peso (g); VP, Vida Poscosecha (días); a/b, relación entre absorbancia a 540 nm (a) y 675 nm (b); L, porcentaje de reflectancia; SS, sólidos solubles (°Brix); AT, acidez titulable (gramos de ácido cítrico/100 gramos de jugo).

Secuenciación y alineado de genomas

Teniendo en cuenta que el genoma del tomate tiene un tamaño aproximado de 900 Mb y que en este trabajo se secuenciaron las dos muestras en una misma línea con un secuenciador tipo Illumina HiSeq 2500 que genera 150 millones de lecturas por cada línea, se determinó utilizando la fórmula propuesta por Lander y Waterman (1988) una profundidad de cobertura esperada de 16,83x para cada genotipo.

Mediante la implementación de técnicas de secuenciación de última generación se obtuvieron 128.692.024 y 134.466.322 lecturas de 101 pb de longitud del genoma de Caimanta y de la accesión LA722 respectivamente. La profundidad de cobertura promedio obtenida luego del alineamiento contra el genoma de referencia fue de 16,43x para Caimanta y de 16,42x para LA722. Este cálculo incluyó la profundidad de cobertura obtenida para el denominado cromosoma 0, el cual está constituido principalmente por secuencias repetitivas que aún no se ha podido determinar a cuál de los doce cromosomas del genoma de referencia pertenecen. Por tal motivo, si consideramos solamente la profundidad de cobertura obtenida para los 12 cromosomas, el promedio de cobertura desciende a un 14,41x para Caimanta y a un 14,88x para LA722. En la Tabla I-3 se muestra la profundidad de cobertura y su correspondiente desvío estándar para los 12 cromosomas de cada genotipo y también para el cromosoma 0. En ambos casos la mayor profundidad de cobertura se obtuvo para el cromosoma 0, pero teniendo en cuenta solo los 12 cromosomas, la mayor profundidad de cobertura se obtuvo para los dos genomas en el cromosoma 1 y la menor en el 4.

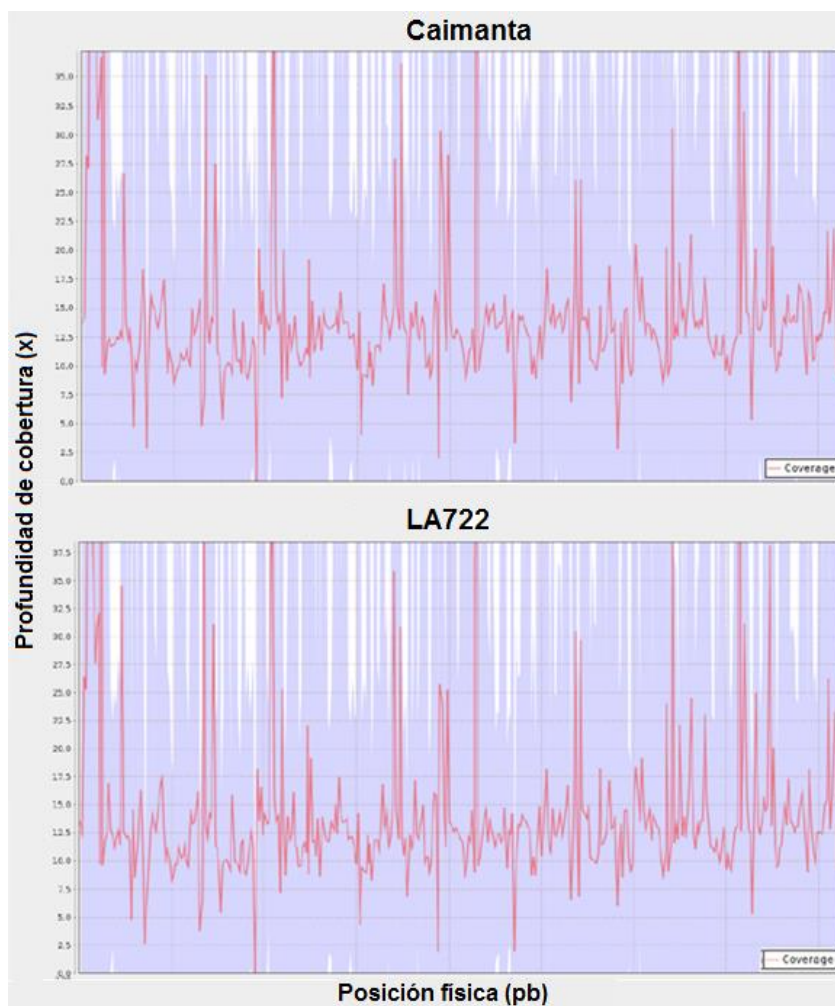
Tabla I-3: Profundidad de cobertura promedio y desvío estándar para cada cromosoma de Caimanta y LA722.

Cromosoma	CAIMANTA		LA722	
	Profundidad de Cobertura(x)	Desvío Estándar	Profundidad de Cobertura(x)	Desvío Estándar
0	40,73	731,06	34,86	483,96
1	21,04	422,97	25,19	606,51
2	12,57	121,75	13,30	203,30
3	13,48	194,48	13,81	269,39
4	12,49	95,60	12,23	124,93
5	13,91	206,93	13,46	276,23
6	14,37	366,99	14,57	590,91
7	13,89	484,48	13,31	512,63
8	13,91	116,17	13,69	156,91
9	12,66	84,04	12,98	113,89
10	14,07	121,35	14,53	189,07
11	16,36	184,36	17,28	250,49
12	14,14	87,15	14,26	124,48

En la Figura I-3 se presentan gráficos logrados con la versión 2.0.2 del programa Qualimap (García-Alcalde et al. 2012) de la profundidad de cobertura obtenida en función de

la posición física en pb respecto del genoma de referencia para cada genotipo.

Figura I-3: Profundidad de cobertura en función de la posición física en pares de base (pb) para Caimanta y LA722 respecto del genoma de referencia.



La visualización gráfica de la profundidad de cobertura de ambos genotipos permitió detectar regiones comunes de muy elevada y de muy baja profundidad de cobertura. Estas mismas regiones explican los elevados valores de desvío estándar de la profundidad de cobertura hallados para todos los cromosomas.

A partir del alineado de las secuencias de Caimanta y LA722 al mismo genoma de referencia, se pudo extraer una lista de polimorfismos detectados a nivel de ADN entre ambos genotipos la cual estuvo compuesta por 1.081.626 polimorfismos del tipo *SNP* y por 316.430 InDel distribuidos en los 12 cromosomas como se muestran en la Tabla I-4. En el cromosoma 7 fue donde se detectó el mayor número de *SNP* (131.624) mientras que el mayor número de InDel se encontró en el cromosoma 1 (40.493). El cromosoma 3 fue el que

presentó la menor cantidad de polimorfismos tanto de tipo *SNP* (44.480) como *InDel* (14.765).

Tabla I-4: Polimorfismo entre Caimanta de *S. lycopersicum* y la accesión LA722 de *S. pimpinellifolium* para cada cromosoma.

Cromosoma	<i>SNPs</i>	<i>InDels</i>	Polimorfismo Total
1	128.278	40.493	168.771
2	50.688	15.916	66.604
3	44.480	14.765	59.245
4	101.058	28.679	129.737
5	126.888	34.990	161.878
6	64.121	19.526	83.647
7	131.624	36.013	167.637
8	130.590	37.397	167.987
9	79.521	22.883	102.404
10	87.771	25.343	113.114
11	69.948	20.599	90.547
12	66.659	19.826	86.485
Total	1.081.626	316.430	1.398.056

Comparación de genomas completos

En la Figura I-4 se presentan los gráficos realizados para visualizar la densidad de *SNP* detectada respecto del genoma de referencia para cada genotipo para los 12 cromosomas. Estos gráficos proveen una visión integral del polimorfismo existente entre Caimanta y LA722 a partir de la comparación de ambos genomas respecto de la misma referencia. La accesión LA722 presentó un nivel mucho mayor de polimorfismo respecto al genoma de referencia a lo largo de todo el genoma que el detectado en el cultivar Caimanta dado que el genotipo utilizado como referencia fue el cultivar Heinz 1706 de *S. lycopersicum* L. Llamativamente dos grandes regiones con muy bajo nivel de polimorfismo fueron halladas en el inicio del cromosoma 2 y en la región central del cromosoma 3 de ambos genomas. El cultivar Caimanta presentó la mayor cantidad de polimorfismos respecto de la referencia en la base del cromosoma 2 y 4, en el comienzo del cromosoma 9 y 11 y a lo largo de casi todo el cromosoma 12. Si bien la cantidad de polimorfismo detectado en el cromosoma 12 no es tan grande como la cantidad encontrada en las otras regiones, lo que se evidencia en este caso son diferencias continuas a lo largo de todo el cromosoma.

Figura I-4: Cantidad de *SNP* detectados cada 10 kilobases (kb) para cada cromosoma respecto al genoma de referencia para el cultivar Caimanta y la accesión LA722.

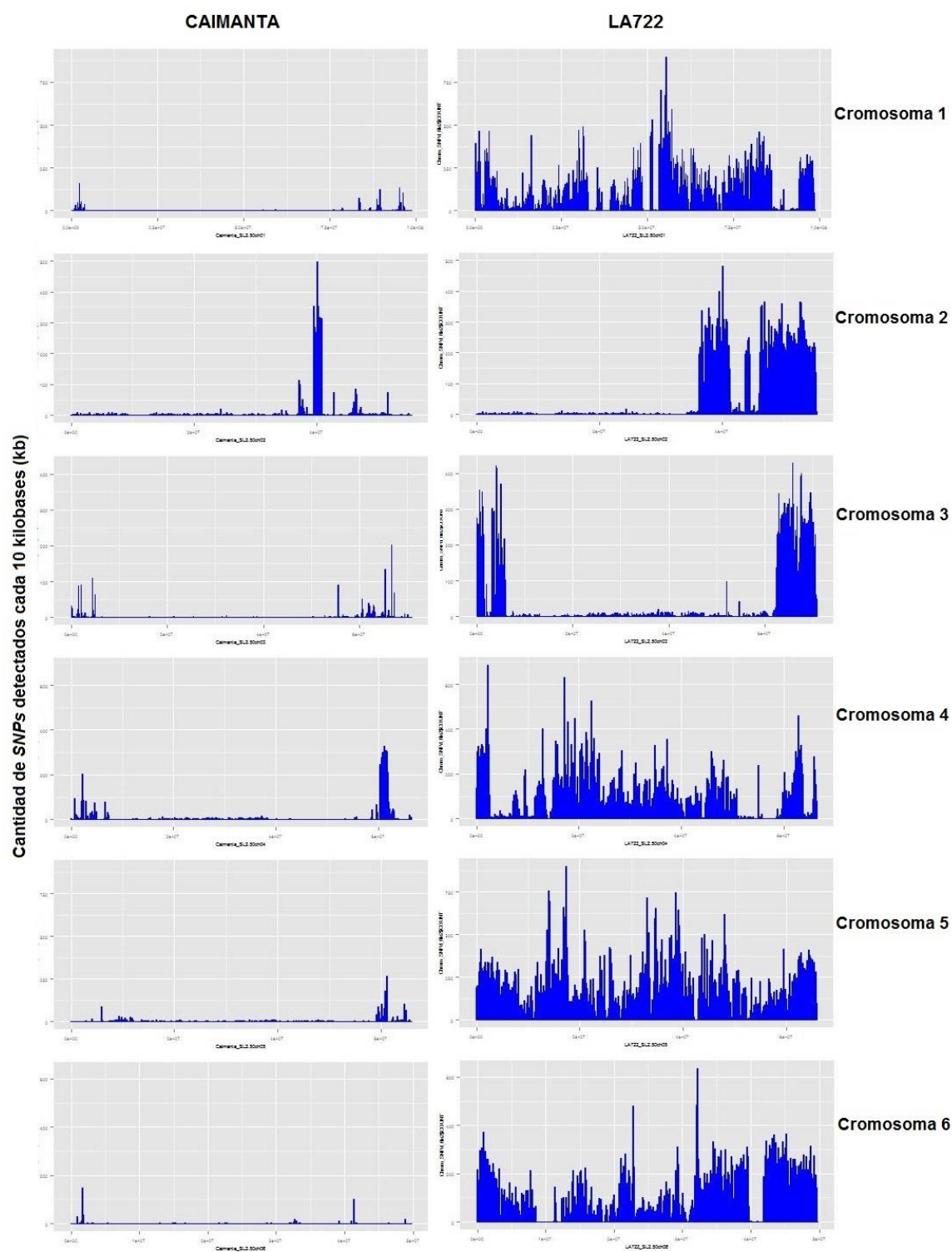
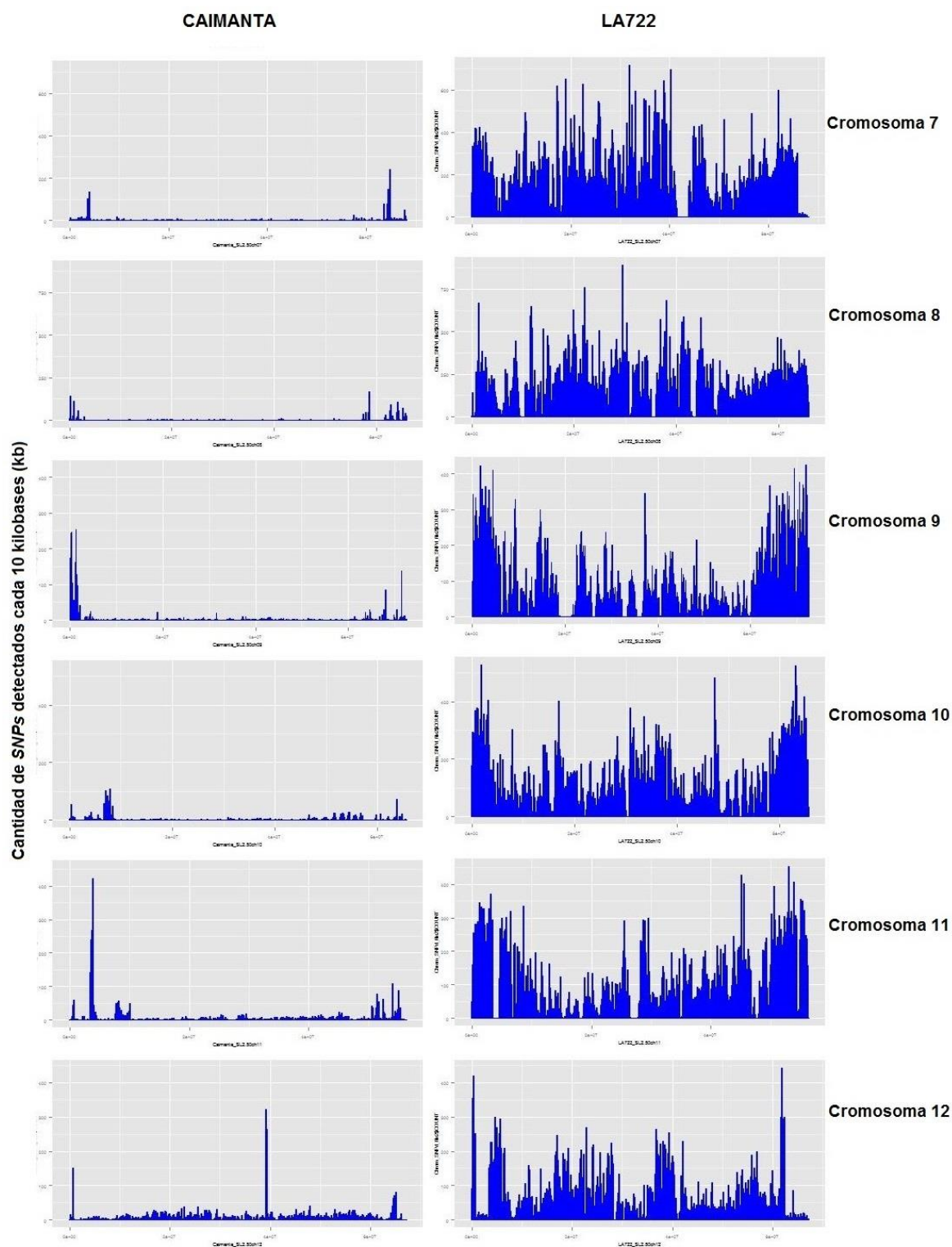


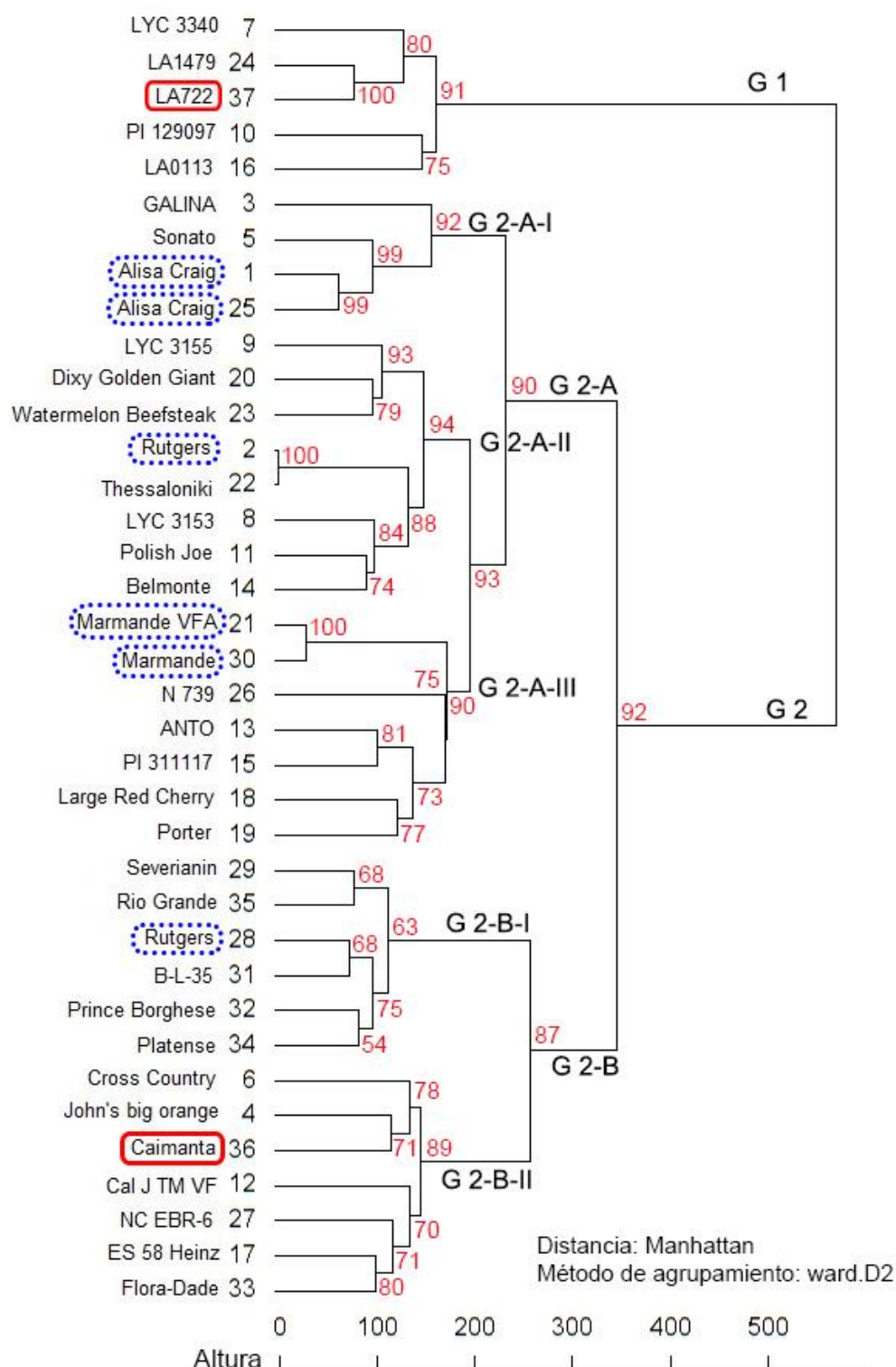
Figura I-4 (continuación): Cantidad de *SNP* detectados cada 10 kilobases (kb) para cada cromosoma respecto al genoma de referencia para el cultivar Caimanta y la accesión LA722.



Análisis de la variabilidad genética

En la Figura I-5 se presenta el dendrograma obtenido a partir del análisis de conglomerados, en el cual se resaltan en color rojo los valores de significancia (en porcentaje) obtenidos para cada agrupamiento una vez realizado el método de re-muestreo denominado *bootstrapping* de múltiples escalas. Se distinguen claramente dos grandes grupos denominados G1 y G2. En el G1 se agruparon las accesiones con tamaño de fruto pequeño junto con LA722 y en el G2 las de tamaño intermedio y grande junto con Caimanta. La accesión PI311117 fue la única con tamaño de fruto pequeño ubicada en el G2. Dentro del G2 se diferencian a su vez otros dos grupos, el G2-A y G2-B. Dentro del grupo G2-A se encuentran la mayor parte de los cultivares criollos y tradicionales de diferentes tamaños, mientras que en el G2-B se agruparon principalmente los cultivares modernos para procesado y para consumo en fresco con tamaño de fruto grande. El grupo G2-A quedó dividido en tres subgrupos: el G2-A-I que estuvo integrado por cultivares criollos y tradicionales de tamaño intermedio; el G2-A-II integrado por cultivares principalmente criollos y de tamaño grande y el G2-A-III que presentó cultivares de diferente tipo y tamaño. Dentro del grupo G2-B se diferenciaron dos subgrupos: el G2-B-I constituido casi exclusivamente por cultivares para consumo en fresco y el G2B-II que incluyó tanto cultivares modernos para procesado como para consumo en fresco. El cultivar Caimanta se ubicó en el grupo G2-B junto con el otro cultivar de origen argentino incluido en el análisis llamado Platense y más específicamente en el subgrupo G2-B-II junto con Flora Dade, resultado que concuerda con los datos presentados de la genealogía de Caimanta (Ver Figura I-1). Respecto de los tres cultivares (Alisa Craig, Rutgers y Marmande) utilizados como control entre los datos obtenidos de los dos proyectos de re-secuenciación, el cultivar Rutgers fue el único de los tres que presentó diferencias entre los dos orígenes distintos ubicándose uno en el subgrupo G2-A-II y el otro en el subgrupo G2-B-I.

Figura I-5: Distancias genéticas entre 37 genotipos de tomate, realizado con 229 *SNP* localizados en regiones no codificantes a lo largo de todo el genoma.



En color rojo se presentan los valores de significancia (en porcentaje) obtenidos para cada agrupamiento.

Con líneas punteadas de color azul se resaltan los cultivares utilizados como control.

Con líneas sólidas de color rojo se resaltan los genotipos progenitores.

DISCUSIÓN

Se evidenciaron diferencias significativas entre los progenitores para todos los caracteres fenotípicos analizados en concordancia con resultados obtenidos en trabajos previos (Rodríguez et al. 2006 a y b; Pratta et al. 2011 a y b; Pereira da Costa et al. 2013). Los valores medios de los caracteres morfológicos fueron semejantes a los informados en trabajos previos con los mismos genotipos, en cambio los valores medios de los caracteres de calidad de fruto presentaron algunas diferencias sobre todo para la vida poscosecha de los frutos, resaltando la importancia del factor ambiental en la determinación de estas características.

La fórmula propuesta por Lander y Waterman (1988) para calcular la profundidad de cobertura esperada permitió predecir con notable exactitud la profundidad de cobertura obtenida para cada genotipo secuenciado. Los elevados valores de desvío estándar obtenidos al calcular la profundidad de cobertura son semejantes en los dos genomas alineados. La Figura I-3 reveló que los sitios en los que se evidencian picos de muy elevada y de muy baja profundidad de cobertura son compartidos por ambos genomas, indicando que esto es causado por cuestiones inherentes al ensamblado del genoma de referencia y no a propias de los genomas alineados. Al inspeccionar puntualmente en ambos genomas las regiones de muy elevada y muy baja profundidad de cobertura mediante el programa IGV (*Integrative Genomics Viewer*; Robinson et al. 2011) se pudo evidenciar que las mismas se encuentran generalmente circundando grandes espacios de secuencia desconocida en el genoma de referencia.

Alinear los dos genomas secuenciados al mismo genoma de referencia permitió su posterior comparación. Dos grandes regiones ubicadas en el comienzo del cromosoma 2 y en la región central del cromosoma 3 presentaron un nivel muy bajo de polimorfismo evidenciando regiones genómicas compartidas entre los genomas de Caimanta, de LA722 y el de referencia. La repentina caída en el nivel de polimorfismo entre el genoma de referencia y el de la accesión LA722 indica una posible introgresión de un fragmento del genoma silvestre en el cultivado. Con la excepción de las mencionadas regiones del cromosoma 2 y 3, grandes niveles de polimorfismos fueron detectados entre el cultivar Caimanta y la accesión LA722 a lo largo de todo el genoma, brindando la posibilidad de desarrollar marcadores moleculares para caracterizar poblaciones segregantes obtenidas a partir del cruzamiento de estos genotipos.

La comparación entre el genoma del cultivar Caimanta y el de referencia permitió detectar regiones con altos niveles de polimorfismos entre dos genotipos cultivados de tomate. Si bien las regiones con mayores diferencias estuvieron localizadas en la base del

cromosoma 2 y 4 y en el comienzo del cromosoma 9 y 11, se destacaron las diferencias encontradas para el cromosoma 12 ya que aunque estas fueron de menor magnitud se presentaron de manera casi continua a lo largo de todo el cromosoma. Resultados similares fueron obtenidos por Sim et al. (2012b) al evaluar las diferencias entre genotipos cultivados de tomate agrupados en tres categorías: tradicionales, para consumo en fresco y para procesado.

La utilización como control en el análisis de conglomerados de tres cultivares tradicionales, que fueron secuenciados en los dos proyectos de re-secuenciación de genomas de tomate de donde se tomaron los datos genotípicos, permitió demostrar que en ciertas ocasiones cultivares que han sido registrados con el mismo nombre pueden presentar importantes diferencias genotípicas. Tal fue el caso del cultivar Rutgers que presentó un 28% de polimorfismo entre los materiales secuenciados bajo el mismo nombre en ambos proyectos para los 229 *SNP* analizados en este trabajo. Destacándose el porcentaje de polimorfismo detectado en los cromosomas 6, 10, 11 y 12 los cuales presentaron un 44%, 46%, 58% y 42% de polimorfismo respectivamente, mientras que los cromosomas 1 y 2 apenas mostraron un 3% y 5% de polimorfismo. Estos resultados resaltan la importancia de secuenciar los genotipos utilizados en programas de mejoramiento a pesar de la gran cantidad de información de secuencias públicas disponibles para cientos de cultivares de tomate.

Mediante el análisis de conglomerados se agrupó a la accesión LA722 junto con los cultivares de tamaño pequeño y al cultivar Caimanta junto con genotipos de tamaño grande y clasificados como materiales modernos. El agrupamiento por tamaño de fruto y por tipo de cultivar concuerda con los resultados obtenidos por Lin et al. (2014) y Blanca et al. (2015) en los cuales se postula que el tomate ha tenido un proceso de domesticación en dos etapas en el cual se fue incrementado el peso del fruto y luego un proceso de mejoramiento en el que se obtuvieron los cultivares modernos para consumo en fresco y para procesamiento industrial. Los cultivares criollos y los tradicionales presentan una menor variabilidad genética que los modernos, debido a que durante el proceso de mejoramiento de estos últimos se les fueron introgresando regiones provenientes de genotipos silvestres en la búsqueda de lograr resistencia a ciertas enfermedades (Blanca et al. 2015). La diferencia de variabilidad genética existente entre estos dos grupos se evidenció en el análisis de conglomerados al agruparse los cultivares criollos y tradicionales por un lado y los modernos por el otro. El cultivar Caimanta se ubicó dentro del grupo de los cultivares modernos junto con el cultivar Flora Dade confirmando de esta manera la información brindada en la genealogía de Caimanta. En función de la ubicación en el análisis de conglomerados del

cultivar Caimanta y de la accesión LA722 podemos decir que al realizar el cruzamiento entre estos dos materiales se está abarcando una gran parte de la variabilidad genética disponible en tomate y que la misma se evidenciará en poblaciones segregantes derivadas de este cruzamiento. Por lo tanto, a partir de las diferencias fenotípicas y genómicas encontradas entre estos dos genotipos, sumado a la factibilidad del desarrollo de marcadores moleculares a partir de los datos de la secuenciación, resulta viable el desarrollo de poblaciones segregantes para la construcción de un mapa de ligamiento genético y la posterior detección de regiones genómicas asociadas a la determinación de las características fenotípicas evaluadas.

CONCLUSIONES PARCIALES

Se detectaron diferencias significativas para todos los caracteres fenotípicos evaluados entre Caimanta y LA722. A nivel genómico se evidenció un elevado polimorfismo genético a lo largo de casi todo el genoma.

El polimorfismo genómico entre Caimanta y LA722 representa gran parte de la variabilidad genética disponible en el cultivo de tomate.

CAPÍTULO II

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y ESTIMACIÓN DE EFECTOS RECÍPROCOS EN GENERACIONES F_1 Y F_2

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar fenotípicamente caracteres de calidad en los frutos en distintas generaciones del cruzamiento entre el cultivar Caimanta de *S. lycopersicum* L. y la accesión LA722 de la especie silvestre *S. pimpinellifolium* L.
- Estimar efectos recíprocos para caracteres de calidad de fruto en los híbridos F_1 y las generaciones segregantes F_2 en los que se invirtió la función sexual (macho o hembra) de los progenitores.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Mediante cruzamientos manuales (Rick 1973) entre el cultivar Caimanta (C) y la accesión silvestre LA722 (P) se obtuvo el genotipo híbrido (CxP) y su recíproco (PxC), siendo la primera letra la correspondiente al progenitor femenino. Por autofecundación de cada híbrido se lograron las generaciones segregantes F_2 (F_2 CxP y F_2 PxC). Durante el mismo ciclo se cultivaron bajo invernadero y siguiendo un diseño completamente aleatorizado, 10 plantas de cada genotipo progenitor como testigos del ensayo, 10 plantas de cada generación F_1 y 120 de cada población F_2 . La siembra, trasplante y mantenimiento de las plantas se realizó de la misma manera que se describió en los materiales y métodos del Capítulo I.

Figura II-1: Forma de conducción de los ensayos bajo invernadero.



Caracterización fenotípica

De cada planta F_1 y F_2 se cosecharon diez frutos en estado pintón y al menos seis en estado rojo maduro para realizar las determinaciones de las características fenotípicas que fueron descritas en el Capítulo I para los genotipos progenitores. En total se cosecharon cerca de 5.200 para poder llevar a cabo la caracterización fenotípica de ambas generaciones F_1 y F_2 .

Análisis estadístico

En las plantas F_1 se probó la distribución normal mediante la prueba propuesta por Shapiro y Wilk (1965) y se compararon los valores medios entre genotipos mediante una prueba *t Student* (*t*). Cuando las variables no presentaron una distribución normal se realizó la prueba no paramétrica propuesta por Kruskal y Wallis (1952). Se estableció que hubo efectos recíprocos cuando hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los valores medios de los genotipos híbridos.

En las poblaciones F_2 se probó la normalidad de todos los caracteres y luego se compararon los valores medios mediante una prueba *t*. Para determinar la presencia de efectos recíprocos se realizó un gráfico de distribución de frecuencias para cada una de las variables y se compararon las distribuciones de cada F_2 mediante la prueba de

homogeneidad del Chi-cuadrado. Para verificar si la segregación fenotípica en F_2 se debía a componentes genéticos, se calculó mediante un análisis de la variancia el Grado de Determinación Genética (GDG) para todos los caracteres evaluados en cada generación F_2 (Mariotti y Collavino 2014).

RESULTADOS

Caracterización fenotípica

En la Tabla II-1 se muestran los valores medios y errores estándares para ambas generaciones F_1 . Se encontraron efectos recíprocos en los caracteres diámetro, altura, peso, vida poscosecha, parámetro L de color, pH y acidez titulable. Por el contrario, para los caracteres forma, cociente a/b de color, N° de lóculos, firmeza y sólidos solubles no hubo efectos recíprocos.

Tabla II-1: Valor medio y error estándar para caracteres fenotípicos evaluados en las generaciones F_1 recíprocas obtenidas del cruzamiento entre Caimanta (C) y LA722 (P).

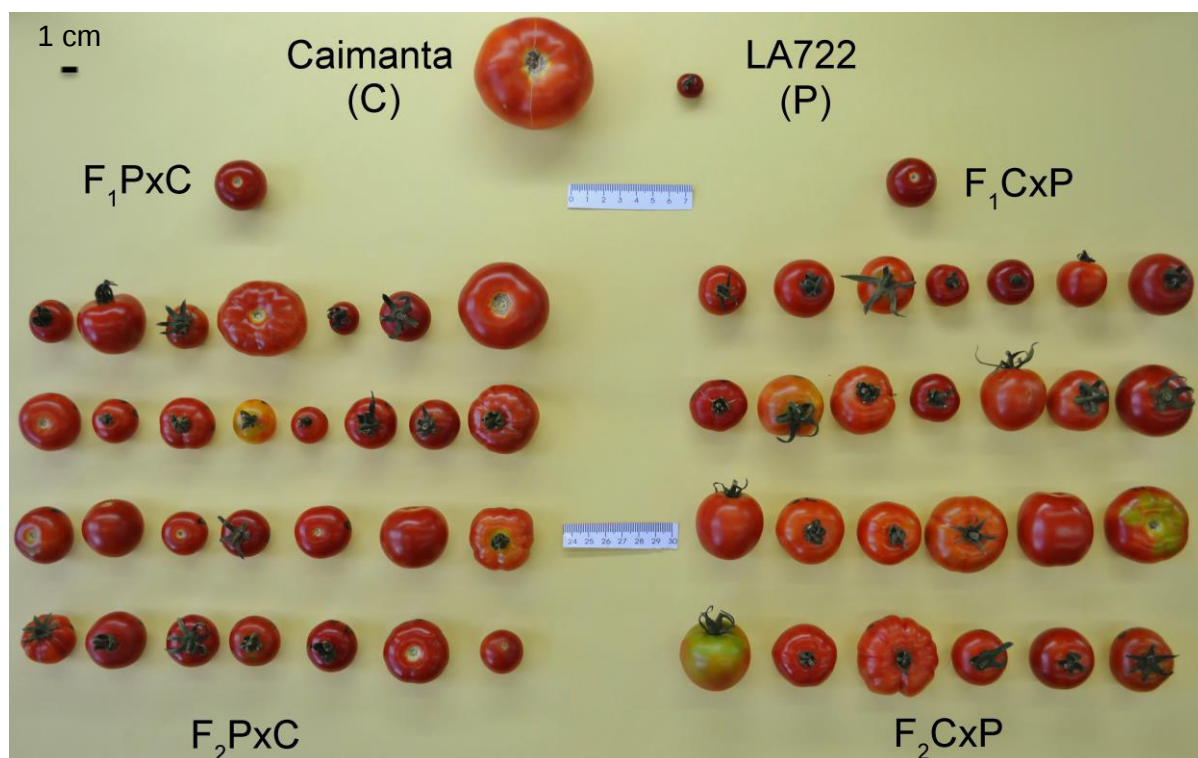
Variable ^y	F_1 CxP	F_1 PxC
Diámetro	2,84 ± 0,04 a	2,55 ± 0,04 b
Altura	2,49 ± 0,03 a	2,20 ± 0,04 b
Forma	0,88 ± 0,01 a	0,87 ± 0,01 a
Peso	11,99 ± 0,37 a	9,10 ± 0,36 b
VP	12,53 ± 0,81 a	9,10 ± 0,38 b
a/b	1,37 ± 0,01 a	1,41 ± 0,03 a
L	36,91 ± 0,18 b	37,89 ± 0,20 a
N° Lóculos	2,25 ± 0,05 a	2,53 ± 0,09 a
Firmeza	43,27 ± 0,64 a	46,32 ± 3,25 a
SS	6,43 ± 0,13 a	6,28 ± 0,35 a
^z pH	4,29 ± 0,03 a	4,16 ± 0,05 b
^z AT	0,67 ± 0,03 b	0,95 ± 0,09 a

^y Diámetro (cm); Altura (cm); Forma (altura/ diámetro); Peso (g); VP, Vida Poscosecha (días); a/b, relación entre absorbancia a 540 nm (a) y 675 nm (b); L, porcentaje de reflectancia; SS, sólidos solubles (°Brix); AT, acidez titulable (gramos de ácido cítrico/100 gramos de jugo).

Letras diferentes indican diferencias significativas al 1%. ^z Letras diferentes indican diferencias significativas al 5%.

En la Figura II-2 se presentan frutos maduros representativos de los progenitores, los híbridos recíprocos y las poblaciones F_2 recíprocas en la que se puede evidenciar la segregación fenotípica existente en ambas poblaciones tanto para caracteres de color como de tamaño y forma.

Figura II-2: Frutos representativos de Caimanta (C), LA722 (P) y de las F_1 y F_2 recíprocas.



En la Tabla II-2 se detallan para cada población F_2 los valores medios con sus desvíos estándares (DS), la variancia genética (σ^2G), variancia fenotípica (σ^2F) y el GDG para cada carácter. Para todos los caracteres y en ambas poblaciones se encontraron valores de GDG significativos ($p < 0,01$).

Tabla II-2. Valores medios, desvíos estándares (DS), variancia genética (σ^2G), variancia fenotípica (σ^2F) y el GDG para cada carácter.

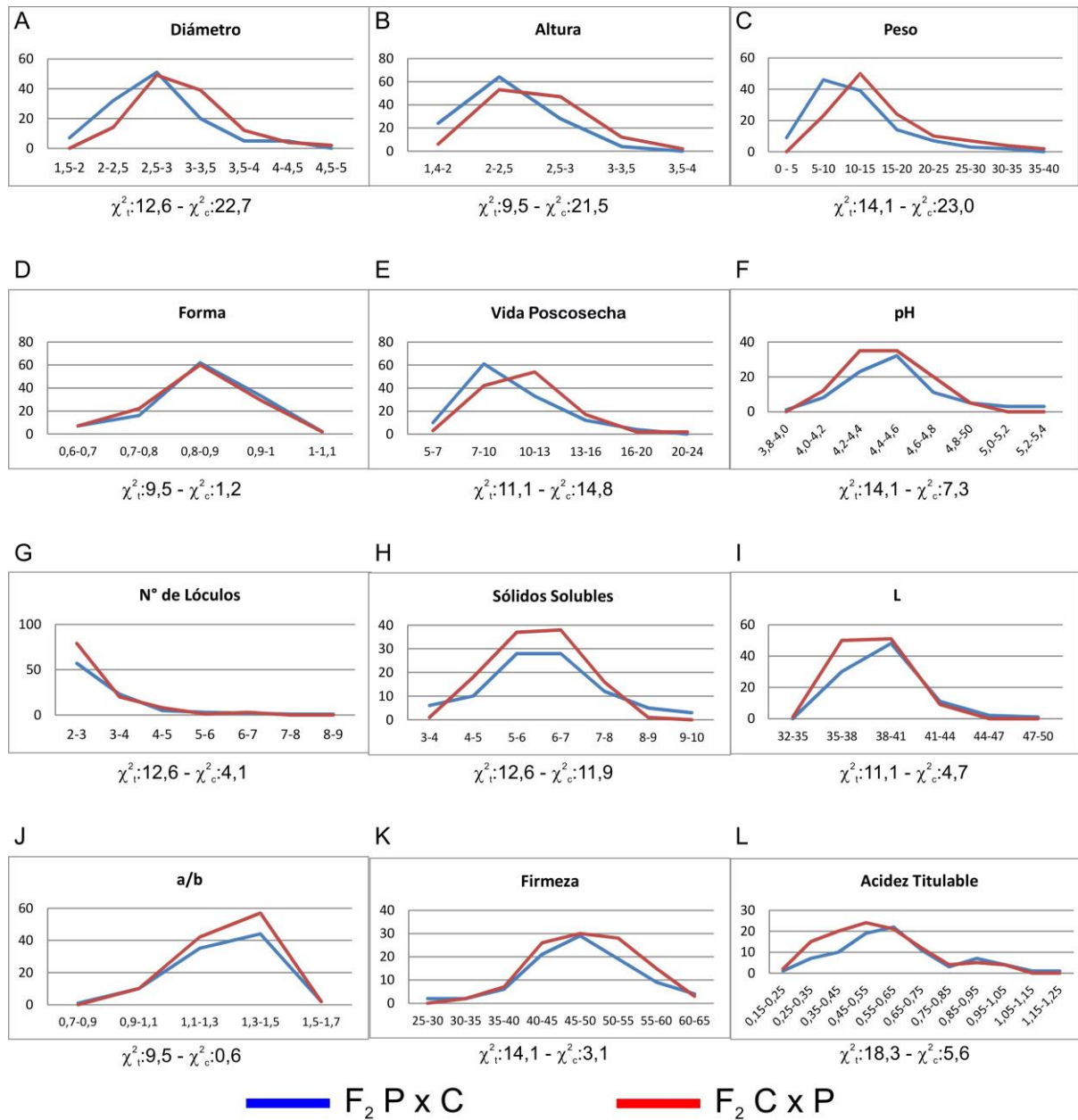
Variable ^y	Población F ₂ CxP ^z				Población F ₂ PxP			
	Media ± DS	$\sigma^2 G$	$\sigma^2 F$	GDG	Media ± DS	$\sigma^2 G$	$\sigma^2 F$	GDG
Diámetro	3,06 ± 0,49	0,22	0,49	0,45	2,75 ± 0,54	0,11	0,25	0,44
Altura	2,57 ± 0,37	0,12	0,29	0,41	2,32 ± 0,35	0,26	0,50	0,52
Forma	0,85 ± 0,09	0,005	0,008	0,62	0,86 ± 0,10	0,006	0,01	0,60
Peso	15,41 ± 6,78	40,83	103,67	0,39	11,70 ± 6,05	33,36	76,57	0,44
VP	11,00 ± 2,62	4,79	15,11	0,32	10,08 ± 2,54	5,71	14,06	0,41
a/b	1,29 ± 0,12	0,01	0,02	0,50	1,28 ± 0,15	0,02	0,03	0,67
L	38,36 ± 1,80	2,95	4,35	0,68	39,08 ± 2,15	4,08	6,56	0,62
Nº Lóculos	2,84 ± 0,98	0,91	1,24	0,73	3,15 ± 1,25	1,42	1,90	0,75
Firmeza	48,48 ± 6,37	35,53	60,38	0,59	47,51 ± 7,01	40,68	70,43	0,58
SS	6,00 ± 0,96	0,89	1,08	0,82	6,14 ± 1,34	1,73	1,91	0,91
pH	4,45 ± 0,20	0,03	0,05	0,61	4,49 ± 0,28	0,06	0,07	0,86
AT	0,54 ± 0,19	0,03	0,04	0,76	0,60 ± 0,20	0,03	0,04	0,77

^y Diámetro (cm); Altura (cm); Forma (altura/ diámetro); Peso (g); VP, Vida Poscosecha (días); a/b, relación entre absorbancia a 540 nm (a) y 675 nm (b); L, porcentaje de reflectancia; SS, sólidos solubles (°Brix); AT, acidez titulable (gramos de ácido cítrico/100 gramos de jugo).

^z C, cultivar Caimanta de *Solanum lycopersium* L. ; P, accesión LA722 de *S. pimpinellifolium* L.

En la Figura II-3 (de la A a la L) se muestran los gráficos de distribución de frecuencias en cada generación segregante F₂. En cada figura se muestran los valores de Chi-cuadrado calculado (χ^2_c) y tabulado (χ^2_t) siendo estas distribuciones significativamente diferentes ($p < 0,05$) cuando el χ^2_t es menor al χ^2_c . Del análisis de las distribuciones de frecuencias de las F₂ se detectó la presencia de efecto recíproco para los caracteres diámetro, altura, peso y vida poscosecha de los frutos. Para los valores medios de estos caracteres se encontraron también diferencias significativas ($p < 0,01$) (Figura II-3 A, B, C y E). Los caracteres firmeza, pH, acidez titulable, sólidos solubles, Nº de lóculos, forma de fruto, el parámetro L y el cociente a/b de color no presentaron efectos recíprocos en las generaciones F₂.

Figura II-3: Distribución de frecuencias en generaciones F₂ para cada carácter evaluado (de A a L) y valor de Chi-cuadrado calculado (χ^2_c) y tabulado (χ^2_t).



Diámetro (cm); Altura (cm); Peso (g); Forma (altura/diámetro); Vida Poscosecha (días); Sólidos solubles (°Brix); L, porcentaje de reflectancia; a/b, relación entre absorbancia a 540 nm (a) y 675 nm (b); Acidez Titulable (gramos de ácido cítrico/100 gramos de jugo).

C, cultivar Caimanta de *Solanum lycopersium* L.; P, accesión LA722 de *S. pimpinellifolium* L.

DISCUSIÓN

Para todos los caracteres y en las dos poblaciones F_2 se verificó que la segregación fenotípica observada se debe en gran medida a componentes genéticos.

Para el parámetro L de color del fruto y los caracteres pH y acidez titulable no se detectaron efectos recíprocos a nivel de la generación F_2 a pesar de haberse encontrado en las generaciones F_1 . A nivel de F_2 se sugieren efectos de la interacción núcleo – citoplasmática, ya que al evaluar los genotipos de la F_2 la información fenotípica relevada puede estar siendo afectada por la interacción particular de cada genotipo con su citoplasma, siendo entonces difícil discriminar el efecto de esta interacción con el de la segregación genotípica de la F_2 . En cambio cuando se analizan los híbridos F_1 todas las plantas evaluadas comparten el mismo genotipo nuclear lo que permite discriminar más fácilmente el efecto del citoplasma. También se debe considerar que en estos casos los efectos causados por impronta genética pueden ser los causantes de las diferencias encontradas.

El cociente a/b de color, la forma, el N° de lóculos, el contenido de sólidos solubles y la firmeza de los frutos no mostraron efectos recíprocos en ninguna de las generaciones evaluadas, confirmando la ausencia de efectos recíprocos en la determinación de estos caracteres.

En cuanto a la vida poscosecha, el diámetro, la altura y el peso de los frutos se encontraron efectos recíprocos significativos en todas las generaciones evaluadas. La estabilidad de los efectos encontrados indica una importante influencia del citoplasma en la determinación de estos caracteres. La presencia de interacciones epistáticas cito-nucleares significativas fueron informadas en maíz para caracteres cuantitativos como altura de planta y largo de espiga (Tang et al. 2013) en coincidencia con lo observado en este estudio. La presencia del citoplasma proveniente del genotipo cultivado incrementó los valores para estos tres caracteres del fruto. En cuanto a la vida poscosecha y contrariamente a lo manifestado en el genotipo cultivado utilizado como progenitor, los híbridos y las plantas F_2 que portaban el citoplasma cultivado mostraron un aumento de la vida poscosecha de los frutos. Es importante destacar que si bien los genes nucleares aportados por la especie silvestre incrementan el valor medio para este carácter, el citoplasma cultivado produce un sinergismo positivo sobre el mismo. De este modo, resulta importante destacar la interacción positiva manifestada tanto en los híbridos como en la población F_2 con el citoplasma cultivado en cuanto al carácter vida poscosecha.

La existencia de efectos recíprocos en la determinación de caracteres de calidad del fruto en las generaciones F_1 y F_2 de este contexto genético pone de manifiesto la necesidad

de considerar el aporte de la herencia parental al momento de planear cruzamientos en programas de mejoramiento.

CONCLUSIONES PARCIALES

Se detectó un importante componente de variancia genética para todos los caracteres de calidad de frutos evaluados en las generaciones segregantes derivadas del cruzamiento recíproco entre Caimanta y LA722.

Se demostró la existencia de efectos recíprocos en la determinación de algunos caracteres de calidad de fruto en tomate, tales como diámetro, altura, peso y vida poscosecha en las generaciones F_1 y F_2 del cruzamiento evaluado.

CAPÍTULO III

CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA CON MARCADORES MOLECULARES DE ADN PARA LA CONSTRUCCIÓN DE MAPAS DE LIGAMIENTO GENÉTICO EN POBLACIONES F₂

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar los genotipos uniformes (progenitores y F_1) y las generaciones F_2 con marcadores moleculares de ADN.
- Construir un mapa de ligamiento para cada población F_2 obtenida por autofecundación de los híbridos recíprocos entre Caimanta y LA722.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se seleccionaron para la caracterización molecular 94 plantas de cada F_2 para facilitar y hacer más eficiente el uso de equipamiento del laboratorio. Solo se seleccionaron plantas F_2 que tuviesen datos para todos los valores fenotípicos analizados en el Capítulo II.

Extracción y cuantificación de ADN

Tanto las extracciones de ADN de cada una de las plantas evaluadas como la determinación de la cantidad y calidad de ADN extraído se llevaron a cabo de la misma manera que se detalló en el Capítulo I para las muestras de ADN que fueron secuenciadas.

Caracterización molecular

Se utilizó el mismo protocolo de preparado de muestras y de amplificación en todas las reacciones de *PCR* (*Polymerase Chain Reaction* o reacción en cadena de la polimerasa) realizadas durante la caracterización molecular con todos los diferentes tipos de marcadores de ADN usados. Cada muestra consistió en 40 ng de ADN genómico, 2,5 mM de dNTPs, 40 mM de cloruro de magnesio ($MgCl_2$), 10 μM de cada cebador, 2 μl 10X de Taq *buffer* (50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl pH 8.3) y 2 unidades de Taq polimerasa.

El protocolo de amplificación utilizado fue el que se detalla a continuación:

- Desnaturalización del ADN: 1 minuto a 94 °C
- Gradiente térmico de amplificación constituido por siete ciclos con diferente temperatura de hibridación: desnaturalización del ADN 30 segundos a 94 °C, hibridación 30 segundos a 58 °C – 52 °C (disminuyendo de a 1°C por ciclo) y extensión dos minutos a 72 °C.
- 30 ciclos de amplificación: desnaturalización del ADN 30 segundos a 94 °C, hibridación 30 segundos a 52 °C y extensión dos minutos a 72 °C.
- Elongación: 5 minutos a 72 °C.

La caracterización molecular de las generaciones F_2 se llevó a cabo utilizando:

1) Marcadores de ADN previamente desarrollados y disponibles públicamente para el cultivo de tomate.

2) Marcadores del tipo InDel desarrollados a partir de la lista de polimorfismos publicada luego de la comparación del genoma completo del cultivar Heinz 1706 de *S. lycopersicum* L. y la accesión LA1589 de la especie *S. pimpinellifolium* L. (The Tomato Genome Consortium 2012)

3) Marcadores del tipo InDel y CAPS desarrollados a partir de la comparación de los datos obtenidos de la secuenciación de genoma completo del cultivar Caimanta de *S. lycopersicum* L. y de la accesión LA722 de *S. pimpinellifolium* L.

A todos los marcadores moleculares que amplificaron de manera correcta se les evaluó mediante el programa R (R Core Team 2014) la segregación obtenida luego de realizar la caracterización molecular de cada población F₂.

1) Caracterización con marcadores moleculares disponibles:

La caracterización molecular se comenzó con 26 marcadores del tipo *SSR* (*Simple Sequence Repeat* o repetición de secuencia simple) disponibles en <http://www.solgenomics.net> que fueron previamente seleccionados por ser polimórficos entre Caimanta y LA722 (Pereira da Costa et al. 2013). En la Tabla III-1 se detalla la ubicación cromosómica, la posición física en la versión SL2.50 del ensamblado del genoma de referencia en tomate, la secuencia de los cebadores y el tamaño de los alelos cultivados y silvestres de cada uno de los *SSR* disponibles. Además se utilizaron cuatro marcadores funcionales: dos para peso de fruto *FW2.2* (Blanca et al. 2015) y *FW3.2* (Chakrabarti et al. 2013) y dos para el número de lóculos y la forma de frutos *LC* (Muños et al. 2011) y *FAS* (Rodríguez et al. 2011). En la Tabla III-2 se presenta la posición física en la versión SL2.50 del ensamblado del genoma de referencia en tomate, la información de secuencia de los cebadores, la enzima de restricción y el tamaño de los alelos cultivados y silvestres para los cuatro marcadores funcionales utilizados en la caracterización molecular de las poblaciones F₂.

Tabla III-1: SSR (*Simple Sequence Repeat*) utilizados en la caracterización molecular. Ubicación cromosómica, posición física, secuencia de cebadores y tamaño de los alelos.

Cr	Marcador	Posicion Fisica	Secuencia de cebadores (5'-3')	Tamaño alelo cultivado (pb)	Tamaño alelo silvestre (pb)
1	SSR095	SL2.50ch01:77.706.795	F: CCACATAACTAAGCCCACAACCTT R: AGGGATTGCTTGTGGATTG	229	242
	SSR220060	SL2.50ch01:81.703.670	F: CCTTCTGACAGAGATTGCGT R: ACATCTGGGAAAGCAACTGG	142	132
	SSR009	SL2.50ch01:93.020.940	F: CCCTTTGCAAGTTCTTCTTCA R: CCTCCTATGTTGGCTCATGAA	168	150
	SSR288	SL2.50ch01:96.929.367	F: TCTTCATCGTCCTCCTCCTG R: GGGTTAACAATTCCACGA	275	270
2	SSR295	SL2.50ch02:37.913.549	F: CTCCAGAAGGAATCGATGC R: GTGGCAGGTGAAAGGAATTG	204	224
	SSR032	SL2.50ch02:45.859.621	F: TGGAAAGAAGCAGTAGCATTG R: AGAACGGAGGATGTTCTGTTG	186	194
3	SSR320	SL2.50ch03:69.163.650	F: ATGAGGCAATCTTCACCTGG R: CGCAGGAATATCAGCTGAA	165	159
	SSR014	SL2.50ch03:69.761.765	F: CTGGATTGCCTGGTTGATTT R: CTTGCTTCACCAGATGCAGA	166	174
5	SSR115	SL2.50ch05:2.732.360	F: CACCCTTTATTCAGATTCCTCT R: GGCTGTTGCATACCCTCAAT	200	210
	SSR162	SL2.50ch05:65.471.674	F: TCTCTCTACAAGTGGAACCTTCTC R: ATCCTTGTTCTGGCTGTTG	260	264
6	SSR211044	SL2.50ch06:1.000.251	F: AGCAGGGTAAGTCTCCAGCA R: CACAGACACCAATGGTCTTG	209	203
	SSR128	SL2.50ch06:37.635.715	F: GGTCCAGTTCAATCAACCGA R: CGAACCATGAGACGACTTCA	139	147
7	SSR286	SL2.50ch07:1.876.222	F: AGCTATGGAGTTTCAGGACCA R: GCGTTCATGCTACCTGAAT	120	130
	SSR276	SL2.50ch07:7.397.050	F: CGACGGAGTACTTCGCATTT R: AATGTTCACTCTTGCCGGAG	160	194
	SSR045	SL2.50ch07:65.008.071	F: TCCAAGTATCAGGCACACCA R: CATTGGTCCACCAGGATACA	158	167
8	SSR327	SL2.50ch08:52.580.462	F: TCAGGATCAGGAGCAGGAGT R: GGGTTCATGGAACAAGTCCA	180	186
	SSR038	SL2.50ch08:61.433.851	F: GTTCTATAGCTGAACTCAACCTG R: TGATGGTAGATTTGATGAACCC	215	223
9	SSR069	SL2.50ch09:3.545.307	F: GCATTTGATAGAAGGCCAGC R: CAACAGGAATAATACAGCCAA	146	164
	SSR070	SL2.50ch09:3.628.940	F: TTTAGGGTGTCTGTGGGTCC R: CTCTATCCTCTGCGCACTCC	136	128
	SSR110	SL2.50ch09:64.265.356	F: CTCTGCAATGTGTGTATGG R: CACCTGAAGTTTGACGTTACA	170	180
10	SSR596	SL2.50ch10:2.831.041	F: TTCGGATAAAGCAATCCACC R: GGACGTTGGTACACAATCGA	184	190
	SSR318	SL2.50ch10:56.819.742	F: CTAACCGAACTCATCAAGGG R: GCGAATGCAATATCCTCTGC	276	290
11	SSR080	SL2.50ch11:2.274.318	F: ATGGTCATGTTCTTGATTATCA R: CCAATCCTTTGACATTTGCC	167	170
	SSRG036	SL2.50ch11:54.409.537	F: TGAATGAGCAAGTTAAACAGTAAGG R: CATTTTACACATCTTCAGTTTAAACA	140	150
	SSR1061	SL2.50ch11:55.169.932	F: GTTCCTACGTAAGATTCATG R: CTGCATGGAACACTAACCTGA	222	229
12	SSRH301	SL2.50ch12:63.555.677	F: TGTTTCATATCTTTGATGGCATGT R: GTGAGCCAAACAAAACAGCA	190	183

Cr: Cromosoma; F: cebador directo, R: cebador reverso; pb: tamaño en pares de base

Tabla III-2: Marcadores funcionales utilizados en la caracterización molecular. Posición física, secuencia de cebadores, enzima de restricción y tamaño de alelos.

Gen	Posición Física	Secuencia de cebadores (5' to 3')	Enzima de Restricción	Tamaño alelo cultivado (pb)	Tamaño alelo silvestre (pb)
^a FW2.2*	SL2.50ch02:52.251.863	F: CATATAAAGTGTACTGACCGTCA R: CTGTCCTATTCAAGAGGTAATGAG	<i>Tsp</i> 45I	168	149
^b FW3.2*	SL2.50ch03:64.798.921	F: AAAGTCGAATAAATTAGATGAACCTGA R: ATTGGGTCTCTCCTCGCTCT	<i>Hpy</i> 188I	326	304
^c LC*	SL2.50ch02:47.188.272	F: GCCGAACACATCAACATTTTC R: CCTTTTCCTAAAAGATTTGGCATGAAG	<i>Hin</i> dIII	260	235
^d FAS**	SL2.50ch11:54.877.107	F ₁ : CCAATGATAATTAAGATATTGTGACG F ₂ : ATGGTGGGGTTTTCTGTTCA R: CAGAAATCAGAGTCCAATTCCA	-	466	335

F: cebador directo; R: cebador reverso.

F₁: cebador directo en presencia de la inversión; F₂: cebador directo en ausencia de la inversión.

^a: Blanca et al. 2015; ^b: Chakrabarti et al. 2013; ^c: Muños et al. 2011; ^d: Rodríguez et al. 2011.

En el caso de los SSR la separación de los fragmentos de amplificación se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 6% p/v realizando corridas electroforéticas de 3 horas a 50 W constantes. Debido a la diferencia de tamaño existentes entre los marcadores, se los pudo seleccionar de manera tal de sembrar dos marcadores con un desfase de una hora entre siembras en un mismo gel para evitar superposiciones y poder analizar ambos marcadores simultáneamente. La visualización se realizó a través de tinción con nitrato de plata (AgNO₃) procediendo de la siguiente manera: en primer lugar se realizó un proceso de fijación que consistió en 30 minutos en agitación en 1,5 litros de una solución de ácido acético al 10 % v/v; luego se hicieron dos lavados con agua destilada de 5 minutos cada uno y finalmente se revelaron los geles agitándolos en una solución de carbonato de calcio (CaCO₃) 3% p/v, formaldehído 0,07% v/v y tiosulfato de sodio 0,4 % p/v.

Por su parte, la separación de los fragmentos amplificados de los 4 marcadores funcionales se realizó en geles de agarosa al 3 % p/v realizando corridas electroforéticas de 2 horas a 140 V constantes y se los visualizó mediante tinción con SYBR® Safe (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA, EEUU).

2) Caracterización con marcadores moleculares desarrollados a partir de secuencias genómicas disponibles públicamente:

Con el objetivo de incrementar la densidad de marcadores moleculares por cromosoma se planteó, antes de contar con la secuencia de ADN de los progenitores, esta primera estrategia utilizando como referencia para el desarrollo de marcadores tipo InDel la lista de inserciones y deleciones predichas que surgieron de comparar las secuencias de los

genomas del cultivar Heinz 1706 de *S. lycopersicum* L. y la entrada LA1589 de *S. pimpinellifolium* L. (The Tomato Genome Consortium 2012) disponible en sitio de Internet de la red de Solanáceas (<http://solgenomics.net/oldhighlights.pl>). Las inserciones y deleciones de *S. pimpinellifolium* L. se confirmaron por comparación de las secuencias flanqueantes de los InDel predichos con los genomas respectivos a través de *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*). De este modo se validó el tamaño en pares de bases (pb) de la inserción/delección y la localización cromosómica. Las secuencias que contenían los InDel se utilizaron para desarrollar los cebadores directo y reverso con el programa libre *Primer 3* versión 0.4.0 (Untergasser et al. 2012). Se desarrollaron marcadores con productos de amplificación de aproximadamente 200 pb debido a que la mayoría de la inserciones y deleciones detectadas fueron de entre 15 y 20 pb. Antes de utilizar los marcadores desarrollados para caracterizar la población F_2 se comprobó para cada marcador la existencia del polimorfismo utilizando la misma metodología descrita para los marcadores funcionales para separar fragmentos amplificados en geles de agarosa al 3% p/v. En este caso el polimorfismo en cada marcador se probó utilizando siete genotipos diferentes: tres cultivares de *S. lycopersicum* L. (Caimanta, Rio Grande y un cultivar con los genes *nor*); un cultivar de *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (Dunal) Spooner, G.J. Anderson y R.K. Jansen; dos cultivares de *S. pimpinellifolium* L. (la accesión LA722 y LA1589) y el híbrido F_1 entre Caimanta y LA722. Solo los marcadores que resultaron ser polimórficos entre Caimanta y LA722 fueron utilizados para caracterizar la población F_2 .

3) Caracterización con marcadores moleculares desarrollados a partir de la secuencia de los genotipos utilizados como progenitores de las poblaciones segregantes:

Tal como se detalla en el Capítulo I, una vez obtenida y alineada la secuencia completa del genoma de Caimanta y de LA722 se procedió a realizar una comparación de ambos genomas y se obtuvo una lista de polimorfismos *SNP* (Polimorfismo de Nucleótido Simple) e InDel encontrados a lo largo de todo el genoma con su posición física exacta. La lista de inserciones y deleciones se utilizó para desarrollar marcadores moleculares del tipo InDel y la lista de *SNP* se utilizó para desarrollar marcadores tipo *CAPS* (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequences* o Secuencias Polimórficas Amplificadas y Cortadas). Inserciones y deleciones de entre 15 y 50 pares de base (pb) fueron utilizadas para desarrollar InDel de diferentes tamaños con el objetivo de poder incluir hasta tres marcadores en una misma reacción de *PCR* (*PCR* múltiple) sin que exista superposición de tamaños en los fragmentos amplificados al momento de visualizarlos en geles de agarosa al 3% p/v. Las inserciones y deleciones de 15 - 22 pb; de 23 - 40 pb y de 41 - 50 pb fueron utilizadas para desarrollar marcadores con longitudes de fragmentos totales de 100 – 200 pb; de 220 – 350 pb y de

400 – 500 pb respectivamente. Las regiones candidatas para el desarrollo de InDel fueron evaluadas visualmente mediante el programa IGV 2.3 (*Integrative Genomics Viewer*) (Robinson et al. 2011). Por su parte, para desarrollar los marcadores tipo CAPS se utilizó la herramienta “CAPS Designer” disponible en el sitio *Sol Genomics Network* (https://solgenomics.net/tools/caps_designer/caps_input.pl), la cual permite encontrar sitios de restricción sobre los SNP polimórficos. El diseño de los cebadores de los marcadores tipo CAPS e InDel se llevó a cabo mediante el programa libre *Primer 3* versión 0.4.0 (Untergasser et al. 2012). La separación de los fragmentos amplificados de los CAPS e InDel en PCR múltiples se realizó en geles de agarosa al 3 % p/v realizando corridas electroforéticas de 2 horas a 140 V constantes y se los visualizó mediante tinción con SYBR® Safe (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA, EEUU).

Construcción de mapas de ligamiento

La construcción de ambos mapas de ligamiento se realizó con el programa R (R Core Team 2014) utilizando el paquete R/QTL (Broman et al. 2003). Los marcadores fueron agrupados en el mismo grupo de ligamiento cuando presentaron valores de puntuación *LOD* (*Logarithm Of Odds* o logaritmo de probabilidades) mayores a 3,8 y valores de frecuencia de recombinación (*Rf*) menores de 0,35. La función “*orderMarkers*” y “*ripple*” fueron utilizadas para establecer y verificar el orden de los marcadores dentro de cada grupo de ligamiento. La distancia entre marcadores fue calculada mediante la función de Kosambi (1943).

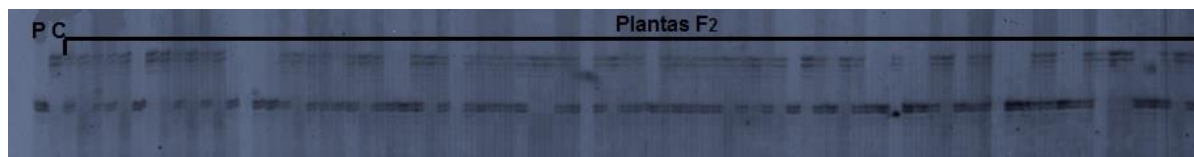
RESULTADOS

Caracterización molecular

1) Caracterización con marcadores moleculares disponibles:

De los 26 SSR utilizados solo dos (SSR009 y SSRH301) no pudieron ser amplificados correctamente y solo uno (SSR032) presentó una segregación distorsionada respecto de la esperada para un marcador codominante en una población F_2 . En la Figura III-1 se presenta un gel de poliacrilamida al 6% p/v en el cual se evidencia el polimorfismo detectado entre Caimanta (C) y LA722 (P) y la segregación encontrada en una población F_2 para un marcador tipo SSR.

Figura III-1: Polimorfismo detectado en plantas de una generación F_2 por un marcador SSR en un gel de poliacrilamida al 6% p/v.



P: Alelo de LA722; C: Alelo de Caimanta

Los cuatro marcadores funcionales fueron amplificados correctamente y los datos obtenidos no presentaron distorsiones en la segregación esperada. En la Figura III-2 se muestra un gel de agarosa al 3% p/v para el marcador funcional para peso *FW3.2*, el polimorfismo entre los progenitores y la segregación en una población F_2 .

Figura III-2: Polimorfismo detectado en generación F_2 por el marcador funcional para peso *FW3.2* en un gel de agarosa al 3% p/v.



P: Alelo de LA722; C: Alelo de Caimanta

2) Caracterización con marcadores moleculares desarrollados a partir de secuencias genómicas disponibles públicamente:

Mediante esta estrategia se desarrollaron 51 marcadores distribuidos en los 12 cromosomas del genoma de tomate de los cuales 11 (21,5%) resultaron ser monomórficos entre Caimanta y LA722. Los cromosomas 2, 3 y 12 fueron los que presentaron la mayor cantidad de marcadores monomórficos, mientras que en los cromosomas 6, 8, 9, 10 y 11 todos los marcadores desarrollados resultaron ser polimórficos entre Caimanta y LA722. En la Figura III-3 se muestra un gel de agarosa al 3% p/v en el cual se puede visualizar el resultado de la prueba del polimorfismo existente para uno de los InDel desarrollados mediante esta estrategia. En la Tabla III-3 se presentan la ubicación cromosómica y la posición física en la versión SL2.50 del ensamblado del genoma de referencia en tomate; la secuencia de los cebadores y el tamaño en pares de bases del alelo cultivado y silvestre para cada uno de los marcadores desarrollados.

Figura III-3. Gel de agarosa 3% p/v que muestra el polimorfismo existente para uno de los InDel desarrollados a partir de secuencias genómicas disponibles.

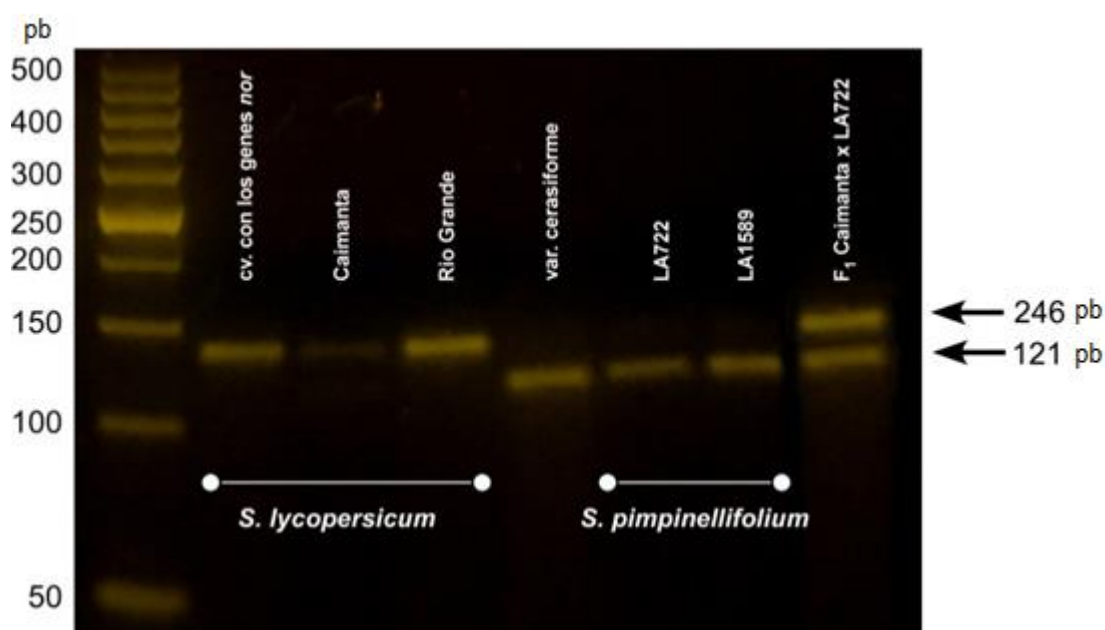


Tabla III-3 (1ra Parte): InDel desarrollados a partir de secuencias genómicas disponibles. Ubicación cromosómica, posición física, secuencia de los cebadores y tamaño de los alelos.

Cr	Marcador	Posición Física	Secuencia de cebadores (5'- 3')	Tamaño alelo cultivado (pb)	Tamaño alelo silvestre (pb)
1	IND1-0021	SL2.50ch01:215.456	F: ATTTTGGCCATCCAAACACC R: AATAACACTAGCATTGTGGATCTTT	187	209
	IND1-4036*	SL2.50ch01:45.790.960	F: GAATCGTACCAATATAGTTCCATAAGA R: CAAGGGAGAGCGTAAATGAGA	149	127
	IND1-9003	SL2.50ch01:98.276.467	F: AGGCAGAGAAGCATCATTTC R: ATGGTACTCCGGCCTTTCTT	146	121
2	IND2-0874*	SL2.50ch02:17.542.936	F: ATGGTCCTAGAACCGTAGGC R: AGCATGAGGCACGACTCTTT	132	152
	IND2-2794*	SL2.50ch02:33.367.775	F: TGACGACTGGACGATCCTATT R: CCACTTTATTTTCTTCAAGTTTTC	116	136
	IND2-3644	SL2.50ch02:41.871.132	F: CCACAACATATGAGTGAATAACCA R: TGACTTTGCATGAGGATAAAGTAGA	87	105
	IND2-4010	SL2.50ch02:45.530.156	F: GTGGACCAAGTTCCCTTCAAA R: CAGGCAAGCTTCATTCATTTT	155	167
	IND2-4465	SL2.50ch02:50.075.134	F: TGGTGAATTGTAATACTTGCTTG R: CAGCTTGGCTAAGCATACTTTT	142	163
	IND2-4824	SL2.50ch02:53.667.913	F: CAGAAATATCGTAGAAGGCTGGA R: TGGCTATGTGGTTCAGTACTCC	131	151
3	IND3-0180*	SL2.50ch03:1.800.168	F: TCTTTGGATTAAATTACAAGTATCAGC R: TGGCCAGGTTAGAATTTGCT	91	112
	IND3-0868	SL2.50ch03:4.408.764	F: TGAGGTTACCTTTTGTCTATTCTGAT R: CAGTGTAACACAGAATAAAGGGACATA	78	95
	IND3-4703*	SL2.50ch03:53.487.384	F: TGCCATCAGACCCTAGTCAA R: GCAAACCTTTTATCTTTAGGAGCTCAA	99	118
	IND3-5695	SL2.50ch03:62.902.395	F: TGGTGAATACTTTTCATGTCCA R: AACATGAGCAAACTGATTTCGAT	101	120
	IND3-6435	SL2.50ch03:70.305.170	F: TCAGTTGCTGTTGGGCTAAA R: TGTGTGGAAGATGGGTTTCA	114	129
4	IND4-0008	SL2.50ch04:88.430	F: GCAGAGCAAAGCAGCACATA R: GTCTTTAGGACACCGCGAAC	153	174
	IND4-0581	SL2.50ch04:5.819.286	F: TGAGGATTTAGCTATTAATGCTTCC R: TCAGCCGAACACATAGGGTA	65	86
	IND4-5254*	SL2.50ch04:53.401.072	F: AACCTCTCCATTTCTTATTTTGT R: TCCCAAAGGTGAAATTAAGAACA	119	140
	IND4-6399	SL2.50ch04:66.396.718	F: TGCTTACGGTTTACAATCTCACA R: CCTTTGGGGGTAGTTTGGTT	182	197
5	IND5-0016	SL2.50ch05:164.222	F: TTGCTTCGTGTGAAACAACAG R: TTCATCCCTACGCCCTTTTA	187	202
	IND5-1148	SL2.50ch05:11.481.047	F: TCCTATCATTATAATCTGAATTTGTG R: AGGATCACAGTTGAAATCACGA	86	107
	IND5-5981*	SL2.50ch05:60.667.207	F: AACCCATCTTGATAAATTATTGGTAGA R: GCCTGCAAGAAGCAAACATT	81	101
	IND5-6474	SL2.50ch05:65.602.455	F: TTTGGCCAAACAGTTTGAA R: GGGTTAGCCAAGAAACATGAA	180	197
6	IND6-0135	SL2.50ch06:1.354.346	F: GGCAATATCAAAGCAACCACA R: CGGAACAACCTCTCTAACTTCC	92	110
	IND6-2915	SL2.50ch06:32.661.561	F: AGGTGACTGGTCAAAGATTGTT R: GGCTGACAACCTTAAATTCCTTACT	83	100
	IND6-4186	SL2.50ch06:45.472.050	F: GGTGGAATAAATTCTAAACAACATT R: ACAATGCTTCTCTATTAGGCAAA	108	129
	IND6-4561	SL2.50ch06:49.324.666	F: TGGTTTCAATGGGAGATTCA R: CGTGCTTAGCAATGATGGTG	124	139

Cr: Cromosoma; F: cebador directo; R: cebador reverso; pb: pares de bases; *: Marcador monomórfico entre Caimanta y LA722

Tabla III-3 (Continuación): InDel desarrollados a partir de secuencias genómicas disponibles. Ubicación cromosómica, posición física, secuencia de los cebadores y tamaño de los alelos.

Cr	Marcador	Posición Física	Secuencia de cebadores (5'- 3')	Tamaño alelo cultivado (pb)	Tamaño alelo silvestre (pb)
7	IND7-0050	SL2.50ch07:501.490	F: CTTGACCTATTTAGCCAAGTTTTATAC R: TCTTTTCCAATGATCTAGCTGAGTA	132	150
	IND7-5180	SL2.50ch07:54.484.431	F: CGTTCCAACCTCTAATTTCAAAGC R: GACGAGTATGAAGATGGTGCAG	84	104
	IND7-5550	SL2.50ch07:58.185.110	F: CAGGTTAATAACAAGGGATGGTGA R: TCAACTCTGATCCATGGTGGT	141	120
	IND7-5642	SL2.50ch07:59.101.035	F: TGCATCTCAATGTATTCCATAGC R: TGCCTGGCTAAGATACGG	81	100
	IND7-6521*	SL2.50ch07:67.992.303	F: ACAATTAATGCGCGGACA R: CCTTCAATCCCTTTCTGCT	89	107
8	IND8-0171	SL2.50ch08:1.714.022	F: AAGATAGCAAGGAAGTTGAAGATCA R: AGTTGAACCTGCCGTGTGAA	99	119
	IND8-0357	SL2.50ch08:3.677.413	F: CTCTGCTGCTGCTGTCGT R: CTCACACTCTCTCACCTGACC	95	110
	IND8-4649	SL2.50ch08:49.282.424	F: CCAATATTGAAATGGGAAAAA R: GGGAAAGCAACTTTGAGATGG	123	143
	IND8-6185	SL2.50ch08:64.998.161	F: TGAATATAGTCCGAATTCATGCT R: TGGCTTAGACATGTGGATTTGAT	168	188
9	IND9-0006	SL2.50ch09:67.633	F: TTCCTGCTGCAATATTTGATG R: TTTGAGATTTTGTGTGTTATTTTG	134	155
	IND9-0232	SL2.50ch09:2.323.223	F: ATGACTTAATTCGTTAACATATGACTG R: GACTCACATAATTGAAGTTCATTG	138	156
	IND9-5961	SL2.50ch09:64.016.484	F: GAGATGCACAACCTGCGCTAA R: GCGAACCTCTGTGAGAGACC	73	91
	IND9-6732	SL2.50ch09:72.048.689	F: TCTGTCAAGGTCAGCTTTTATCA R: TGTTGGTGAGGATGAATGGA	98	117
10	IND10-0015	SL2.50ch10:55.000	F: TTGAGAATGAGGGGGTGTTT R: TAACCACCCACGACTTAGCC	122	141
	IND10-0265	SL2.50ch10:2.658.489	F: GAACTTAAATTTATTGGAACATCTCA R: CATCATGGCAACCTCTTGTC	63	85
	IND10-4698	SL2.50ch10:51.506.547	F: CAGGTTTGCATACTTGAATTTTCT R: AGGGTCACTGATAATGCTCAA	155	173
	IND10-6196	SL2.50ch10:65.075.125	F: GGGGTCACTGGAACAGAAGA R: TCCTTCCCCACCCTCTTTTA	93	114
11	IND11-0017	SL2.50ch11:172.705	F: CATTCTGTGAAGGCAATATGA R: GATGTGCTATCAAATAGATGGATGA	114	134
	IND11-1073	SL2.50ch11:10.735.544	F: TCTTATTTTATGTTTCTGTGCAA R: TTCAATGGCTATCCTCCTTTT	79	98
	IND11-4770	SL2.50ch11:50.625.957	F: GCTTTTCTTACCTTGTATTTGTAA R: TGGAGGAGAAATTGTAGTTGTTACC	107	126
	IND11-5323	SL2.50ch11:56.150.684	F: AAGACAAACATGCCAGCCTTA R: TTGGAATAAACAACAAACAATCA	111	130
12	IND12-0038	SL2.50ch12:389.209	F: GACGAAGCATCTCAGATTCACA R: TCTTTTGTGTTGGGTTTGCTC	108	127
	IND12-0421*	SL2.50ch12:4.219.718	F: TGCAATGTACTTGAGCATTCTTC R: AAAAATAACGGTGACTATCAAAAA	92	114
	IND12-6253*	SL2.50ch12:64.089.632	F: GGCAACGTTGTAGGAGGAAG R: TGGCACCTAGTTCCGATCCTC	106	124
	IND12-6405*	SL2.50ch12:65.714.582	F: AAAAAGGTGAGTAGACCGTTCC R: CACTTGGATCACGATGCTGT	128	148

Cr: Cromosoma; F: cebador directo; R: cebador reverso; pb: pares de bases; *: Marcador monomórfico entre Caimanta y LA722

3) Caracterización con marcadores moleculares desarrollados a partir de la secuencia de los genotipos utilizados como progenitores de las poblaciones segregantes:

Una vez confeccionadas las listas de polimorfismos se desarrollaron a lo largo de todo el genoma 126 marcadores tipo InDel y seis CAPS. El polimorfismo de los marcadores desarrollados se probó en primer lugar en los genotipos progenitores para luego procederse con la caracterización molecular de las poblaciones F₂. En la Tabla III-4 se presenta la ubicación cromosómica; la posición física en la versión SL2.50 del ensamblado del genoma de referencia en tomate, la secuencia de los cebadores, la enzima de restricción utilizada y el tamaño en pares de bases de los alelos cultivados y silvestres obtenidos para los seis marcadores tipo CAPS desarrollados a partir de la lista de *SNP* polimórficos entre Caimanta y LA722.

Tabla III-4: CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequences*) desarrollados a partir de la secuencia Caimanta y LA722. Ubicación cromosómica, posición física, secuencia de los cebadores, enzima de restricción utilizada y tamaño de los alelos.

Cr	Marcador	Posición física	Secuencia de cebadores (5'- 3')	Enzima de restricción	Tamaño alelos cultivados (pb)	Tamaño alelos silvestres (pb)
1	CAPS1-8685	SL2.50ch01:86.855.520	F: ATATATTGCCACATAAACATAACAAG R: AAGCAGATTCTCTTTTCCTCCT	RsaI	160	91
	CAPS1-8996	SL2.50ch01:89.960.150	F: CATGAATTTGAGTTGTGAATACAGTG R: TTGGGCTAATGTTGTGAGTCC	Hpy188I	289	218
						71
	CAPS1-9221**	SL2.50ch01:92.216.600	F: TTTGTATCTTCCTTAACGAATTGATTT R: TTCTGTACATTCTCCACAATTTGA	Hpy188I	194	145
					145	108
						86
12	CAPS12-0097	SL2.50ch12:972.781	F: CAGAAACAAGAATTTTAAGCACCA R: CATTGGTTGATGCATCTGAA	HinfI	209	160
	CAPS12-0290	SL2.50ch12:2.904.713	F: TTCCATATGAGAATGAAATGACAA R: TTTGAATTAGTCATATTAGTTGGAACC	Hpy188I	127	196
					69	
	CAPS12-0354	SL2.50ch12:3.548.700	F: AATGTGTGGCGTGATGAGAT R: AGCGGCATGGATTATGGTAG	RsaI	221	144
						77

Cr: Cromosoma; F: cebador directo; R: cebador reverso; pb: pares de bases; **: Marcador que no amplificó

En la Tabla III-5 se muestra la ubicación cromosómica; la posición física en la versión SL2.50 del ensamblado del genoma de referencia en tomate, la secuencia de los cebadores y el tamaño en pares de bases del alelo cultivado y silvestre de los 126 InDel desarrollados a partir de la secuencia de Caimanta y LA722. Para cada cromosoma se desarrollaron como mínimo 10 InDel (cromosoma 11) y como máximo 33 (cromosoma 1). La cantidad de InDel desarrollados mediante esta estrategia varió principalmente en función del nivel de recombinación existente en cada cromosoma, pero también en función de la cantidad de marcadores polimórficos desarrollados mediante la primera estrategia y la cantidad de *SSR* polimórficos con lo que se contaba.

Tabla III-5 (1ra Parte): InDel desarrollados a partir de la secuencia Caimanta y LA722. Ubicación cromosómica, posición física, secuencia de los cebadores y tamaño de los alelos.

Cr	Marcador	Posición Física	Secuencia de cebadores (5'- 3')	Tamaño alelo cultivado (pb)	Tamaño alelo silvestre (pb)
1	IND1-0054	SL2.50ch01:542.395	F:GGTCACCACGACCAAAAAGA R:TGTCTTTGCCTACTCTTGGACTC	406	365
	IND1-0149	SL2.50ch01:1.497.410	F:TTGTTTCTAAGTTTGGATTCAACC R:GGTCTACTCCTTTTCAAACCTCG	133	106
	IND1-0317	SL2.50ch01:3.170.728	F:TGTAACCTTTCCCTCTCACG R:AACACAGCACAGAACCAACG	261	228
	IND1-0512	SL2.50ch01:5.125.727	F:GAAAATCTACTTGTAAAGCACACTCG R:AAACTCGCGTTTAAATGGTG	127	103
	IND1-0897	SL2.50ch01:8.972.899	F:GGGTAGTTTTCCGCATTCA R:TCTATTGAAGAATTCAAGCGAGTG	140	120
	IND1-4035	SL2.50ch01:40.353.186	F:CCCAACAAGAACCCTAACCAA R:TCCACCTAGATGCTATGTTTCATGT	449	399
	IND1-4731	SL2.50ch01:47.314.509	F:CCACCTCCTTGTTCCTCAAA R:TGGGCAAGTCTCCACTCTTT	459	403
	IND1-5963	SL2.50ch01:59.632.031	F:TGTGATGTTTGGGAGATGATG R:TCCTCTTGCTGCTAAGCTGAAT	260	225
	IND1-8018	SL2.50ch01:80.183.362	F:AAACAAGGGGTGGAACCTGTG R:TATTCAGCATCTGGGCATGT	275	248
	IND1-8182	SL2.50ch01:81.820.319	F:AGGGTATCTCTTCTTGAGAACCAA R:TCACCTTCTCCAGTTTAAATACCA	242	206
	IND1-8244	SL2.50ch01:82.440.973	F:AAATATCACTGCCCTCCTG R:TCTGTGCACCAATAGGCAAC	251	220
	IND1-8347	SL2.50ch01:83.470.322	F:TTAAGGAGGGTGAAGCAAGC R:TGCTGGTAATTGGTTTGCAC	422	379
	IND1-8428	SL2.50ch01:84.287.478	F:GCCCATGTGGAACCTATCAT R:TGCTAATCAGTTTGAATCATGG	248	216
	IND1-8441	SL2.50ch01:84.416.092	F:TGAGATTGAGTTAGATTCAAGATTGCG R:CTGCGTTACATCTGTCCCAAT	436	387
	IND1-8542	SL2.50ch01:85.423.404	F:GCCCCAATCTGTCTTTACCA R:CATGTTAAGGTGCCAATCTTTT	151	123
	IND1-9422	SL2.50ch01:94.220.270	F:CTTGGTAGATTTTGAAGAACATCG R:GCAATGCATTCAATTCAGAGG	140	120
	IND1-9461	SL2.50ch01:94.617.516	F:CATGACCTCGTAACCTGCCTTC R:ACAGATTTGGGACCAGTGATCT	450	405
	IND1-9652	SL2.50ch01:96.524.181	F:CATGCCAAATTTAGGTCAAGAAT R:CACATTTTGCTCATTACATAGTTGC	137	109
2	IND2-2019	SL2.50ch02:20.190.423	F:CAGGGAGGCTTCTCAACATAA R:GCATGGATGTCTCCCATCTT	264	223
	IND2-3815	SL2.50ch02:38.151.569	F:TGCTATGTGCTACAAAACATGTAAA R:GCATGAATAAGGTAGCCTCTGC	457	406
	IND2-3976	SL2.50ch02:39.761.162	F:GGCCTGAATTCCTTTCCATTT R:TCATCAACTTTTAGTGCGTTC	240	208
	IND2-4384	SL2.50ch02:43.840.109	F:TGTTACAATTCACCCCACTGC R:TGATTTTCATAACAAGTAATGCTGCT	136	118
	IND2-5218	SL2.50ch02:52.188.354	F:CCTTTCTGAGCAGAAGCTCGAA R:CCAACATGGTGGTAACACAAGA	160	131
	IND2-5414	SL2.50ch02:54.148.125	F:CCTGATCCAAGTTGCTGAAAT R:CGTGGACCATTAAGGGAAGA	469	415

Cr: Cromosoma; F: cebador directo; R: cebador reverso; pb: pares de bases

Tabla III-5 (2da Parte): InDel desarrollados a partir de la secuencia Caimanta y LA722. Ubicación cromosómica, posición física, secuencia de los cebadores y tamaño de los alelos

Cr	Marcador	Posición Física	Secuencia de cebadores (5'- 3')	Tamaño alelo cultivado (pb)	Tamaño alelo silvestre (pb)
3	IND3-0011	SL2.50ch03:113.523	F:ACTGCGATGACCTAGCCAAC R:TGATTAATGTGCGCAATAATTACTCAAT	127	105
	IND3-0117	SL2.50ch03:1.177.205	F:GGGGAAGCAAAGTGTCTTCA R:GCCATAAGCCAAGTCACTTCA	478	417
	IND3-0375	SL2.50ch03:3.758.695	F:CCATGTGAGAATTATTGGGAAAA R:CCCAACTATGTCTGCTTTTATGTTT	459	406
	IND3-0448	SL2.50ch03:4.480.134	F:AGAAGATTGCGGCCCCATTAT R:GCCACATGTAGGGTCTTTGG	250	222
	IND3-0601	SL2.50ch03:6.016.874	F:TTGGATTGAGGTTGAGGTT R:ACCCGGCTTGAGATCTAACTT	150	132
	IND3-5470	SL2.50ch03:54.702.027	F:TGTTGGTTTTGCAAATCAGG R:TGCAGCCAGAGTTCAGACAT	115	100
	IND3-6289	SL2.50ch03:62.898.396	F:TGCTCCAAGAACTCCGGTAA R:ATGGTTCGATTCTTCGTTGC	230	207
	IND3-6466	SL2.50ch03:64.662.041	F:AGCTGAAGATTATGATGTTATCCCTTA R:CAGCAACTGCTGCAATATAAGC	247	210
	IND3-6570	SL2.50ch03:65.770.634	F:TTAAACCGCCAAGGGATGT R:TAGTCGCGTGTACCTCCTCA	116	97
	IND3-6722	SL2.50ch03:67.225.507	F:AATGGAAGCTAAACGCTAAAACA R:TCTAATGCAGCCAGCACTGT	204	228
	IND3-6853	SL2.50ch03:68.535.818	F:CGCTGTGCTTTTCATTCAAG R:TGACAACATATCGACACCATCA	461	417
	IND3-6900	SL2.50ch03:69.002.639	F:ATCCTGGAGCATAACAGTGGTT R:AGCTGAGAATGAGAACATTTTGA	225	200
4	IND3-7057	SL2.50ch03:70.577.267	F:TCCAGACCATATACAGCACCTAAA R:CTCCAATGGGACCACTGTCT	147	130
	IND4-0238	SL2.50ch04:2.384.993	F:TCACAATGGTAGGGGTAAGGTC R:CAAAGCATGTCAAGGTCTTCAA	118	141
	IND4-0954	SL2.50ch04:9.541.735	F:CAGCAATCCCTTGAAAGTGC R:AATCTTTCCCAAGACATGC	269	238
	IND4-3519	SL2.50ch04:35.195.747	F:AGGCATGTGCTTCCATTTT R:ACAACCTGGCTACGATCCTGAA	449	400
	IND4-4286	SL2.50ch04:42.869.465	F:AAGACTGGTGTGCGGTGATT R:CCAATTTGAGAGCGATAGGC	446	402
	IND4-5507	SL2.50ch04:55.075.989	F:CAAGGCAGCTTGGTAAGGAC R:GACTTTGCTTGCCCTTTGGA	259	229
	IND4-6078	SL2.50ch04:60.783.326	F:TCCAACCTGAAACATCAACTTCT R:TCAAGCTCGCTATGGCTTCT	119	140
	IND4-6168	SL2.50ch04:61.683.713	F:GGGAGATAACCTGCCATCAG R:TGCACCAGAGGTAAGTTAGGC	240	212
	IND4-6310	SL2.50ch04:63.103.054	F:ACTAAAACTACACTGCCTTTGACTT R:TTGGAACGAAACAAGTATTTTAACAG	130	112

Cr: Cromosoma; F: cebador directo; R: cebador reverso; pb: pares de bases

Tabla III-5 (3ra Parte): InDel desarrollados a partir de la secuencia Caimanta y LA722. Ubicación cromosómica, posición física, secuencia de los cebadores y tamaño de los alelos.

Cr	Marcador	Posición Física	Secuencia de cebadores (5'- 3')	Tamaño alelo cultivado (pb)	Tamaño alelo silvestre (pb)
5	IND5-0191	SL2.50ch05:1.912.631	F:CGGGACGAAGTATTCCAT R:CAAATGTGTCTAAAAGTAGGCAATG	451	400
	IND5-0325	SL2.50ch05:3.253.878	F:CGGAAACGGCTTCTTTACC R:CGTGTGTAAGTTTTGTGCATTG	142	119
	IND5-0418	SL2.50ch05:4.185.503	F:CATATGATATCTCGTTCTCGGTAAGA R:GACGGAGCCACAATGGTAGT	132	114
	IND5-0546	SL2.50ch05:5.464.300	F:GGAGGATGAAGATGCGAGTG R:GAAAGTCAAGAAGCAAGAAATCG	232	206
	IND5-0697	SL2.50ch05:6.972.292	F:CACTTCTCCGCTCCATCATT R:CATGTTTTTGCCATGGATGA	230	203
	IND5-1450	SL2.50ch05:14.502.433	F:TTGGAGGCATGTCACCTT R:GCAATTTTCGGCCCTTTCTAC	451	408
	IND5-4612	SL2.50ch05:46.125.816	F:AGGTGATGGCTTTGAGTGTTG R:CACATCAATCTGCTCCATGC	248	209
	IND5-5411	SL2.50ch05:54.111.354	F:CATCAGACACCTCAAACACGA R:GAGAATTTGACACTCGAAACGA	450	388
	IND5-6112	SL2.50ch05:61.125.549	F:CGGTGGGAGGTGAAAGGTA R:CCACTTGTTTTCCAAATCAATACA	113	143
	IND5-6262	SL2.50ch05:62.621.607	F:CAAGGATATATCCAGTGGTTAATGA R:GGGAACTTTTCTGTGCAACC	242	203
6	IND5-6475	SL2.50ch05:64.754.311	F:GGAATAAGCTAGAAATTCACCCATC R:TCTTGGGTAATCCTAAAGTTCCA	123	103
	IND6-0068	SL2.50ch06:684.878	F:CATGAATTCAAAGAATTTACAAAA R:ACGAATAGCTCTCGCTCTGTG	151	121
	IND6-0311	SL2.50ch06:3.113.320	F:GCTTTTCTGGACTATTTTAATTTGG R:TTCAATCTTATGTCAAGAATCACCA	267	232
	IND6-0468	SL2.50ch06:4.683.353	F:TTGGTAGTTGAACTTGAAAGCAA R:TCGTGTGCTTGAAGTATTTTAC	439	394
	IND6-2374	SL2.50ch06:23.746.315	F:TCACCTACCTCGAAATCAAGC R:ATGATCCGGGTAAATTAGACCTT	140	118
	IND6-3385	SL2.50ch06:33.851.627	F:AATCGCAACTGCAAAAAGAAGA R:TATGGGCAAAATGGATTGG	236	208
	IND6-3717	SL2.50ch06:37.171.980	F:TGGTTCATCTATGCCGGATT R:TCTCAAATGCCAAGACAAA	460	403
	IND6-3930	SL2.50ch06:39.303.864	F:TGGTGCCTCTACCATGTATCC R:AATTTGCATATGTGTTGCCAGT	246	214
	IND6-4232	SL2.50ch06:42.323.106	F:CAAAGCCTATAAAGCCCAATTT R:CGGCACCACAAGACACTTA	479	429
	IND6-4370	SL2.50ch06:43.705.084	F:TGAAAATTACCCCTAATCAACGAG R:CTCCTGAACCTTTGATAAATGGTACG	331	291
	IND6-4707	SL2.50ch06:47.078.091	F:TGATTTGAAAAAGTAAGCTTGTC R:AGCACACGTATGTTAGAGAAGGAA	144	123

Cr: Cromosoma; F: cebador directo; R: cebador reverso; pb: pares de bases

Tabla III-5 (4ta Parte): InDel desarrollados a partir de la secuencia Caimanta y LA722. Ubicación cromosómica, posición física, secuencia de los cebadores y tamaño de los alelos.

Cr	Marcador	Posición Física	Secuencia de cebadores (5'- 3')	Tamaño alelo cultivado (pb)	Tamaño alelo silvestre (pb)
7	IND7-0152	SL2.50ch07:1.525.059	F:AAAAAGGGGTTACAAAAGTTGCT R:TACATGCAGGCATACCAAGC	138	111
	IND7-0312*	SL2.50ch07:3.126.024	F:CCACTGTGAGACATTGCTACAT R:AAAGGAGGCCCAAAATCTGT	469	411
	IND7-0397	SL2.50ch07:3.972.336	F:TGATTGAAATTGGTTGGAACAG R:TCAGGTTTAAATGGGGATGAA	230	200
	IND7-0695	SL2.50ch07:6.951.913	F:TTCTAACGTTGGGCACCATA R:CTTCCCCTGCTCATTCTACG	451	404
	IND7-0918	SL2.50ch07:9.185.262	F:GTCCCAAACCAGAATCGAGA R:CATTTTGCACCACATCCAGA	264	225
	IND7-1436	SL2.50ch07:14.367.058	F:GAGAACTTGTTCGTGTTCTTG R:CAGACGACAACGTGACAGGA	250	211
	IND7-4808	SL2.50ch07:48.089.508	F:GCTGACTGGTCTGGATGGAT R:CACGTATGAATTGGGCAACA	451	401
	IND7-6047	SL2.50ch07:60.475.382	F:GGTGCTGGGTTGATGAGATT R:TGAAATGCGTTGGAAAATTG	141	117
	IND7-6266	SL2.50ch07:62.665.186	F:CCAGCAGTTGTGTCATTAGAGC R:AAATAAGTTGGCGGTCATGAGT	232	204
	IND7-6489	SL2.50ch07:64.896.521	F:GGGAATGGAATGATGGTTTG R:CATCCAGGCCAGGTTGAA	143	122
	IND7-6590	SL2.50ch07:65.906.456	F:GTTGTTGAACTTAACCGTTCAAAG R:CCCATGTCTTGAATATTGTGA	158	133
8	IND8-0698	SL2.50ch08:6.980.675	F:TCCTTGTCAAATATGAAAGTAGGTCA R:GCACTATACTGCTAGATCACCTCAA	154	134
	IND8-4090	SL2.50ch08:40.905.028	F:CCAAGCACTCAACAAGATGG R:GGAAGCAAGGGCTAAGAGAAA	259	228
	IND8-5292	SL2.50ch08:52.923.106	F:TCACAATACTGCACAAAAACACA R:TGGAAATGTTTGAGGTTCCAT	443	397
	IND8-5445	SL2.50ch08:54.452.499	F:TGCACAACCTTGGTTTCTTCA R:ACGGGTTGTTCTTGTGTTT	145	125
	IND8-5616	SL2.50ch08:56.161.016	F:CACTCTCAAGTCTTGTGTCATATTCA R:CCTCTAATTTCTGGCAAGTGTA	445	389
	IND8-5823	SL2.50ch08:58.237.833	F:AAAAGGGTCTGGTGAACCATTA R:CTGCCACATAGACTGCCAAG	140	120
	IND8-6049	SL2.50ch08:60.491.868	F:ATGAATAAAATATAGGAAGTCGCACA R:GAAAGAGCGAGCCTGCTG	446	386
	IND8-6206	SL2.50ch08:62.069.867	F:CCTCTGCTTGTGTCATCCCTTC R:ACGCTTTAGCTTACAACATACATCTTG	250	213
	IND8-6582	SL2.50ch08:65.826.614	F:AGCGAAAAGGTACCCATTGA R:GGGTTGCATGAAATCTGGAC	258	224

Cr: Cromosoma; F: cebador directo; R: cebador reverso; pb: pares de bases; *: Marcador monomórfico entre Caimanta y LA722

Tabla III-5 (5ta Parte): InDel desarrollados a partir de la secuencia Caimanta y LA722. Ubicación cromosómica, posición física, secuencia de los cebadores y tamaño de los alelos.

Cr	Marcador	Posición Física	Secuencia de cebadores (5'- 3')	Tamaño alelo cultivado (pb)	Tamaño alelo silvestre (pb)
9	IND9-0093	SL2.50ch09:935.331	F:AACACGATGGGGTGAAATGT R:GGAAGAATATTTTCATGATGATTTTGAG	149	124
	IND9-0744	SL2.50ch09:7.443.003	F:CTCTATGACCAGGCCAACG R:TTGGAGTTGTCATTTTCTGTGG	445	402
	IND9-1322	SL2.50ch09:13.228.934	F:TCTTCAACGTTTCACCTCCA R:TGTGTGGTATGGTTATGTGCTG	245	214
	IND9-4508	SL2.50ch09:45.089.334	F:CGCCCTATTTCACCTAACA R:GAAACGCGAGGGTATGACTC	254	222
	IND9-5376	SL2.50ch09:53.762.594	F:TAGACTCGACCGGGTATTG R:ATGTGGGCCTCATCAGAGAC	149	129
	IND9-5909	SL2.50ch09:59.090.196	F:AAAATGGGAAATGGCCAAAC R:AGACAGACCCTGCTCTAATACCA	453	401
	IND9-6611	SL2.50ch09:66.111.464	F:GCAGCAAAACAAGTTGCAG R:TCAGAAGGGTGTGGGTCTAAA	244	211
	IND9-6829	SL2.50ch09:68.297.103	F:AGGAGGCTCGTGCAATAAGA R:CAATACAGGGGTCACAAGTCAA	435	394
	IND9-7010	SL2.50ch09:70.108.663	F:TGAACACTTCAACTTACAAAAAGTCA R:CTCGGCACCAAGCTTTATTT	149	126
10	IND10-0064*	SL2.50ch10:640.371	F:CACCTATTGGAACCCACCAT R:GGAGGAACCAAGGTTAGGA	254	225
	IND10-0163	SL2.50ch10:1.631.600	F:CATAGATTGCTGGACAACAACA R:TGCTCAACTAAGATCCAAGTGC	446	399
	IND10-0194	SL2.50ch10:1.940.516	F:TGAACGCATTTTCTAGAGTTTCA R:CGACACATAAAGGGGTCATGT	137	114
	IND10-0429	SL2.50ch10:4.293.453	F:ATATTCGGCGTCATTTAGGC R:GGTCGATCGTTTACTTTTCGAT	407	459
	IND10-0939	SL2.50ch10:9.393.712	F:CACAACTTGCGACAACCTCAA R:TGACCTTTATTGAGGCTGGTG	243	213
	IND10-3978	SL2.50ch10:39.780.866	F:TCCCACTTATGGCCATCTT R:TCACCAAATTCCTTAATTGTT	456	400
	IND10-4583	SL2.50ch10:45.839.729	F:GCAAAGATAGACCTCGGATCA R:CAAATCTATGAAAAGTTGCAAGAGAA	151	127
	IND10-4910	SL2.50ch10:49.101.803	F:ATCTTGTTTCAGCGGAGATCTTA R:ACCTCTGCATACTTTCTCTAACAA	140	119
	IND10-5332**	SL2.50ch10:53.324.802	F:TGAACGCAATGAAAAGAGTCA R:TTAGGCTGAATAGGTTAATCTGGTG	451	401
	IND10-5706	SL2.50ch10:57.068.960	F:CAAATCTAATGAAAAACCGAACG R:GGAACATGGACTTTGACTGGA	250	210
	IND10-5801	SL2.50ch10:58.014.264	F:ACCTCGACCCCAACCTTAAT R:AGGGTTTAGGTCAGAGCCAAC	135	112
	IND10-6245	SL2.50ch10:62.457.995	F:CTCCCATCTCGTTTTCTCC R:GCTCTCCTTGCAATTCATCAG	278	246

Cr: Cromosoma; F: cebador directo; R: cebador reverso; pb: pares de bases; *: Marcador monomórfico entre Caimanta y LA722

** : Marcador que no amplificó

Tabla III-5 (6ta Parte): InDel desarrollados a partir de la secuencia Caimanta y LA722. Ubicación cromosómica, posición física, secuencia de los cebadores y tamaño de los alelos.

Cr	Marcador	Posición Física	Secuencia de cebadores (5'- 3')	Tamaño alelo cultivado (pb)	Tamaño alelo silvestre (pb)
11	IND11-0530	SL2.50ch11:5.034.020	F:TTTATCTTGCAATTTGGTGTGG R:ACCCAGCTAAAAGAATGAAGTCG	232	204
	IND11-0690 **	SL2.50ch11:6.905.589	F:GTTACCCCCATTCTTTCACC R:TGGATTATGGATTCAAGGTTCA	147	121
	IND11-1458 **	SL2.50ch11:14.586.359	F:GTCTCGTTTCAAAACACTTGGGA R:TGCTCCGTCACAGAGTTCAG	155	136
	IND11-4108	SL2.50ch11:41.083.975	F:GTTTCATTAAATTATTTGTGGGGAGT R:TGTTTAGTCGAAACTTCACTATCTCC	446	383
	IND11-4502 **	SL2.50ch11:45.025.339	F:CACTCTGTGCTAGACTTCGTTCTC R:AAAATGATACGCTACATGTGCTAAA	411	458
	IND11-5266	SL2.50ch11:52.668.620	F:CAATTGACACAGTGGAGATAAGTTG R:TGCATTATCTTGGGCAGAAA	235	209
12	IND12-0058	SL2.50ch12:589.824	F:GCTGGGATGGATCATCACTT R:TGGACTGGCAACTGTCTTGT	129	114
	IND12-0379	SL2.50ch12:3.792.533	F:AGGGTCTGGCTTAGGCAAAAT R:TGCTATTTTTATGAGCAGATGGTT	247	221
	IND12-0572	SL2.50ch12:5.723.262	F:CAATGAAAATACTGCACTTCGTG R:TCTCACCTATTGATTTTGAAATTTG	130	108
	IND12-0670	SL2.50ch12:6.709.970	F:AGGCTTGTTGGGTGTATCG R:TGTCTAACAAACAAGGCATTCAA	445	405
	IND12-0852*	SL2.50ch12:8.520.480	F:CACATTTAGACATACCACATGTTGAG R:ACCCCGTGTCATAATCTACAAAC	143	124
	IND12-1197	SL2.50ch12:11.970.185	F:GGCATTCTCTAGGCAACAGC R:GCCAGCTAGCTCGATTGTGTC	270	235
	IND12-4227	SL2.50ch12:42.275.129	F:TGACGTCCACGACAACGA R:TGTCGTCGATATTGTCATCG	125	107
	IND12-4813	SL2.50ch12:48.139.123	F:GTTTTGGGTCGTGACATGC R:TTTCAGTTGATCTCCATGGTTG	329	365
	IND12-5565	SL2.50ch12:55.658.221	F:GGGTGGGGTAAATGGAAAGA R:GCAGTGGGTGCATCTCTATG	281	248
	IND12-5727	SL2.50ch12:57.273.186	F:AGATTGTGAAATGGGTGCAAG R:GTGGCTAAGGCTTGACGTATG	234	208
	IND12-5919	SL2.50ch12:59.195.221	F:TGACCATACTCCCGACCAAT R:TCCAAAGTGCATGTCATGGT	399	467
	IND12-6095*	SL2.50ch12:60.956.006	F:TGTGTTGAAGGTCTCCTAAATGAA R:CCATGATTGACCTCTTCAAGACT	256	232
	IND12-6230	SL2.50ch12:62.309.904	F:ACCTCATGTTCTCAACCCACTT R:AATCAAGGATAAGTTGTGGTGCT	141	120

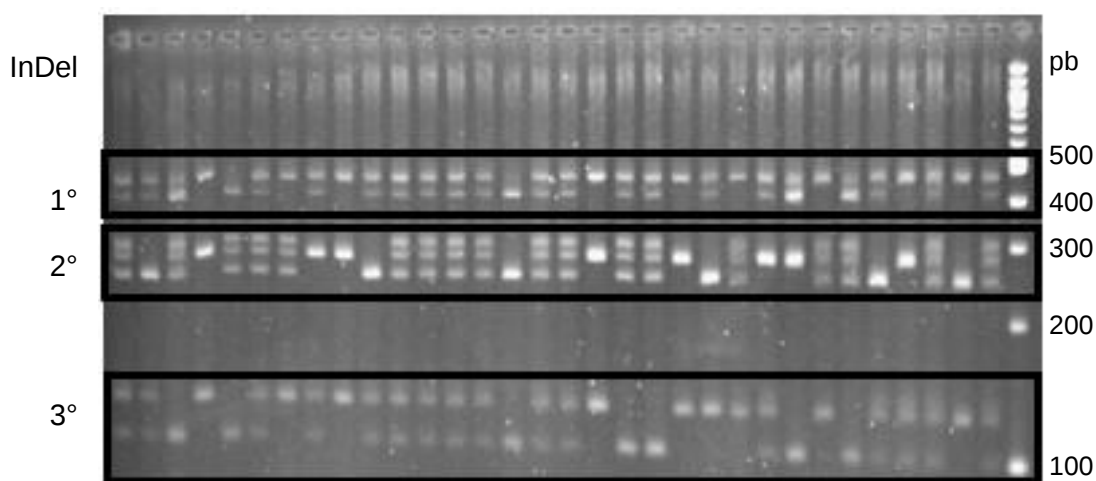
Cr: Cromosoma; F: cebador directo; R: cebador reverso; pb: pares de bases; *: Marcador monomórfico entre Caimanta y LA722

** : Marcador que no amplificó

Del total de marcadores desarrollados mediante esta estrategia solo cinco no pudieron ser amplificados (IND10-5332, IND11-0690, IND11-1458, IND11-4502 y CAPS1-9221) y cuatro resultaron ser monomórficos entre Caimanta y LA722 (IND7-0312, IND10-0064, IND12-0852 y IND12-6095) obteniéndose de esta manera una efectividad del 93% en el desarrollo de marcadores.

La eficiencia en el proceso de caracterización molecular se vio notablemente incrementada por la utilización de la técnica de *PCR* múltiple, la cual pudo ser implementada debido a la posibilidad de desarrollar marcadores de diferente peso molecular. Esta técnica permitió agrupar los InDel de a tres según su peso molecular de manera tal de poder incluirlos en una misma reacción de *PCR* y luego poder diferenciar el polimorfismo de cada marcador en una misma corrida electroforética en geles agarosa al 3% p/v como se muestra en la Figura III-4.

Figura III-4: Gel de agarosa al 3% p/v en que puede diferenciarse el polimorfismo detectado en una generación F_2 por tres marcadores tipo InDel de diferente peso molecular amplificados en la misma *PCR* múltiple.



Construcción de mapas de ligamiento

El primer mapa de ligamiento se construyó en base a la caracterización molecular de la población F_2 CxP y a partir de las distancias genéticas obtenidas en este mapa se seleccionaron los marcadores moleculares para caracterizar y construir el mapa de ligamiento de la población F_2 PxC.

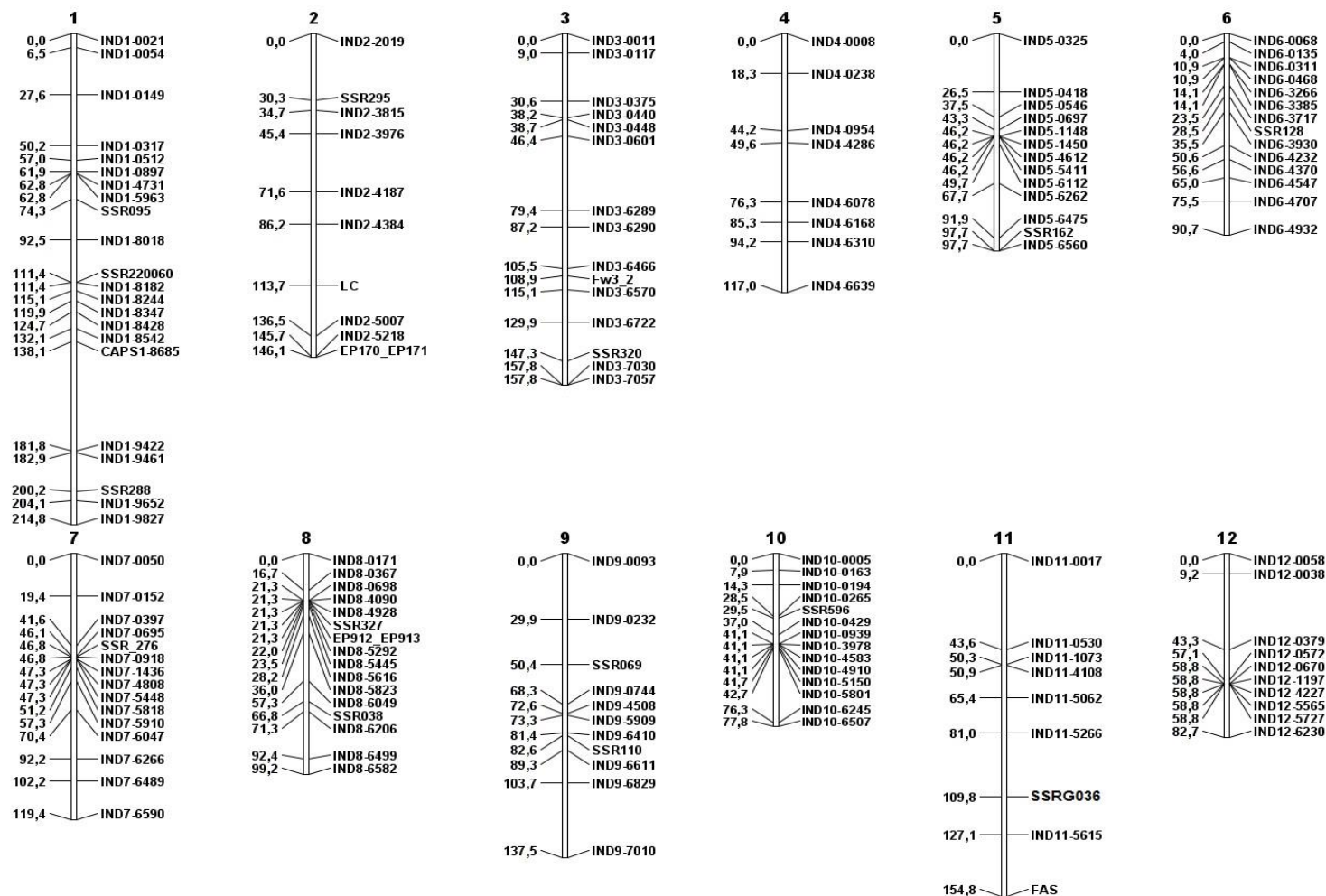
1) Construcción del mapa de ligamiento en la población F_2 CxP:

Si bien se utilizaron 192 marcadores moleculares de ADN (24 SSR, 4 marcadores funcionales, 162 InDel y 2 CAPS) para realizar la caracterización molecular de la población F_2 , el mapa de ligamiento genético obtenido estuvo constituido por 157 marcadores

agrupados en 12 grupos de ligamiento los cuales se corresponden con los 12 cromosomas presentes en el tomate. El resto de los marcadores fueron excluidos del mapa final debido a que tuvieron un alto número de datos faltantes o bien una segregación distorsionada de la esperada para marcadores codominantes en una generación F_2 . Los únicos marcadores que igualmente se tuvieron en cuenta para construir el mapa a pesar de que presentaron una segregación distorsionada fueron los primeros cuatro marcadores del cromosoma 11 (IND11-0017, IND11-0530, IND11-1073 y IND11-4108), debido a que toda la región cromosómica presentó la misma distorsión sesgada en dirección al progenitor silvestre.

El orden de todos los marcadores mapeados se correspondió con el esperado según su posición física. La longitud total del mapa de ligamiento obtenido fue de 1.495,6 centimorgan (cM) con una distancia promedio entre dos marcadores consecutivos de 10,3 cM y una distancia máxima de 43,8 cM ubicada en el cromosoma 1, como puede observarse en la Figura III-5.

Figura III-5: Mapa de ligamiento obtenido a partir de la población F₂ CxP derivada del cruzamiento interespecífico entre el cultivar Caimanta de *S. lycopersicum* y la accesión LA722 de *S. pimpinellifolium*.



En la Tabla III-6 se presenta un resumen del mapa de ligamiento genético obtenido en la F₂ CxP, detallando la cantidad de marcadores, la longitud, la distancia promedio y máxima en cM para cada cromosoma. El número promedio de marcadores por cromosoma fue de 13 variando entre 22 marcadores para el cromosoma 1 y ocho para el cromosoma 4. El cromosoma 1 fue el de mayor longitud (214,8 cM) y también fue el que presentó la mayor distancia entre dos marcadores contiguos alcanzando los 43,8 cM entre los marcadores CAPS1-8685 y IND1-9422. Mientras que la menor distancia máxima entre dos marcadores contiguos se obtuvo en el cromosoma 6, la menor distancia promedio entre marcadores se logró en el cromosoma 10 con apenas 6,0 cM, siendo a su vez el cromosoma de menor longitud con 77,8 cM. La mayor distancia promedio entre marcadores fue de 19,4 cM obtenida en el cromosoma 11.

Tabla III-6: Tabla resumen del mapa de ligamiento obtenido a partir de la población F₂ CxP. Cantidad de marcadores, longitud, distancia promedio y máxima entre marcadores expresada en centimorgan (cM) para cada cromosoma.

Cromosoma	N° de marcadores	Longitud (cM)	Distancia promedio (cM)	Distancia máxima (cM)
1	22	214,8	10,2	43,8
2	10	146,1	16,2	30,3
3	15	157,8	11,3	33,0
4	8	117,0	16,7	26,7
5	13	97,7	8,1	26,5
6	14	90,7	7,0	15,2
7	15	119,4	8,5	22,2
8	16	99,2	6,6	21,3
9	11	137,5	13,8	33,8
10	14	77,8	6,0	33,6
11	9	154,8	19,4	43,6
12	10	82,7	9,2	34,1
Total	157	1495,6	10,3	43,8

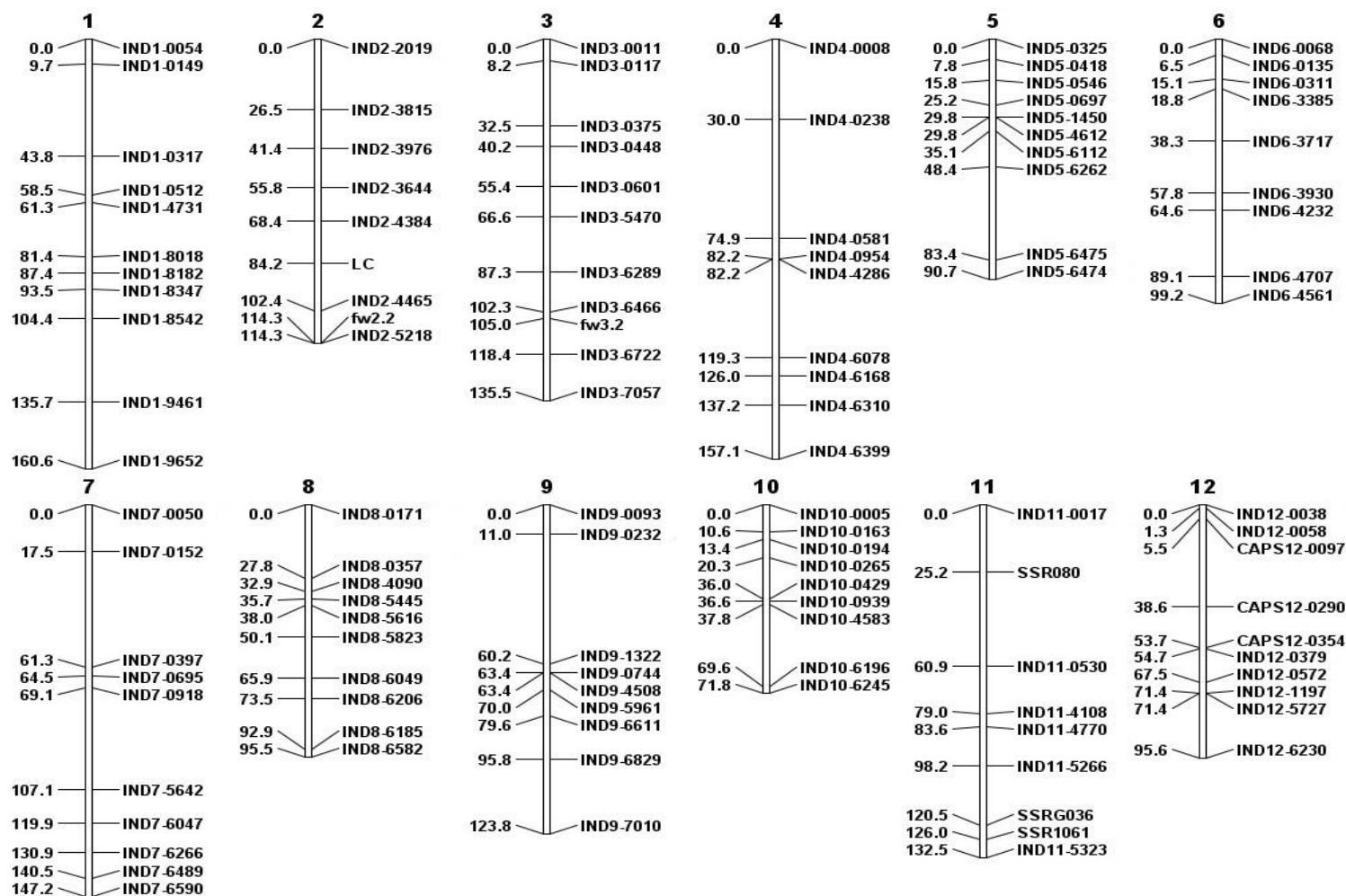
2) Construcción del mapa de ligamiento en la población F_2 PxC:

La población F_2 PxC se caracterizó con 119 marcadores moleculares de ADN (3 SSR, 4 marcadores funcionales, 109 InDel y 3 CAPS) seleccionados en función de las posiciones genéticas en el mapa de ligamiento construido en base a la población F_2 CxP. Finalmente el mapa de ligamiento obtenido estuvo constituido por 116 marcadores agrupados en 12 grupos de ligamiento. Tan solo tres marcadores fueron excluidos del mapa final debido a que tuvieron un alto número de datos faltantes.

Tal como se detectó en la población F_2 CxP, los marcadores IND11-0530, IND11-4108 e IND11-4770 presentaron una segregación distorsionada, mientras que en este caso los dos primeros marcadores de este cromosoma (IND11-0017 y SSR080) presentaron una segregación levemente distorsionada. Sin embargo, al igual que en la población F_2 CxP toda la región cromosómica presentó una distorsión sesgada en dirección al progenitor silvestre.

El orden de todos los marcadores mapeados se correspondió con el esperado según su posición física. La longitud total del mapa de ligamiento obtenido fue de 1.424,4 centimorgan (cM) con una distancia promedio entre dos marcadores consecutivos de 13,7 cM y una distancia máxima de 49,3 cM ubicada en el cromosoma 9, como puede observarse en la Figura III-6.

Figura III-6: Mapa de ligamiento obtenido a partir de la población F₂ PxC derivada del cruzamiento interespecífico entre el cultivar Caimanta de *S. lycopersicum* y la accesión LA722 de *S. pimpinellifolium*.



En la Tabla III-7 se presenta un resumen del mapa de ligamiento genético obtenido en la F₂ PxC, detallando la cantidad de marcadores, la longitud, la distancia promedio y máxima en cM para cada cromosoma. El número de marcadores por cromosoma se mantuvo entre nueve y once.

El cromosoma 1 fue el de mayor longitud (160,6 cM) mientras que el 10 fue el de menor longitud (71,9 cM) y a su vez fue el que presentó la menor distancia promedio entre marcadores con apenas 9,0 cM. La mayor distancia entre dos marcadores contiguos fue de 49,3 cM entre los marcadores IND9-0232 e IND9-1322 del cromosoma 9. La menor distancia máxima entre dos marcadores contiguos fue de 24,2 cM en el cromosoma 3 y la mayor distancia promedio entre marcadores fue de 19,6 cM obtenida en el cromosoma 4.

Tabla III-7: Tabla resumen del mapa de ligamiento obtenido a partir de la población F₂ PxC. Cantidad de marcadores, longitud, distancia promedio y máxima entre marcadores expresada en centimorgan (cM) para cada cromosoma.

Cromosoma	N° de marcadores	Longitud (cM)	Distancia promedio (cM)	Distancia máxima (cM)
1	11	160,6	16,1	34,1
2	9	114,3	14,3	26,6
3	11	135,6	13,6	24,2
4	9	157,1	19,6	44,9
5	10	90,8	10,1	34,9
6	9	99,3	12,4	24,5
7	10	147,2	16,4	43,8
8	10	95,6	10,6	27,8
9	9	123,9	15,5	49,3
10	9	71,9	9,0	31,8
11	9	132,5	16,6	35,7
12	10	95,6	10,6	33,1
Total	116	1424,4	13,7	49,3

DISCUSIÓN

Se pudo corroborar para la gran mayoría de los marcadores tipo *SSR* el polimorfismo entre Caimanta y LA722 previamente detectado por Pereira da Costa et al. (2013). La utilización de estos *SSR* junto con los marcadores funcionales permitió establecer el punto de partida en la construcción de los mapas de ligamiento focalizando el desarrollo de nuevos marcadores en las regiones menos saturadas.

El desarrollo de marcadores tipo *InDel* a partir de los datos de secuencias disponibles en bases de datos públicas resultó exitoso para casi todos los cromosomas mostrando una efectividad del 78,5%, aunque en determinadas regiones del cromosoma 2, 3 y 12 la efectividad disminuyó notablemente. Las regiones del cromosoma 2 y 3 con baja efectividad para el desarrollo de marcadores con esta estrategia se corresponden con las regiones de bajo nivel de polimorfismo detectadas en la comparación entre el genoma de Caimanta y LA722 presentada en el Capítulo I de este trabajo (ver Figura I-4). Respecto del cromosoma 12, la dificultad para desarrollar marcadores polimórficos con esta estrategia se encontró a lo largo de casi todo el cromosoma, correspondiéndose con las diferencias continuas en todo el cromosoma 12 detectadas en el Capítulo I de este trabajo (ver Figura I-4) al comparar el genoma de Caimanta con el del cultivar Heinz 1706. La lista de inserciones y deleciones predichas que se usaron para el desarrollo de marcadores en esta estrategia surgieron de comparar las secuencias de los genomas del cultivar Heinz 1706 de *S. lycopersicum* L. y la entrada LA1589 de *S. pimpinellifolium* L. El principal supuesto en el que se sustentó el desarrollo de marcadores con esta estrategia radica en las semejanzas esperadas entre los genomas de dos genotipos cultivados como son Heinz 1706 y Caimanta por un lado y entre dos accesiones distintas de la misma especie silvestre como son LA1589 y LA722 por el otro. De esta manera es de esperar que la gran mayoría de regiones polimórficas entre Heinz 1706 y LA1589 también lo sean entre Caimanta y LA722. Los resultados presentados en el Capítulo I de esta tesis luego de la comparación de genomas completos, demuestran que este supuesto no se cumple ni el inicio del cromosoma 2 y ni en la región central del cromosoma 3, ya que para estas regiones las diferencias entre Caimanta, LA722 y Heinz 1706 son escasas. Es por ello que la mayoría de los marcadores desarrollados con esta estrategia en estas regiones no resultaron polimórficos entre Caimanta y LA722. Respecto de lo ocurrido en el cromosoma 12, los resultados obtenidos en el Capítulo I demuestran que entre el genoma de Caimanta y el de Heinz 1706 existen diferencias continuas a lo largo de todo el cromosoma. Por lo tanto el supuesto de semejanza entre estos dos genomas planteado para el desarrollo de marcadores con esta

estrategia tampoco se cumple dificultando así la obtención de marcadores polimórficos entre Caimanta y LA722 a lo largo de todo el cromosoma 12.

A partir de la secuenciación, alineamiento respecto al genoma de referencia y comparación de los genomas completos de los progenitores de las poblaciones F_2 se pudo desarrollar marcadores en las regiones donde la primera estrategia utilizada había presentado inconvenientes y además se logró incrementar la cantidad de marcadores disponibles para completar los mapas de ligamiento. A su vez se aumentó la eficiencia en el proceso de caracterización molecular de las poblaciones F_2 mediante la implementación de la técnica de *PCR* múltiple, disminuyendo los tiempos y la cantidad de insumos requeridos para caracterizar cada población.

En ambas poblaciones F_2 se detectó una región cromosómica al inicio del cromosoma 11 con una distorsión sesgada en dirección al progenitor silvestre. Estos resultados concuerdan con los encontrados por Lippman y Tanksley (2001), Gonzalo y van der Knaap (2008) y por Robbins et al. (2011) en mapas de ligamiento genéticos desarrollados a partir de poblaciones F_2 derivadas de cruzamientos interespecíficos entre diferentes genotipos de *S. lycopersicum* L. y *S. pimpinellifolium* L. A su vez, Shirasawa et al. (2010) también informaron una segregación distorsionada en la misma región del cromosoma 11 pero en un mapa de ligamiento construido a partir de una población F_2 obtenida de un cruzamiento intraespecífico entre cultivares de *S. lycopersicum* L.

Los mapas presentados en esta tesis constituyen el primer antecedente de obtención de mapas de ligamiento a partir de poblaciones segregantes recíprocas. Ambos mapas tuvieron una longitud total semejante entre sí, 1.495 cM (F_2 CxP) y 1.424 cM (F_2 PxP) y también respecto a la de los mapas de alta densidad publicados hasta el momento en tomate: 1.276 cM (Tanksley et al. 1992); 1.670 cM (EXPEN2000-SNP), 1.155 cM (EXPEN2012) y 1.049 cM (EXPIM2012) (Sim et al. 2012a). Si bien la longitud total de ambos mapas fue similar, la distancia genética entre los marcadores mapeados en ambas poblaciones no fue siempre semejante marcando diferencias en la recombinación ocurrida en ambas poblaciones. A pesar de que la distancia promedio obtenida entre dos marcadores fue mucho mayor a la que presentan los mapas de alta densidad, los mapas de ligamiento obtenidos en este trabajo serán de gran utilidad para el estudio y la detección en las poblaciones F_2 de regiones cromosómicas asociadas a las características fenotípicas evaluadas.

CONCLUSIONES PARCIALES

Se validó el polimorfismo entre Caimanta y LA722 a lo largo de todo el genoma y se logró caracterizar genotípicamente ambas poblaciones F_2 .

Se obtuvieron los primeros mapas de ligamiento genético a partir de poblaciones F_2 recíprocas con una longitud total y una distancia promedio entre dos marcadores consecutivos de 1.495 cM y 10,3 cM para la F_2 CxP y de 1.424 cM y 13,7 cM para la F_2 PxC.

CAPÍTULO IV

IDENTIFICACIÓN DE REGIONES GENÓMICAS ASOCIADAS A CARACTERES DE CALIDAD DE FRUTOS EN POBLACIONES F₂ RECÍPROCAS

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar y localizar *QTL* en mapas de ligamiento obtenidos a partir de poblaciones F_2 recíprocas.
- Estimar los efectos génicos de los marcadores moleculares asociados a la determinación de los caracteres cuantitativos evaluados.
- Comparar los *QTL* detectados en las poblaciones F_2 recíprocas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Detección de QTL y estimación de efectos génicos

Obtenidos los dos mapas de ligamiento genético se utilizaron los datos de la caracterización fenotípica presentados en el Capítulo II y los datos de la caracterización molecular del Capítulo III, para llevar a cabo mediante el programa R (R Core Team 2014) la detección de *QTL* (*Loci* de caracteres cuantitativos). En ambas poblaciones F_2 se realizó en primer lugar el mapeo de *QTL* por intervalos simples (Lander y Botstein 1989) y luego por intervalos compuestos (Zeng 1993). Se utilizó la función “*sim.geno*” del paquete R/QTL (Broman et al. 2003) para generar datos genotípicos y obtener marcadores simulados cada dos centiMorgan (cM) de distancia como máximo. La simulación de los datos se realizó a partir de los datos genotípicos obtenidos durante la caracterización molecular de cada población F_2 y teniendo en cuenta la frecuencia de recombinación detectada entre marcadores adyacentes durante la construcción del mapa. Los marcadores simulados se codificaron como “cx.locn” remplazando “x” con el número de cromosoma y “n” con la posición en cM en la que se generó cada marcador. Se fijó un $LOD = 2,4$ como límite inferior del nivel de significancia el cuál se corresponde con un valor de probabilidad $p < 0,001$ (Paterson et al. 1988; Lander y Botstein 1989; Grandillo y Tanksley 1996). Los marcadores utilizados como cofactores para llevar a cabo el mapeo por intervalos compuestos fueron seleccionados a partir de los resultados obtenidos del mapeo por intervalos simples. Los marcadores que presentaron asociaciones significativas ($LOD \geq 2,4$) a alguno de los caracteres estudiados durante el mapeo por intervalos simples fueron utilizados como cofactores en el mapeo por intervalos compuestos, con la excepción de:

- aquellos marcadores que presentaron una segregación distorsionada.
- aquellos casos en que se detectaron más de un *QTL* mediante el mapeo por intervalos simples, como máximo fueron utilizados como cofactores los tres marcadores con mayor valor de LOD .
- aquellos casos en que los picos detectados con el mapeo por intervalos simples fueron muy cercanos entre sí, solo se utilizó como cofactor el marcador que presentó el mayor valor de LOD .

Se utilizó el valor de R^2 para estimar el porcentaje de variancia fenotípica total explicada por cada marcador asociado a un *QTL* (Liu 1998). Se calcularon los grados de dominancia (d/a) y la acción génica para cada *QTL* detectado mediante el mapeo por

intervalos compuestos, a partir de los datos fenotípicos registrados para los tres genotipos posibles (homocigota con alelos aportados por el genotipo cultivado (CC), homocigota con alelos silvestres (PP) y heterocigota (CP)) en cada marcador asociado a un *QTL*. Para poder discriminar entre acción génica de aditividad o de dominancia parcial se calcularon intervalos de confianza del 95% para la media de los individuos heterocigotas para el marcador asociado al carácter evaluado. Se consideró aditividad cuando el punto de origen (PO) o valor medio entre los genotipos homocigotas se encontraba dentro del intervalo calculado y dominancia parcial cuando se encontraba por fuera. No se calcularon los grados de dominancia ni la acción génica cuando las diferencias entre los valores medios de los genotipos homocigotas no fueron estadísticamente significativas. En los casos en los que se detectaron asociaciones a marcadores simulados, se calculó el valor de R^2 , los grados de dominancia y la acción génica utilizando los datos genotípicos obtenidos para el marcador molecular más cercano a la posición simulada.

Comparación de los QTL detectados

A partir de la detección de *QTL* mediante el método de mapeo por intervalos compuestos en poblaciones F_2 recíprocas, se realizó una comparación de los resultados obtenidos en cada población y se determinaron las regiones genómicas compartidas en las que se detectaron asociaciones a los mismos caracteres.

RESULTADOS

Detección de QTL y estimación de efectos génicos en la población F_2 CxP

Utilizando como cofactores del mapeo por intervalos compuestos los *QTL* detectados mediante el mapeo por intervalos simples, se detectaron un total de 16 *QTL* con un $LOD \geq 2,4$ encontrándose asociaciones a casi todos los caracteres evaluados con la excepción de la altura de frutos. En la Tabla IV-1 se presentan los resultados de la detección de *QTL* mediante el mapeo por intervalos compuestos, detallando para cada *QTL* el carácter asociado; la ubicación cromosómica; el marcador asociado (para los marcadores simulados se indica entre paréntesis el marcador más cercano); la posición en centiMorgans (cM) del pico de detección; el tamaño del intervalo (en cM) ocupado por el pico y el valor de LOD y de R^2 obtenido. El cromosoma 11 fue el que presentó la mayor cantidad de asociaciones con un total de cuatro. En este cromosoma el marcador simulado c11.loc150 estuvo asociado al carácter forma y el c11.loc148 al N° de lóculos, en ambos casos el marcador más cercano fue FAS. El marcador simulado c11.loc114 estuvo asociado al carácter diámetro siendo el marcador SSRG036 el más cercano, el cual a su vez resultó asociado a la vida poscosecha de los frutos. Las asociaciones entre los marcadores simulados cercanos al marcador FAS con la forma de frutos y el N° de lóculos fueron las que presentaron los mayores valores de R^2 explicando un 27% y 32% de la variancia fenotípica total respectivamente. A su vez se destacaron los valores de R^2 detectados en las asociaciones al pH en el cromosoma 1 y a la vida poscosecha de los frutos en el cromosoma 11 explicando respectivamente un 17% y 15% del total de la variancia fenotípica. En la Tabla IV-1 se muestra la estimación de los efectos génicos de cada *QTL* mediante el valor fenotípico medio de cada genotipo: homocigota con alelos aportados por el genotipo cultivado (CC), homocigota con alelos silvestres (PP) y heterocigota (CP); el número de individuos que presentaron cada genotipo; el punto de origen (PO); el grado de dominancia (d/a) y la acción génica. La gran mayoría de los *QTL* presentaron una acción génica de dominancia completa hacia los alelos silvestres (PP), salvo dos *QTL* del cromosoma 1 asociados al diámetro y peso de los frutos que mostraron dominancia completa hacia los alelos aportados por el genotipo cultivado (CC).

Tabla IV-1: Detección de *QTL* mediante el mapeo por intervalos compuestos en la población F_2 CxP. Carácter asociado, cromosoma (Cr); marcador asociado; posición en centiMorgan (cM) del pico de asociación; intervalo comprendido por el pico (en cM); valor de *LOD* y de R^2 . Estimación de los efectos génicos de cada *QTL* mediante el valor fenotípico medio de cada genotipo: homocigota con alelos aportados por el genotipo cultivado (CC), homocigota con alelos silvestres (PP) y heterocigota (CP); el número de individuos (Nr) que presentaron cada genotipo; el punto de origen (PO); el grado de dominancia (d/a) y la acción génica.

^w Carácter	Cr	^x Marcador asociado	Posición del pico (cM)	Intervalo (cM)	LOD	R^2	^y Media CC	Nr CC	Media CP	Nr CP	Media PP	Nr PP	PO	d/a	^z Acción Génica
Diámetro	1	SSR220060	111	12	2,46	0,13	3,16 ± 0,09a	24	3,06 ± 0,07a	41	2,74 ± 0,09b	24	2,95	0,52	Dominancia completa de CC
Diámetro	11	SSRG036	110	22	2,41	0,10	3,28 ± 0,10a	19	2,92 ± 0,06b	47	2,92 ± 0,10b	21	3,10	-1,00	Dominancia completa de PP
Forma	11	c11.loc150 (FAS)	150	7	5,88	0,27	0,76 ± 0,02b	11	0,86 ± 0,01a	37	0,89 ± 0,01a	30	0,83	-0,54	Dominancia completa de PP
Peso	1	IND1-8182	111	12	3,15	0,13	17,62 ± 1,23a	24	14,85 ± 0,91a	44	11,30 ± 1,21b	25	14,46	0,12	Dominancia completa de CC
VP	11	c11.loc114 (SSRG036)	114	12	3,09	0,15	9,27 ± 0,45b	19	11,12 ± 0,28a	47	11,34 ± 0,42a	21	10,31	-0,79	Dominancia completa de PP
SS	5	c5.loc4 (IND5-0325)	4	6	2,84	0,13	6,67 ± 0,20a	23	5,94 ± 0,15b	42	5,71 ± 0,21b	20	6,19	-0,52	Dominancia completa de PP
SS	6	c6.loc52 (IND6-4232)	52	12	2,81	0,11	5,47 ± 0,21b	21	6,29 ± 0,13a	56	6,10 ± 0,23a	17	5,79	-1,60	Dominancia completa de PP
SS	9	c9.loc64 (IND9-0744)	64	12	4,00	0,12	5,56 ± 0,23b	18	6,41 ± 0,17a	32	6,09 ± 0,23ab	18	5,83	-	No Calculado
pH	1	IND1-4731	63	11	2,79	0,17	4,33 ± 0,04b	26	4,50 ± 0,03a	43	4,49 ± 0,05a	12	4,41	-1,13	Dominancia completa de PP
AT	2	IND2-5218	146	6	3,16	0,12	0,44 ± 0,04b	22	0,57 ± 0,03a	45	0,61 ± 0,04a	20	0,53	-0,53	Dominancia completa de PP
AT	3	c3.loc6 (IND3-0117)	6	16	2,99	0,09	0,45 ± 0,04b	19	0,59 ± 0,03a	49	0,53 ± 0,04ab	21	0,49	-	No Calculado
Nº Lóculos	11	c11.loc148 (FAS)	148	8	10,31	0,32	4,30 ± 0,26a	11	2,74 ± 0,14b	37	2,55 ± 0,16b	30	3,43	-0,78	Dominancia completa de PP
a/b	7	c7.loc24 (IND7-0152)	24	12	2,51	0,13	1,20 ± 0,03b	15	1,32 ± 0,02a	44	1,31 ± 0,02a	33	1,26	-1,18	Dominancia completa de PP
a/b	8	c8.loc32 (IND8-5616)	32	22	2,47	0,09	1,25 ± 0,02b	25	1,33 ± 0,02a	28	1,30 ± 0,03ab	20	1,28	-	No Calculado
L	7	c7.loc24 (IND7-0152)	24	12	3,17	0,14	39,61 ± 0,42a	15	38,18 ± 0,25b	44	37,68 ± 0,29b	33	38,65	-0,48	Dominancia completa de PP
Firmeza	9	IND9-5909	73	12	3,05	0,10	51,96 ± 1,56a	15	47,16 ± 0,99b	37	46,97 ± 1,29b	22	49,47	-0,92	Dominancia completa de PP

^w Diámetro (cm); Forma (altura/diámetro); Peso (g); VP, Vida Poscosecha (días); SS, sólidos solubles (°Brix); AT, acidez titulable (gramos de ácido cítrico/100 gramos de jugo); a/b, relación entre absorbancia a 540 nm (a) y 675 nm (b); L, porcentaje de reflectancia.

^x cx.locn: codificación para marcadores simulados. Se indica con “x” el número de cromosoma y “n” la posición en cM donde se generó el marcador. Entre paréntesis se indica el marcador más cercano.

^y Letras diferentes indican diferencias significativas al 1% ($p < 0,01$)

^z No se calculó la acción génica cuando no hubo diferencias significativas entre los valores fenotípicos medios de los genotipos homocigotas.

Detección de QTL y estimación de efectos génicos en la población F_2 PxC

Utilizando como cofactores del mapeo por intervalos compuestos los *QTL* detectados mediante el mapeo por intervalos simples, se detectaron un total de 33 *QTL* con un $LOD \geq 2,4$ encontrándose asociaciones a casi todos los caracteres evaluados con la excepción del contenido de sólidos solubles. En la Tabla IV-2 se presentan los resultados de la detección de *QTL* mediante el mapeo por intervalos compuestos, detallando para cada *QTL* el carácter asociado; la ubicación cromosómica; el marcador asociado (para los marcadores simulados se indica entre paréntesis el marcador más cercano); la posición en centiMorgans (cM) del pico de detección, el tamaño del intervalo (en cM) ocupado por el pico y el valor de LOD y de R^2 obtenido. El cromosoma 2 fue el que presentó la mayor cantidad de asociaciones con un total de cinco. En este cromosoma el marcador IND2-5218 estuvo asociado al carácter diámetro, altura y peso de fruto, el marcador simulado c2.loc72 y el c2.loc90 a la forma y al N° de lóculos respectivamente, siendo los marcadores IND2-4384 y LC los más cercanos en cada caso. El marcador SSR1061 fue el más cercano a los marcadores simulados c11.loc124, c11.loc126 y c11.loc128 los cuales presentaron las asociaciones con los mayores valores de R^2 . Los marcadores simulados cercanos al SSR1061 presentaron asociaciones al N° de lóculos, el diámetro, la forma y el peso de los frutos explicando un 62%, 29%, 51% y 21% de la variancia fenotípica total respectivamente para cada carácter. A su vez las asociaciones entre el IND2-5218 y el diámetro, la altura y el peso de los frutos presentaron también valores elevados de R^2 explicando un 29%, 23% y 29% de la variancia fenotípica total respectivamente para cada carácter. En esta población se detectaron dos *QTL* asociados a la vida poscosecha de los frutos, uno en el cromosoma 3 y otro en el 5 los cuales explicaron un 12% y un 14% de la variancia fenotípica total respectivamente. También en la Tabla IV-2 se muestra la estimación de los efectos génicos de cada *QTL* mediante el valor fenotípico medio de cada genotipo: homocigota con alelos aportados por el genotipo cultivado (CC), homocigota con alelos silvestres (PP) y heterocigota (CP); el número de individuos que presentaron cada genotipo; el punto de origen (PO); el grado de dominancia (d/a) y la acción génica. La gran mayoría de los *QTL* detectados presentaron una acción génica de dominancia completa o parcial hacia los alelos provenientes del progenitor silvestre (PP). Efectos de dominancia hacia el progenitor cultivado (CC) se manifestaron principalmente al evaluar las asociaciones con la forma y el peso de los frutos y en menor medida con la vida poscosecha y la firmeza. Efectos de aditividad se encontraron al evaluar marcadores asociados principalmente al diámetro, la altura y peso de los frutos y en menor medida al N° de lóculos y la acidez titulable.

Tabla IV-2: Detección de *QTL* mediante el mapeo por intervalos compuestos en la población F_2 PxC. Carácter asociado, cromosoma (Cr); marcador asociado; posición en centiMorgan (cM) del pico de asociación; intervalo comprendido por el pico (en cM); valor de *LOD* y de R^2 . Estimación de los efectos génicos de cada *QTL* mediante el valor fenotípico medio de cada genotipo: homocigota con alelos aportados por el genotipo cultivado (CC), homocigota con alelos silvestres (PP) y heterocigota (CP); el número de individuos (Nr) que presentaron cada genotipo; el punto de origen (PO); el grado de dominancia (d/a) y la acción génica.

^w Carácter	Cr	^x Marcador asociado	Posición del pico (cM)	Intervalo (cM)	LOD	R^2	^y Media CC	Nr CC	Media CP	Nr CP	Media PP	Nr PP	PO	d/a	^z Acción Génica
Diámetro	1	c1.loc100 (IND1-8542)	100	24	2,53	0,08	2,93 ± 0,10a	27	2,70 ± 0,08ab	45	2,51 ± 0,12b	19	2,72	-0,10	Aditividad
Diámetro	2	IND2-5218	114	6	9,58	0,29	3,20 ± 0,10a	24	2,66 ± 0,07b	41	2,40 ± 0,10c	24	2,80	-0,35	Aditividad
Diámetro	3	c3.loc48 (IND3-0601)	48	24	3,58	0,06	3,00 ± 0,13a	14	2,68 ± 0,08b	43	2,61 ± 0,09b	34	2,81	-0,64	Dominancia completa de PP
Diámetro	4	c4.loc76 (IND4-0581)	76	24	2,78	0,08	2,97 ± 0,11a	24	2,63 ± 0,09b	37	2,63 ± 0,10b	31	2,80	-1,00	Dominancia completa de PP
Diámetro	10	IND10-0163	11	12	6,99	0,12	3,03 ± 0,11a	22	2,67 ± 0,07b	50	2,52 ± 0,11b	21	2,78	-0,41	Dominancia completa de PP
Diámetro	11	c11.loc128 (SSR1061)	128	10	8,99	0,29	3,05 ± 0,12a	11	2,78 ± 0,06b	48	2,31 ± 0,08c	27	2,68	0,27	Aditividad
Altura	1	c1.loc102 (IND1-8542)	102	24	4,35	0,12	2,50 ± 0,07a	27	2,29 ± 0,05b	45	2,13 ± 0,08b	19	2,32	-0,14	Dominancia completa de PP
Altura	2	IND2-5218	114	6	6,72	0,23	2,56 ± 0,07a	24	2,32 ± 0,05b	41	2,08 ± 0,07c	24	2,32	0,00	Aditividad
Altura	4	c4.loc76 (IND4-0581)	76	24	2,57	0,08	2,48 ± 0,07a	24	2,22 ± 0,06b	37	2,31 ± 0,06ab	31	2,40	-	No Calculado
Altura	9	IND9-0093	0	10	2,73	0,10	2,30 ± 0,08ab	20	2,44 ± 0,05a	44	2,18 ± 0,07b	26	2,24	-	No Calculado
Altura	10	IND10-0163	11	12	5,26	0,13	2,53 ± 0,07a	22	2,29 ± 0,05b	50	2,15 ± 0,08b	21	2,34	-0,26	Dominancia completa de PP
Forma	2	c2.loc72 (IND2-4384)	72	24	4,63	0,12	0,83 ± 0,02b	20	0,85 ± 0,01b	42	0,90 ± 0,02a	26	0,87	0,43	Dominancia completa de CC
Forma	9	c9.loc32 (IND9-0232)	32	24	3,03	0,12	0,89 ± 0,02a	20	0,87 ± 0,01a	45	0,82 ± 0,01b	25	0,86	0,43	Dominancia completa de CC
Forma	11	c11.loc126 (SSR1061)	126	11	17,12	0,51	0,74 ± 0,02c	11	0,87 ± 0,01b	48	0,91 ± 0,01a	27	0,83	-0,53	Dominancia parcial de PP
Peso	1	c1.loc102 (IND1-8542)	102	24	3,87	0,10	14,12 ± 1,13a	27	10,97 ± 0,88ab	45	8,87 ± 1,35b	19	11,50	-0,20	Aditividad
Peso	2	IND2-5218	114	6	9,45	0,29	16,70 ± 1,09a	24	10,74 ± 0,83b	41	7,83 ± 1,09c	24	12,27	-0,34	Aditividad
Peso	3	c3.loc46 (IND3-0601)	46	22	3,45	0,07	14,71 ± 1,51a	14	10,96 ± 0,86b	43	10,24 ± 0,97b	34	12,48	-0,68	Dominancia completa de PP
Peso	4	IND4-0581	75	22	2,78	0,09	14,49 ± 1,21a	24	10,29 ± 0,97b	37	10,41 ± 1,06b	31	12,45	-1,06	Dominancia completa de PP
Peso	10	IND10-0163	11	12	7,60	0,14	15,27 ± 1,18a	22	10,58 ± 0,78b	50	9,24 ± 1,21b	21	12,26	-0,56	Dominancia completa de PP
Peso	11	c11.loc128 (SSR1061)	128	11	5,29	0,21	13,79 ± 1,46a	11	12,15 ± 0,70a	48	7,34 ± 0,93b	27	10,57	0,49	Dominancia completa de CC

^w Diámetro(cm), Altura(cm), Forma (altura/diámetro), Peso(g). ^x cx.locn: codificación para marcadores simulados. Se indica con “x” el número de cromosoma y “n” la posición en cM donde se generó el marcador. Entre paréntesis se indica el marcador más cercano. ^y Letras diferentes indican diferencias significativas al 1% ($p < 0,01$). ^z No se calculó la acción génica cuando no hubo diferencias significativas entre los valores fenotípicos medios de los genotipos homocigotas.

Tabla IV-2 (Continuación): Detección de *QTL* mediante el mapeo por intervalos compuestos en la población F_2 PxC. Carácter asociado, cromosoma (Cr); marcador asociado; posición en centiMorgan (cM) del pico de asociación; intervalo comprendido por el pico (en cM); valor de *LOD* y de R^2 . Estimación de los efectos génicos de cada *QTL* mediante el valor fenotípico medio de cada genotipo: homocigota con alelos aportados por el genotipo cultivado (CC), homocigota con alelos silvestres (PP) y heterocigota (CP); el número de individuos (Nr) que presentaron cada genotipo; el punto de origen (PO); el grado de dominancia (d/a) y la acción génica.

^w Carácter	Cr	^x Marcador asociado	Posición del pico (cM)	Intervalo (cM)	LOD	R^2	^y Media CC	Nr CC	Media CP	Nr CP	Media PP	Nr PP	PO	d/a	^z Acción Génica
VP	3	c3.loc104 (fw3.2)	104	12	2,71	0,12	10,19 ± 0,48a	22	10,85 ± 0,33a	46	8,82 ± 0,46b	24	9,51	1,96	Dominancia completa de CC
VP	5	c5.loc12 (IND5-0546)	12	12	3,85	0,14	10,78 ± 0,40a	27	9,12 ± 0,33b	39	10,83 ± 0,45a	21	10,81	-	No Calculado
pH	4	IND4-6078	119	22	2,63	0,12	4,60 ± 0,07a	15	4,38 ± 0,04b	42	4,55 ± 0,06ab	16	4,58	-	No Calculado
pH	9	c9.loc118 (IND9-7010)	118	12	4,08	0,13	4,61 ± 0,05a	31	4,45 ± 0,05b	34	4,36 ± 0,06b	19	4,49	-0,28	Dominancia completa de PP
AT	9	c9.loc116 (IND9-7010)	116	20	2,42	0,11	0,53 ± 0,03b	31	0,60 ± 0,03ab	34	0,70 ± 0,04a	19	0,62	0,18	Aditividad
AT	10	IND10-0005	0	6	2,40	0,14	0,49 ± 0,04b	20	0,61 ± 0,03a	34	0,69 ± 0,04a	22	0,59	-0,20	Dominancia completa de PP
Nº Lóculos	2	c2.loc90 (LC)	90	22	8,96	0,09	3,42 ± 0,25a	14	2,91 ± 0,17ab	32	2,58 ± 0,21b	21	3,00	-0,21	Aditividad
Nº Lóculos	11	c11.loc124 (SSR1061)	124	9	22,57	0,62	5,20 ± 0,20a	11	2,91 ± 0,10b	48	2,43 ± 0,14c	25	3,82	-0,65	Dominancia parcial de PP
a/b	7	c7.loc130 (IND7-6266)	130	12	3,13	0,14	1,17 ± 0,03b	18	1,31 ± 0,02a	50	1,29 ± 0,03a	17	1,23	-1,33	Dominancia completa de PP
L	6	c6.loc84 (IND6-4707)	84	24	2,47	0,09	39,39 ± 0,44a	17	38,06 ± 0,33b	29	38,36 ± 0,41ab	19	38,88	-	No Calculado
L	7	c7.loc8 (IND7-0152)	8	12	5,01	0,11	40,12 ± 0,63a	8	38,29 ± 0,29b	38	38,08 ± 0,40b	20	39,10	-0,79	Dominancia completa de PP
Firmeza	1	IND1-0054	0	6	2,57	0,17	49,53 ± 1,48a	16	50,09 ± 1,12a	28	44,29 ± 1,33b	20	46,91	1,21	Dominancia completa de CC
Firmeza	6	IND6-4232	65	22	3,29	0,12	50,72 ± 1,73a	12	45,71 ± 1,13b	28	49,34 ± 1,50ab	16	50,03	-	No Calculado

^w VP, Vida Poscosecha (días); AT, acidez titulable (gramos de ácido cítrico/100 gramos de jugo); a/b, relación entre absorbancia a 540 nm (a) y 675 nm (b); L, porcentaje de reflectancia.

^x cx.locn: codificación del marcador simulado. Indicando con “x” el número de cromosoma y “n” la posición en cM donde se generó el marcador. Entre paréntesis se indica el marcador más cercano.

^y Letras diferentes indican diferencias significativas al 1% ($p < 0,01$)

^z No se calculó la acción génica cuando no hubo diferencias significativas entre los valores fenotípicos medios de los genotipos homocigotas.

Comparación de los QTL detectados

Se detectaron tres regiones del genoma que presentaron asociaciones a los mismos caracteres en ambas poblaciones F_2 , mientras que todos los demás QTL encontrados fueron exclusivos de una u otra población. Se encontraron asociaciones comunes en el cromosoma 1 para el carácter diámetro y peso de frutos; en el cromosoma 7 para el parámetro L de color y en el cromosoma 11 se detectaron asociaciones al número de lóculos, al diámetro y a la forma de fruto. En la Tabla IV-3 se detalla para las tres regiones del genoma que presentaron asociaciones en común en ambas F_2 , el cromosoma (Cr) en el que se detectaron; el carácter y el marcador asociado con su respectiva posición física para cada población F_2 . En los casos en los que el carácter estuvo asociado a un marcador simulado, se indica entre paréntesis el marcador más cercano.

Tabla IV-3: Comparación de regiones genómicas asociadas a los mismos caracteres en ambas poblaciones F_2 recíprocas. Cromosoma (Cr) en el que se detectaron las regiones; carácter y marcador asociado con su respectiva posición física.

Cr	w Caracter	x F_2 CxP		x F_2 PxC	
		y Marcador asociado	z Posición Física	y Marcador asociado	z Posición Física
1	Diámetro	SSR220060	SL2.50ch01:81.703.670	IND1-8542	SL2.50ch01:85.423.404
	Peso	IND1-8182	SL2.50ch01:81.820.319	c1.loc102 (IND1-8542)	
7	L	c7.loc24 (IND7-0152)	SL2.50ch07:1.525.059	c7.loc8 (IND7-0152)	SL2.50ch07:1.525.059
11	Diámetro	SSRG036	SL2.50ch11:54.409.537	c11loc128 (SSR1061)	SL2.50ch11:55.169.932
	Forma	c11.loc150 (FAS)	SL2.50ch11:54.877.107	c11loc126 (SSR1061)	
	Nº Lóculos	c11.loc148 (FAS)		c11loc124 (SSR1061)	

^w L, porcentaje de reflectancia; Forma (altura/diámetro).

^x Población F_2 proveniente del cruzamiento entre Caimanta (C) y LA722 (P). La primera letra corresponde al progenitor femenino.

^y cx.locn: codificación del marcador simulado. Indicando con “x” el número de cromosoma y “n” la posición en cM donde se generó el marcador. Entre paréntesis se indica el marcador más cercano.

^z posición física en la versión SL2.50 del ensamblado del genoma de referencia en tomate

De los cuatro marcadores funcionales utilizados en este trabajo se encontraron asociaciones en ambas poblaciones F_2 solo para la región del marcador FAS. En la población F_2 CxP no se detectaron asociaciones a ninguno de los otros tres marcadores funcionales, mientras que en la F_2 PxC se encontraron también asociaciones entre la forma y el número de lóculos al marcador LC y entre el peso de los frutos y una región cercana a la del marcador FW2.2.

DISCUSIÓN

La cantidad y la ubicación de los *QTL* detectados en las poblaciones F_2 recíprocas fueron notablemente diferentes. Solo tres regiones genómicas resultaron asociadas a los mismos caracteres en ambas poblaciones F_2 . Estas regiones se encontraron cerca de *QTL* previamente reportados por otros autores en diferentes trasfondos genéticos: *QTL fw1.2* (Grandillo y Tanksley 1996; Lippman y Tanksley 2001); *QTL fc7.1* (Tanksley et al. 1996); *QTL L*.7F* (Liu et al. 2003a) y gen *FAS* (Lippman y Tanksley 2001; Barrero y Tanksley 2004; Cong et al. 2008). Los *QTL* del cromosoma 1 asociados al carácter diámetro y peso de frutos se detectaron en una región cercana al *QTL fw1.2*; el *QTL* del cromosoma 7 asociado al parámetro L de color se ubicó en una región cercana al *QTL fc7.1* y al *QTL L*.7F* y los *QTL* del cromosoma 11 asociados al número de lóculos, diámetro y forma de fruto se encontraron en una región cercana al gen *FAS*. Todos los demás *QTL* detectados en este trabajo fueron exclusivos de una u otra población F_2 evidenciando que según la dirección del cruzamiento inicial distintas regiones cromosómicas toman relevancia en la determinación de los caracteres de calidad de fruto evaluados.

La utilización de marcadores funcionales para peso y para número de lóculos y forma de fruto permitieron analizar algunas de estas regiones puntuales del genoma que tomaron una relevancia distinta en ambas F_2 . Respecto del número de lóculos y la forma de los frutos, la región cercana al gen *FAS* estuvo asociada en ambas poblaciones F_2 a los dos caracteres en cambio para la región donde se encuentra ubicado el gen *LC* (Lippman y Tanksley 2001; van der Knaap y Tanksley 2003; Barrero y Tanksley 2004) se detectaron asociaciones solo en la población F_2 PxC. Algo semejante sucedió al analizar los marcadores funcionales para peso de fruto asociados al *QTL fw3.2* (Chen et al. 1999; Saliba-Colombani et al. 2001; Lippman y Tanksley 2001; van der Knaap y Tanksley 2003) y al *QTL fw2.2* (Grandillo y Tanksley 1996; Chen et al. 1999; Lippman y Tanksley 2001; van der Knaap y Tanksley 2003). En la región cercana al *QTL fw3.2* no se encontraron asociaciones en ninguna de las poblaciones F_2 , mientras que en la región del *QTL fw2.2* se detectaron asociaciones al diámetro, altura y peso de frutos solo en la F_2 PxC. Otras regiones del genoma que han sido asociadas al peso de los frutos consistentemente por otros autores pero para las cuales no se encuentran disponibles marcadores funcionales son la región del *QTL fw1.2* (Grandillo y Tanksley 1996; Lippman y Tanksley 2001); *QTL fw2.1* (Grandillo y Tanksley 1996; Saliba-Colombani et al. 2001; Lippman y Tanksley 2001) y *QTL fw11.3* (Grandillo y Tanksley 1996; Saliba-Colombani et al. 2001; Lippman y Tanksley 2001; van der Knaap y Tanksley 2003). Al estudiar estas regiones se evidencia que en la región cercana al *QTL fw1.2* se encontraron asociaciones en ambas poblaciones F_2 , mientras que

cerca del *fw2.1* no hubo asociaciones en ninguna de las dos y en la región del *fw11.3* solo se detectaron asociaciones en la F₂ PxC. Por lo tanto a partir del análisis de regiones genómicas en las que ya han sido comprobadas las asociaciones a caracteres de forma y peso de frutos en diferentes fondos genéticos, se reafirma que la dirección del cruzamiento inicial influye en la relevancia que toman las distintas regiones cromosómicas involucradas en la determinación de estas características.

Para el carácter vida poscosecha se detectaron en total tres *QTL*, uno en la población F₂ CxP ubicado en el cromosoma 11 y dos en la población F₂ PxC localizados en los cromosomas 3 y 5. El *QTL* ubicado en el cromosoma 5 fue detectado en la misma región en la que se encuentra el gen mutante para la maduración de los frutos *rin* (*ripening-inhibitor*; (Giovannoni et al. 1995; Giovannoni et al. 1999) siendo posible entonces que este sea un alelo diferente a los ya reportados. Se evidenció una relevancia diferencial de distintas regiones del genoma en la determinación del carácter y del análisis de la acción génica de los *QTL* detectados se destaca que tanto el cultivar Caimanta como la accesión LA722 aportaron alelos que permitieron prolongar la vida poscosecha de los frutos. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Pratta et al. (2011b).

Tres *QTL* detectados en este trabajo se encontraron en regiones genómicas cercanas a *QTL* detectados previamente por Pereira da Costa et al. (2013) en poblaciones de retrocruzas derivadas también del cruzamiento entre el cultivar Caimanta y la accesión silvestre LA722. El *QTL* asociado al parámetro a/b de color detectado en la F₂ CxP que estuvo ligado al IND7-0152 (posición física SL2.50ch07:1.525.059) fue también detectado en una retrocruza pero asociado al SSR286 (posición física SL2.50ch07:1.876.222). La región genómica asociada a la forma de los frutos marcada por el IND9-0232 (posición física SL2.50ch09:2.323.223) en la población F₂ PxC fue también detectada en una retrocruza pero asociada al SSR070 (posición física SL2.50ch09:3.628.940). Finalmente, la región del cromosoma 10 asociada a los caracteres diámetro, altura y peso de los frutos detectada en la F₂ PxC al estar ligada al IND10-0163 (posición física SL2.50ch10:1.631.600) había sido detectada previamente en una retrocruza pero ligada al SSR596 (posición física SL2.50ch10:2.831.041). La detección de estos tres *QTL* en diferentes generaciones segregantes obtenidas a partir de cruzamientos entre los mismos progenitores y en diferentes años permite validar la estabilidad del efecto que poseen estas regiones genómicas en este trasfondo genético en la determinación de las características fenotípicas asociadas.

CONCLUSIONES PARCIALES

En la población F_2 CxP se detectó un *QTL* en el cromosoma 11 para vida poscosecha y 15 *QTL* asociados a otros caracteres de calidad de fruto. En la población F_2 PxC se detectaron dos *QTL* para vida poscosecha, uno en el cromosoma 3 y otro en el 5 y 31 *QTL* asociados a otros caracteres de calidad de fruto.

En ambas poblaciones F_2 la dominancia hacia el progenitor silvestre fue la acción génica prevaleciente. La dominancia hacia el progenitor cultivado se manifestó principalmente al evaluar el efecto génico de marcadores moleculares asociados a características relacionadas con el tamaño y la forma de los frutos. Tanto el cultivar Caimanta como la accesión LA722 aportaron alelos que permiten prolongar la vida poscosecha de los frutos.

En función de la dirección del cruzamiento realizado ciertas regiones genómicas tienen efectos diferenciales en la determinación fenotípica de los caracteres de calidad de fruto evaluados. Se validó la estabilidad del efecto causado por ciertas regiones del genoma asociadas al color, tamaño y forma de los frutos.

CONSIDERACIONES FINALES

La obtención de la secuencia del cultivar Caimanta de *S. lycopersicum* L. y la accesión LA722 de *S. pimpinellifolium* L. y la posterior comparación con otros genomas secuenciados permitió determinar que el cruzamiento entre estos dos genotipos abarca una gran parte de la variabilidad genética disponible en tomate. Los marcadores moleculares desarrollados y los mapas de ligamiento construidos a partir de este cruzamiento permitieron caracterizar molecularmente los diferentes materiales vegetales derivados y profundizar el análisis de las regiones genómicas asociadas a caracteres cuantitativos.

Hasta el momento los efectos recíprocos en tomate habían sido estudiados solo a nivel fenotípico para pocos caracteres y en generaciones F_1 (Smith et al. 2008). La originalidad de este trabajo radica en que además de evaluarse los efectos para 12 caracteres cuantitativos de importancia agronómica, también se avanzó en el análisis fenotípico de las generaciones F_2 detectándose efectos recíprocos para cuatro caracteres que hacen a la calidad de los frutos como lo son el diámetro, la altura, el peso y la vida poscosecha.

Se han publicado numerosos mapas de ligamiento a partir de cruzamientos interespecíficos en tomate y todos han sido obtenidos utilizando el genotipo cultivado como progenitor femenino (Foolad 2007). Esta tesis presenta el primer mapa de ligamiento en tomate utilizando el genotipo silvestre como progenitor femenino. Esto permitió realizar de una manera inédita la evaluación de los efectos recíprocos a nivel molecular mediante la comparación de mapas de ligamiento obtenidos en poblaciones F_2 recíprocas y el posterior mapeo de *QTL*. El tamaño de ambos mapas fue semejante y el orden de los marcadores fue el mismo en los 12 grupos de ligamiento. Las diferencias entre los mapas estuvieron en la distancia genética encontrada entre algunos marcadores adyacentes mostrando que para determinadas regiones del genoma las poblaciones F_2 presentaron diferencias en la recombinación ocurrida. La detección de *QTL* en ambas F_2 permitió comparar los resultados e identificar que distintas regiones del genoma toman una relevancia diferencial en la determinación de caracteres de calidad de frutos en función de la dirección del cruzamiento inicial. Por ejemplo, la región cercana al *QTL fw2.2* (SL2.50ch02:52.251.863) mostró un relevancia diferencial en ambas poblaciones en cuanto a la determinación del peso de los frutos. Por un lado presentó el mayor efecto en la población F_2 PxC (marcador asociado = IND2-5218, $R^2 = 29\%$; ver Tabla IV-2) mientras que en la F_2 CxP (Tabla IV-1) ni siquiera estuvo asociada al peso. A su vez, el marcador IND2-5218 (SL2.50ch02:52.188.354) también estuvo asociado al diámetro y la altura de los frutos solo en la población F_2 PxC. El gen involucrado en el efecto causado por el *QTL fw2.2* (Grandillo y Tanksley 1996; Chen et

al. 1999; Lippman y Tanksley 2001; van der Knaap y Tanksley 2003) ha sido identificado y se ha determinado que es un regulador de la división celular que afecta tanto el diámetro como la altura de los frutos modificando el peso de los mismos pero no su forma y que se expresa en tejidos maternos de frutos en desarrollo como son la placenta y el pericarpio (Frary et al. 2000; Cong et al. 2002; Liu et al. 2003b; Cong y Tanksley 2006). Estos resultados permiten postular que la relevancia diferencial que tomó la región cercana al *QTL fw2.2* en la determinación del diámetro, altura y peso de los frutos en las poblaciones F_2 recíprocas fue causada por una interacción diferencial entre el genotipo utilizado como progenitor femenino y la expresión del gen *FW2.2* que se expresa en tejidos de origen materno. La falta de estudios con la suficiente profundidad en otras regiones asociadas al diámetro, altura y peso de los frutos o a las regiones que se expresaron diferencialmente para el carácter vida poscosecha en ambas F_2 impiden realizar el mismo análisis que el llevado a cabo con la región del *QTL fw2.2*, pero los resultados obtenidos permiten postular que algo similar puede estar ocurriendo en otras regiones del genoma que estuvieron asociadas a caracteres que presentaron efectos recíprocos a nivel fenotípico.

Se debe considerar también que la detección de diferentes regiones en ambos mapas asociadas a los mismos caracteres pero que no presentaron efectos recíprocos a nivel fenotípico pueden deberse a cuestiones de estructura de las poblaciones F_2 evaluadas o a asociaciones espurias. Por lo tanto estudios de validación de los *QTL* detectados en este trabajo son necesarios como primer paso para luego poder avanzar con el mapeo fino de estas regiones candidatas y finalmente lograr la identificación y evaluación de la expresión de los genes involucrados en la determinación de las características asociadas. A pesar de ello, la detección de efectos recíprocos a nivel fenotípico y la identificación de distintas regiones del genoma que tienen efectos diferenciales en la determinación de caracteres de calidad de frutos en función de la dirección del cruzamiento inicial, resaltan la importancia de evaluar y considerar el material a utilizar como progenitor femenino en un programa de mejoramiento.

CONCLUSIÓN GENERAL

Se validó la existencia de regiones genómicas de la accesión LA722 de *Solanum pimpinellifolium* L. que prolongan la vida poscosecha y mejoran otros caracteres de calidad de fruto. En el mapa de ligamiento obtenido a partir de la población F_2 CxP, se localizaron un *QTL* en el cromosoma 11 para vida poscosecha y 15 *QTL* asociados a otros caracteres de calidad de fruto, mientras que en la población F_2 PxC se detectaron dos *QTL* para vida poscosecha, uno en el cromosoma 3 y otro en el 5 y 31 *QTL* asociados a otros caracteres de calidad de fruto. En ambas poblaciones F_2 recíprocas se detectaron tres regiones genómicas asociadas a los mismos caracteres cuantitativos. La primera en el cromosoma 1 asociada al diámetro y peso de los frutos; la segunda en el cromosoma 7 asociada al porcentaje de reflectancia (L) del color y la tercera en el cromosoma 11 asociada al diámetro, forma y número de lóculos.

BIBLIOGRAFÍA

- Andrews S (2010) FastQC a quality control tool for high throughput sequence data. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
- Angosto Trillo T, Lozano Ruíz R, Martínez Zapater JM, et al (2001) Mejora genética del sabor en tomate: Identificación de marcadores moleculares (PCR-AFLPs) para selección de genotipos de interés agronómico. FIAPA, Fundación para la Investigación Agraria de la Provincia de Almería. In: FIAPA, Fund. para la Investig. Agrar. la Prov. Almer. <http://www.fiapa.es>.
- Barrero LS, Tanksley SD (2004) Evaluating the genetic basis of multiple-locule fruit in a broad cross section of tomato cultivars. *Theor Appl Genet* 109:669–679. doi: 10.1007/s00122-004-1676-y
- Bartoszewski G, Niedziela A, Szwacka M, Niemirowicz-Szczytt K (2003) Modification of tomato taste in transgenic plants carrying a thaumatin gene from *Thaumatococcus daniellii* Benth. *Plant Breed* 122:347–351. doi: 10.1046/j.1439-0523.2003.00864.x
- Bernacchi D, Beck-Bunn T, Eshed Y, et al (1998) Advanced backcross QTL analysis in tomato. I. Identification of QTLs for traits of agronomic importance from *Lycopersicon hirsutum*. *Theor Appl Genet* 97:381–397. doi: 10.1007/s001220050908
- Blanca J, Cañizares J, Cordero L, et al (2012) Variation revealed by SNP genotyping and morphology provides insight into the origin of the tomato. *PLoS One* 7:e48198. doi: 10.1371/journal.pone.0048198
- Blanca J, Montero-Pau J, Sauvage C, et al (2015) Genomic variation in tomato, from wild ancestors to contemporary breeding accessions. *BMC Genomics* 16:257. doi: 10.1186/s12864-015-1444-1
- Blum A, Monir M, Wirsansky I, Ben-Arzi S (2005) The beneficial effects of tomatoes. *Eur J Intern Med* 16:402–404. doi: 10.1016/j.ejim.2005.02.017
- Broman KW, Wu H, Sen S, Churchill GA (2003) R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics* 19:889–890. doi: 10.1093/bioinformatics/btg112
- Carelli BP, Gerald LTS, Grazziotin FG, Echeverrigaray S (2006) Genetic diversity among Brazilian cultivars and landraces of tomato *Lycopersicon esculentum* Mill. revealed by RAPD markers. *Genet Resour Crop Evol* 53:395–400. doi: 10.1007/s10722-004-0578-9
- Causse M, Saliba-Colombani V, Lesschaeve I, Buret M (2001) Genetic analysis of

- organoleptic quality in fresh market tomato. 2. Mapping QTLs for sensory attributes. *Theor Appl Genet* 102:273–283. doi: 10.1007/s001220051644
- Chakrabarti M, Zhang N, Sauvage C, et al (2013) A cytochrome P450 regulates a domestication trait in cultivated tomato. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:17125–17130. doi: 10.1073/pnas.1307313110
- Chen FQ, Foolad MR, Hyman J, et al (1999) Mapping of QTLs for lycopene and other fruit traits in a *Lycopersicon esculentum* x *L. pimpinellifolium* cross and comparison of QTLs across tomato species. *Mol Breed* 5:283–299. doi: 10.1023/A:1009656910457
- Collard BCY, Jahufer MZZ, Brouwer JB, Pang ECK (2005) An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142:169–196. doi: 10.1007/s10681-005-1681-5
- Cong B, Barrero LS, Tanksley SD (2008) Regulatory change in YABBY-like transcription factor led to evolution of extreme fruit size during tomato domestication. *Nat Genet* 40:800–804. doi: 10.1038/ng.144
- Cong B, Liu J, Tanksley SD (2002) Natural alleles at a tomato fruit size quantitative trait locus differ by heterochronic regulatory mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:13606–11. doi: 10.1073/pnas.172520999
- Cong B, Tanksley SD (2006) FW2.2 and cell cycle control in developing tomato fruit: A possible example of gene co-option in the evolution of a novel organ. *Plant Mol Biol* 62:867–880. doi: 10.1007/s11103-006-9062-6
- DePristo M a, Banks E, Poplin R, et al (2011) A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat Genet* 43:491–8. doi: 10.1038/ng.806
- Esquinas-Alcazar JT (1987) Plant genetic resources: a base for food security. *Ceres FAO Rev* 20:39–45.
- Fernandez-Pozo N, Menda N, Edwards JD, et al (2015) The Sol Genomics Network (SGN)-from genotype to phenotype to breeding. *Nucleic Acids Res* 43:D1036–D1041. doi: 10.1093/nar/gku1195
- Ferratto J, Mondino MC, Longo A, Grasso R (2006) Diagnóstico y necesidades de estrategias de intervención del Proyecto Hortícola de Rosario. 40.
- Foolad MR (2007) Genome mapping and molecular breeding of tomato. *Int J Plant*

- Genomics 2007:64358. doi: 10.1155/2007/64358
- Frary A, Nesbitt T, Frary A, et al (2000) fw2.2: A quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science* (80-.). 289:85–88.
- Frary A, Xu Y, Liu J, et al (2005) Development of a set of PCR-based anchor markers encompassing the tomato genome and evaluation of their usefulness for genetics and breeding experiments. *Theor Appl Genet* 111:291–312. doi: 10.1007/s00122-005-2023-7
- Fulton TM, Grandillo S, Beck-Bunn T, et al (2000) Advanced backcross QTL analysis of a *Lycopersicon esculentum* x *Lycopersicon parviflorum* cross. *Theor Appl Genet* 100:1025–1042. doi: 10.1007/s001220051384
- Fulton TM, Van der Hoeven R, Eannetta NT, Tanksley SD (2002) Identification, analysis, and utilization of conserved ortholog set markers for comparative genomics in higher plants. *Plant Cell* 14:1457–1467. doi: 10.1105/tpc.010479
- García-Alcalde F, Okonechnikov K, Carbonell J, et al (2012) Qualimap: Evaluating next-generation sequencing alignment data. *Bioinformatics* 28:2678–2679. doi: 10.1093/bioinformatics/bts503
- Giovannoni J, Yen H, Shelton B, et al (1999) Genetic mapping of ripening and ethylene-related loci in tomato. *Theor Appl Genet* 98:1005–1013. doi: 10.1007/s001220051161
- Giovannoni JJ (2004) Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell* 16:S170–S180. doi: 10.1105/tpc.019158
- Giovannoni JJ, Noensie EN, Ruezinsky DM, et al (1995) Molecular genetic analysis of the ripening-inhibitor and non-ripening loci of tomato: A first step in genetic map-based cloning of fruit ripening genes. *Mol Gen Genet* 248:195–206. doi: 10.1007/BF02190801
- Gonzalo MJ, van der Knaap E (2008) A comparative analysis into the genetic bases of morphology in tomato varieties exhibiting elongated fruit shape. *Theor Appl Genet* 116:647–56. doi: 10.1007/s00122-007-0698-7
- Grandillo S, Tanksley SD (1996) QTL analysis of horticultural traits differentiating the cultivated tomato from the closely related species *Lycopersicon pimpinellifolium*. *Theor Appl Genet* 92:935–951. doi: 10.1007/BF00224033
- Gur A, Zamir D (2004) Unused natural variation can lift yield barriers in plant breeding. *PLoS Biol* 2:1610–1615. doi: 10.1371/journal.pbio.0020245

- INTA (2005) Plan de tecnología regional (2006-2008). Centro Regional Santa Fe. Rafaela.
- Kosambi DD (1943) The estimation of map distances from recombination values. *Ann Eugen* 12:172–175. doi: 10.1111/j.1469-1809.1943.tb02321.x
- Kruskal WH, Wallis WA (1952) Use of ranks in one-criterion variance analysis stable. *J Am Stat Assoc* 47:583–621.
- Lander ES, Botstein S (1989) Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121:185.
- Lander ES, Waterman MS (1988) Genomic mapping by fingerprinting random clones: a mathematical analysis. *Genomics* 2:231–239.
- Langmead B, Salzberg SL (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 9:357–359. doi: 10.1038/nmeth.1923
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al (2009) The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25:2078–2079. doi: 10.1093/bioinformatics/btp352
- Lin T, Zhu G, Zhang J, et al (2014) Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding. *Nat Genet*. doi: 10.1038/ng.3117
- Lippman Z, Tanksley SD (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* 158:413–22.
- Liu BH (1998) Statistical genomics: linkage, mapping, and QTL analysis. CRC press, Boca Raton
- Liu Y-S, Gur A, Ronen G, et al (2003a) There is more to tomato fruit colour than candidate carotenoid genes. *Plant Biotechnol J* 1:195–207. doi: 10.1046/j.1467-7652.2003.00018.x
- Liu J, Cong B, Tanksley SD (2003b) Generation and Analysis of an Artificial Gene Dosage Series in Tomato to Study the Mechanisms by Which the Cloned Quantitative Trait Locus fw2.2 Controls Fruit Size 1. *Plant Physiol* 132:292–299. doi: 10.1104/pp.102.018143.has
- Mariotti JA, Collavino NG (2014) Los caracteres cuantitativos en la mejora genética de los cultivos, 1st edn. Orientación Gráfica Editora, Buenos Aires
- McCouch S, Baute GJ, Bradeen J, Bramel P, et al. (2013) Feeding the future. *Nature* 499:23–24.

- McKenna A, Hanna M, Banks E, et al (2010) The genome analysis toolkit: a mapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res* 20:1297–303. doi: 10.1101/gr.107524.110
- Meli VS, Ghosh S, Prabha TN, et al (2010) Enhancement of fruit shelf life by suppressing N-glycan processing enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:2413–2418. doi: 10.1073/pnas.0909329107
- Mueller L a, Solow TH, Taylor N, et al (2005) The SOL Genomics Network: a comparative resource for Solanaceae biology and beyond. *Plant Physiol* 138:1310–1317. doi: 10.1104/pp.105.060707
- Muños S, Ranc N, Botton E, et al (2011) Increase in tomato locule number is controlled by two single-nucleotide polymorphisms located near WUSCHEL. *Plant Physiol* 156:2244–2254. doi: 10.1104/pp.111.173997
- Murtagh F, Legendre P (2014) Ward's hierarchical agglomerative clustering method: which algorithms implement Ward's criterion? *J Classif* 31:274–295. doi: 10.1007/s00357-
- Nakamura RR, Stanton ML (1989) Embryo growth and seed size in *Raphanus sativus*: maternal and paternal effects in vivo and in vitro. *Evolution* 43:1435–1443.
- Paterson AH, Lander ES, Hewitt JD, et al (1988) Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Nature* 335:721–726.
- Peralta IE, Spooner DM, Knaap S (2008) Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (*Solanum* sect. *Lycopersicoides*, sect. *Juglandifolia*, sect. *Lycopersicon*; Solanaceae). *Syst Bot Monogr Am Soc Plant Taxon* 84:186.
- Pereira da Costa JH, Rodríguez GR, Pratta GR, et al (2013) QTL detection for fruit shelf life and quality traits across segregating populations of tomato. *Sci Hortic* 156:47–53.
- Pollak PE (1991) Cytoplasmic effects on components of fitness in tobacco cybrids. *Evolution* 45:785–791.
- Pratta GR, Rodriguez GR, Zorzoli R, et al (2011a) Phenotypic and molecular characterization of selected tomato recombinant inbred lines derived from the cross *Solanum lycopersicum* x *S. pimpinellifolium*. *J Genet* 90:229–37.
- Pratta GR, Rodriguez GR, Zorzoli R, et al (2011b) Molecular markers detect stable genomic regions underlying tomato fruit shelf life and weight. *Crop Breed Appl Biotechnol* 157–164. doi: 10.1590/S1984-70332011000200008

- Pratta GR, Zorzoli R, Picardi LA (1996) Evaluación de caracteres de interés agronómico en especies del género *Lycopersicon*. *Hortic Argentina* 15:25–32.
- R Core Team (2014) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.r-project.org/>.
- Rick CM (1973) Potential genetic resources in tomato species: clues from observations in native habitats. *Genes, Enzym Popul* 255–269. doi: 10.1007/978-1-4684-2880-3_17
- Robbins MD, Sim SC, Yang W, et al (2011) Mapping and linkage disequilibrium analysis with a genome-wide collection of SNPs that detect polymorphism in cultivated tomato. *J Exp Bot* 62:1831–1845. doi: 10.1093/jxb/erq367
- Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, et al (2011) Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol* 29:24–26. doi: 10.1038/nbt.1754
- Rodríguez GR, Muños S, Anderson C, et al (2011) Distribution of SUN, OVATE, LC, and FAS in the tomato germplasm and the relationship to fruit shape diversity. *Plant Physiol* 156:275–85. doi: 10.1104/pp.110.167577
- Rodríguez GR, Pratta GR, Liberatti DR, et al (2010) Inheritance of shelf life and other quality traits of tomato fruit estimated from F1's, F2's and backcross generations derived from standard cultivar, nor homozygote and wild cherry tomato. *Euphytica* 176:137–147. doi: 10.1007/s10681-010-0241-9
- Rodríguez GR, Pratta GR, Zorzoli R, Picardi LA (2006a) Recombinant lines obtained from an interspecific cross between *lycopersicon* species selected by fruit weight and fruit shelf life. *J Am Soc Hortic Sci* 131:651–656.
- Rodríguez GR, Pratta GR, Zorzoli R, Picardi LA (2006b) Evaluación de caracteres de planta y frutos en líneas recombinantes autofecundadas de tomate obtenidos por cruzamiento entre *Lycopersicon esculentum* y *L. pimpinellifolium*. *Cien Inv Agr* 33:133–141.
- Saliba-Colombani V, Causse M, Gervais L, Philouze J (2000) Efficiency of RFLP, RAPD, and AFLP markers for the construction of an intraspecific map of the tomato genome. *Genome* 43:29–40. doi: 10.1139/gen-43-1-29
- Saliba-Colombani V, Causse M, Langlois D, et al (2001) Genetic analysis of organoleptic quality in fresh market tomato. 1. Mapping QTLs for physical and chemical traits. *Theor Appl Genet* 102:259–272. doi: 10.1007/s001220051643
- Schuelter AR, Finger FL, Casali VWD, et al (2002) Inheritance and genetic linkage analysis of a firm-ripening tomato mutant. *Plant Breed* 121:338–342. doi: 10.1046/j.1439-

0523.2002.00719.x

- Shapiro SS, Wilk MB (1965) An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* 52:591–611.
- Shirasawa K, Isobe S, Hirakawa H, et al (2010) SNP discovery and linkage map construction in cultivated tomato. *DNA Res* 17:381–91. doi: 10.1093/dnares/dsq024
- Sim S-C, Durstewitz G, Plieske J, et al (2012a) Development of a large SNP genotyping array and generation of high-density genetic maps in tomato. *PLoS One* 7:e40563. doi: 10.1371/journal.pone.0040563
- Sim S-C, Van Deynze A, Stoffel K, et al (2012b) High-density SNP genotyping of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) reveals patterns of genetic variation due to breeding. *PLoS One* 7:e45520. doi: 10.1371/journal.pone.0045520
- Skinner ME, Uzilov a. V., Stein LD, et al (2009) JBrowse: A next-generation genome browser. *Genome Res* 19:1630–1638. doi: 10.1101/gr.094607.109
- Smith CJS, Watson CF, Ray J, et al (1988) Antisense RNA inhibition of polygalacturonase gene expression in transgenic tomatoes. *Nature* 334:724–726.
- Smith SM, Scott JW, Bartz JA, Sargent SA (2008) Diallel analysis of fruit water absorption in tomato, a contributing factor in postharvest decays. *J Am Soc Hortic Sci* 133:55–60.
- Suzuki R, Shimodaira H (2006) Pvcust: An R package for assessing the uncertainty in hierarchical clustering. *Bioinformatics* 22:1540–1542. doi: 10.1093/bioinformatics/btl117
- Tandon KS, Baldwin EA, Shewfelt RL (2000) Aroma perception of individual volatile compounds in fresh tomatoes (*Lycopersicon esculentum*, Mill.) as affected by the medium of evaluation. *Postharvest Biol Technol* 20:261–268. doi: 10.1016/S0925-5214(00)00143-5
- Tang Z, Yang Z, Hu Z, et al (2013) Cytonuclear epistatic quantitative trait locus mapping for plant height and ear height in maize. *Mol Breed* 31:1–14. doi: 10.1007/s11032-012-9762-3
- Tanksley SD (1993) Mapping Polygenes. *Annu Rev Genet* 27:205–233.
- Tanksley SD, Ganai MW, Prince JP, et al (1992) High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics* 132:1141–60.
- Tanksley SD, Grandillo S, Fulton TM, et al (1996) Advanced backcross QTL analysis in a cross between an elite processing line of tomato and its wild relative *L. pimpinellifolium*.

- Theor Appl Genet 92:213–224. doi: 10.1007/s001220050116
- Tao D, Hu F, Yang J, et al (2004) Cytoplasm and cytoplasm-nucleus interactions affect agronomic traits in japonica rice. *Euphytica* 135:129–134.
- The 100 Tomato Genome Sequencing Consortium, Aflitos S, Schijlen E, et al (2014) Exploring genetic variation in the tomato (*Solanum section Lycopersicon*) clade by whole-genome sequencing. *Plant J* 136–148. doi: 10.1111/tpj.12616
- The Tomato Genome Consortium (2012) The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* 485:635–41. doi: 10.1038/nature11119
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, et al (2012) Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* 40:1–12. doi: 10.1093/nar/gks596
- Van der Knaap E, Tanksley SD (2003) The making of a bell pepper-shaped tomato fruit: identification of loci controlling fruit morphology in Yellow Stuffer tomato. *Theor Appl Genet* 107:139–147. doi: 10.1007/s00122-003-1224-1
- Ward JHJ (1963) Hierarchical grouping to optimize an objective function. *J Am Stat Assoc* 58:236–244.
- Wickham H (2009) *ggplot2: Elegant graphics for data analysis*. Springer-Verlag New York, New York
- Yang J, Wang Y, Shen H, Yang W (2014) In silico identification and experimental validation of insertion-deletion polymorphisms in tomato genome. *DNA Res* 21:429–38. doi: 10.1093/dnares/dsu008
- Zeng ZB (1993) Theoretical basis for separation of multiple linked gene effects in mapping quantitative trait loci. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:10972–6. doi: 10.1073/pnas.90.23.10972
- Zorzoli R, Pratta GR, Picardi LA (1998) Efecto de los mutantes nor y rin y de genes silvestres sobre características del fruto en *Lycopersicon*. *Mendeliana* 13:12–19.
- Zuriaga E, Blanca JM, Cordero L, et al (2009) Genetic and bioclimatic variation in *Solanum pimpinellifolium*. *Genet Resour Crop Evol* 56:39–51. doi: 10.1007/s10722-008-9340-z