



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

**LOCALIZACIÓN PRECISA EN EL CROMOSOMA 2 DE *QTL* QUE CONTROLAN
CARACTERES DE FRUTO EN TOMATE**

LIC. (MSc.) GISELA YAEL GREEN

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS AGRARIAS

DIRECTOR: DR. GUSTAVO R. RODRÍGUEZ

CO- DIRECTOR: DRA. ROXANA ZORZOLI

2016

**LOCALIZACIÓN PRECISA EN EL CROMOSOMA 2 DE *QTL* QUE CONTROLAN
CARACTERES DE FRUTO EN TOMATE**

Gisela Yael Green

Licenciada en Biotecnología – Universidad Nacional del Litoral

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 Cátedra de Genética de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario ubicada en la localidad de Zavalla, Provincia de Santa Fe, Argentina, durante el período comprendido entre el 1 de Abril de 2012 y el 30 de Septiembre de 2016, bajo la dirección del Dr. Gustavo R. Rodríguez y la co-dirección de la Dra. Roxana Zorzoli.

Doctorando Lic. (*MSc.*) Gisela Y. Green

Director Dr. Gustavo R. Rodríguez

Co-Director Dra. Roxana Zorzoli

Defendida:de 20.....

A mis amados padres...
por dejarme una herencia invaluable,
EDUCACIÓN

PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS

Publicaciones

Green, G.Y., Pereira da Costa, J.H., Cambiaso, V., Pratta, G.R., Zorzoli, R., Rodríguez, G.R., 2016. Single and joint effect of the basal region of chromosome 2 and centromeric region of chromosome 8 on morphological and fruit quality traits in tomato. *Euphytica* 210: 327-339.

Presentaciones a Congresos

Green, G.Y., Delpiccolo, C., Pereira da Costa, J.H., Zorzoli, R., Rodríguez, G.R., 2015. Fine mapping of *fs2.1*, a *locus* controlling fruit elongation in tomato. International Plant Molecular Biology Congress - IMPB2015. Foz do Iguazú, Brasil.

Green, G.Y., Pereira da Costa, J.H., Zorzoli, R., Rodríguez, G.R., 2015. Pruebas de progenie para el mapeo preciso de un *QTL* que controla forma de fruto en tomate (*Solanum lycopersicum*). XLIV Congreso Argentino de Genética. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.

Green, G.Y., Bettinsoli, A., Pereira da Costa, J.H., Piola, E., Zorzoli, R., Rodríguez, G.R., 2014. Estimación de acciones génicas de *QTL* para morfología de fruto en tomate utilizando imágenes de corte transversal. XVI Congreso XXXIV Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario, Santa Fe, Argentina.

Green, G.Y., Delpiccolo, C., Pereira da Costa, J.H., Zorzoli, R., Rodríguez, G.R., 2014. Localización de *QTL* en la base del cromosoma 2 que controlan morfología de fruto en tomate. XLIII Congreso de Genética IV Reunión Regional de la Sociedad Argentina de Genética. San Carlos de Bariloche, Río Negro, Argentina.

Green, G.Y., Pereira da Costa, J.H., Piola, E., Pratta, G.R., Zorzoli, R., Rodríguez, G.R., 2013. Efecto de la región centromérica del cromosoma 8 de tomate sobre caracteres de morfología y calidad de fruto. XV Congreso XXXIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario, Santa Fe, Argentina.

Green, G.Y., Pereira da Costa, J.H., Zorzoli, R., Rodríguez, G.R., 2013. Mapeo preciso de *fs2.1*, un *QTL* mayor que controla la forma del fruto en tomate. VII Encuentro Latinoamericano y del Caribe de Biotecnología – REDBIO. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	3
RESUMEN	5
ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓN	8
OBJETIVOS GENERALES	12
Objetivos Específicos	12
CAPÍTULO I	13
OBJETIVO ESPECÍFICO	13
MATERIALES Y MÉTODOS	13
Material Vegetal	13
Caracterización fenotípica	17
Análisis estadístico	19
Validación de <i>QTL</i> por mapeo por intervalos simple	19
RESULTADOS	20
Caracterización molecular de individuos recombinantes	20
Evaluación fenotípica de progenitores	22
Prueba de progenie en familias recombinantes	23
Detección y validación de <i>QTL</i> por mapeo por intervalos simple	26
Conclusiones del Capítulo I	28
CAPÍTULO II	29
OBJETIVO ESPECÍFICO	29
MATERIALES Y MÉTODOS	29
Material Vegetal	29
Caracterización fenotípica y tratamiento estadístico de los datos	31
Saturación de la región estudio	31
RESULTADOS	32
Prueba de progenie en familias recombinantes	32
Nueva caracterización molecular	34
Conclusiones del Capítulo II	36
CAPÍTULO III	37
OBJETIVO ESPECÍFICO	37
MATERIALES Y MÉTODOS	37
Material Vegetal	37
Metodología de análisis de fruto en desarrollo	38

Análisis estadísticos.....	40
RESULTADOS	41
Ensayo 1	41
Ensayo 2	46
Conclusiones del Capítulo III.....	48
CAPÍTULO IV	49
OBJETIVO ESPECÍFICO.....	49
MATERIALES Y MÉTODOS.....	49
RESULTADOS	52
Conclusión del Capítulo IV	55
DISCUSIÓN	56
CONCLUSIÓN	65
ANEXO I.....	66
Desarrollo de marcadores moleculares.....	66
Reacción en cadena de la polimerasa	68
Caracterización molecular	69
Elaboración de un mapa de ligamiento en la base del cromosoma 2 de tomate.....	69
ANEXO II	71
Extracción de ADN	71
ANEXO III	74
Desarrollo de un comando en lenguaje R de programación	74
TABLAS SUPLEMENTARIAS	77
Referencias	85

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

@	Autofecundación
<i>ab</i>	Índice a sobre b de color
<i>adm</i>	Ángulo Distal Macro
ADN	Ácido desoxirribonucleico
<i>alt</i>	Altura de fruto en desarrollo
<i>ap</i>	Área de Pericarpio
<i>apd</i>	Área de la Protuberancia Distal
<i>apm</i>	Ángulo Proximal Macro
BC	Retrocruza
CAPS	Secuencia polimórfica amplificada por corte
CD	Cebador derecho
cM	Centimorgan
CR	Cebador izquierdo
<i>dfs</i>	Índice de forma de fruto en desarrollo
<i>diam</i>	Diámetro de fruto en desarrollo
<i>E.E.</i>	Error estándar
<i>ep</i>	Espesor de Pericarpio
F	Generación filial
<i>fed</i>	Forma Cuadrangular Distal
<i>fcp</i>	Forma Cuadrangular Proximal
<i>fs I</i>	Índice de forma de fruto
<i>ft</i>	Forma Triangular del Fruto
H	Genotipo heterocigoto
<i>InDel</i>	Inserción / Deleción
<i>L</i>	Índice de reflectancia
L	Genotipo homocigoto para los alelos del genotipo cultivado, Rio Grande
LA	LA1589 de <i>Solanum pimpinellifolium</i>
la	Transcriptoma de LA1589 de <i>Solanum pimpinellifolium</i>
M	Concentración molar
Mb	Megabases
MP	Marcador de peso molecular
<i>NIL</i>	Línea casi isogénica
P	Genotipo homocigoto para los alelos del genotipo silvestre, LA1589
pb	Pares de bases
<i>PCR</i>	Reacción en cadena de la polimerasa
<i>pH</i>	Potencial hidrógeno
PL	Planta
<i>QTL</i>	<i>Loci</i> de carácter cuantitativo
RG	Rio Grande de <i>Solanum lycopersicum</i>
rgl	Transcriptoma de línea casi isogénica a Rio Grande con alelos cultivados en <i>fs8.1</i>
rgp	Transcriptoma de línea casi isogénica a Rio Grande con alelos silvestres en <i>fs8.1</i> .
<i>RPKM</i>	Lecturas por kilobase por millón de lecturas mapeadas

rpm	Revoluciones por minuto
S	Generación derivada de autofecundación
S.A.M.M	Selección asistida por marcadores moleculares
SGN	SOL Genomics Network
SNPs	Polimorfismo de nucleótido simple

RESUMEN

Localización precisa en el cromosoma 2 de *QTL* que controlan caracteres de fruto en tomate

Cuatro *QTL* mayores se encuentran asociados a frutos alargados en el germoplasma del tomate cultivado (*Solanum lycopersicum*): *ovate*, *sun*, *fs8.1* y *fs2.1*. El cultivar comercial Rio Grande de *S. lycopersicum* porta los alelos silvestres para los genes *SUN* y *OVATE* y el carácter índice de forma de fruto (*fs I*) es controlado en un 61,55% por los *QTL* *fs2.1* y *fs8.1* que presentan interacción epistática. El *QTL* *fs2.1* (cromosoma 2) controla principalmente el extremo distal del fruto y otros caracteres de calidad como *pH* e índices *L* y *ab* de color. En base a estos antecedentes se plantea como hipótesis que la recombinación de marcadores moleculares en la base del cromosoma 2 permite estudiar la segregación mendeliana de caracteres de forma y calidad de fruto para localizar en forma más precisa a los *QTL* que los definen. El objetivo general de este trabajo es validar *QTL* que controlan caracteres de fruto en poblaciones segregantes avanzadas entre Rio Grande y LA1589. Además, localizar en forma precisa al *QTL* mayor *fs2.1* asociado a frutos alargados en el cultivar Rio Grande e identificar el estadio de desarrollo del fruto en el que ejerce su efecto. Se plantean como objetivos específicos: 1) Evaluar a través de pruebas de progenie de padres recombinantes en la base del cromosoma 2 caracteres de morfología y calidad de fruto a fin de validar y localizar de forma precisa *QTL* de interés; 2) Evaluar en la descendencia de padres recombinantes el carácter *fs I* para minimizar la región que contiene a *fs2.1*; 3) Detectar el estadio de desarrollo del fruto en el que *fs2.1* afecta la forma; 4) Proponer genes candidatos para *fs2.1* haciendo uso de herramientas bioinformáticas. Como material vegetal se utilizaron familias derivadas por autofecundación de plantas recombinantes en la base del cromosoma 2 conteniendo a *fs2.1*. Estas plantas no segregaron para el *QTL* *fs8.1* y derivan del cruzamiento entre Rio Grande (padre recurrente) y LA1589. Para llevar a cabo las pruebas de progenie, en cada familia generada se seleccionaron por marcadores moleculares plantas homocigotas para el alelo cultivado y otras homocigotas para el alelo silvestre en la región genómica segregante. Las plantas seleccionadas, incluyendo cinco plantas de Rio Grande y cinco de LA1589, se trasplantaron en invernadero a una distancia de 1 m entre hileras y 40 cm entre plantas. Para el objetivo específico 1 se realizó una prueba de progenie sobre la descendencia de 8 plantas

recombinantes y se midieron 10 atributos morfológicos y 3 de calidad sobre un total de 1370 frutos. Se aplicó la prueba *t* de *Student* para comparar los valores medios de grupos homocigotas por familia para todas las variables. Solo dos familias presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre grupos homocigotas para *fs I* indicando que el *QTL* que rige el carácter se encuentra en el segmento segregante compartido por ambas. De esta manera se logró acotar la región conteniendo a *fs2.1* de 9,64 Mb a 4,48 Mb. No se pudo determinar la posición de los *QTL* para los demás caracteres analizados debido a que presentaron asociaciones erráticas a través de las diferentes familias. Sin embargo, mediante mapeo por intervalos simple se logró detectar *QTL* menores de morfología y calidad de fruto previamente detectados en una generación F_3 - BC_1 - S_1 derivada del mismo cruzamiento interespecífico. Para el objetivo 2, en virtud de los resultados del objetivo 1, se midió únicamente el carácter *fs I* en un total de 94 plantas (546 frutos) producto de la descendencia de 9 plantas recombinantes en la base del cromosoma 2. Como resultado, dos familias presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre grupos homocigotas para *fs I* acotando la región que contiene a *fs2.1* de 4,48 Mb a 0,71 Mb. El objetivo específico 3 consistió en el análisis de frutos en desarrollo en los días 0, 3 y 5 después de anthesis. Fue realizado durante dos ensayos evaluándose un total de 102 y 293 flores en los ensayos 1 y 2 respectivamente. Nuevamente se utilizó la descendencia de plantas recombinantes en la región estudio. Como resultado de la comparación entre genotipos homocigotas mediante la prueba *t* de *Student* se observaron diferencias en el índice de forma de fruto en desarrollo desde el día cero de anthesis. Para el objetivo 4 se hizo uso de la herramienta BLAST de la página SOL Genomics Network y se obtuvieron los genes contenidos en el segmento de 0,71 Mb correspondiente a *fs2.1*. También se obtuvieron los transcriptomas de LA1589 y seis *NIL* de Rio Grande. Tres *NIL* presentan alelos cultivados en la región centromérica del cromosoma 8 y otras tres alelos de LA1589. Utilizando un algoritmo en R se realizó el análisis de expresión diferencial entre todos los genotipos haciendo uso del paquete DE-seq. Se lograron identificar 10 genes diferencialmente expresados en flores en anthesis entre los genotipos Rio Grande y LA1589. En base a estos resultados, se concluye que *QTL* menores de morfología y calidad de fruto se localizan en la base del cromosoma 2 (segmento de 9,64 Mb). Además, se demostró que el *QTL* mayor *fs2.1* ejerce su efecto sobre el carácter *fs I* desde antes de anthesis y se localiza en un segmento de 0,71 Mb en la base del cromosoma 2 que contiene genes diferencialmente expresados.

ABSTRACT

Fine Mapping on chromosome 2 of QTL that control fruit traits in tomato

The Rio Grande cultivar of *Solanum lycopersicum* carries the wild alleles at *SUN* and *OVATE* genes and the fruit shape index (*fs I*) is controlled in a 61.55% by *fs8.1* and *fs2.1* which have epistatic interaction. *fs2.1* on chromosome 2 mainly controls the distal end of the fruit and other quality traits as *pH* and *L* and *ab* parameters of color. The goal of this work is to validate QTL controlling fruit traits using advanced segregating populations between Rio Grande and LA1589 of *S. pimpinellifolium*. Also, to fine map the QTL *fs2.1* which is associated to elongated fruit in Rio Grande and to identified the development stage when it exerts its effect. The analyses were performed using families derived from selfed recombinant plants in the chromosome 2 region containing the *fs2.1* QTL. These plants did not segregate for *fs8.1* and derived from a cross between Rio Grande (recurrent parent) and LA1589. From progeny of each selected plant, homozygous plants for the cultivated and wild alleles were selected by molecular markers. Selected plants, five plants of Rio Grande and five of LA1589 were transplanted at greenhouse. Ten morphological and three quality traits were measured on green mature fruits. As a result, the region controlling *fs I* was narrowed down from 9.64 Mb to 0.71 Mb. Also, by simple interval mapping, it was possible to detect minor QTLs for morphology and quality traits previously detected in a F₃-BC₁-S₁ generation derived from the same interspecific cross. When fruits of 0, 3 and 5 days after anthesis were analyzed in plants with and without *fs2.1*, differences since zero days were observed. Within the 0,71 Mb segment corresponding to *fs2.1*, 10 differentially expressed genes were identified in flowers at anthesis between LA158 and Rio Grande-like genotypes. This work demonstrates that minor QTL for morphology and quality fruit are located at the bottom of chromosome 2 (segment of 9.64 Mb). Besides, the major QTL *fs2.1* exerts its effect on the *fs I* trait before anthesis *fs2.1* is located in a 0.71 Mb segment at the base of chromosome 2 and contains differentially expressed genes considered as candidates.

INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una especie dicotiledónea, autógama, de genoma diploide ($2n=2x=24$) y una de las hortalizas que más se consumen en nuestro país. Desde el punto de vista nutricional constituye una interesante fuente de antioxidantes (principalmente licopeno, β -caroteno y vitamina C), vitaminas y minerales (Adalid, Roselló, & Nuez, 2007; Labate et al., 2007).

A nivel taxonómico se clasifica dentro de la familia *Solanaceae*, género *Solanum* sección *Lycopersicon*. Dicha sección se compone de una especie cultivada y 12 silvestres, todas nativas del oeste de Sudamérica (desde Ecuador hasta el norte de Bolivia y Chile), con dos especies endémicas de las Islas Galápagos (Stevens y Rick, 1986; Peralta et al., 2008).

Como centro de domesticación del cultivo han sido propuestos Mesoamérica o Ecuador junto al norte de Perú, no obstante esta información continúa incierta. La primera etapa de este proceso habría consistido en la selección de *Solanum pimpinellifolium* L. o *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (Dunal) Voss por parte de los primeros agricultores en Ecuador y el norte de Perú. La segunda etapa se cree ocurrió en Mesoamérica y consistió en la selección de las accesiones de *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* pre-domesticadas. Este último evento habría completado el proceso, resultando en cambios evolutivos que llevaron al incremento del tamaño del fruto, la obtención de formas y colores muy variadas y la reducción de la diversidad genética (Blanca et al., 2015).

Solanum pimpinellifolium L. constituye una de las especies silvestres ampliamente utilizada para mejorar características agronómicas como resistencia a enfermedades, color rojo de los frutos a través del aumento en el contenido de licopeno (Nuez, 1995), contenido de sólidos solubles, acidez titulable (Grandillo y Tanksley, 1996; Fulton et al., 2000; Yates et al., 2004) y vida poscosecha de los frutos (Pratta et al., 1996; Zorzoli et al., 1998; Rodríguez et al., 2006), entre otros. Dentro de *S. pimpinellifolium* encontramos a LA1589, recolectada por el Dr. Charles M. Rick en 1974, en el Departamento La Libertad, Perú, y en 2012, utilizada en el proceso de secuenciación del genoma junto al cultivar comercial Heinz 1706 de *S. lycopersicum*. Estas dos especies presentaron un 0,6% de divergencia al comparar su secuencia de nucleótidos, diferencia que se debe a aproximadamente 5 millones de *SNP* (*Single Nucleotide Polymorphism*) y más de 9000 polimorfismos del tipo *InDel* (Inserción/Delección) (The Tomato Genome Consortium, 2012).

Más de 10 cruzamientos interespecíficos han sido realizados utilizando a LA1589 como progenitor silvestre para la construcción de mapas (<https://solgenomics.net/>) destinados a la investigación del control genético de caracteres de calidad, forma y tamaño de fruto (Bernacchi et al., 1998; Ku et al., 2000; Lippman y Tanksley, 2001; Gonzalo y van der Knaap, 2008).

La forma del fruto en tomate es objeto de interés en estudios básicos de desarrollo de órganos vegetales y representa un carácter de fundamental importancia en la comercialización y utilización del producto de cosecha. Los tomates alargados (comúnmente denominados tipo perita) son preferentemente utilizados en procesados o productos industrializados, mientras que los frutos redondos y los frutos pequeños (*cherry* o cereza) son destinados al consumo en fresco. Al igual que la mayoría de las características importantes para la agricultura, la forma del fruto en tomate presenta herencia cuantitativa (Grandillo, Zamir, & Tanksley, 1999). El término *QTL* (*Quantitative Trait Loci*) se utiliza para describir una región del genoma o segmento cromosómico que tiene un efecto significativo sobre un rasgo o carácter cuantitativo (Tanksley, 1993). Según Tanksley et al. (1992), los marcadores moleculares de ADN permiten estimar con precisión la localización del *locus* o los *loci* subyacentes al carácter de interés, en el mapa cromosómico de la especie, así como también el número, tipo y magnitud de sus efectos génicos. Este mismo autor define a un *QTL* mayor como aquel que explica 20% o más de la variación fenotípica para un carácter en una población segregante. Según Paterson et al. (1988), la disponibilidad de mapas de ligamiento hace posible el estudio de caracteres cuantitativos a través de la descomposición de sus elementos en factores genéticos discretos.

Cuatro *QTL* mayores están asociados a frutos alargados en el germoplasma del tomate cultivado: *ovate*, *sun*, *fs8.1* y *fs2.1* (Gonzalo y van der Knaap, 2008). El gen *OVATE* fue localizado por mapeo fino en el cromosoma 2 y funcionalmente es un regulador negativo del crecimiento. El fenotipo alargado se produce a partir de una mutación que provee un codón de stop prematuro resultando en una proteína nula (Liu, Van Eck, Cong, & Tanksley, 2002). *SUN* codifica un miembro de la familia de proteínas de unión a calmodulina y el nivel de expresión del gen subyacente se asocia positivamente con la forma alargada del fruto (Xiao, Jiang, Schaffner, Stockinger, & van der Knaap, 2008). La mutación surge de un evento de duplicación de 24,7 Kb del cromosoma 10 al cromosoma 7 mediada por el retrotransposón *Rider*. Rodríguez et al. (2011) sugieren que el *locus SUN* surgió hace relativamente poco

tiempo en Europa luego de su introducción desde América. Mientras, la mutación en *OVATE* se encuentra en accesiones latinoamericanas, semi-silvestres de *L. esculentum* var. *cerasiforme* y poblaciones italianas, por consiguiente proponen que es una mutación más antigua. Las funciones moleculares de *SUN*, *OVATE* y el gen o genes subyacentes a *fs8.1* no se conocen bien. No obstante, diversos estudios sugieren que contribuyen al patrón de elongación en la dirección longitudinal del carpelo durante el desarrollo floral desde antes de anthesis (Wu et al., 2015). Por su parte, *SUN* presenta un efecto fenotípico dramático sobre la forma del fruto a partir del día cinco después de anthesis. Ambos, *SUN* y *OVATE* conducen a un aumento en el número de células en la dirección longitudinal del fruto y una disminución en el número de células en la dirección medio-lateral. Mientras que *fs8.1* provoca el incremento del número de células en la dirección longitudinal, sin un cambio en la dirección medio-lateral, dando como resultado un fruto alargado.

El cuarto *QTL*, *fs2.1*, se encuentra en la región distal del cromosoma 2, que muestra una alta frecuencia de recombinación (Grandillo y Tanksley, 1996; Lippman y Tanksley, 2001). Gonzalo y van der Knaap (2008), demostraron que *fs2.1* logró explicar el 19% de la variabilidad para el índice de la forma (*fs I*, relación entre la altura y el diámetro) en una generación F_2 derivada del cruzamiento entre el cultivar Río Grande y la línea LA1589. En la proximidad genómica de *fs2.1* han sido localizados *QTL* asociados a caracteres de calidad en varios cruzamientos entre genotipos cultivados y silvestres. Por ejemplo, esta región contiene al gen *FW2.2* que rige para peso del fruto, un *QTL* asociado al contenido en sólidos solubles y otro a acidez titulable (Frery et al., 2000; Causse, 2002).

Se comenzó un proyecto de investigación para dilucidar las bases moleculares de la forma de fruto alargado en el cultivar comercial Río Grande de *S. lycopersicum*. Este genotipo porta los alelos silvestres para los genes *SUN* y *OVATE* y el carácter *fs I* estaría controlado por los *QTL* mayores *fs8.1* y *fs2.1* localizados en los cromosomas 8 y 2 respectivamente (Gonzalo y van der Knaap, 2008). En el año 2011, en el Campo Experimental J.F. Villarino de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario, se evaluaron 128 plantas de una generación F_3 -BC₁-S₁ derivada del cruzamiento entre Río Grande (padre recurrente) y LA1589 para determinar el efecto individual y conjunto de los *loci* *fs2.1* y *fs8.1* sobre la morfología del fruto. Se utilizaron marcadores moleculares para seleccionar ambas regiones genómicas y se evaluaron caracteres de morfología y calidad en aproximadamente 2315 frutos. Se logró demostrar que el carácter *fs I* en el cultivar Río Grande es controlado en un

61,55% por *fs2.1* y *fs8.1*. Por otro lado, se demostró que *fs2.1* controla principalmente el extremo distal del fruto mientras que *fs8.1* parecería extender en igual magnitud los extremos distal y proximal. Además, la región conteniendo a *fs2.1* controla otros caracteres de calidad como *pH* y los índices *L* y *ab* de color (Green et al., 2016).

Dado lo expuesto, se plantea como hipótesis que la recombinación de marcadores moleculares en la base del cromosoma 2 permite estudiar la segregación mendeliana de caracteres de forma y calidad de fruto para localizar en forma más precisa a los *QTL* que los controlan.

OBJETIVOS GENERALES

- Validar *QTL* que controlan caracteres de fruto en retrocruzas avanzadas entre el cultivar Rio Grande de *Solanum lycopersicum* y la línea LA1589 de *S. pimpinellifolium*.
- Localizar en forma precisa al *QTL* mayor *fs2.1* asociado a frutos de tomate alargado en el cultivar Rio Grande e identificar el estadio de desarrollo en el que ejerce su efecto.

Objetivos Específicos

1. Evaluar caracteres de morfología y calidad de fruto, a través de pruebas de progenie de padres recombinantes en la base del cromosoma 2, a fin de validar y localizar de forma precisa *QTL* de interés.
2. Evaluar el carácter índice de forma de fruto, en la descendencia de padres recombinantes, para minimizar la región que contiene al *QTL fs2.1*.
3. Detectar el estadio de desarrollo del fruto en el que el *QTL fs2.1* afecta la forma.
4. Proponer genes candidatos para el *QTL fs2.1* haciendo uso de herramientas bioinformáticas.

Este trabajo de tesis se desarrolla en cuatro capítulos, cada uno de ellos responde a un objetivo específico.

CAPÍTULO I

OBJETIVO ESPECÍFICO

Evaluar caracteres de morfología y calidad de fruto, a través de pruebas de progenie de padres recombinantes en la base del cromosoma 2, a fin de validar y localizar de forma precisa *QTL* de interés.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

Se utilizaron como progenitores el cultivar comercial Rio Grande de *S. lycopersicum* y la línea LA1589 de *S. pimpinellifolium*. El cultivar Rio Grande proviene de un programa de mejoramiento genético de los Estados Unidos. Esta variedad produce frutos alargados y de gran tamaño, los cuales son utilizados tanto para consumo en fresco como en procesado. La línea silvestre LA1589 es originaria del Departamento La Libertad, Perú, y presenta frutos de tamaño pequeño (peso menor a un gramo) y morfología esférica (<https://solgenomics.net/>). Las diferencias morfológicas entre los frutos de los genotipos progenitores se pueden apreciar en la Figura 1.

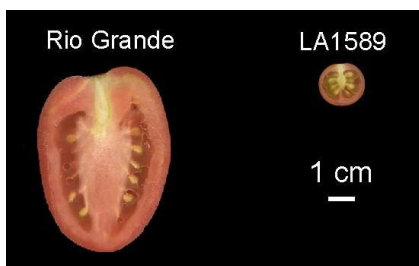


Figura 1. Frutos representativos de los progenitores Rio Grande de *S. lycopersicum* y LA1589 de *S. pimpinellifolium*.

La caracterización molecular de la F_2 derivada de este cruzamiento fue realizada por Gonzalo y van der Knaap (2008). De esta generación fue seleccionada una planta genéticamente similar al genotipo cultivado (L) y heterocigota para las regiones *fs2.1* y *fs8.1* (Figura 2).

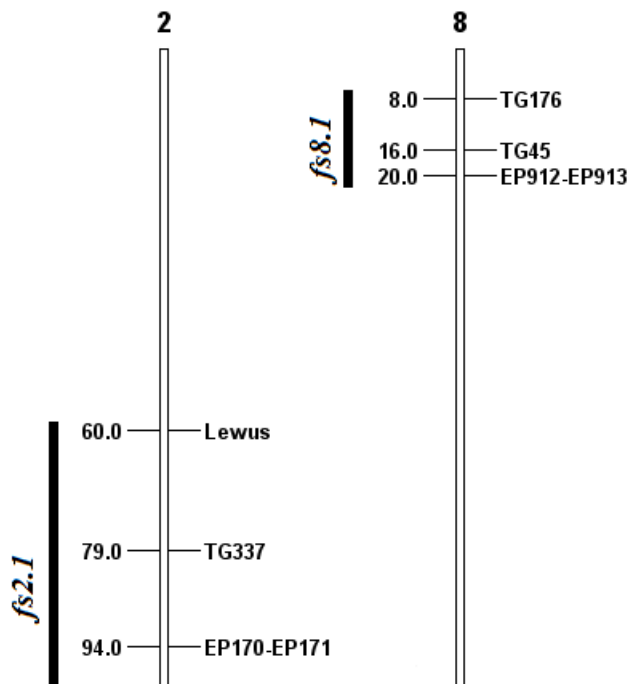


Figura 2. Distancia genética entre marcadores moleculares y localización aproximada de los *QTL fs2.1* (cromosoma 2) y *fs8.1* (cromosoma 8) para la F_2 del cruzamiento entre Rio Grande y LA1589. Adaptado de Gonzalo y van der Knaap (2008).

De la descendencia de la planta F_2 (generación F_3), se seleccionó un planta por ser heterocigota para las regiones *fs2.1* y *fs8.1*, pero homocigota para los alelos del progenitor cultivado en otros marcadores moleculares distribuidos a lo largo del genoma. Esta planta fue cruzada por el padre recurrente Rio Grande. De la progenie resultante, se seleccionó una planta por ser heterocigota para las dos regiones de interés y se dejó autofecundar a fin de obtener semilla F_3 -BC₁-S₁ (Figura 3). La población segregante consistió en 128 plantas que fueron analizadas molecular y fenotípicamente durante la campaña 2011-2012 (Green et al., 2016).

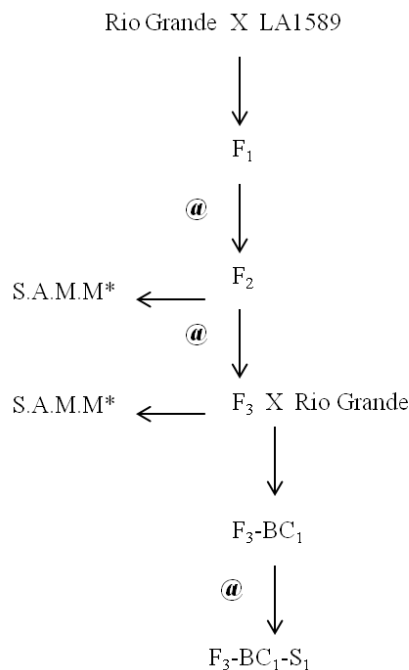


Figura 3. Diagrama de obtención del material vegetal de partida.

BC₁: primer retrocruza; F₁: filial 1; F₂: filial 2; F₃: filial 3; S₁: primer ciclo de autofecundación; @: autofecundación; S.A.M.M: selección asistida por marcadores moleculares; *: selección de una planta con constitución genética heterocigota para las regiones *fs2.1* y *fs8.1* y homocigota para los alelos del progenitor cultivado en otros marcadores moleculares distribuidos a lo largo del genoma.

De la población F₃-BC₁-S₁ se seleccionaron plantas que presentaron recombinación entre los marcadores moleculares utilizados en el cromosoma 2 (Lewus y EP170-EP171 de tipo *InDel* y TG337 tipo CAPS; ver ANEXO I) y no segregaron para el *locus fs8.1* (marcador TG45 de tipo CAPS), el otro *QTL* mayor que define la forma de fruto alargado en Rio Grande (Gonzalo & van der Knaap, 2008; Green et al., 2016). En la Tabla 1 se muestra la constitución genética de las plantas seleccionadas en los marcadores moleculares utilizados para los cromosomas 2 y 8.

Tabla 1. Recombinantes seleccionados para la prueba de pro genie (generación F₃-BC₁-S₁).

Planta	<i>fs2.1</i>			<i>fs8.1</i>
	Lewus	TG337	EPI170-EPI171	TG45
1	P	P	H	L
2	L	H	H	P
3	P	P	H	P
4	P	H	H	P
5	H	L	L	L
6	H	L	L	P
7	H	L	L	P
8	H	L	L	P

fs2.1: región que contiene al *QTL* para forma de fruto en el cromosoma 2; *fs8.1*: región que contiene al *QTL* para forma de fruto en el cromosoma 8; H: genotipo heterocigoto; L: genotipo homocigoto para los alelos de Rio Grande; P: genotipo homocigoto para los alelos de LA1589.

El ADN del material vegetal descrito en la Tabla 1 fue caracterizado en la región estudio utilizando ocho nuevos marcadores moleculares (IND2-4010, IND2-4346, IND2-442433, IND2-4465, IND2-4526, IND2-4569, IND2-4824 e IND2-4975, ver ANEXO I). Estas plantas se dejaron autofecundar para obtener semilla suficiente y generar familias F₃-BC₁-S₂. Treinta semillas de cada una fueron sembradas generando ocho diferentes familias (Figura 4).



Figura 4. Siembra de semillas en almácigos.

En etapa de plántula se realizó la extracción de ADN según ANEXO II y se seleccionaron por marcadores moleculares (IND2-4010, Lewus, IND2-4346, TG337, IND2-442433, IND2-4465, IND2-4526, IND2-4569, EP170-EP171, IND2-4824 e IND2-4975; ver ANEXO I) plantas homocigotas para el alelo cultivado (L) y plantas homocigotas para el alelo silvestre (P), en la región genómica segregante (segmento heterocigota), siguiendo la metodología descrita en el ANEXO I. Las plantas seleccionadas, incluyendo cinco plantas de cada progenitor, se trasplantaron en invernadero a una distancia de 1 m entre hileras y 40 cm entre plantas. Las mismas se tutoraron y condujeron a un tallo, de acuerdo a las prácticas de manejo recomendadas para el cultivo bajo invernadero de la zona de producción del cinturón hortícola de Rosario. Se realizaron las prácticas usuales de control de malezas y plagas, riego y fertilización.

Caracterización fenotípica

La caracterización fenotípica se realizó sobre las ocho familias F_3 -BC₁-S₂ (progenie de las plantas de la Tabla 1). Se cosecharon en promedio seis frutos por planta en estado pintón. Este estado se define como aquél en el que el 10 % de la superficie del fruto vira hacia el color de madurez (Nuez, 1995). Los frutos seleccionados se cortaron longitudinalmente y se colocaron en un *scanner* para obtener una imagen de 300 *dpi* con fondo negro. Las imágenes fueron posteriormente analizadas utilizando el programa *Tomato Analyzer 3.0* (Rodríguez et al., 2010) como se muestra en la Figura 5.

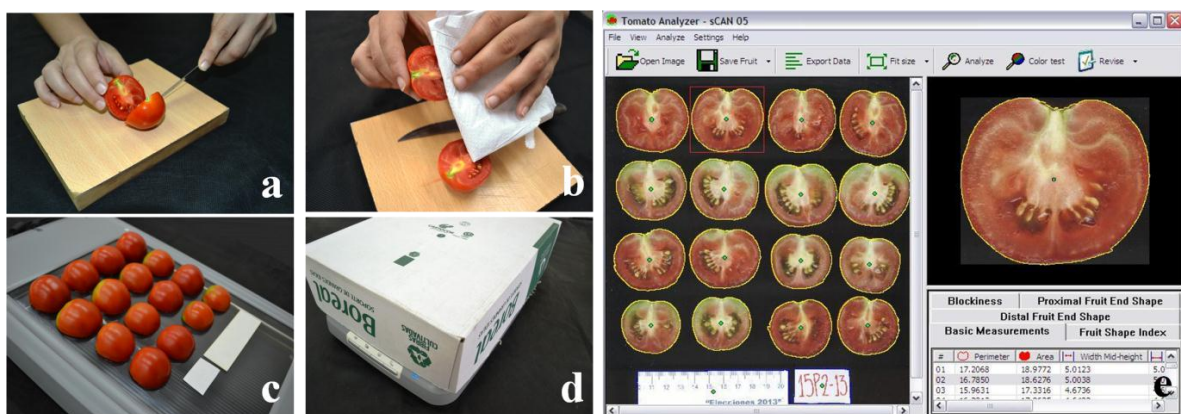


Figura 5. Preparación del material vegetal y toma de imágenes para el análisis fenotípico. Corte longitudinal de frutos (a), secado de la parte interna del fruto (b). Obtención de la imagen: posicionamiento de los frutos junto a una regla e identificación del genotipo (c) y escaneo aplicando un fondo negro (d). Pantalla del programa *Tomato Analyzer 3.0* (e).

A partir del análisis de las imágenes se obtuvieron de cada fruto los siguientes atributos morfológicos (Figura 6):

- Área (*área*, en cm^2).
- Índice de forma (*fs I*, relación entre la altura y el diámetro).
- Forma Cuadrangular Proximal (*fcp*, cociente entre el ancho en el extremo proximal y el ancho en la mitad del fruto).
- Forma Cuadrangular Distal (*fcd*, cociente entre el ancho en el extremo distal y el ancho en la mitad del fruto).
- Forma Triangular del Fruto (*ft*, cociente entre el ancho en las partes proximal y distal).
- Ángulo Proximal Macro (*apm*, ángulo medido al 20 % del perímetro desde la parte proximal).
- Ángulo Distal Macro (*adm*, ángulo medido al 20 % del perímetro desde la parte distal).
- Área de la Protuberancia Distal (*apd*, cociente entre área de la protuberancia distal multiplicada por 10 y el área total del fruto).

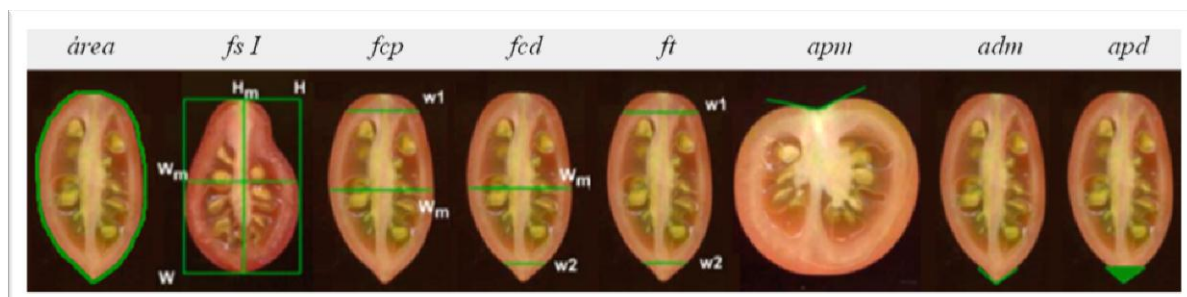


Figura 6. Representación gráfica de los atributos morfológicos evaluados. Adaptada de Brewer et al. (2006).

fs I: índice de forma de fruto, *fcp*: forma cuadrangular proximal; *fcd*: forma cuadrangular distal; *ft*: forma triangular; *apm*: ángulo proximal macro; *adm*: ángulo distal macro; *apd*: área de la protuberancia distal.

Otros 6 frutos fueron cortados transversalmente y analizados utilizando el programa *Tomato Analyzer 3.0* para evaluar:

- Área de Pericarpio (*ap*, en cm^2).
- Espesor de Pericarpio (*ep*, en cm).

Para los caracteres de calidad se cosecharon en promedio siete frutos al estado maduro (90% de la superficie del fruto presenta el color de madurez; Nuez, 1995) y se evaluaron los siguientes caracteres:

- pH del jugo homogeneizado (pH).
- Porcentaje de reflectancia (L) de color.
- Cociente a/b de color (ab).

Los valores de L , a (absorbancia a longitudes de onda de 540 nm) y b (absorbancia a longitudes de onda de 675 nm) fueron medidos utilizando un Chromameter CR 400. El parámetro a presenta valores desde + 60 para tonos rojos a - 60 para tonos verdes, b desde + 60 para amarillos a - 60 para azules y L desde 0 para blancos a 100 para negro. El valor final de los mismos corresponde al promedio de tres lecturas en la zona ecuatorial de cada fruto.

Análisis estadístico

La progenie de cada planta (Tabla 1) fue dividida en dos grupos: homocigota para los alelos cultivados (L) y homocigota para los alelos silvestres (P) en el segmento segregante en cada caso (H). Utilizando el programa InfoStat (Di Renzo et al., 2001) versión estudiantil, se calcularon los valores medios y error estándar por grupo para todos los caracteres evaluados. Se aplicó la prueba t de Student (Snedecor, 1964) para comparar los valores medios de ambos grupos para todas las variables. Con una probabilidad menor al 5 % en el análisis de t se concluye que el QTL que rige el carácter fenotípico se encuentra en el segmento segregante.

Validación de QTL por mapeo por intervalos simple

En aquellos caracteres que presentaron asociación errática a través de las diferentes familias en la prueba de t , se utilizó el programa Qgene (www.qgene.org) para realizar un análisis de mapeo por intervalos simple. Se graficaron los valores de LOD en función de los marcadores moleculares utilizados y se calcularon los valores de corte para cada carácter. Para llevar a cabo este análisis se consideró a todas las familias como una sola población y se incluyó en el análisis a los individuos heterocigotas (Nº total de plantas: 128).

RESULTADOS

Caracterización molecular de individuos recombinantes

La aplicación de los ocho marcadores moleculares desarrollados permitió definir con mayor precisión los sitios de recombinación en las plantas F₃-BC₁-S₁ (Tabla 1).

Según puede observarse en la Tabla 2, existe diferencia en el segmento segregante de los individuos 1 y 3. La planta 1 presenta segregación entre los marcadores IND2-4569 e IND2-4975 y la planta 3 entre IND2-4465 y EP170-EP171 (dos puntos de recombinación). Las plantas 2 y 4 exhiben la misma constitución genética heterocigota entre los marcadores IND2-4346 e IND2-4975. Las plantas 5, 6 y 8 no presentaron diferencias entre sí, segregando todas en el segmento comprendido por el marcador Lewus. Por otro lado, estas últimas tres se diferenciaron de la planta 7 cuyo segmento segregante se encuentra comprendido por los marcadores Lewus e IND2-4346.

Tabla 2. Constitución genética de recombinantes seleccionados para la prueba de progenie, generación F₃-BC₁-S₁.

Familia	<i>fs2.1</i>										<i>fs8.1</i>	
	IND2 4010	Lewus	IND2 4346	TG337	IND2 442433	IND2 4465	IND2 4526	IND2 4569	EP170 EP171	IND2 4824	IND2 4975	TG45
1	L	P	P	P	P	P	P	H	H	H	H	L
2	L	L	H	H	H	H	H	H	H	H	H	P
3	L	P	P	P	P	H	H	H	H	L	L	P
4	L	P	H	H	H	H	H	H	H	H	H	P
5	L	H	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
6	L	H	L	L	L	L	L	L	L	L	L	P
7	L	H	H	L	L	L	L	L	L	L	L	P
8	L	H	L	L	L	L	L	L	L	L	L	P

fs2.1: región que contiene al *QTL* para forma de fruto en el cromosoma 2; *fs8.1*: región que contiene al *QTL* para forma de fruto en el cromosoma 8; H: genotipo heterocigoto; L: genotipo homocigoto para los alelos de Rio Grande; P: genotipo homocigoto para los alelos de LA1589.

En la Figura 7 se observa el producto de amplificación de progenitores (Rio Grande y LA1589) y plantas recombinantes (Tabla 2) utilizando el marcador molecular IND2-4346. La

figura corresponde a un gel de agarosa al 3% m/v teñido con SYBR® Safe. En la primera calle se puede observar el marcador de peso molecular CienMarker cuya última banda corresponde a 100 pb. En la segunda y tercer calle se encuentran los progenitores Rio Grande (146 pb) y LA1589 (166 pb) respectivamente. Las calles restantes corresponden a las plantas recombinantes detalladas en la Tabla 2. En esta imagen se puede apreciar que las plantas 1 y 3 resultan homocigotas para los alelos silvestres (P). Los individuos 5, 6 y 8 son homocigotas para los alelos cultivados (L) mientras las plantas 2, 4 y 7 son heterocigotas.

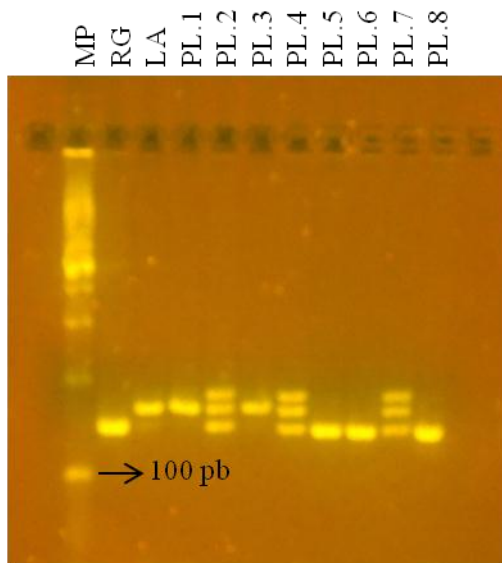


Figura 7. Gel de agarosa al 3% m/v teñido con SYBR® Safe para el marcador molecular IND2-4346 en los progenitores y las plantas recombinantes de la Tabla 2.

LA: LA1589 de *S. pimpinellifolium*; MP: marcador de peso molecular CienMarker; PL: planta; RG: Rio Grande *S. lycopersicum*.

La tercera banda observada en los genotipos heterocigotas (Figura 7) sería consecuencia de lo que se denomina *heteroduplex* (Thompson et al., 2002). Este artefacto de la técnica de PCR se produce en reacciones que amplifican dos segmentos de ADN homólogos que difieren para una mutación puntual o inserción/delección. La generación de *heterodúplex* se debe probablemente al aumento de la concentración de ADN de forma tal que las cadenas complementarias se aparean y superan la hibridación de los oligonucleótidos a su cadena molde. La separación del *heteroduplex* puede realizarse por electroforesis en condiciones desnaturalizantes.

Los resultados para el marcador molecular IND2-4824 se pueden apreciar en la Figura 8. En este gel de agarosa al 3% m/v teñido con SYBR® Safe se observan en la primera y segunda calle los progenitores Rio Grande (131 pb) y LA1589 (151 pb). Las calles restantes corresponden a las plantas recombinantes detalladas en la Tabla 2. En la última calle se observa el marcador de peso molecular CienMarker. En esta imagen se puede apreciar que las plantas 3, 5, 6, 7 y 8 resultan homocigotas para los alelos cultivados (L). Los individuos 1, 2 y 4 son heterocigotas.

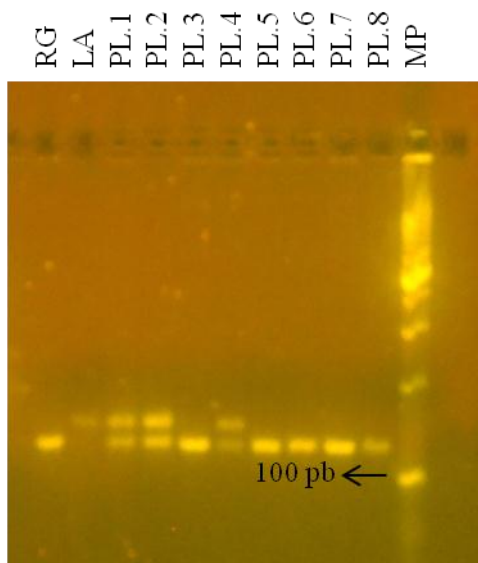


Figura 8. Gel de agarosa al 3% m/v teñido con SYBR® Safe para el marcador molecular IND2-4824 en los progenitores y las plantas recombinantes de la Tabla 2.

LA: LA1589 *S. pimpinellifolium*; MP: marcador de peso molecular CienMarker; PL: planta; RG: Rio Grande *S. lycopersicum*.

La aplicación de un mayor número de marcadores moleculares permitió definir con precisión los sitios de recombinación y diferenciar los segmentos segregantes en la región genómica de estudio.

Evaluación fenotípica de progenitores

La evaluación fenotípica de los progenitores arrojó diferencias significativas para caracteres morfológicos y de calidad de fruto. En la Tabla 3 puede observarse que el progenitor Rio Grande presentó valores medios mayores a los de LA1589 para los caracteres morfológicos

área, *fs I*, *fcp*, *ft*, *ap* y *ep*. Mientras LA1589 fue superior al cultivado para los caracteres *fcd* y *adm*. No se observaron diferencias para el carácter *apm* y *apd*.

En cuanto a los caracteres de calidad, LA1589 presentó mayores valores para *ab* y menores valores para *L* respecto de Rio Grande. No se observaron diferencias significativas entre progenitores para el carácter *pH* (Tabla 3).

Tabla 3. Caracteres de morfología y calidad de fruto medidos en los progenitores Rio Grande y LA1589.

Categoría	Variable	Rio Grande	LA1589
		Media ± EE	Media ± EE
Morfología	<i>área</i>	27,21 ± 1,14 ^a	4,86 ± 0,17 ^b
	<i>fs I</i>	1,20 ± 0,02 ^a	0,96 ± 0,01 ^b
	<i>fcp</i>	0,77 ± 7E-3 ^a	0,64 ± 5E-3 ^b
	<i>fcd</i>	0,55 ± 1E-2 ^b	0,64 ± 4E-3 ^a
	<i>ft</i>	1,42 ± 0,04 ^a	1,01 ± 0,01 ^b
	<i>apm</i>	109,89 ± 2,52 ^a	114,24 ± 0,78 ^a
	<i>adm</i>	84,09 ± 1,25 ^b	115,43 ± 1,12 ^a
	<i>apd</i>	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a
	<i>ap</i>	12,31 ± 0,74 ^a	0,53 ± 0,01 ^b
	<i>ep</i>	1,51 ± 0,05 ^a	0,31 ± 3E-3 ^b
Calidad	<i>pH</i>	4,53 ± 0,02 ^a	4,75 ± 0,04 ^a
	<i>L</i>	42,67 ± 0,57 ^a	37,77 ± 0,29 ^b
	<i>ab</i>	1,08 ± 0,03 ^b	1,42 ± 0,03 ^a

Letras diferentes indican diferencias significativas entre valores medios ($p < 0,05$).

EE: error estándar. *ab*: índice a/b de color; *adm*: ángulo distal macro; *apd*: área de la protuberancia distal; *apm*: ángulo proximal macro; *área*: en cm²; *fcd*: forma cuadrangular distal; *fcp*: forma cuadrangular proximal; *fs I*: índice de forma de fruto; *ft*: forma triangular; *L*: índice de reflectancia de color.

Prueba de progeñie en familias recombinantes

Todas las familias presentadas en la Tabla 2 fueron analizadas para los caracteres de morfología y calidad de fruto. Las familias 2, 3 y 7 fueron descartadas por falta de un número adecuado de datos (menos de tres plantas de algún genotipo dentro de la familia).

El análisis de las familias recombinantes permitió definir con mayor precisión el sitio que contiene al *QTL* para *fs I*. En la Tabla 4 se observa que las familias 1 y 4 presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre grupos homocigotas contrastantes para el carácter

índice de forma de fruto. El grupo de plantas homocigotas para los alelos cultivados (Genotipo L) presentó valores de *fs I* mayores que el grupo con alelos silvestres (Genotipo P) en estas dos familias. En la familia 1 el valor para el carácter fue de $1,14 \pm 0,04$ para el genotipo cultivado y de $0,96 \pm 0,02$ para el silvestre. En la familia 4 el valor para el carácter fue de $1,25 \pm 0,03$ para el genotipo cultivado y de $1,07 \pm 0,01$ para el silvestre. En el resto de las familias no se observaron diferencias entre grupos contrastantes (Tabla 4).

La caracterización fenotípica y molecular de estas familias permitió establecer que el *QTL* que rige el carácter *fs I* se encuentra entre los marcadores moleculares IND2-4526 e IND2-4975 (Tabla 4, marcado por flechas y borde rojo). El segmento conteniendo a *fs I* presenta una longitud aproximada de 4,48 Mb (42,9 cM, ANEXO I).

Tabla 4. Prueba de progenie de recombinantes seleccionados para el carácter índice de forma de fruto (generación F₃-BC₁-S₂).

Familia	Resultados Fenotípicos								Resultados Moleculares														
	Genotipo L				Genotipo P				Estadísticos <i>t-Student</i>		<i>fs2.1</i>										<i>fs8.1</i>		
	n	Media	±	E.E	n	Media	±	E.E	Valor <i>t</i>	Valor p	IND2-4010	Lewus	IND2-4346	TG337	IND2-442433	IND2-4465	IND2-4526	IND2-4569	EPI170-EP171	IND2-4824	IND2-4975	TG45	
1	5	1,14	±	0,04	3	0,96	±	0,02	3,07	0,022	L	P	P	P	P	P	P → H	H	H	H	H	L	
4	5	1,25	±	0,03	3	1,07	±	0,01	3,99	0,007	L	P → H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	P
5	4	1,18	±	0,09	7	1,14	±	0,03	0,41	0,690	L	H → L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
6	5	1,16	±	0,03	4	1,22	±	0,05	-1,22	0,264	L	H → L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	P
8	3	1,15	±	0,01	5	1,14	±	0,03	0,36	0,732	L	H → L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	P

E.E: error estándar; *fs2.1*: región que contiene al *QTL* para forma de fruto en el cromosoma 2; *fs8.1*: región que contiene al *QTL* para forma de fruto en el cromosoma 8; H: genotipo heterocigoto; L: genotipo homocigoto para los alelos de Rio Grande; n: número de plantas; P: genotipo homocigoto para los alelos de LA1589.

No se pudo determinar la posición de los *QTL* para los demás caracteres morfológicos y de calidad de fruto analizados debido a que presentaron asociaciones erráticas a través de las diferentes familias analizadas. Al final de este manuscrito se adjuntan las tablas con los valores medios y error estándar por población, carácter y genotipo (Tabla S1 a Tabla S8).

Detección y validación de *QTL* mediante mapeo por intervalos simple

En el Gráfico 1 se muestran los valores de LOD, en función de los marcadores moleculares utilizados en esta etapa, en la base del cromosoma 2, para caracteres de morfología de fruto, en una generación F₃-BC₁-S₂.

Se puede observar que las variables *área* y *fcd* presentan picos de LOD máximos cercanos al marcador TG337, detectándose posibles *QTL* afectando a dichos caracteres. Los caracteres *fcp* y *ft* presentan mayores valores de LOD para el marcador IND2-442433. En cuanto a *apd*, el máximo valor se encuentra comprendido por la región entre el marcador IND2-4346 y TG337. No se encontraron *QTL* para *apm*, *adm*, *ap* y *ep* en el segmento estudio dado que los valores de LOD resultantes se localizan por debajo del umbral determinado por permutaciones (alfa 0,05, línea celeste horizontal).

En tanto, en el Gráfico 2 se observan los valores de LOD, en función de los marcadores moleculares localizados en la base del cromosoma 2, para caracteres de calidad de fruto. LA variable *ab* de color presentó una pico de LOD máximo cercano al marcador IND2-4465, detectándose un posible *QTL* en la región. No se detectaron *QTL* para *pH* e índice *L* de color en el segmento estudio debido, nuevamente a que los valores de LOD resultaron por debajo del valor umbral (alfa 0,05, línea celeste horizontal).

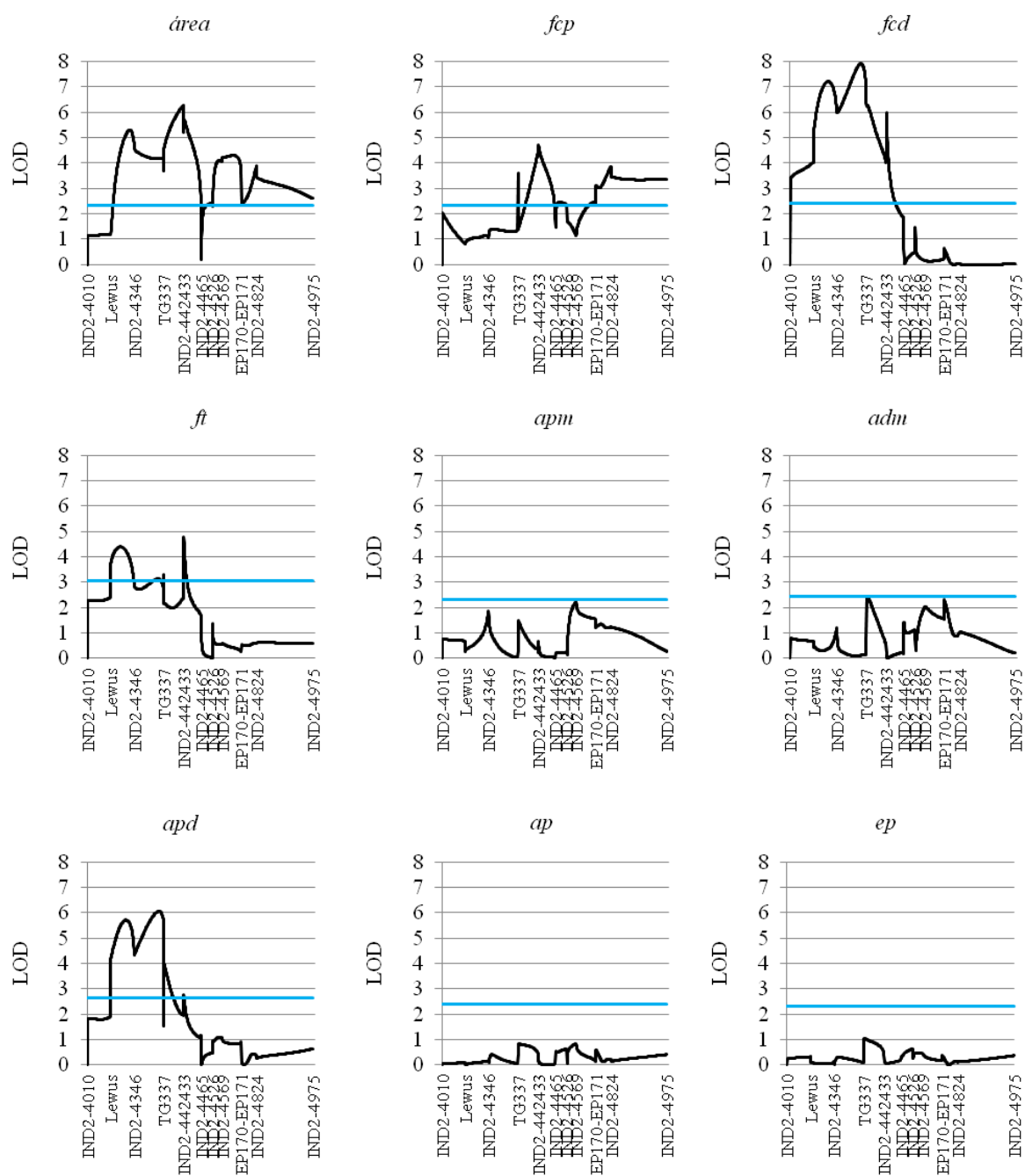


Gráfico 1. Mapeo por intervalos simple para caracteres de morfología de futo en tomate en una generación $F_3-BC_1-S_2$. Valores de LOD en función de la posición de los marcadores moleculares utilizados en la base del cromosoma 2.

adm: ángulo distal macro; *apd*: área de la protuberancia distal; *apm*: ángulo proximal macro; *área*: en cm^2 ; *fcd*: forma cuadrangular distal; *fcp*: forma cuadrangular proximal; *ft*: forma triangular.

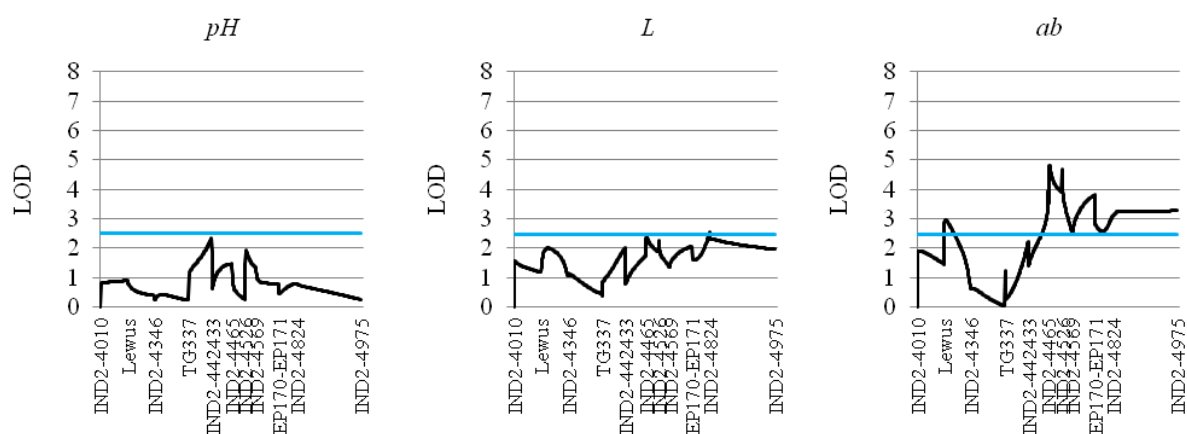


Gráfico 2. Mapeo por intervalos simple para caracteres de calidad de futo en tomate en una generación F_3 - BC_1 - S_2 . Valores de LOD en función de la posición de los marcadores moleculares utilizados en la base del cromosoma 2.

ab: índice a/b de color; *L*: índice de reflectancia de color.

Debido a que el resto de los caracteres evaluados no pudieron ser detectados mediante comparaciones entre grupos homocigotas se prosigue únicamente con el estudio del carácter índice de forma de fruto (*fs I*).

Conclusiones del Capítulo I

Se detectó mediante prueba de progenie al *QTL* mayor *fs2.1* y se logró acotar la región conteniendo a dicho *QTL* de 9,64 Mb a 4,48 Mb entre los marcadores moleculares IND2-4526 e IND2-4975 en la base del cromosoma 2. Se detectaron *QTL* menores mediante mapeo por intervalos simples para las variables *área* y *fcd* en el marcador TG337, para *fcp* y *ft* en IND2-44243, para *ab* en IND2-4465 y para *apd* en la región comprendida por los marcadores IND2-4346 y TG337.

CAPÍTULO II

OBJETIVO ESPECÍFICO

Evaluar el carácter índice de forma de fruto, en la descendencia de padres recombinantes, para minimizar la región que contiene al *QTL fs2.1*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

El material corresponde a retrocruzas derivadas del mismo cruzamiento interespecífico (Rio Grande x LA1589) cuyo pedigrí se detalla en la Tabla 5.

Tabla 5. Pedigrí de las plantas analizadas en la búsqueda de recombinantes.

Pedigrí	Número de plantas analizadas
F ₃ -BC ₁ -S ₂	215
F ₃ -BC ₂ -S ₁	20
F ₃ -BC ₂ -S ₂	7

BC₁: primera retrocruza; BC₂: segunda retrocruza; F₃: filial 3; S₁: primer ciclo de autofecundación; S₂: segundo ciclo de autofecundación.

Utilizando los marcadores moleculares (IND2-4010, Lewus, IND2-4346, TG337, IND2-442433, IND2-4465, IND2-4526, IND2-4569, EP170-EP171, IND2-4824 e IND2-4975 de tipo *InDel* descritos en Anexo I) localizados en la base del cromosoma 2, se buscaron recombinantes entre las 242 plantas detalladas en la Tabla 5. Nueve plantas fueron seleccionadas por presentar recombinación en el segmento bajo estudio de 9,64 Mb (96,5 cM), para realizar una prueba de progenie a fin de acotar la región conteniendo al *QTL fs2.1*. En la Tabla 6 se detalla el pedigrí y la constitución genética de las plantas seleccionadas en base a los marcadores moleculares utilizados en el cromosoma 2 y cromosoma 8.

Tabla 6. Pedigrí y constitución genética de recombinantes seleccionados.

Pedigrí	Planta	<i>fs2.1</i>										<i>fs8.1</i>	
		IND2-4010	Lewus	IND2-4346	TG337	IND2-442433	IND2-4465	IND2-4526	IND2-4569	EPI70-EPI71	IND2-4824	IND2-4975	TG45
F ₃ -BC ₂ -S ₁	1	L	H	H	H	H	H	L	L	L	L	L	L
F ₃ -BC ₂ -S ₁	2	L	L	H	H	H	H	L	L	L	L	L	L
F ₃ -BC ₁ -S ₂	3	L	L	L	L	H	H	H	H	H	P	P	L
F ₃ -BC ₁ -S ₂	4	L	P	P	P	P	H	H	H	H	P	P	L
F ₃ -BC ₁ -S ₂	5	L	P	P	P	P	H	H	H	H	L	L	P
F ₃ -BC ₁ -S ₂	6	L	L	L	L	L	H	H	H	H	P	P	P
F ₃ -BC ₁ -S ₂	7	L	P	P	P	P	P	P	H	H	H	H	L
F ₃ -BC ₁ -S ₂	8	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	H	P
F ₃ -BC ₁ -S ₂	9	L	H	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L

BC₁: primera retrocruza; BC₂: segunda retrocruza; F₃: filial 3; *fs2.1*: región que contiene al *QTL* para forma de fruto en el cromosoma 2; *fs8.1*: región que contiene al *QTL* para forma de fruto en el cromosoma 8; H: genotipo heterocigoto; L: genotipo homocigoto para los alelos de Rio Grande; P: genotipo homocigoto para los alelos de LA1589; S₁: primer ciclo de autofecundación; S₂: segundo ciclo de autofecundación.

Según los resultados obtenidos durante el Capítulo I, el *QTL fs2.1* que rige para índice de forma de fruto se encuentra localizado en un segmento de 4,48 Mb (42,9 cM), comprendido por los marcadores IND2-4526 e IND2-4975 en la base del cromosoma 2. Por este motivo, al analizar la descendencia de las plantas 3 a 8 se espera encontrar diferencias entre grupos homocigotas contrastantes para el carácter, ya que segregan en el segmento conteniendo a *fs2.1*. Así mismo, se espera que la descendencia de las plantas 1, 2 y 9 no presenten diferencias entre grupos homocigotas para el carácter, ya que no segregan en el segmento conteniendo a *fs2.1*. Estas últimas fueron seleccionadas con el objeto de validar la posición del *QTL fs2.1* mediante control negativo.

Al igual que lo descrito en el Capítulo I, de cada planta recombinante seleccionada (Tabla 6) se sembraron 30 semillas. En etapa de plántula se extrajo el ADN según ANEXO II y se seleccionaron seis plantas homocigotas para el alelo cultivado (L) y seis plantas homocigotas para el alelo silvestre (P) en la región genómica segregante (segmento heterocigota),

siguiendo la metodología descrita en el Capítulo I. Las plantas seleccionadas se trasplantaron en invernadero, a una distancia de 1 m entre hileras y 40 cm entre plantas, siguiendo la metodología descrita en el Capítulo I.

Caracterización fenotípica y tratamiento estadístico de los datos

Según los resultados expuestos en el Capítulo I, únicamente el carácter *fs I* pudo ser analizado como de herencia monogénica mediante prueba *t* de *Student*. Por este motivo, se decidió continuar con las pruebas de progenie analizando solo el carácter índice de forma de fruto (*fs I*) según se detalla en la sección "Caracterización fenotípica" del Capítulo I (Figura 5 y Figura 6).

Saturación de la región estudio

Una vez realizada la prueba de progenie e identificada la región que contiene al *QTL fs2.1*, que rige para el carácter *fs I*, se procedió al desarrollo de nuevos marcadores moleculares a fin de saturar dicho segmento. Siguiendo la metodología descrita en el ANEXO I se aplicaron seis nuevos marcadores sobre el ADN de las plantas detalladas en la Tabla 6 a fin de acotar la región conteniendo a *fs2.1*.

RESULTADOS

Prueba de progenie en familias recombinantes

Todas las familias presentadas en la Tabla 6 fueron analizadas para el carácter *fs I*. Las familias 3, 4, 5 y 6 fueron descartadas por falta de un número adecuado de datos (menos de tres plantas de algún genotipo dentro de la familia). La prueba de progenie y el análisis estadístico se realizó sobre las familias 1, 2, 7, 8 y 9 (Tabla 7).

En la Tabla 7 se observa que las familias 7 y 8 presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre grupos homocigotas contrastantes para el carácter índice de forma de fruto. El grupo de plantas homocigotas para los alelos cultivados (Genotipo L) presentó un valor de *fs I* mayor que el grupo con alelos silvestres (Genotipo P) en estas dos familias (7 y 8). En el resto de las familias no se observaron diferencias entre grupos contrastantes como se esperaba.

La caracterización fenotípica y molecular de estas familias permitió establecer que el *QTL* que rige el carácter *fs I* se encuentra entre los marcadores moleculares IND2-4824 e IND2-4975 (Tabla 7, marcado por flechas y borde rojo). El segmento conteniendo a *fs I* presenta una longitud aproximada de 1,50 Mb (23,9 cM), ANEXO I).

Tabla 7. Prueba de progenie de recombinantes seleccionados para el carácter índice de forma de fruto.

Familia	Resultados Fenotípicos									Resultados Moleculares													
	Genotipo L				Genotipo P				Estadísticos <i>t</i> -Student		<i>fs2.1</i>										<i>fs8.1</i>		
	n	Media	±	E.E.	n	Media	±	E.E.	Valor <i>t</i>	Valor p	IND2-4010	Lewus	IND2-4346	TG337	IND2-442433	IND2-4465	IND2-4526	IND2-4569	EP170-EP171	IND2-4824	IND2-4975	TG45	
1	4	1,20	±	0,14	7	1,20	±	0,03	0,02	0,98	L	H	H	H	H	H	L	L	L	L	L	L	L
2	3	1,27	±	0,05	5	1,17	±	0,02	2,45	0,05	L	L	H	H	H	H	L	L	L	L	L	L	L
7	10	1,31	±	0,04	6	1,12	±	0,07	2,73	0,02	L	P	P	P	P	P	P	H	H	H	H	H	L
8	8	1,10	±	0,02	11	1,04	±	0,01	4,06	<0,001	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	P
9	9	1,32	±	0,07	8	1,17	±	0,06	1,70	0,11	L	H	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L

EE: error estándar; *fs2.1*: región que contiene al *QTL* para forma de fruto en el cromosoma 2; *fs8.1*: región que contiene al *QTL* para forma de fruto en el cromosoma 8; H: genotipo heterocigoto; L: genotipo homocigoto para los alelos de Rio Grande; n: número de plantas; P: genotipo homocigoto para los alelos de LA1589.

Nueva caracterización molecular

La aplicación de los nuevos seis marcadores moleculares (IND2-5375, IND2-5408, IND2-5429, IND2-5436, IND2-5463 e IND2-5485) sobre el ADN de la descendencia de las plantas detalladas en la Tabla 6, permitió definir con mayor precisión los sitios de recombinación en el segmento conteniendo al *QTL fs2.1* (comprendido por los marcadores IND2-4824 e IND2-4975).

En la Tabla 8 se puede observar que la familia 7 presenta un segmento segregante comprendido por los marcadores IND2-4569 e IND2-4975 (4,05 Mb). Por otro lado, la familia 8 presenta un segmento segregante comprendido por los marcadores IND2-5485 e IND2-4975 (0,32 Mb). En la Tabla 7 se observó que ambas familias resultaron con diferencias significativas entre grupos homocigotas para el carácter *fs I* indicando que ambas contienen al *QTL fs2.1* en su segmento segregante. En virtud de la caracterización molecular más detallada en el segmento de estudio se pudo observar que el *QTL fs2.1* estaría localizado en un segmento de 0,54 Mb en la base del cromosoma 2 comprendido por los marcadores IND2-5463 e IND2-4975 (marcado por flechas y borde rojo, Tabla 8).

Tabla 8. Constitución genética de las plantas utilizadas para la prueba de progenie.

Familia	Resultados Moleculares															TG45		
	<i>fs2.1</i>														<i>fs8.1</i>			
	IND2-4010	Lewus	IND2-4346	TG337	IND2-4424	IND2-4465	IND2-4526	IND2-4569	EP170-171	IND2-4824	IND2-5375	IND2-5408	IND2-5429	IND2-5436	IND2-5463		IND2-5485	IND2-4975
1	L	H	H	H	H	H	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
2	L	L	H	H	H	H	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
7	L	P	P	P	P	P	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
8	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	H	H
9	L	H	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L

fs2.1: región que contiene al *QTL* para forma de fruto en el cromosoma 2; *fs8.1*: región que contiene al *QTL* para forma de fruto en el cromosoma 8; H: genotipo heterocigoto; L: genotipo homocigoto para los alelos de Rio Grande; P: genotipo homocigoto para los alelos de LA1589.

En la Figura 9 pueden observarse frutos representativos de la familia 7 de los grupos homocigotas para alelos cultivados (L) y silvestres (P). Puede observarse frutos más alargados cuando se encuentran presentes alelos cultivados en el segmento segregante de la familia 7. Por otro lado, el grupo con alelos silvestres presenta una morfología esférica más similar a LA1589.

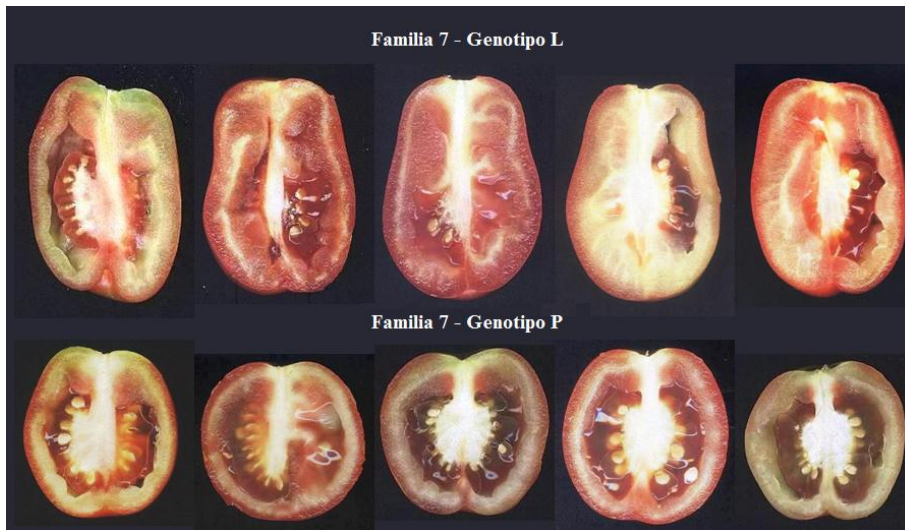


Figura 9. Frutos representativos de los grupos homocigotas con alelos cultivados (L) y silvestres (P) de la familia 7.

En la Figura 10 pueden observarse frutos representativos de la familia 8 de los grupos homocigotas para alelos cultivados (L) y silvestres (P). Nuevamente, se observa una morfología más similar al progenitor Rio Grande cuando se encuentran presentes alelos cultivados en el segmento segregante y morfología esférica similar a LA1589 cuando se encuentran presentes alelos silvestres.

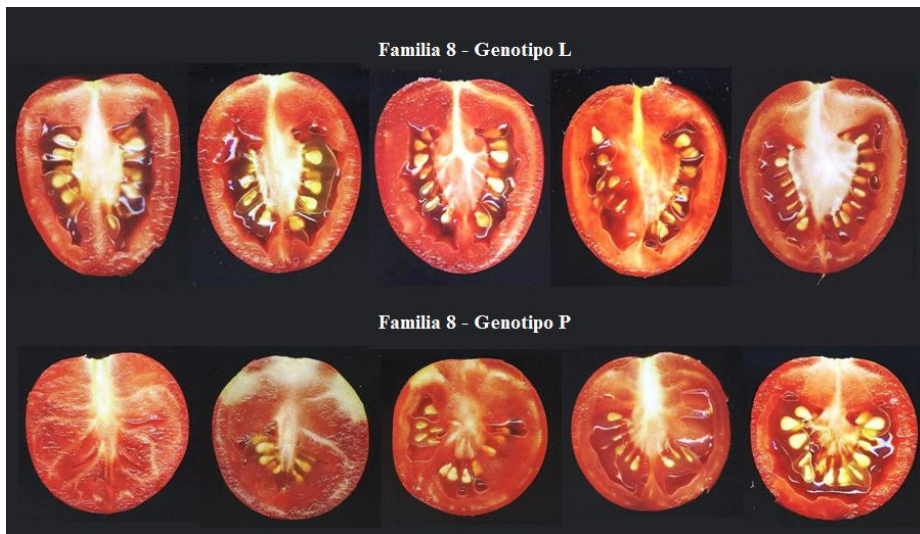


Figura 10. Frutos representativos de los grupos homocigotas con alelos cultivados (L) y silvestres (P) de la familia 8.

Estos resultados permitirán comenzar con la búsqueda de genes candidatos contenidos en la región estudio.

Conclusiones del Capítulo II

Se logró acotar la región conteniendo a *fs2.1* de 4,48 Mb (42,9 cM) a 0,54 Mb (11,00 cM; ANEXO I) en la base del cromosoma 2 entre los marcadores IND2-5463 e IND2-4975.

CAPÍTULO III

OBJETIVO ESPECÍFICO

Detectar el estadio de desarrollo del fruto en el que el *QTL fs2.1* afecta la forma.

MATERIALES Y MÉTODOS

El análisis de frutos en desarrollo se realizó en dos ensayos. A continuación se describe el material vegetal utilizado en cada uno de ellos.

Material Vegetal

Ensayo 1 (2014-2015): Para el análisis de fruto en desarrollo se utilizaron los progenitores (Rio Grande y LA1589) y dos familias segregantes denominadas A y B. En la Tabla 9 se detalla la constitución genética, en la base del cromosoma 2 y la región centromérica del cromosoma 8, de las plantas que dieron origen a dichas familias. La planta B fue seleccionada por segregar en el segmento conteniendo a *fs2.1* y la planta A como control negativo por presentar alelos cultivados en estado homocigota entre los marcadores IND2-5463 e IND2-4975.

Tabla 9. Constitución genética en *fs2.1* y *fs8.1* de las plantas seleccionadas para el análisis de fruto en desarrollo del ensayo 1 y que dieron origen a las familias A y B.

Planta	<i>fs2.1</i>																<i>fs8.1</i>	
	IND2-4010	Lewus	IND2-4346	TG337	IND2-442433	IND2-4465	IND2-4526	IND2-4569	EP170-EPI171	IND2-4824	IND2-5375	IND2-5408	IND2-5429	IND2-5436	IND2 5463	IND2-5485	IND2-4975	TG45
A	L	P	P	P	P	H	H	H	H	L	L	L	L	L	L	L	L	P
B	L	P	P	P	P	P	P	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	L

fs2.1: región que contiene al *QTL* para forma de fruto en el cromosoma 2; *fs8.1*: región que contiene al *QTL* para forma de fruto en el cromosoma 8; H: genotipo heterocigoto; L: genotipo homocigoto para los alelos de Rio Grande; P: genotipo homocigoto para los alelos de LA1589.

Ensayo 2 (2015-2016): Se utilizaron los progenitores y otras dos familias segregantes diferentes a las utilizadas en el ensayo 1 denominadas A y B. En la Tabla 10 se detalla la constitución genética, en la base del cromosoma 2 y la región centromérica del cromosoma 8, de las plantas que dieron origen a dichas familias. Ambas plantas segregan en el segmento conteniendo a *fs2.1* entre los marcadores IND2-5463 e IND2-4975.

Tabla 10. Constitución genética en *fs2.1* y *fs8.1* de las plantas seleccionadas para el análisis de fruto en desarrollo del ensayo 2 y que dieron origen a las familias A y B.

Planta	<i>fs2.1</i>															<i>fs8.1</i>		
	IND2 4010	Lewus	IND2 4346	TG337	IND2 442433	IND2 4465	IND2 4526	IND2 4569	EP170 -EP171	IND2 4824	IND2 5375	IND2 5408	IND2 5429	IND2 5436	IND2 5463	IND2 5485	IND2 4975	TG45
A	L	P	P	P	P	P	P	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	L
B	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	H	H	P

fs2.1: región que contiene al *QTL* para forma de fruto en el cromosoma 2; *fs8.1*: región que contiene al *QTL* para forma de fruto en el cromosoma 8; H: genotipo heterocigoto; L: genotipo homocigoto para los alelos de Rio Grande; P: genotipo homocigoto para los alelos de LA1589.

Las plantas recombinantes seleccionadas se dejaron autofecundar para obtener semilla. Treinta semillas de cada una fueron sembradas y en etapa de plántula se seleccionaron homocigotas para los alelos cultivados y silvestres como se detalla en el Capítulo I de esta tesis. Seis plantas por familia y grupo homocigota fueron transplantadas en invernadero junto a cinco ejemplares de Rio Grande y cinco de LA1589.

Metodología de análisis de fruto en desarrollo

Cuarenta días después del trasplante a invernadero se comenzó el análisis de fruto en desarrollo utilizando todas las plantas correspondientes a los progenitores (Rio Grande y LA1589) y las familias A y B.

El primer día se procedió al etiquetado, seleccionando inflorescencias con al menos seis pimpollos por abrir. Se colocaron en promedio tres etiquetas por planta. Las flores ya abiertas se registraron indicando su posición dentro de la inflorescencia para no ser tenidas en cuenta.

El segundo día se dio inicio al registro de apertura de las flores, indicando posición dentro de la inflorescencia y fecha (Figura 11a). Este procedimiento se realizó siempre a la misma hora (7:30 am).

El séptimo día se procedió a la recolección de frutos en desarrollo correspondientes a los estadios 0, 3 y 5 días post antesis. El registro se realizó discriminando por familia (Rio Grande, LA1589, familia A y familia B) y genotipo (L, H o P en las familias segregantes). La recolección de frutos en desarrollo se realizó utilizando placas de Petri debidamente rotuladas y con sus bordes rodeados de papel humedecido para conservarlos hasta el momento del análisis.

Los frutos en desarrollo fueron seccionados longitudinalmente con bisturí y colocados sobre papel milimetrado. Se utilizó una lupa marca Leica y cámara digital Sony Carl Zeiss de 12.1 Mega pixeles para obtener imágenes individuales (Figura 11b, c y d).



Figura 11. Proceso de análisis de frutos en desarrollo.

Fechado de inflorescencias (a); montaje de cámara fotográfica sobre lupa (b); disposición de los cortes de frutos en desarrollo (c); captura de imagen (d).

Para el análisis de imágenes se utilizó el programa libre ImageJ (rsbweb.nih.gov/ij/) que permitió registrar altura (*alt*, en mm) y diámetro (*diam*, en mm) de fruto en desarrollo. Los datos fueron archivados en una planilla de Excel donde posteriormente se calculó el índice de forma de fruto en desarrollo (*dfs*).

Análisis estadísticos

Los datos recolectados fueron procesados para eliminar valores atípicos. Este proceso se realizó mediante un gráfico de dispersión por población, genotipo y estadio de desarrollo. Los valores alejados de la media fueron descartados en forma visual y por desviarse de la media el doble de la desviación estándar calculada. La explicación biológica de estas desviaciones pueden deberse a que algunas flores no fueron fecundadas presentando una tasa de crecimiento menor a la media y aquellas con valores mayores podrían haberse fecundado en un rango horario anterior a la media. Dado el intervalo de marcaje programado (24 hs) algunas flores podrían presentar hasta 6 hs de diferencias en el momento de antesis.

Con los valores filtrados, se constituyó una nueva base de datos con la cual se llevaron a cabo los análisis correspondientes.

Utilizando el programa InfoStat 1.0 (Di Renzo et al., 2001) se obtuvieron los valores medios y error estándar para los diferentes genotipos por población analizada. Se aplicó la prueba *t* de Student (Snedecor, 1964) utilizando un valor de significancia del 5%.

RESULTADOS

Ensayo 1

En la Tabla 11 se detallan los valores medios, error estándar y número de flores analizadas para los caracteres *alt*, *diam* y *dfs* en los tres estadios de desarrollo, se indica también el valor del estadístico t y de probabilidad asociada al comparar Rio Grande y LA1589. Se presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre progenitores para la variable *alt* y *dfs* desde el día 0 de antesis. Para la variable *diam* se observaron diferencias significativas solo hasta el día 3.

Tabla 11. Análisis de comparación de valores medios para los caracteres medidos en frutos en desarrollo en los progenitores Rio Grande y LA1589 en el ensayo 1.

<i>dpa</i>	Variable	Rio Grande		LA 1589		Estadísticos <i>t-Student</i>	
		n	Media \pm E.E.	n	Media \pm E.E.	Valor t	Valor p
0	<i>alt</i>	3	1,69 \pm 0,09	4	0,72 \pm 0,04	-11,41	<0,001
3	<i>alt</i>	3	2,68 \pm 0,31	4	0,99 \pm 0,17	-5,15	0,004
5	<i>alt</i>	3	5,60 \pm 0,88	3	2,52 \pm 0,21	-3,42	0,027
0	<i>diam</i>	3	1,09 \pm 0,07	4	0,56 \pm 0,03	-7,34	0,001
3	<i>diam</i>	3	1,83 \pm 0,25	4	0,84 \pm 0,15	-3,63	0,015
5	<i>diam</i>	3	3,83 \pm 0,69	3	2,11 \pm 0,21	-2,41	0,074
0	<i>dfs</i>	3	1,56 \pm 0,03	4	1,29 \pm 0,03	-7,24	0,001
3	<i>dfs</i>	3	1,48 \pm 0,09	4	1,19 \pm 0,03	-3,57	0,016
5	<i>dfs</i>	3	1,48 \pm 0,04	3	1,20 \pm 0,03	-5,80	0,004

dpa: días post antesis; *alt*: altura en mm; *diam*: diámetro en mm; *dfs*: índice de forma de fruto en desarrollo; n: número de flores; E.E.: error estándar.

El progenitor Rio Grande fue superior a LA1589 para el carácter *dfs* a lo largo de los estadios estudiados siendo casi constante la diferencia observada (Gráfico 3).

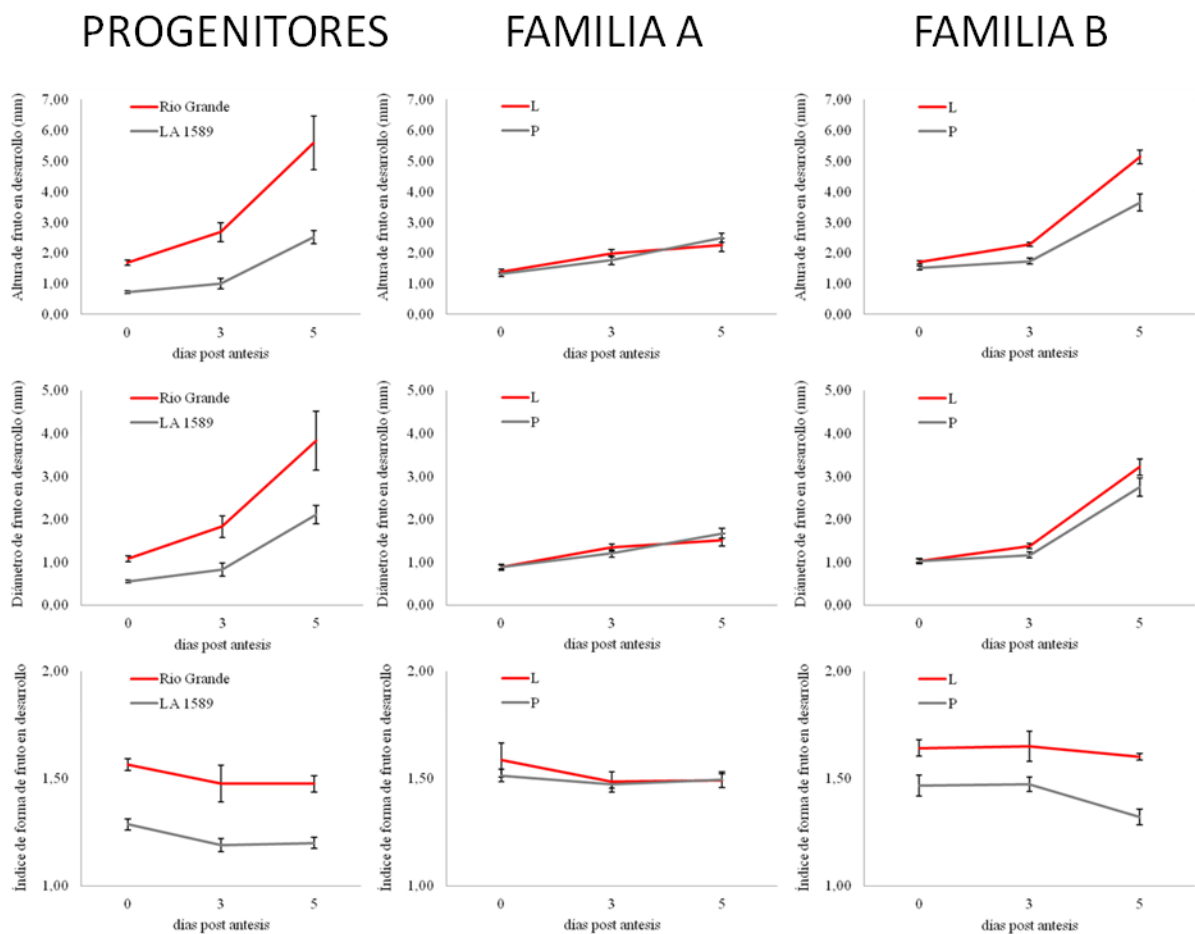


Gráfico 3. Valores medios de los caracteres altura, diámetro e índice de forma de fruto en desarrollo en tres estadios post antesis en los progenitores y las familias A y B del ensayo 1.

L: grupo homocigota para alelos de Rio Grande; P: grupo homocigota para alelos LA1589

En la Tabla 12 se pueden observar los valores medios, error estándar y número de flores analizadas para los caracteres *alt*, *diam* y *dfs* en los tres estadios de desarrollo, se indica también el valor del estadístico *t* y de probabilidad asociada al comparar los grupos homocigotas de la familia A.

Tabla 12. Análisis de comparación de valores medios para los caracteres medidos en frutos en desarrollo en la familia A del ensayo 1.

Familia A							
<i>dpa</i>	Variable	L		P		Estadísticos t-Student	
		n	Media ± E.E.	n	Media ± E.E.	Valor t	Valor p
0	<i>alt</i>	4	1,39 ± 0,07	7	1,31 ± 0,07	0,76	0,468
3	<i>alt</i>	10	1,99 ± 0,14	10	1,76 ± 0,13	1,24	0,229
5	<i>alt</i>	8	2,25 ± 0,15	9	2,50 ± 0,21	-0,90	0,380
0	<i>diam</i>	4	0,88 ± 0,05	7	0,89 ± 0,07	-0,06	0,956
3	<i>diam</i>	10	1,34 ± 0,09	10	1,20 ± 0,09	1,13	0,273
5	<i>diam</i>	8	1,52 ± 0,11	9	1,67 ± 0,14	-0,84	0,415
0	<i>dfs</i>	4	1,59 ± 0,03	7	1,51 ± 0,08	0,67	0,522
3	<i>dfs</i>	10	1,49 ± 0,02	10	1,47 ± 0,05	0,26	0,803
5	<i>dfs</i>	8	1,49 ± 0,04	9	1,49 ± 0,03	-0,09	0,928

L: grupo homocigota para alelos de Rio Grande; P: grupo homocigota para alelos LA1589; *dpa*: días post anthesis; *alt*: altura en mm; *diam*: diámetro en mm; *dfs*: índice de forma de fruto en desarrollo; n: número de flores; E.E.: error estándar.

En esta familia, todos los caracteres evaluados por estadio resultaron estadísticamente no significativos ($p > 0,05$) (Tabla 12 y Gráfico 3). Este resultado indicaría que la región segregante en esta población (desde IND2-4465 hasta EP170-EP171) no estaría involucrada en el control de estos caracteres.

Por último, en la Tabla 13, se pueden observar los valores medios, error estándar y número de flores analizadas para los caracteres *alt*, *diam* y *dfs* en los tres estadios de desarrollo, se indica también el valor del estadístico *t* y de probabilidad asociada al comparar los grupos homocigotas de la familia B.

Tabla 13. Análisis de comparación de valores medios para los caracteres medidos en frutos en desarrollo en la familia B del ensayo 1.

Familia B									
<i>dpa</i>	Variable	L			P			Estadísticos t-Student	
		n	Media	± E.E.	n	Media	± E.E.	Valor t	Valor p
0	<i>alt</i>	6	1,68	± 0,06	6	1,50	± 0,05	2,35	0,041
3	<i>alt</i>	7	2,27	± 0,10	3	1,71	± 0,06	3,47	0,008
5	<i>alt</i>	7	5,12	± 0,28	5	3,63	± 0,23	3,90	0,003
0	<i>diam</i>	6	1,03	± 0,06	6	1,02	± 0,04	0,08	0,936
3	<i>diam</i>	7	1,38	± 0,07	3	1,17	± 0,06	1,91	0,093
5	<i>diam</i>	7	3,22	± 0,22	5	2,75	± 0,19	1,53	0,157
0	<i>dfs</i>	6	1,64	± 0,05	6	1,47	± 0,04	2,81	0,018
3	<i>dfs</i>	7	1,65	± 0,03	3	1,47	± 0,07	2,65	0,029
5	<i>dfs</i>	7	1,60	± 0,04	5	1,32	± 0,02	6,26	<0,001

L: grupo homocigota para alelos de Rio Grande; P: grupo homocigota para alelos LA1589; *dpa*: días post antesis; *alt*: altura en mm; *diam*: diámetro en mm; *dfs*: índice de forma de fruto en desarrollo; n: número de flores; E.E.: error estándar.

Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) para las variables *alt* y *dfs* en los tres estadios analizados en la familia B (Tabla 13). Las diferencias entre los dos genotipos (L y P) para ambas variable fueron incrementándose con el tiempo (Gráfico 3). Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) para el carácter *diam* en ninguno de los estadios evaluados (Tabla 13). Estos resultados indicarían que la región segregante comprendida por los marcadores EP170-EP171 e IND2-4975 afecta a los caracteres *alt* y *dfs* al menos desde el día de la antesis.

En la Figura 12 se pueden observar imágenes de frutos en desarrollo en los estadios 0, 3 y 5 después de antesis en los progenitores y las familias A y B.

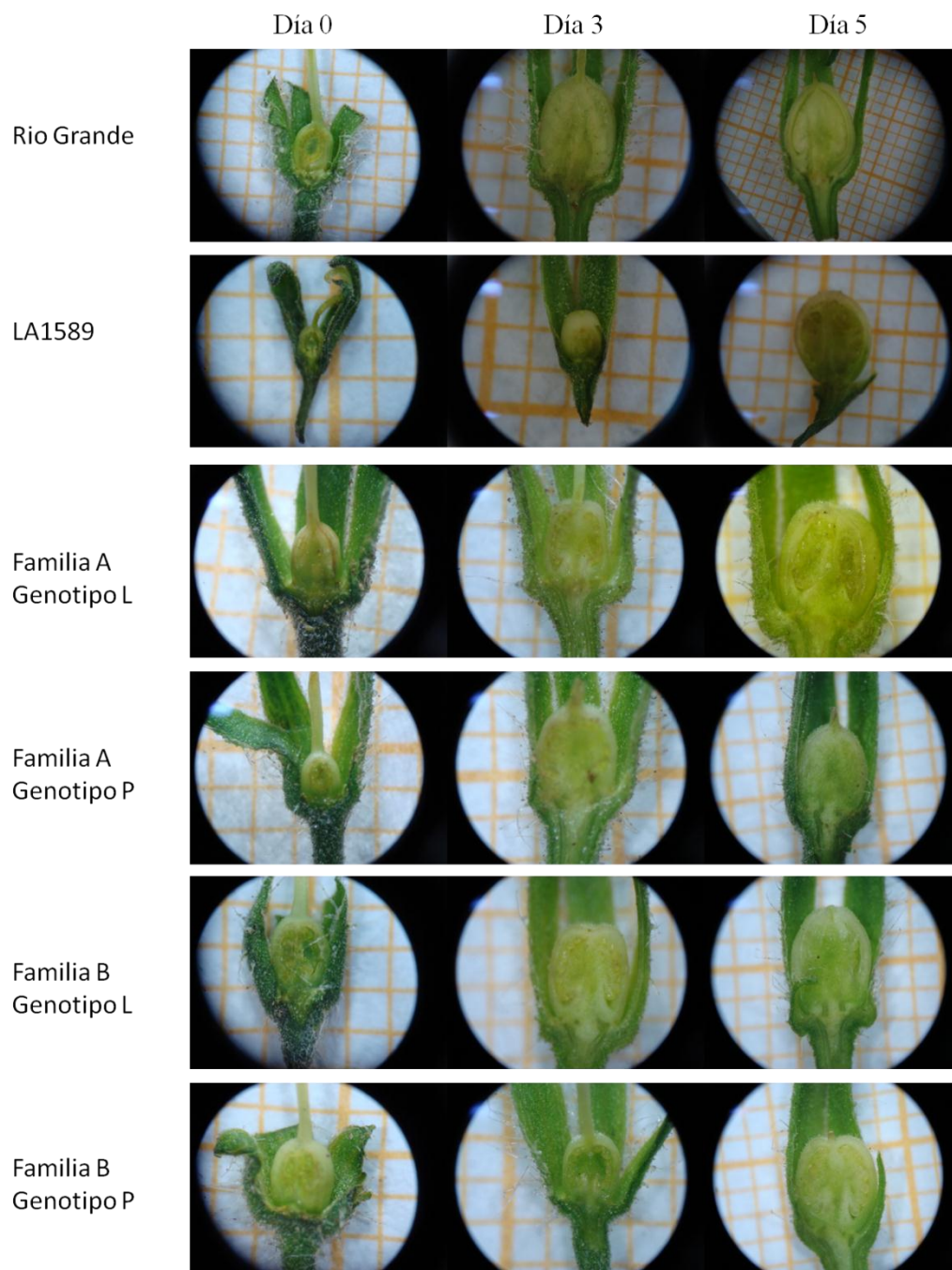


Figura 12. Imágenes representativas de frutos en tres estadios de desarrollo en los progenitores y las familias A y B.

L: grupo homocigota para alelos de Rio Grande; P: grupo homocigota para alelos LA1589.

Ensayo 2

En la Tabla 14 se detalla el número de flores analizadas por familia, genotipo y estadio durante el ensayo 2.

Tabla 14. Número de flores analizadas en los progenitores y las familias segregantes A y B durante el ensayo 2.

Estadio	Rio Grande	LA1589	Familia A			Familia B		
			L	H	P	L	H	P
0	7	8	16	11	13	11	8	15
3	5	8	23	18	17	18	12	12
5	7	7	15	13	15	8	10	16

H: genotipo heterocigoto; L: genotipo homocigoto para los alelos de Rio Grande; P: genotipo homocigoto para los alelos de LA1589.

En la Tabla 15 se detallan los resultados del análisis de comparación por *t* de *Student* de los genotipos uniformes Rio Grande y LA1589, para las variables altura, diámetro e índice de forma de fruto en desarrollo, medidos en los días 0, 3 y 5 después de antesis.

Tabla 15. Análisis de comparación de valores medios para los caracteres medidos en frutos en desarrollo en los progenitores Rio Grande y LA1589 en el ensayo 2.

<i>dpa</i>	Variable	Rio Grande			LA1589			Estadísticos <i>t-Student</i>	
		n	Media	± E.E.	n	Media	± E.E.	Valor t	Valor p
0	<i>alt</i>	7	2,13	± 0,10	8	0,99	± 0,01	11,20	<0,0001
3	<i>alt</i>	5	2,26	± 0,10	8	1,20	± 0,08	7,94	<0,0001
5	<i>alt</i>	7	2,57	± 0,09	7	1,46	± 0,15	6,62	<0,0001
0	<i>diam</i>	7	1,72	± 0,07	8	0,81	± 0,01	12,24	<0,0001
3	<i>diam</i>	5	1,78	± 0,06	8	0,95	± 0,05	11,46	<0,0001
5	<i>diam</i>	7	1,91	± 0,07	7	1,12	± 0,12	5,74	<0,005
0	<i>dfs</i>	7	1,24	± 0,03	8	1,23	± 0,03	0,13	0,898
3	<i>dfs</i>	5	1,27	± 0,04	8	1,26	± 0,05	0,19	0,853
5	<i>dfs</i>	7	1,35	± 0,03	7	1,31	± 0,05	0,73	0,482

dpa: días post antesis; *alt*: altura en mm; *diam*: diámetro en mm; *dfs*: índice de forma de fruto en desarrollo; n: número de flores; E.E.: error estándar.

Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,005$) entre Rio Grande y LA1549 para las variables altura y diámetro en todos los estadios analizados. No obstante, no se encontraron diferencias para la variable índice de forma de fruto en desarrollo (Tabla 15).

A su vez, las familias segregantes utilizadas (Tabla 10) no presentaron diferencias para la variable índice de forma de fruto en desarrollo (datos no presentados) en los estadios analizados. Estos resultados fueron inesperados y dada la baja producción de flores y frutos observada durante este ensayo en los materiales analizados se decidió realizar una comparación respecto del ensayo 1.

En el Gráfico 4 se pueden observar los valores que tomaron las variables *alt* y *diam* en los genotipos uniformes Rio Grande y LA1589 durante ambos ensayos.

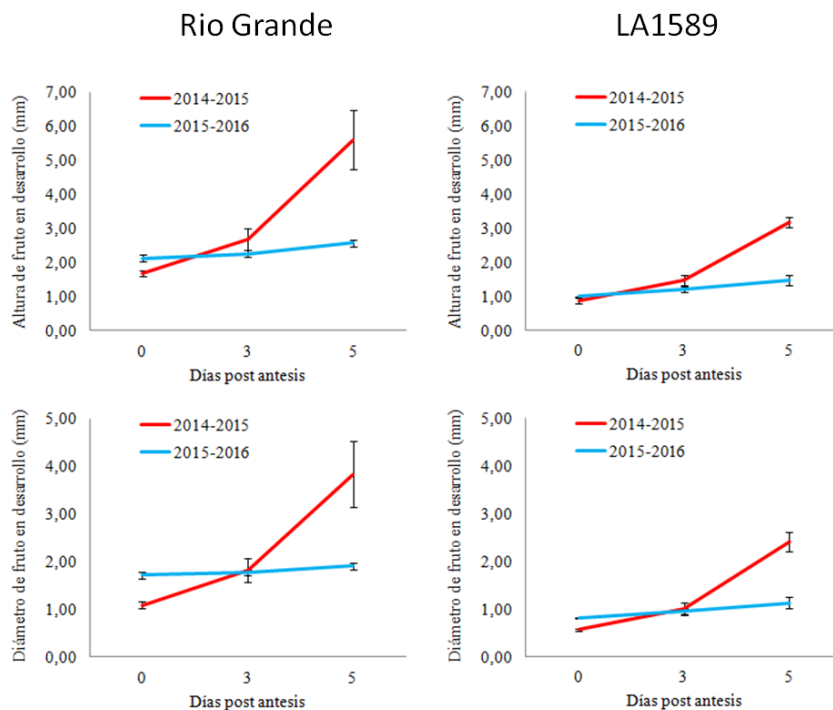


Gráfico 4. Altura y diámetro de frutos en desarrollo medidos en tres estadios después de antesis en los genotipos Rio Grande y LA1589 durante el ensayo 1 (2014-2015) y ensayo 2 (2015-2016).

Los genotipos uniformes Rio Grande y LA1589 se utilizan como controles año a año y se espera siempre encontrar diferencias significativas en los valores de *alt*, *diam* y *dfs* dadas sus diferencias morfológicas. En función de los resultados obtenidos en los progenitores

(diferencias en *alt*, *diam* pero no *dfs*) durante el ensayo 2 (2015-2016), se decide desestimar los datos tomados ya que los valores se ven afectados por algún tipo de factor ambiental.

Conclusiones del Capítulo III

El efecto de *fs2.1* resultó estadísticamente significativo desde el momento de antesis en individuos segregantes en la región conteniendo al *QTL fs2.1*.

CAPÍTULO IV

OBJETIVO ESPECÍFICO

Proponer genes candidatos para el *QTL fs2.1* haciendo uso de herramientas bioinformáticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Haciendo uso de la página SOL Genomics Network (SGN, <https://solgenomics.net/>), fecha de acceso 19 de noviembre de 2015) se extrajo un archivo en formato FASTA correspondiente a la secuencia completa del cromosoma 2 de tomate al que se denominó SL2.50ch02 (de una longitud de 55.340.444 pb). FASTA en bioinformática es un formato de fichero basado en texto, utilizado para representar secuencias de ácidos nucleicos o péptidos. La simplicidad de este formato hace fácil el manipular y analizar secuencias haciendo uso de herramientas de procesamiento de textos y lenguajes de programación. Utilizando el lenguaje de programación en R se creó un algoritmo que permitió extraer de SL2.50ch02 el fragmento conteniendo a *fs2.1* (desde el marcador IND2-5463 hasta la base del cromosoma), el archivo fue denominado subseqch02 (de una longitud de 706.783 pb).

En el entorno de SGN, la secuencia contenida en subseqch02 permitió realizar un BLAST contra una base de secuencias de DNA codificante (Tomato Genome CDS - ITAG release 2.40, fecha de acceso 19 de noviembre de 2015) y obtener los genes contenidos en el segmento estudio. La lista de genes se constituyó en una planilla de Excel a la que se denominó Gen02.

Dos archivos en formato FASTA, correspondientes a los resultados de RNA-seq de LA1589 utilizando tecnología Illumina (archivo D006) y seis líneas casi isogénicas (*NIL*, Near Isogenic Lines) de Rio Grande (archivo D012), fueron descargados de la página Tomato Functional Genomics Database (<http://ted.bti.cornell.edu/>, fecha de acceso 19 de noviembre de 2015).

El archivo D012 contiene el análisis del transcriptoma sobre ovarios en antesis de *NIL* de Rio Grande. Se presenta la lectura de 37.726 genes en tres *NIL* con alelos de Rio Grande en la región centromérica del cromosoma 8 y otras tres con alelos de LA1589 (Sun et al., 2015) que se diferencian en la longitud del fragmento introgresado. Cabe recordar que la región centromérica del cromosoma 8 contiene al *QTL fs8.1* que rige para índice de forma de fruto que permitió explicar el 30% de la variabilidad fenotípica para el carácter en una población

segregante derivada del cruzamiento entre Rio Grande de *S. lycopersicum* y LA1589 de *S. pimpinellifolium* (Green et al., 2016). El archivo D006 contiene el análisis del transcriptoma (37.728 genes) de 12 tejidos, incluidos flores en antesis, en cuatro réplicas de LA1589. Las lecturas de ambos archivos se encuentran expresadas en RPKM (lecturas por kilobase por millón de lecturas mapeadas), un método de cuantificación de expresión génica que permite la normalización de los datos en base a la longitud total de la lectura y el número de secuencias leídas.

A partir de estos archivos se confeccionaron tres planillas de forma manual: 1) denominado rgl.la, contiene las lecturas de LA1589 y las tres *NIL* con alelos cultivados en *fs8.1*; 2) denominado rgp.la, contiene las lecturas de LA1589 y las tres *NIL* con alelos silvestres en *fs8.1*; 3) denominado rgl.rgp, contiene las lecturas de las seis *NIL* en *fs8.1*; todas de flores en antesis. En la Figura 13 se muestra de forma gráfica la constitución genética en los cromosomas 2 y 8 de los materiales a comparar. En color rojo se señalan los segmentos cuyo genotipo corresponde a Rio Grande y en celeste aquellos que corresponden a LA1589.

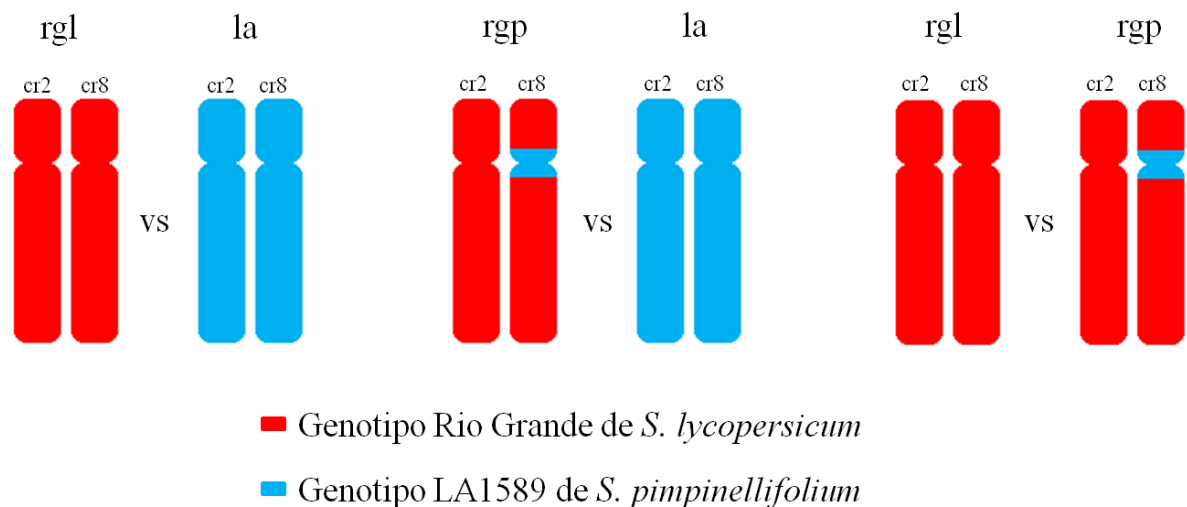


Figura 13. Representación esquemática de genotipos comparados mediante análisis de expresión diferencial.

cr: cromosoma; la: transcriptoma de LA1589 de *S. pimpinellifolium*; rgl: transcriptoma de línea casi isogénica a Rio Grande con alelos cultivados en *fs8.1*; rgp: transcriptoma de línea casi isogénica a Rio Grande con alelos silvestres en *fs8.1*.

Utilizando un algoritmo en R se realizó el análisis de expresión diferencial entre los diferentes genotipos (rgl vs la, rgp vs la y rgl vs rgp) haciendo uso del paquete DESeq y siguiendo la metodología descrita por Anders y Huber (2012). Este análisis inicia con un proceso de normalización estimando el tamaño efectivo de cada biblioteca. Así, por ejemplo, si las lecturas de los genes que no presentaron expresión diferencial en una muestra resultan el doble que las lecturas en la otra muestra, entonces el factor de tamaño de la primera será el doble que el de la segunda. De esta manera, cada columna (muestra) es dividida por su factor y los valores se referencian a una misma escala, haciéndolos comparables entre sí.

El programa DESeq permite comparar repeticiones de dos genotipos o tratamientos. En el caso de nuestras bases de datos, LA1589 corresponde a 4 lecturas del mismo genotipo, mientras las *NIL* de Rio Grande presentan seis genotipos diferentes de única lectura. Dado que tres *NIL* presentan alelos cultivados en *fs8.1* y otras tres alelos silvestres, fueron tomadas como réplicas. Este análisis fue realizado haciendo uso de información pública a fin de obtener una aproximación a la búsqueda de genes candidatos.

Como resultado, la primera comparación permitiría analizar diferencias de expresión en función de los alelos en *fs2.1* y del fondo genético. Estos resultados, comparados con el análisis de la segunda planilla, permitirían analizar si hay diferencias de expresión debidas no solo al fondo genético sino también al *QTL* mayor *fs8.1* que ha demostrado presentar interacción de tipo epistática con *fs2.1* (Green et al., 2016). Por último, la tercera comparación (en caso de encontrar diferencias de expresión) permitiría concluir que estas diferencias podrían deberse al efecto de *fs8.1* sobre *fs2.1*.

RESULTADOS

En el Anexo III se describe el algoritmo desarrollado en R para completar la búsqueda de potenciales genes candidatos.

La función BLAST realizada en el entorno de SGN, haciendo uso del archivo subseqch02, permitió identificar 53 genes codificados en la región de 706.783 pb conteniendo a *fs2.1*. En la Tabla 16 se detalla el código de identificación según SGN.

Tabla 16. Código de identificación de cada uno de los 53 genes codificados en la región que contiene a *fs2.1* según SOL Genomics Network.

Código de identificación de genes contenidos en <i>fs2.1</i>					
Solyc02g066980	Solyc02g094100	Solyc02g094280	Solyc02g094400	Solyc02g094540	Solyc02g094770
Solyc02g067100	Solyc02g094110	Solyc02g094290	Solyc02g094410	Solyc02g094590	Solyc02g094810
Solyc02g093970	Solyc02g094130	Solyc02g094300	Solyc02g094430	Solyc02g094650	Solyc02g094830
Solyc02g093980	Solyc02g094160	Solyc02g094310	Solyc02g094450	Solyc02g094660	
Solyc02g094000	Solyc02g094170	Solyc02g094330	Solyc02g094470	Solyc02g094680	
Solyc02g094010	Solyc02g094180	Solyc02g094340	Solyc02g094480	Solyc02g094690	
Solyc02g094030	Solyc02g094190	Solyc02g094360	Solyc02g094490	Solyc02g094700	
Solyc02g094050	Solyc02g094230	Solyc02g094370	Solyc02g094500	Solyc02g094720	
Solyc02g094060	Solyc02g094240	Solyc02g094380	Solyc02g094510	Solyc02g094730	
Solyc02g094080	Solyc02g094260	Solyc02g094390	Solyc02g094520	Solyc02g094750	

El análisis de expresión diferencial de los genes listados en la Tabla 16 arrojó como resultado que solo 10 de los 53 se expresan diferencialmente entre la *NIL* con alelos de Rio Grande, en la región centromérica del cromosoma 8 y LA1589 (*rgl.la*), y entre la *NIL* con alelos de LA1589 en la región centromérica del cromosoma 8 y LA1589 (*rgp.la*). Otros tres genes, Solyc02g094370, Solyc02g094380 y Solyc02g094830, presentaron diferencias en sus lecturas, pero el valor de las mismas resultó inferior a 2 RPKM en las *NIL* analizadas. Por este motivo, se considera que dichos genes no se estarían expresando y son eliminados como posibles candidatos.

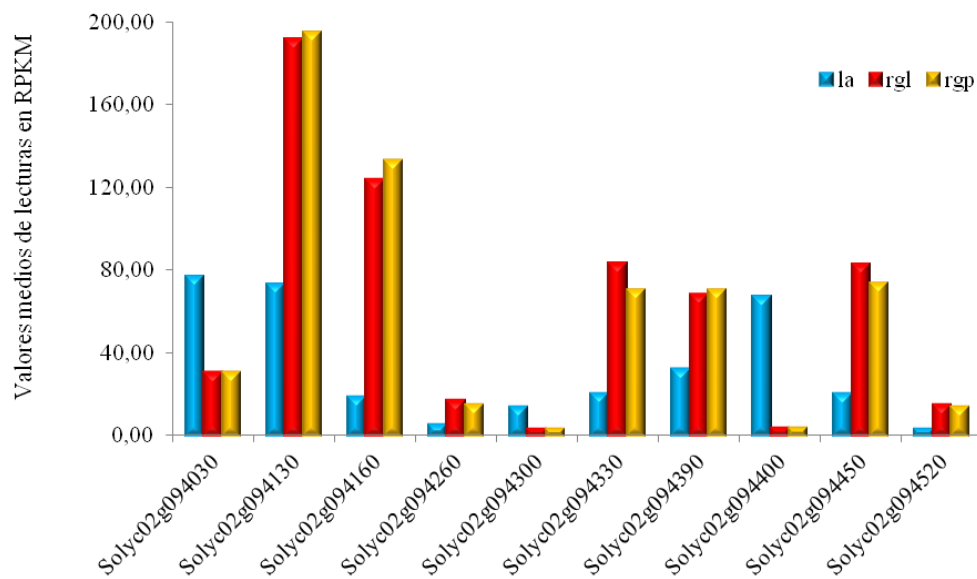
Los genes informados en la Tabla 17 se expresaron diferencialmente entre LA1589 y ambas *NIL*. Por otro lado, ninguno de los 53 genes evaluados presentó expresión diferencial cuando se realizó el análisis entre *NIL*.

Tabla 17. Código de identificación de los genes expresados diferencialmente, valores medios de lecturas normalizadas y probabilidad asociada del análisis DE-seq entre LA1589 y dos *NIL* de Rio Grande.

Código de identificación	rgl.la			rgp.la		
	Media la	Media rgl	Valor p	Media la	Media rgp	Valor p
Solyc02g094030	76,94	30,64	4,00E-04	76,94	30,85	0,001
Solyc02g094130	73,55	191,17	2,07E-05	73,55	194,68	1,50E-05
Solyc02g094160	19,11	123,99	3,89E-13	19,11	133,05	4,83E-14
Solyc02g094260	5,88	17,33	0,007	5,88	15,32	0,021
Solyc02g094300	14,10	3,41	0,002	14,10	3,33	0,001
Solyc02g094330	20,52	83,56	7,15E-08	20,52	70,52	2,94E-06
Solyc02g094390	32,69	68,70	0,003	32,69	70,76	0,002
Solyc02g094400	67,35	4,25	1,12E-15	67,35	4,09	3,26E-16
Solyc02g094450	20,69	82,71	1,07E-07	20,69	73,83	1,43E-06
Solyc02g094520	3,48	15,48	0,001	3,48	14,46	0,001

la: transcriptoma de LA1589 de *S. pimpinellifolium*; rgl: transcriptoma de línea casi isogénica a Rio Grande con alelos cultivados en *fs8.1*; rgp: transcriptoma de línea casi isogénica a Rio Grande con alelos silvestres en *fs8.1*.

En el Gráfico 5 se observan los valores medios de las lecturas normalizadas informados en la Tabla 17.



Genes con expresión diferencial en la base del cromosoma 2

Gráfico 5. Valores medios de lecturas en RPKM de los genes que presentaron expresión diferencial entre LA1589 y las *NIL*.

la: transcriptoma de LA1589; RPKM (lecturas por kilobase por millón de lecturas mapeadas); rgl: transcriptoma de línea casi isogénica a Rio Grande con alelos cultivados en *fs8.1*; rgp: transcriptoma de línea casi isogénica a Rio Grande con alelos silvestres en *fs8.1*.

En la Tabla 18 se muestra la función, según SGN, de cada uno de los 10 genes diferencialmente expresados en la base del cromosoma 2 de tomate.

Tabla 18. Código de identificación y proteína según SOL Genomics Network de genes diferencialmente expresados en la base del cromosoma 2 de tomate entre líneas casi isogénicas de Rio Grande y LA1589.

Código de identificación	Proteína
Solyc02g094030	Proteína desconocida
Solyc02g094130	ADN genómico en cromosoma 5
Solyc02g094160	Ribonucleótido reductasa
Solyc02g094260	Proteína SMG9
Solyc02g094300	Uridiltransferasa PII
Solyc02g094330	Proteínas del polen
Solyc02g094390	Palmitoiltransferasa
Solyc02g094400	Glicerofosfodiester fosfodiesterasa
Solyc02g094450	Proteína desconocida
Solyc02g094520	Histona-lysine N-metiltransferasa

Conclusión del Capítulo IV

Solo 10 de los 53 genes codificados por el segmento de 0,71 Mb conteniendo a *fs2.1* se expresan diferencialmente en flores en antesis entre Rio Grande y LA1589.

DISCUSIÓN

Evaluación fenotípica de progenitores

El genotipo cultivado Rio Grande presentó frutos de mayor tamaño que el genotipo silvestre LA1589, es decir mayores valores medios para el carácter *área*. Además, presentó mayores valores medios para *fs I*, *fcp* y *ft*, un resultado esperado en virtud de la morfología de fruto de ambos genotipos (Tabla 3). Los frutos de Rio Grande se clasifican visualmente como cuadrados (“*block-shaped*”; Mazzucato et al., 2008) y según estudios genéticos y fenotípicos, utilizando el software *Tomato Analyzer*, se clasifican dentro del 27% de las accesiones con frutos rectangulares que no poseen los genes *SUN*, *OVATE*, *FAS* o *LC* (Rodríguez et al., 2011). Es por ello que Rio Grande presenta un índice de forma (altura/diámetro) mayor que uno y LA1589 un valor cercano a uno (dada su morfología cuasi esférica). El mayor valor para el carácter *fcp* (ancho proximal/ancho medio) en Rio Grande es el resultado de una menor diferencia, comparado con LA1589, entre el ancho proximal y medio en el genotipo cultivado de morfología rectangular. El valor de *ft* (ancho proximal/ancho distal) observado en Rio Grande se debe a que los frutos de este genotipo presentan un extremo distal de menor ancho respecto al proximal. No ocurre lo mismo con LA1589 que al presentar morfología redonda sus extremos proximal y distal son prácticamente iguales.

Los caracteres *fcd* y *adm* resultaron significativamente mayores para LA1589 respecto de Rio Grande. El resultado de *fcd* (ancho distal/ancho medio) se debe a que LA1589 presenta una menor diferencia entre el ancho distal y medio comparado con Rio Grande. En cuanto a *adm* (ángulo del extremo distal) es el resultado de la diferencia a nivel morfológico del extremo basal de ambos frutos. Este atributo es mayor en LA1589 por su forma redonda y menor en Rio Grande por su extremo distal más pronunciado.

Por otro lado, *apm* (ángulo del extremo proximal) presenta un valor muy similar al de *adm* en LA1589 como resultado de su morfología esférica. Para este atributo, no se observaron diferencias significativas entre progenitores.

Otro atributo para el cuál no se observaron diferencias y resultó con un valor medio de $0,00 \pm 0,00$ fue para *apd* (área del pico respecto del área total) ya que ninguno de estos frutos presenta un pico en el extremo basal.

Como era de esperarse, Rio Grande presentó mayores valores de *ap* (área de pericarpio) y *ep* (espesor de pericarpio) respecto de LA1589. Este resultado se sustenta en las diferencias de tamaño y morfología entre ambos genotipos.

En cuanto a caracteres de calidad, Rio Grande presentó mayores valores de *L* (índice de reflectancia) y menores para *ab* (cociente a/b de color) respecto de LA1589. El carácter *pH* no presentó diferencias significativas entre genotipos. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Green et al. (2016) utilizando una generación F₃-BC₁-S₁ derivada del mismo cruzamiento interespecífico. Además, la ausencia de diferencias significativas para pH entre genotipos silvestres y cultivados concuerda con Pereira da Costa et al. (2013) quien no observó diferencias entre Caimanta de *S. lycopersicum* y LA722 de *S. pimpinellifolium*.

Desarrollo de marcadores moleculares

El tamaño del intervalo en el que un *QTL* se puede mapear está determinado por el número de marcadores moleculares utilizados y la distancia entre ellos (Paterson, DeVerna, Lanini, & Tanksley, 1989). El aumento de la densidad de marcadores en un segmento cromosómico de interés es conceptualmente el factor limitante más fácil a resolver en un estudio de mapeo. Anteriormente, el desarrollo de marcadores dirigidos a regiones específicas era una tarea laboriosa y que requería mucho tiempo. Afortunadamente, la reciente secuenciación del genoma de tomate (The Tomato Genome Consortium, 2012) permitió la identificación de más de 9000 polimorfismos de tipo *InDel* entre el genotipo cultivado Heinz 1706 de *S. lycopersicum* y LA1589 de *S. pimpinellifolium*. La disponibilidad de información sobre estas secuencias (posición física dentro del mapa) ha permitido el desarrollo de cebadores útiles para la detección de polimorfismos y el mapeo fino de *QTL* de interés agronómico.

Según Boopathi (2013), la técnica de mapeo fino se realiza utilizando marcadores moleculares en la región estudio a una distancia de entre 0,50 y 20 cM. En este trabajo de tesis se han utilizado 17 marcadores moleculares (ANEXO I) distribuidos en un segmento de 96,50 cM (9,64 Mb) a una distancia promedio de 5,67 cM. Cabe destacar que ocho de los últimos marcadores moleculares (desde IND2-4824 hasta IND2-4975) se localizan en una región de 23,90 cM separados por segmentos promedio de 2,98 cM. La distancia total del segmento estudio (96,50 cM) resulta mayor que la encontrada en la bibliografía. Por ejemplo, en el mapa genético desarrollado por Bernacchi et al. (1998) el cromosoma 2 presentó una longitud total de 129,50 cM, utilizando una población BC₁ derivada del cruzamiento entre E6203 de *S.*

lycopersicum y LA1777 de *S. habrochaites*. Por otro lado, la distancia genética del segmento estudio en este trabajo de tesis equivale a aproximadamente 50,00 cM en una población F₂ entre LA925 de *S. lycopersicum* y LA716 de *S. pennellii* (fuente SGN, mapa Tomato-EXPEN). Estas diferencias pueden deberse a la elevada frecuencia de recombinación presentada por el segmento distal del cromosoma 2 (de 96,50 cM) y a las características genéticas propias de la población F₂ entre Rio Grande y LA1589 utilizada para la realización del mapa en este trabajo.

El desarrollo de cebadores permitió identificar con mayor precisión los sitios de recombinación en los individuos utilizados así como en su descendencia. A su vez, los últimos ocho marcadores moleculares (desde IND2-4824 hasta IND2-4975) permitieron saturar la región conteniendo al *QTL fs2.1* y localizarlo en un segmento de 11,00 cM (0,54 Mb).

Detección de QTL menores en el segmento estudio

Gracias al aporte de otros autores, se sabe que en la porción distal del cromosoma 2 se localizan *QTL* involucrados en caracteres de calidad como firmeza, pH, contenido de sólidos solubles (Bernacchi et al., 1998), índices L, a y b de color, acidez titulable, contenido de azúcares, caroteno, compuestos volátiles (Saliba-Colombani, Causse, Langlois, Philouze, & Buret, 2001) y espesor de pericarpio (Grandillo y Tanksley, 1996) entre otros. En este trabajo, a excepción de *fs I*, los restantes caracteres analizados presentaron asociaciones erráticas a través de las diferentes familias imposibilitando su localización precisa en la base del cromosoma 2. Por este motivo, la aplicación de la técnica de mapeo por intervalos simple surge ante la necesidad de detectar *QTL* menores que no pudieron ser analizados de acuerdo a una segregación mendeliana.

Se generó una nueva base de datos contemplando como población a todas las plantas analizadas durante la primer prueba de progenie independientemente de la familia o genotipo (L, H o P). La matriz de 128x11 (plantas x marcadores moleculares) se utilizó para generar los perfiles de LOD, en función de la posición de los marcadores moleculares detallados en el cromosoma 2. Como resultado se detectaron *QTL* para seis (*área*, *fcp*, *fcd*, *ft*, *apd* y *ab*) de los 13 caracteres analizados. Las variables *área* y *fcd* se encontraron asociadas al marcador TG337, *fcp* y *ft* al IND2-442433, *ab* al IND2-4465 y *apd* a la región entre IND2-4346 y TG337 (Gráfico 1 y Gráfico 2).

Green et al. (2016), utilizando el método de un solo punto y una generación F_3 - BC_1 - S_1 lograron detectar *QTL* para los caracteres *área*, *fcp*, *fcd*, *ft*, *pH*, *ab* y *L* asociados al marcador EP170-EP171 y los caracteres *apm*, *adm* y *apd* estuvieron asociados al marcador TG337. Solo la posición del *QTL* que rige para *apd* es detectada en las dos generaciones por ambos métodos. Los *QTL* correspondientes a las variables *área*, *fcp*, *fcd*, *ft* y *ab* se detectaron en la región media del segmento estudio; mientras Green et al. (2016) los localizaron en la porción distal señalada por EP170-EP171. Finalmente, no se registraron *QTL* para *apm*, *adm*, *pH* y *L* en este trabajo. Estas diferencias podrían ser el resultado de: a) la cantidad de marcadores moleculares utilizados, tres y 17 respectivamente; b) la naturaleza diferencial de ambos métodos, el mapeo por intervalos provee información más precisa en cuanto a la localización de *QTL* en relación al método de un solo punto (Haley y Knott, 1992); c) la estructura genética de las poblaciones analizadas, la población utilizada en este trabajo para realizar el análisis de detección de *QTL* se encuentra sesgada por intervención de la selección propia de la prueba de progenie.

Mapeo fino y caracterización del QTL fs2.1

En el año 2008, Gonzalo y van der Knaap localizaron al *QTL fs2.1* ligado al marcador molecular TG645, utilizando una población F_2 derivada del mismo cruzamiento interespecífico. El marcador TG645 se encuentra entre Lewus (46,52 Mb) y TG337 (49,56 Mb) utilizados en este trabajo de tesis.

Green et al. (2016), utilizando una población F_3 - BC_1 - S_1 entre Rio Grande y LA1589 y el método de detección de un solo punto, informaron que el *QTL fs2.1* presentó mayor asociación (valor de R^2) al marcador TG337. En virtud de estos resultados, hasta el momento solo se había estimado la localización aproximada de dicho *QTL*, dado el bajo número de marcadores moleculares utilizados.

Uno de los objetivos específicos de este trabajo fue el mapeo fino del *QTL fs2.1*, siendo necesario entonces el desarrollo de marcadores moleculares a fin de saturar la región estudio. Este proceso permitió, no solo la detección precisa del *QTL* sino también una mejor caracterización genotípica de plantas segregantes en esta región de elevada frecuencia de recombinación.

La adecuada selección de recombinantes y posterior evaluación de progenie permitieron reducir el segmento estudio de 9,64 Mb (96,50 cM) a 0,54 Mb (11,00 cM) entre los

marcadores IND2-5463 e IND2-4975 en la base del cromosoma 2. Durante el primer ciclo de mapeo, solo las familias 1 y 4 resultaron con diferencias significativas entre grupos homocigotas ($p < 0,05$), derivando este resultado en la presencia del *QTL fs2.1* en el segmento segregante compartido (de 4,48 Mb y 42,9 cM; Tabla 4). En el segundo ciclo, solo las familias 7 y 8 resultaron con diferencias significativas entre grupos homocigotas, nuevamente acotando la presencia del *QTL* al segmento compartido de 0,54 Mb (Tabla 7 y Tabla 8). Las diferencias en los valores medios por grupo para el carácter *fs I* entre estas cuatro familias, sin considerar el efecto del año de evaluación, podría ser explicado por el genotipo en el marcador TG45 del cromosoma 8, dado que el *QTL fs8.1* presenta efecto epistático con *fs2.1*, generando un aumento del valor medio del carácter *fs I* cuando se presentan los alelos cultivados en ambos *QTL* (Green et al., 2016). Por ejemplo, en la familia 7 el valor para el carácter *fs I* fue de $1,31 \pm 0,04$ para el genotipo cultivado y de $1,12 \pm 0,07$ para el silvestre. En la familia 8 el valor para el carácter fue de $1,10 \pm 0,02$ para el genotipo cultivado y de $1,04 \pm 0,01$ para el silvestre. La familia 7 presentó valores medios mayores que la familia 8, independientemente del genotipo en el segmento segregante del cromosoma 2 (L ó P). Esto último puede deberse a que la familia 7 presenta alelos cultivados en estado homocigota en el marcador TG45 del cromosoma 8 (*QTL fs8.1*), conduciendo a un aumento generalizado en el valor medio del carácter, independientemente del genotipo en *fs2.1*. Por otro lado, el fondo genético de cada individuo podría estar afectando a los valores medios observados para el carácter, dado que si bien se trata de retrocruzas obtenidas por selección asistida por marcadores moleculares aún quedarían numerosos segmentos segregantes. En un estudio realizado por Gonzalo y van der Knaap (2008), *fs8.1* y *fs2.1* explicaron el 29% y 19% respectivamente de la variabilidad fenotípica para el índice de la forma del fruto, en una generación F_2 derivada del cruzamiento entre el cultivar Rio Grande de *S. lycopersicon* y la línea LA1589 de *S. pimpinellifolium*. Además, según Grandillo y Tanksley (1996), ambos *QTLs* lograron explicar el 27,4% (*fs8.1*) y 5,7% (*fs2.1*) de la variabilidad fenotípica observada para el carácter, en una población de retrocruza derivada del cruzamiento entre el cultivar M82-1-7 de *S. lycopersicum* y LA1589. Finalmente, en un trabajo reciente se informó que el 61,55% de la variabilidad fenotípica y 84,31% de la variabilidad genética para el carácter *fs I* pudo ser explicada por estos dos *QTL*, en una generación F_3 - BC_1 - S_1 derivada del cruzamiento entre Rio Grande y LA1589 (Green et al., 2016). Es decir, un porcentaje menor de la

variabilidad fenotípica observada sería explicado por regiones genómicas no detectadas en estos estudios citados.

Estudio de fs2.1 durante el desarrollo floral

Diversos estudios sugieren que *SUN*, *OVATE* y el gen o genes subyacentes a *fs8.1* contribuyen al patrón de elongación en la dirección longitudinal del carpelo, durante el desarrollo floral desde antes de antesis (Liu et al., 2002; Xiao et al., 2008; Wu et al., 2015). Estos antecedentes harían suponer un patrón similar de comportamiento para el *QTL* mayor *fs2.1* localizado en la base del cromosoma 2 de tomate y que controla al carácter *fs 1*. La evaluación de flores provenientes de familias segregantes en la base del cromosoma 2 de tomate, en los estadios 0, 3 y 5 después de antesis, ha permitido establecer que dicha suposición resulta correcta.

Del primer ensayo se supo que la familia A no presentó diferencias entre grupos homocigotas para *alt*, *diam* y *dfs* en los estadios 0, 3 y 5. Es decir, que la región segregante desde IND2-4465 hasta EP170-EP171 no estaría involucrada en el control de estos caracteres. La familia B presentó diferencias significativas entre grupos homocigotas para *alt* y *dfs* a lo largo de todos los estadios. En conclusión, el segmento segregante comprendido por los marcadores EP170-EP171 e IND2-4975 afecta a ambos caracteres desde antesis.

Durante el ensayo 2, a pesar del elevado número de datos se observó una tasa de crecimiento generalizada atípicamente lenta respecto a otros años. El efecto año se vio reflejado en los resultados obtenidos para este análisis. En el caso de los progenitores, se observaron diferencias para las variables *alt* y *diam*, pero no para *dfs*. Durante el ensayo 1, la variable *alt* se incrementó un 37% en Rio Grande entre los días 0 y 3, y un 52% entre los días 3 y 5 después de antesis. En el caso de LA1589, el incremento fue del 27% y 61% para la misma variable y los días 0 a 3 y 3 a 5 respectivamente. Porcentajes similares se obtuvieron para la variable *diam* en ambos genotipos. Durante el ensayo 2, la variable *alt* en Rio Grande se incrementó solo un 6% entre los días 0 y 3 y un 12% entre los días 3 y 5 después de antesis. En el caso de LA1589, el incremento fue del 18% para la misma variable en ambos periodos. Este resultado refleja la baja tasa de crecimiento experimentada por las plantas evaluadas durante el ensayo 2. El crecimiento diferencial entre ambos años se observa también en el Gráfico 4 en las pendientes de evolución de las variables altura y diámetro de fruto en desarrollo, en función de estadios para los genotipos Rio Grande y LA1589. Un nuevo ensayo

sería adecuado para validar los resultados obtenidos hasta el momento, utilizando nuevamente familias recombinantes en el segmento estudio y las líneas puras Rio Grande y LA1589 como controles. Según Wu et al. (2015) *OVATE* y *fs8.1* actúan principalmente durante el desarrollo floral, mientras que *SUN* ejerce su efecto principal durante el período de división celular intensivo luego de la fertilización. Dado que los resultados de este trabajo demuestran que el efecto de *fs2.1* es significativo, al menos desde antesis, un análisis de desarrollo floral sería adecuado para establecer si el *QTL* actúa previo a la fertilización.

Genes candidatos de fs2.1

Previo a la secuenciación del genoma completo, ya existía una enorme variedad de datos moleculares de distintos genotipos de tomate, distribuidos en bases públicas como SOL Genomics Network. Gracias al aporte de la comunidad científica que hace pública la información de sus ensayos es que logramos realizar el análisis de expresión diferencial detallado en el Capítulo IV.

En primer lugar, se determinó el número de genes contenidos en el segmento de 0,71 Mb, mediante alineamiento contra una base de datos de secuencias de ADN codificantes. Un total de 53 genes fueron detectados mediante BLAST y solo 10 de ellos se encontraron diferencialmente expresados entre LA1589 y ambas *NIL* en Rio Grande. Siete de esos diez se expresan entre dos y siete veces más en Rio Grande que en LA1589. Los restantes tres, se expresan de dos a 16 veces más en LA1589 que en Rio Grande.

No se observaron diferencias de expresión entre *NIL* (*rgl.rgp*). Además, las comparaciones *rgl.la* y *rgp.la* presentaron resultados muy similares. Cabe recordar que las *NIL* difieren solo en los alelos presentes en *fs8.1* (L o P), un *QTL* mayor que controla al carácter *fs I* y presenta efecto epistático con *fs2.1* (Green et al., 2016). Estos resultados permitirían sugerir que las diferencias alélicas en *fs8.1* no modifican el grado de expresión de genes en *fs2.1*, al menos de forma estadísticamente significativa.

De los genes diferencialmente expresados, Solyc02g094160 codifica para una ribonucleótido reductasa que cataliza la síntesis reductora de desoxirribonucleótidos a partir de los ribonucleótidos correspondientes ofreciendo precursores necesarios para la síntesis de ADN (base de datos InterPro, <http://www.ebi.ac.uk/interpro/>). Solyc02g094260 codifica para una proteína identificada en ratones involucrada en la eliminación de ARN mensajero que contiene codones de stop prematuros (base de datos UniProt, <http://www.uniprot.org/>).

Solyc02g094300 codifica para una Uridiltransferasa PII con dominio de unión a aminoácidos (ACT), relacionadas al metabolismo de aminoácidos y de actividad regulada por la concentración de los mismos (InterPro). Solyc02g094330 codifica para proteínas de polen con dominio Ole e 1 inicialmente identificadas como alérgenos aunque estudios recientes han sugerido que también funcionan como reguladores del desarrollo en muchos otros tejidos de la planta. En *Arabidopsis thaliana*, la caracterización de proteínas de la familia de extensinas (con dominio Ole e 1) reveló patrones de transcripción espaciales lo que sugiere que pueden estar implicados en varios eventos y etapas del desarrollo (Hu et al., 2014). Solyc02g094400 codifica para una enzima glicerofosfodiéster fosfodiesterasa involucrada en el metabolismo del glicerol que ha sido caracterizada en ratones y humanos (Lang et al., 2008). Solyc02g094520 codifica para una histona-lisina N-metiltransferasa que contiene dominio interpro SRA-YDG que se encuentra principalmente en plantas, animales y bacterias. Este gen sería un potencial candidato dado que en animales se asocia a la proteína Np95 que es un determinante importante en la progresión del ciclo celular. Np95 es una ubiquitina ligasa asociada a la cromatina, de unión directa a histonas (InterPro).

Además, entre las proteínas codificadas por los genes diferencialmente expresados se logró identificar una palmitoiltransferasa (Solyc02g094390). Este tipo de proteínas presenta como función conocida la S-acilación que implica la adición reversible de un ácido graso, con frecuencia palmitato (C16) o estearato de (C18), a través de un enlace tioéster al grupo tiol de un residuo de cisteína específico en una proteína diana incrementando su afinidad con la membrana celular. Las interacciones membrana-proteína son importantes para la formación de complejos de señalización y propagación de la señal, el secuestro, segregación y estabilidad de la proteína y el mantenimiento de la polaridad dentro de la célula. Intervienen en la regulación de funciones celulares, incluyendo respuesta a estrés, resistencia a enfermedades, señalización hormonal, polarización y expansión celular y organización del citoesqueleto (Hemsley y Grierson, 2008). Recientemente se ha demostrado la S-acilación de subunidades de α -tubulina en *Arabidopsis thaliana*. El papel exacto de este proceso se desconoce, aunque se postula podría actuar uniendo los microtúbulos a las membranas contribuyendo en mantener la alineación de los mismos. Además, la S-acilación de microtúbulos podría enlazar y mantener la posición de los compartimentos de membrana dentro de la célula, hecho importante para el crecimiento direccional y la organización celular (Hemsley y Grierson, 2008).

También, dentro del grupo de proteínas que sufre S-acilación encontramos a la Calcineurina B (CBL) asociada a la decodificación de señales de calcio mediante la interacción con CBL-kinasas (CIPKs). Batistič et al. (2012) ha demostrado que en *Arabidopsis thaliana*, la S-acilación de la proteína CBL2 es esencial para ser dirigida de manera eficiente a la membrana vacuolar y así asegurar una adecuada respuesta a ácido absísico (ABA). Es probable, que este tipo de proteínas, codificada por el gen Solyc02g094390, esté relacionada de forma directa o indirecta al proceso de división o expansión celular generando el fenotipo alargado observado en presencia de alelos cultivados en *fs2.1*.

Por ejemplo, se sabe que *SUN* codifica para una proteína con dominio de unión de calmodulina también asociada a la señalización de calcio (Clevenger et al., 2015). Su sobreexpresión conduce a frutos partenocárpicos de morfología alargada determinada por el aumento del número de células en la dirección longitudinal y su disminución en la dirección mediolateral (Wu, Xiao, Cabrera, Meulia, & Knaap, 2011). El fenotipo observado coincide con el obtenido por aplicación exógena de la hormona vegetal auxina. Si bien ha sido demostrado que *SUN* no afecta a la expresión de genes relacionados con la biosíntesis y señalización de auxinas (Xiao et al., 2009) es probable que si se encuentre relacionado a una alteración de su transporte (Wu et al., 2011). Hibridaciones *in situ* utilizando *NIL* mostraron que *SUN* se expresa en ovario y frutos jóvenes, en particular en tejidos vasculares y placenta además en óvulos y semillas en desarrollo (Wu et al., 2011).

A modo de resumen, la región conteniendo a *fs2.1* se logró reducir en un 94,4 % utilizando dos ciclos de evaluación de progenie de plantas recombinantes y 17 marcadores moleculares en la base del cromosoma 2. El efecto de *fs2.1* resulta estadísticamente significativo desde el momento de antesis evaluando individuos segregantes en la región que contiene a dicho *QTL*. Diez de los 53 genes codificados en el segmento estudio se expresan diferencialmente entre Rio Grande y LA1589. Uno de ellos, Solyc02g094390, es probablemente el más prometedor dada su asociación a la señalización de calcio y proteínas tubulinas durante la división celular.

CONCLUSIÓN

QTL menores de morfología y calidad de fruto se localizan en la base del cromosoma 2 (segmento de 9,64 Mb). Además, se demostró que el *QTL* mayor *fs2.1* ejerce su efecto sobre el carácter *fs I* desde antes de antesis, se localiza en un segmento de 0,71 Mb en la base del cromosoma 2 y que contiene genes diferencialmente expresados.

ANEXO I

Desarrollo de marcadores moleculares

Para el desarrollo de marcadores moleculares se utilizó la lista de inserciones y deleciones predichas entre Heinz 1706 de *S. lycopersicum* y LA1589 de *S. pimpinellifolium* disponible en la página web de Solanáceas (<https://solgenomics.net/>). Estas secuencias permitieron el diseño de cebadores directos y reversos con el programa libre Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>). Se buscó que los nuevos marcadores moleculares se encontraran localizados en la base del cromosoma 2 (región estudio de 9,64 Mb y 96,50 cM) además de presentar un polimorfismo apreciable en geles de agarosa al 3% m/v (diferencia de al menos 20 pb entre alelos).

En la Tabla AI 1 se detallan el tipo, nombre, secuencia (5'→3'), temperatura de hibridación de cada par de cebadores (Ta, en grados centígrados), posición física (en Mb, según versión SL2.50), tamaño de los alelos cultivados y silvestres (en pb) de los marcadores moleculares utilizados.

Tabla AI 1. Descripción de los marcadores moleculares utilizados para localizar con mayor precisión los sitios de recombinación en el cromosoma 2.

Tipo	Nombre	Secuencia (5'→3')	Ta (°C)	Posición física (Mb)	Alelo L (pb)	Alelo P (pb)
<i>InDel</i>	IND2-4010*	CD-GTGGACCAGTTCCTTCAAA CR-CAGGCAAGCTTCATTCATTTT	51,70	45,53	155	167
<i>InDel</i>	Lewus	CD-TGGAACTTTGGCTATGGAGAA CR-TGGTGAAGAAAATGTTGTTTTGAT	58,20	46,32	210	222
<i>InDel</i>	IND2-4346*	CD-CCACGACTTACAAATGTCTGGA CR-ATGCACTCCTGTCCTCAACC	55,80	48,88	146	166
<i>CAPS</i>	TG337 ⁺	CD-GCAAAGCATCATCACCAATG CR-ATTATGGGCCACACGCAATA	56,10	49,56	1500	1000
<i>InDel</i>	IND2-442433*	CD-CCCTTCTCAAACACTGAGCTG CR-GCGAATGGTGTGTGATAAA	53,40	49,67	107	124
<i>InDel</i>	IND2-4465*	CD-TGGTGAATTGTAATAACTTGTCTTG CR-CAGCTTGGCTAAGCATACTTTTT	53,00	50,08	142	163
<i>InDel</i>	IND2-4526*	CD-GACCTTCCTTGCACAAAAGC CR-TGATTACGCGGAAAAATTACG	51,70	50,69	79	98
<i>InDel</i>	IND2-4569*	CD-CCTCATTTTTTCTTCCCAGCA CR-GTGGAAATTGTGGGACGTCTA	53,40	51,12	129	150
<i>InDel</i>	EP170-EP171	CD-CACATCTTACGATTATTGGGGTAA CR-TGTGCACACATCTTAACAAATCA	57,90	52,25	169	179
<i>InDel</i>	IND2-4824*	CD-CAGAAATATCGTAGAAGGCTGGA CR-TGGCTATGTGGTTCAGTACTCC	56,00	53,67	131	151
<i>InDel</i>	IND2-5375*	CD-TCCTTCCGATTATGGGATACA CR-TTGAGACCAACCCCATTTGT	53,40	53,76	245	269
<i>InDel</i>	IND2-5408*	CD-ACACCGAATCGAAGAACCAA CR-TTGTCTAAGGTGGTACTGGACA	53,40	54,08	201	232
<i>InDel</i>	IND2-5429*	CD-CGGTAAGAGCGTGTGTAGCA CR-GGATCCTCTTTCCAACACGA	55,40	54,29	245	289
<i>InDel</i>	IND2-5436*	CD-TTCCACCAGAGAATGTGCAA CR-TTTTGTTCCTGAGGTGT	53,40	54,37	212	242
<i>InDel</i>	IND2-5463*	CD-AAGTTAATTGGATGAAAAGAAAGAAA CR-TTTTAGGCAAAAAGGAGAAAGGA	50,10	54,63	140	160
<i>InDel</i>	IND2-5485*	CD-CGGGAACAAAATAAGAATGACA CR-TGGAACTCATCATCGACCAA	52,40	54,85	258	295
<i>InDel</i>	IND2-4975*	CD-TGGAAAGCTTTTGATAGAGAAGAGA CR-TGGCAACACCCATTTACAAG	53,40	55,17	157	177

*Marcadores moleculares desarrollados. ⁺ El marcador TG337 utiliza la enzima HindIII y buffer R (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). *InDel*: Inserción/Delección; *CAPS*: polimorfismo del corte de la secuencia amplificada; CD: Cebador Directo; CR: Cebador Reverso; Ta: Temperatura de hibridación (temperatura de melting menos 5°C); L: Rio Grande; P: LA1589; Mb: Mega bases según versión del mapa SL2.50; pb: pares de bases.

Reacción en cadena de la polimerasa

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR de sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*) se llevó a cabo utilizando los reactivos detallados en concentración y cantidad en la Tabla AI 2. Por tubo o reacción de amplificación fueron utilizados 1 μ l de ADN de concentración 7-70 ng/ μ l y 19 μ l de mezcla de PCR, llegando a un volumen final de reacción de 20 μ l.

Tabla AI 2. Componentes y concentración por tubo de los reactivos en la mezcla de PCR.

Componentes	Volumen (μ l)	Concentración Final
Buffer de Reacción 10X	2,0	1x (50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl pH 8.3)
dNTPs 2,5 mM	0,8	0,1 mM
MgCl ₂ 40 mM	1,0	2,0 mM
Cebador Directo 10 μ M	0,2	0,1 mM
Cebador Reverso 10 μ M	0,2	0,12 mM
Taq 5 U/ μ l	0,2	1,0 Unidad
H ₂ O	15,6	

Los termocicladores utilizados corresponden a la marca BIOER (China) modelos Life Express y GenePro con capacidad para 96 pocillos. El programa utilizado para llevar a cabo las amplificaciones se detalla en la Tabla AI 3.

Tabla AI 3. Programa utilizado para la amplificación.

Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Repeticiones
94	05:00	1
94	00:30	} 32
*Ta	00:30	
72	01:00	
72	05:00	1
4	15:00	1

*Ta: temperatura de hibridación de cada par de cebadores.

Caracterización molecular

Los productos de amplificación fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa al 3% m/v preparados a partir de la droga sólida (Biodynamics S.R.L; Argentina) y solución reguladora de Tris-Borato-EDTA en una concentración 0,5x (ver ANEXO II). Se utilizó una cuba de electroforesis Thermo Scientific OwlTM A2 (Thermo Fisher Scientific; Estados Unidos) y una fuente de poder PowerPac 3000 (BIO-RAD; Estados Unidos). El tiempo de electroforesis fue de una hora a 120 V constantes.

La tinción se realizó incorporando SYBR® Safe (Invitrogen Thermo Fisher Scientific; Estados Unidos) a la preparación del gel en una proporción 1/10.000. La visualización se realizó utilizando un transiluminador Safe ImagerTM 2.0 (Invitrogen Thermo Fisher Scientific; Estados Unidos) de luz azul de 470 nm. Las imágenes de los geles fueron tomadas con una cámara Nikon D3100 (Japón).

Elaboración de un mapa de ligamiento en la base del cromosoma 2 de tomate

Para el análisis de distancias y construcción del mapa se utilizó el programa libre MapDisto (<http://mapdisto.free.fr/>). Como material vegetal se utilizó una planta F₁ derivada del cruzamiento entre Rio Grande y LA1589 y se dejó autofecundar para obtener semilla F₂. Se obtuvo una población F₂ de 198 plantas y se extrajo ADN según la metodología descrita en el ANEXO II. Todos los marcadores moleculares desarrollados a lo largo del trabajo experimental fueron utilizados en esta población a fin de determinar la distancia genética (en centimorgan, cM) entre ellos en la base del cromosoma 2 de tomate. En la Figura AI 1 se muestra la localización física y distancia genética de 17 marcadores moleculares distribuidos en una región de 9,64 Mb (96,50 cM) en la base del cromosoma 2 de tomate.

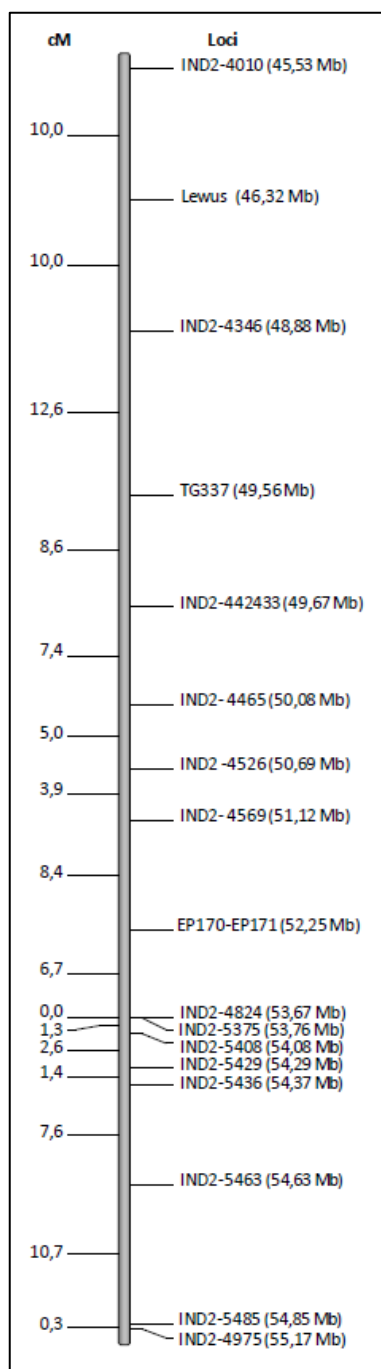


Figura AI 1. Mapa genético de la porción distal del cromosoma 2 de tomate utilizando una población F_2 derivada del cruzamiento entre Rio Grande y LA1589. A la izquierda se muestra la distancia genética (en centimorgan, cM) y a la derecha la denominación de los marcadores moleculares, entre paréntesis la posición física según mapa SL2.50.

ANEXO II

Extracción de ADN

El ADN genómico fue aislado de hojas jóvenes siguiendo las metodologías descritas por Bernatzky y Tanksley (1986) y Fulton et al. (1995).

Se etiquetaron 2 juegos de tubos de 1,5 ml. El primer juego de tubos se utilizó para la recolección y molienda del tejido vegetal. El segundo juego se destinó a la precipitación con isopropanol y almacenamiento de ADN.

Se colectaron de 4 a 8 hojas jóvenes en la primera serie de tubos. Para la preparación de la solución de extracción para 100 muestras se mezclaron 35 ml de “*Solución Reguladora de ADN*”, 0,2 g de Bisulfito de Sodio, 35 ml de “*Solución reguladora de Lisis Nuclear*” y 14 ml de sarkosyl 5% m/v. Se adicionó un primer volumen de 200 µl de solución de extracción a cada tubo y se procedió a la molienda utilizando un sistema de taladros. Se adicionaron otros 450 µl de solución de extracción con posterior mezcla por inversión. Las muestras se colocaron en estufa a 65 °C durante 60 minutos. Se adicionaron, bajo campana, 600 µl de una mezcla de cloroformo con alcohol isoamílico (24:1) y se realizó una agitación vigorosa. Se centrifugó a 10.000 rpm durante cinco minutos. Paralelamente, en otros tubos se colocaron 600 µl de isopropanol. El sobrenadante del tubo conteniendo cloroformo con alcohol isoamílico fue transferido al tubo con isopropanol, se mezcló suavemente por inversión hasta la aparición de un precipitado blanco. Se centrifugó a 10.000 rpm durante cinco minutos. Se eliminó el isopropanol y se adicionaron 600 µl de etanol al 70% para lavar el precipitado de ADN. Se centrifugó a 10.000 rpm durante un minuto. Se eliminó el etanol y se dejó secar durante toda la noche. Una vez finalizada la etapa de secado se adicionaron 100 µl de “*Solución de Rehidratación de ADN*” y se llevó a estufa a 65 °C durante una hora. Para facilitar la disolución del ADN se realizó una agitación breve y una centrifugación a 10.000 rpm durante cinco minutos. La muestra así procesada fue almacenada en freezer a -20 °C. La composición de las soluciones utilizadas se detalla a continuación.

Tris- Borato-EDTA (TBE 10X)

Droga	Cantidad
Tris Base	108,0 g
Ácido Bórico	55,0 g
EDTA 0,5M	40,0 mL
H ₂ O destilada	VN

*VN: volumen necesario hasta completar 1 L.

Solución Reguladora de ADN

Droga	Cantidad	Concentración en la solución
Sorbitol	63,76 g	0,35 M
Tris	12,11 g	0,10 M
EDTA	1,86 g	0,005M
H ₂ O destilada	VN	

*VN: volumen necesario hasta completar 1 L.

Ajustar el pH a 8,25 utilizando HCl (ácido clorhídrico). Almacenar la solución a 4°C. Agregar 5,5 g de Bisulfito de Sodio por litro de la solución reguladora de ADN antes de utilizar.

Solución Reguladora de Lisis Nuclear

Droga	Cantidad	Concentración en la solución
Tris	24,23 g	0,20 M
EDTA	18,61 g	0,05 M
NaCl	116,88 g	2,00 M
CTAB	20,00 g	20,00 g L-1
H ₂ O destilada	VN	

*VN: volumen necesario hasta completar 1 L.

Disolver el CTAB en agua durante toda la noche agregando calor de ser necesario. Ajustar el pH a 7,5 u 8 con HCl (ácido clorhídrico). Almacenar a temperatura ambiente.

Sarkosyl 50 g L⁻¹

Droga	Cantidad	Concentración en la solución
Sarkosyl	50,0 g	50,00 g L ⁻¹
H ₂ O calidad mili Q esterilizada	VN	

*VN: volumen necesario hasta completar 1 L.

Cloroformo:alcohol isoamílico

Droga	Cantidad
Cloroformo	1000 mL
Isoamyl alcohol	40 mL

Solución de Rehidratación de ADN

Droga	Cantidad	Concentración en la solución
Tris-Cl pH 8	1,21 g	0,01 M
EDTA	0,37 g	0,001 M
H ₂ O destilada	VN	

*VN: volumen necesario hasta completar 1 L.

ANEXO III

Desarrollo de un comando en lenguaje R de programación

Con el objetivo de agilizar el proceso de búsqueda de genes candidatos contenidos en la región de 706783 pb en la base del cromosoma 2 de tomate se desarrolló un comando en lenguaje R. El mismo se divide en dos objetivos principales, el primero consiste en extraer del cromosoma 2 de (55.340.444 pb) solo el segmento estudio que contiene a *fs2.1*. El segundo objetivo corresponde al análisis de expresión diferencial mediante el paquete estadístico DESeq y la generación de nuevos archivos conteniendo los resultados de cada comparación. A continuación se muestra dicho comando, con numeral se inician las frases aclaratorias y en azul se resalta el comando propiamente dicho.

#OBJETIVO1: Extracción del segmento comprendido desde IND2-5463 hasta el final del cromosoma a partir de la secuencia completa.

#Selección de la carpeta conteniendo los archivos necesarios. Set working directory -> Carpeta R-Workspace.

```
setwd("C:/Documents and Settings/Gisela/Escritorio/R-Workspace")
```

#Activación de paquetes necesarios

```
library(seqinr)
```

```
library(Biostrings)
```

#Lectura del documento que contiene la secuencia del cromosoma 2 completa, se la denomina ch02.

```
ch02<-readDNASTringSet("SL2.50ch02.fa.txt", format= "fasta")
```

#Se verifica la naturaleza o tipo de clase de las variables contenidas en ch02.

```
class(ch02)
```

#Definición de la posición de la primera base de la secuencia del primer IND2-5463 dentro de la secuencia completa del cromosoma 2.

```
START<-regexpr("AAGTTAATTGGATGAAAAGAAAGAAA",ch02)
```

#Definición de la variable START como un entero.

```
START<-as.integer(START)
```

#Solicitud de información de la variable.

```
START
```

#Solicitud de información sobre el largo de la secuencia completa del cromosoma 2.
Definición de la variable como END.

```
END<-width(ch02)
```

Definición de la variable END como un entero.

```
END<-as.integer(END)
```

#Solicitud de información de la variable.

```
END
```

#Extracción del segmento desde START hasta END a partir de la secuencia completa del cromosoma 2. La nueva variable se denomina subseq02.

```
subseqch02<-subseq(ch02, start=START, end=END)
```

#Verificación de la extracción mediante pedido del largo de subseq02. La longitud de este debe ser menor a la del cromosoma 2 completo.

```
width(subseqch02)
```

#Creación de una archivo formato FASTA para subseq02 en la carpeta WORKSPACE.

```
writeXStringSet(subseqch02, file= "subseqch02.fa", format = "fasta")
```

#OBJETIVO2: Análisis de expresión diferencial entre una NIL de Rio Grande con alelos cultivados en *fs8.1* vs LA1589.

#Lectura del archivo conteniendo las lecturas de 37726 genes de rgl y la.

```
rgl.laTable <- read.table("rgl.la.csv", sep=";", header = TRUE, row.names = 1)
```

#Mostrar la primer parte de la tabla leída para verificar su correcta interpretación por parte del programa.

```
head(rgl.laTable)
```

#Se informa que las columnas diferencian muestras y en las filas están contenidos los resultados o lecturas.

```
rgl.laDesing<-data.frame(row.names =  
                        colnames(rgl.laTable),condition = c("la","la","la","la","rgl","rgl","rgl"))
```

#Este paso previo permite definir factores de tamaño correspondientes a cada librería (rgl y la).

```
condition<-factor(c("la","la","la","la","rgl","rgl","rgl"))
```

#Se solicita la carga del programa DESeq.

```
library("DESeq")
```

#Se estiman los factores de tamaño y se normalizan las lecturas. Se realiza el análisis de expresión diferencial sobre toda la biblioteca.

```
cds<-newCountDataSet(rgl.laTable, condition)
```

```
cds = estimateSizeFactors(cds)
```

```
sizeFactors(cds)
```

```
head(counts(cds,normalized=TRUE))
```

```
cds=estimateDispersions(cds)
```

```
res=nbinomTest(cds, "rgl", "la")
```

#Se solicita que del análisis de expresión completo se tomen solo los genes contenidos en el fragmento estudio entre IND2-5463 y el final del cromosoma. Los genes de interés (53 en total) se listan en el archivo Gen02.

```
Gen02<-read.csv("Gen02.csv",header = TRUE)
```

```
GENES<-Gen02 [1:53,1]
```

Creación de una archivo formato FASTA para los resultados del análisis de los 53 genes en la carpeta WORKSPACE.

```
NEWRGL<-res[res$id %in% GENES, ]
```

```
head(NEWRGL)
```

```
write.csv (NEWRGL, file= "newRGL.csv",quote = FALSE, row.names = FALSE)
```

El objetivo 2 se repite para las comparaciones rgp.la y rgl.rgp

TABLAS SUPLEMENTARIAS

Tabla S 1. Valor medio y error estándar de los caracteres de morfología y calidad de fruto medidos en ambos grupos homocigotas de la familia 1.

Familia	Categoría	Variable	L			P			Estadísticos <i>t</i> -Student	
			n	Media	± E.E.	n	Media	± E.E.	Valor <i>t</i>	Valor p
1	Morfología	<i>área</i>	5	10,97	± 0,67	3	8,57	± 1,23	1,89	0,107
		<i>fs I</i>	5	1,14	± 0,04	3	0,96	± 0,02	3,07	0,022
		<i>fcp</i>	5	0,72	± 0,02	3	0,72	± 0,01	-0,27	0,797
		<i>fcd</i>	5	0,54	± 0,03	3	0,60	± 0,01	-1,57	0,168
		<i>ft</i>	5	1,40	± 0,12	3	1,20	± 0,02	1,63	0,179
		<i>apm</i>	5	104,79	± 6,14	3	121,66	± 0,30	-2,74	0,052
		<i>adm</i>	5	97,51	± 2,04	3	107,62	± 1,44	-3,47	0,013
		<i>apd</i>	5	0,03	± 0,02	3	0,00	± 0,00	1,53	0,201
		<i>ap</i>	3	3,36	± 0,19	3	2,94	± 0,44	0,88	0,426
		<i>ep</i>	3	0,78	± 0,02	3	0,72	± 0,06	0,98	0,381
	Calidad	<i>pH</i>	5	4,32	± 0,09	3	4,19	± 0,04	1,04	0,337
		<i>L</i>	5	41,73	± 0,40	3	45,46	± 0,19	4,54	0,004
		<i>ab</i>	5	1,15	± 0,02	3	0,86	± 0,08	-6,70	0,001

n: número de plantas; EE: error estándar. L: genotipo homocigoto para los alelos de Rio Grande. P: genotipo homocigoto para los alelos de LA1589. *fs I*: índice de forma de fruto; *fcp*: forma cuadrangular proximal; *fcd*: forma cuadrangular distal; *ft*: forma triangular; *apm*: ángulo proximal macro; *adm*: ángulo distal macro; *apd*: área de la protuberancia distal; *ap*: área de pericarpio en cm²; *área*: en cm²; *ep*: espesor de pericarpio en cm; *L*: índice de reflectancia de color; *ab*: índice a/b de color.

Tabla S 2. Valor medio y error estándar de los caracteres de morfología y calidad de fruto medidos en ambos grupos homocigotas de la familia 2.

Familia	Categoría	Variable	L			P			Estadísticos <i>t</i> -Student	
			n	Media	± E.E.	n	Media	± E.E.	Valor <i>t</i>	Valor <i>p</i>
2	Morfología	<i>área</i>	3	7,59	± 0,43					
		<i>fs I</i>	3	1,20	± 0,03					
		<i>fcp</i>	3	0,71	± 0,02					
		<i>fcd</i>	3	0,51	± 0,05					
		<i>ft</i>	3	1,47	± 0,17					
		<i>apm</i>	3	101,58	± 4,62					
		<i>adm</i>	3	94,23	± 1,41					
		<i>apd</i>	3	0,03	± 0,01					
		<i>ap</i>	3	1,72	± 0,85					
		<i>ep</i>	3	0,52	± 0,13					
	Calidad	<i>pH</i>	2	4,46	± 0,11					
		<i>L</i>	2	41,03	± 0,60					
		<i>ab</i>	2	1,19	± 0,04					

n: número de plantas; EE: error estándar. L: genotipo homocigoto para los alelos de Rio Grande. P: genotipo homocigoto para los alelos de LA1589. *fs I*: índice de forma de fruto; *fcp*: forma cuadrangular proximal; *fcd*: forma cuadrangular distal; *ft*: forma triangular; *apm*: ángulo proximal macro; *adm*: ángulo distal macro; *apd*: área de la protuberancia distal; *ap*: área de pericarpio en cm²; *área*: en cm²; *ep*: espesor de pericarpio en cm; *L*: índice de reflectancia de color; *ab*: índice a/b de color.

Tabla S 3. Valor medio y error estándar de los caracteres de morfología y calidad de fruto medidos en ambos grupos homocigotas de la familia 3.

Familia	Categoría	Variable	L			P			Estadísticos <i>t</i> -Student	
			n	Media	± E.E.	n	Media	± E.E.	Valor <i>t</i>	Valor p
3	Morfología	<i>área</i>	4	14,10	± 2,25	1	8,29	± .		
		<i>fs I</i>	4	1,10	± 0,04	1	1,04	± .		
		<i>fcp</i>	4	0,77	± 0,01	1	0,70	± .		
		<i>fcd</i>	4	0,61	± 0,01	1	0,58	± .		
		<i>ft</i>	4	1,26	± 0,03	1	1,21	± .		
		<i>apm</i>	4	114,37	± 3,16	1	111,67	± .		
		<i>adm</i>	4	95,75	± 2,67	1	102,13	± .		
		<i>apd</i>	4	0,00	± 0,00	1	0,01	± .		
		<i>ap</i>	3	4,71	± 0,26		ND			
		<i>ep</i>	3	0,93	± 0,03		ND			
	Calidad	<i>pH</i>	3	4,50	± 0,09		ND			
		<i>L</i>	3	42,66	± 2,96		ND			
		<i>ab</i>	3	0,93	± 0,12		ND			

n: número de plantas; EE: error estándar. L: genotipo homocigoto para los alelos de Rio Grande. P: genotipo homocigoto para los alelos de LA1589. *fs I*: índice de forma de fruto; *fcp*: forma cuadrangular proximal; *fcd*: forma cuadrangular distal; *ft*: forma triangular; *apm*: ángulo proximal macro; *adm*: ángulo distal macro; *apd*: área de la protuberancia distal; *ap*: área de pericarpio en cm²; *área*: en cm²; *ep*: espesor de pericarpio en cm; *L*: índice de reflectancia de color; *ab*: índice a/b de color.

Tabla S 4. Valor medio y error estándar de los caracteres de morfología y calidad de fruto medidos en ambos grupos homocigotas de la familia 4.

Familia	Categoría	Variable	L			P			Estadísticos <i>t</i> -Student	
			n	Media	± E.E.	n	Media	± E.E.	Valor <i>t</i>	Valor <i>p</i>
4	Morfología	<i>área</i>	5	14,06	± 1,44	3	8,07	± 0,45	3,07	0,022
		<i>fs I</i>	5	1,25	± 0,03	3	1,07	± 0,01	3,99	0,007
		<i>fcp</i>	5	0,77	± 0,01	3	0,73	± 0,01	2,99	0,024
		<i>fcd</i>	5	0,39	± 0,02	3	0,62	± 0,01	-7,21	0,000
		<i>ft</i>	5	2,16	± 0,13	3	1,18	± 0,05	5,38	0,002
		<i>apm</i>	5	106,54	± 3,73	3	111,72	± 2,88	-0,96	0,375
		<i>adm</i>	5	94,69	± 0,97	3	101,78	± 3,37	-2,55	0,044
		<i>apd</i>	5	0,11	± 0,03	3	0,00	± 0,00	4,25	0,013
		<i>ap</i>	3	5,35	± 0,44	2	2,76	± 0,12	4,47	0,021
		<i>ep</i>	3	1,09	± 0,06	2	0,72	± 0	5,79	0,029
	Calidad	<i>pH</i>	4	4,60	± 0,10	3	4,49	± 0,04	0,84	0,438
		<i>L</i>	4	43,09	± 0,42	3	41,56	± 0,99	-3,47	0,018
		<i>ab</i>	4	1,00	± 0,02	3	1,09	± 0,01	1,58	0,175

n: número de plantas; EE: error estándar. L: genotipo homocigoto para los alelos de Rio Grande. P: genotipo homocigoto para los alelos de LA1589. *fs I*: índice de forma de fruto; *fcp*: forma cuadrangular proximal; *fcd*: forma cuadrangular distal; *ft*: forma triangular; *apm*: ángulo proximal macro; *adm*: ángulo distal macro; *apd*: área de la protuberancia distal; *ap*: área de pericarpio en cm²; *área*: en cm²; *ep*: espesor de pericarpio en cm; *L*: índice de reflectancia de color; *ab*: índice a/b de color.

Tabla S 5. Valor medio y error estándar de los caracteres de morfología y calidad de fruto medidos en ambos grupos homocigotas de la familia 5.

Familia	Categoría	Variable	L			P			Estadísticos <i>t</i> -Student	
			n	Media	± E.E.	n	Media	± E.E.	Valor <i>t</i>	Valor p
5	Morfología	<i>área</i>	4	6,46	± 0,38	7	6,90	± 0,64	-0,49	0,634
		<i>fs I</i>	4	1,18	± 0,09	7	1,14	± 0,03	0,41	0,690
		<i>fcp</i>	4	0,63	± 0,02	7	0,69	± 0,01	-2,51	0,033
		<i>fcd</i>	4	0,63	± 0,03	7	0,58	± 0,03	1,18	0,267
		<i>ft</i>	4	1,03	± 0,08	7	1,23	± 0,08	-1,72	0,119
		<i>apm</i>	4	95,52	± 10,16	7	104,13	± 2,29	-0,83	0,469
		<i>adm</i>	4	100,36	± 5,05	7	101,79	± 2,14	-0,31	0,766
		<i>apd</i>	4	0,01	± 0,00	7	0,01	± 0,00	-0,21	0,835
		<i>ap</i>	4	1,88	± 0,04	5	2,8	± 0,26	-3,49	0,025
		<i>ep</i>	4	0,52	± 0,03	5	0,75	± 0,06	-3,23	0,015
	Calidad	<i>pH</i>	4	4,30	± 0,14	7	4,69	± 0,14	-1,78	0,109
		<i>L</i>	4	42,91	± 1,59	7	42,50	± 0,54	-0,30	0,772
		<i>ab</i>	4	0,99	± 0,06	7	1,01	± 0,04	0,30	0,768

n: número de plantas; EE: error estándar. L: genotipo homocigoto para los alelos de Rio Grande. P: genotipo homocigoto para los alelos de LA1589. *fs I*: índice de forma de fruto; *fcp*: forma cuadrangular proximal; *fcd*: forma cuadrangular distal; *ft*: forma triangular; *apm*: ángulo proximal macro; *adm*: ángulo distal macro; *apd*: área de la protuberancia distal; *ap*: área de pericarpio en cm²; *área*: en cm²; *ep*: espesor de pericarpio en cm; *L*: índice de reflectancia de color; *ab*: índice a/b de color.

Tabla S 6. Valor medio y error estándar de los caracteres de morfología y calidad de fruto medidos en ambos grupos homocigotas de la familia 6.

Familia	Categoría	Variable	L			P			Estadísticos <i>t</i> -Student	
			n	Media	± E.E.	n	Media	± E.E.	Valor <i>t</i>	Valor <i>p</i>
6	Morfología	<i>área</i>	5	9,04	± 0,42	4	6,45	± 0,61	3,59	0,009
		<i>fs I</i>	5	1,16	± 0,03	4	1,22	± 0,05	-1,22	0,264
		<i>fcp</i>	5	0,75	± 0,01	4	0,73	± 0,02	0,63	0,550
		<i>fcd</i>	5	0,58	± 0,02	4	0,57	± 0,03	0,16	0,880
		<i>ft</i>	5	1,32	± 0,06	4	1,34	± 0,08	-0,17	0,867
		<i>apm</i>	5	111,26	± 2,78	4	98,56	± 5,49	2,20	0,064
		<i>adm</i>	5	94,07	± 1,97	4	95,51	± 2,19	-0,49	0,639
		<i>apd</i>	5	0,03	± 0,01	4	0,04	± 0,01	-1,07	0,319
		<i>ap</i>	4	3,91	± 0,41	2	2,5	± 0,38	2,16	0,097
		<i>ep</i>	4	0,87	± 0,05	2	0,67	± 0,07	2,36	0,078
	Calidad	<i>pH</i>	1	4,50	± .	4	4,41	± 0,08	1,09	0,355
		<i>L</i>	1	44,06	± .	4	42,29	± 0,90	-1,36	0,267
		<i>ab</i>	1	1,04	± .	4	1,11	± 0,05	1,96	0,145

n: número de plantas; EE: error estándar. L: genotipo homocigoto para los alelos de Rio Grande. P: genotipo homocigoto para los alelos de LA1589. *fs I*: índice de forma de fruto; *fcp*: forma cuadrangular proximal; *fcd*: forma cuadrangular distal; *ft*: forma triangular; *apm*: ángulo proximal macro; *adm*: ángulo distal macro; *apd*: área de la protuberancia distal; *ap*: área de pericarpio en cm²; *área*: en cm²; *ep*: espesor de pericarpio en cm; *L*: índice de reflectancia de color; *ab*: índice a/b de color.

Tabla S 7. Valor medio y error estándar de los caracteres de morfología y calidad de fruto medidos en ambos grupos homocigotas de la familia 7.

Familia	Categoría	Variable	L			P			Estadísticos <i>t</i> -Student	
			n	Media	± E.E.	n	Media	± E.E.	Valor <i>t</i>	Valor p
7	Morfología	<i>área</i>	4	7,67	± 1,29	2	6,39	± 0,78	0,64	0,558
		<i>fs I</i>	4	1,31	± 0,06	2	1,23	± 0,01	0,96	0,391
		<i>fcp</i>	4	0,65	± 0,01	2	0,71	± 0,00	-5,74	0,011
		<i>fcd</i>	4	0,57	± 0,02	2	0,53	± 0,05	0,92	0,412
		<i>ft</i>	4	1,17	± 0,05	2	1,38	± 0,15	-1,83	0,141
		<i>apm</i>	4	85,44	± 6,63	2	100,05	± 0,16	-2,20	0,115
		<i>adm</i>	4	88,25	± 5,16	2	90,39	± 0,39	-0,28	0,796
		<i>apd</i>	4	0,03	± 0,01	2	0,02	± 0,02	0,70	0,523
		<i>ap</i>	3	3,42	± 0,26	1	3,3	± .		
		<i>ep</i>	3	0,85	± 0,06	1	0,86	± .		
	Calidad	<i>pH</i>	4	4,45	± 0,06	1	5,03	± .		
		<i>L</i>	4	41,63	± 0,88	1	39,20	± .		
		<i>ab</i>	4	1,08	± 0,04	1	1,08	± .		

n: número de plantas; EE: error estándar. L: genotipo homocigoto para los alelos de Rio Grande. P: genotipo homocigoto para los alelos de LA1589. *fs I*: índice de forma de fruto; *fcp*: forma cuadrangular proximal; *fcd*: forma cuadrangular distal; *ft*: forma triangular; *apm*: ángulo proximal macro; *adm*: ángulo distal macro; *apd*: área de la protuberancia distal; *ap*: área de pericarpio en cm²; *área*: en cm²; *ep*: espesor de pericarpio en cm; *L*: índice de reflectancia de color; *ab*: índice a/b de color.

Tabla S 8. Valor medio y error estándar de los caracteres de morfología y calidad de fruto medidos en ambos grupos homocigotas de la familia 8.

Familia	Categoría	Variable	L			P			Estadísticos <i>t</i> -Student	
			n	Media	± E.E.	n	Media	± E.E.	Valor <i>t</i>	Valor <i>p</i>
8	Morfología	<i>área</i>	3	8,63	± 1,40	5	7,43	± 0,36	1,06	0,330
		<i>fs I</i>	3	1,15	± 0,01	5	1,13	± 0,03	0,36	0,732
		<i>fcp</i>	3	0,73	± 0,02	5	0,71	± 0,01	1,02	0,347
		<i>fcd</i>	3	0,59	± 0,01	5	0,55	± 0,01	2,26	0,065
		<i>ft</i>	3	1,24	± 0,05	5	1,34	± 0,05	-1,40	0,210
		<i>apm</i>	3	108,53	± 1,88	5	107,64	± 1,67	0,34	0,744
		<i>adm</i>	3	95,80	± 1,42	5	98,45	± 1,72	-1,05	0,332
		<i>apd</i>	3	0,01	± 0,01	5	0,02	± 0,01	-0,87	0,420
		<i>ap</i>	3	4,06	± 0,03	5	3,8	± 0,39	0,67	0,542
		<i>ep</i>	3	0,97	± 0,04	5	0,91	± 0,05	0,93	0,388
	Calidad	<i>pH</i>	2	4,50	± 0,04	2	4,43	± 0,17	-0,10	0,923
		<i>L</i>	2	40,21	± 0,68	2	41,51	± 1,77	3,18	0,050
		<i>ab</i>	2	1,18	± 0,00	2	0,98	± 0,04	-0,52	0,637

n: número de plantas; EE: error estándar. L: genotipo homocigoto para los alelos de Rio Grande. P: genotipo homocigoto para los alelos de LA1589. *fs I*: índice de forma de fruto; *fcp*: forma cuadrangular proximal; *fcd*: forma cuadrangular distal; *ft*: forma triangular; *apm*: ángulo proximal macro; *adm*: ángulo distal macro; *apd*: área de la protuberancia distal; *ap*: área de pericarpio en cm²; *área*: en cm²; *ep*: espesor de pericarpio en cm; *L*: índice de reflectancia de color; *ab*: índice a/b de color.

Referencias

- Adalid, A. M., Roselló, S., & Nuez, F. (2007). *Mejora de la calidad nutritiva en tomate : búsqueda de nuevas fuentes de variabilidad con alto contenido en carotenoides y vitamina C. Actas de Horticultura-Sociedad Española de Ciencias Hortícolas* (Vol. 48).
- Anders, S., & Huber, W. (2012). Differential expression of RNA-Seq data at the gene level—the DESeq package. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-10-r106>
- Batistič, O., Rehers, M., Akerman, A., Schlücking, K., Steinhorst, L., Yalovsky, S., ... Kudla, J. (2012). S-acylation-dependent association of the calcium sensor CBL2 with the vacuolar membrane is essential for proper abscisic acid responses. *Cell Research*, 22(7), 1155–1168. <https://doi.org/10.1038/cr.2012.71>
- Bernacchi, D., Beck-Bunn, T., Eshed, Y., Lopez, J., Petiard, V., Uhlig, J., ... Tanksley, S. D. (1998). Advanced backcross QTL analysis in tomato. I. Identification of QTLs for traits of agronomic importance from *Lycopersicon hirsutum*. *Theoretical and Applied Genetics*, 97, 381–397. <https://doi.org/10.1007/s001220050908>
- Bernatzky, R., & Tanksley, S. D. (1986). Toward a saturated linkage map in tomato based on isozymes and random cDNA sequences. *Genetics*, 112(4), 887–98. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1202783&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Blanca, J., Montero-Pau, J., Sauvage, C., Bauchet, G., Illa, E., Díez, M. J., ... Cañizares, J. (2015). Genomic variation in tomato, from wild ancestors to contemporary breeding accessions. *BMC Genomics*, 16, 257. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1444-1>
- Boopathi, N. M. (2013). Fine Mapping. In *Genetic Mapping and Marker Assisted Selection: Basics, Practice and Benefits* (pp. 165–172). India: Springer India. https://doi.org/10.1007/978-81-322-0958-4_7
- Brewer, M. T., Lang, L., Fujimura, K., Dujmovic, N., Gray, S., & van der Knaap, E. (2006). Development of a Controlled Vocabulary and Software Application to Analyze Fruit Shape Variation in Tomato and Other Plant Species. *Plant Physiology*, 141, 15–25. <https://doi.org/10.1104/pp.106.077867.1>
- Causse, M. (2002). QTL analysis of fruit quality in fresh market tomato: a few chromosome regions control the variation of sensory and instrumental traits. *Journal of Experimental Botany*, 53(377), 2089–2098. <https://doi.org/10.1093/jxb/erf058>
- Clevenger, J. P., Van Houten, J., Blackwood, M., Rodríguez, G. R., Jikumaru, Y., Kamiya,

- Y., ... van der Knaap, E. (2015). Network Analyses Reveal Shifts in Transcript Profiles and Metabolites That Accompany the Expression of SUN and an Elongated Tomato Fruit. *Plant Physiology*, *168*(3), 1164–1178. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00379>
- Di Renzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2001). Infostat. Versión 2001.
- Frary, A., Nesbitt, T. C., Frary, A., Grandillo, S., van der Knaap, E., Cong, B., ... Tanksley, S. D. (2000). fw2.2: A Quantitative Trait Locus Key to the Evolution of Tomato Fruit Size. *Science*, *289*, 85–88. <https://doi.org/10.1126/science.289.5476.85>
- Fulton, T., Chunzoongse, J., & Tanksley, S. D. (1995). Microprep Protocol for Extraction of D N A from Tomato and other Herbaceous Plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, *13*(3), 207–209.
- Fulton, T. M., Grandillo, S., Beck-Bunn, T., Fridman, E., Frampton, A., Lopez, J., ... Tanksley, S. D. (2000). Advanced backcross QTL analysis of a *Lycopersicon esculentum* x *Lycopersicon parviflorum* cross. *Theoretical and Applied Genetics*, *100*, 1025–1042. <https://doi.org/10.1007/s001220051384>
- Gonzalo, M. J., & van der Knaap, E. (2008). A comparative analysis into the genetic bases of morphology in tomato varieties exhibiting elongated fruit shape. *Theoretical and Applied Genetics*, *116*, 647–656. <https://doi.org/10.1007/s00122-007-0698-7>
- Grandillo, S., & Tanksley, S. D. (1996). QTL analysis of horticultural traits differentiating the cultivated tomato from the closely related species *Lycopersicon pimpinellifolium*. *Theoretical and Applied Genetics*, *92*, 935–951. <https://doi.org/10.1007/BF00224033>
- Grandillo, S., Zamir, D., & Tanksley, S. D. (1999). Genetic improvement of processing tomatoes : A 20 years perspective. *Euphytica*, *110*, 85–97.
- Green, G. Y., Pereira da Costa, J. H., Cambiaso, V., Pratta, G. R., Zorzoli, R., & Rodríguez, G. R. (2016). Single and joint effect of the basal region of chromosome 2 and centromeric region of chromosome 8 on morphological and fruit quality traits in tomato. *Euphytica*, *210*, 327–339. <https://doi.org/10.1007/s10681-016-1689-z>
- Haley, C. S., & Knott, S. a. (1992). A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. *Heredity*, *69*(4), 315–24. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16718932>
- Hemsley, P. A., & Grierson, C. S. (2008). Multiple roles for protein palmitoylation in plants. *Trends in Plant Science*, *13*(6), 295–302. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.04.006>

- Hu, B., Liu, B., Liu, L., Liu, C., Xu, L., & Ruan, Y. (2014). Epigenetic control of Pollen Ole e 1 allergen and extensin family gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Acta Physiologiae Plantarum*, *36*(8), 2203–2209.
- Ku, H. M., Grandillo, S., & Tanksley, S. D. (2000). fs8. 1, a major QTL, sets the pattern of tomato carpel shape well before anthesis. *Theoretical and Applied Genetics*, *101*, 873–878.
- Labate, J. A., Grandillo, S., Fulton, T., Muños, S., Caicedo, A. L., Peralta, I., ... Causse, M. (2007). Tomato. In *Genome mapping and molecular breeding in plants* (Vol. 5, pp. 1–125). New York: Springer Publishing Co.
- Lang, Q., Zhang, H., Li, J., Yin, H., Zhang, Y., Tang, W., ... Yu, L. (2008). Cloning and characterization of a human GDPD domain-containing protein GDPD5. *Molecular Biology Reports*, *35*(3), 351–359.
- Lippman, Z. B., & Tanksley, S. D. (2001). Dissecting the genetic pathway to extreme fruit size in tomato using a cross between the small-fruited wild species *Lycopersicon pimpinellifolium* and *L. esculentum* var. Giant Heirloom. *Genetics*, *158*, 413–422.
- Liu, J., Van Eck, J., Cong, B., & Tanksley, S. D. (2002). A new class of regulatory genes underlying the cause of pear-shaped tomato fruit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(20), 13302–13306. <https://doi.org/10.1073/pnas.162485999>
- Mazzucato, A., Papa, R., Bitocchi, E., Mosconi, P., Nanni, L., Negri, V., ... Veronesi, F. (2008). Genetic diversity, structure and marker-trait associations in a collection of Italian tomato (*Solanum lycopersicum* L.) landraces. *Theoretical and Applied Genetics*, *116*(5), 657–669. <https://doi.org/10.1007/s00122-007-0699-6>
- Nuez, F. (1995). *El cultivo del tomate*. Madrid: Multi-Prensa.
- Paterson, A. H., DeVerna, J. W., Lanini, B., & Tanksley, S. D. (1989). Fine mapping of quantitative trait loci using selected overlapping recombinant chromosomes, in an interspecies cross of tomato. *Genetics*, *124*(3), 735–742.
- Paterson, A. H., Lander, E. S., Hewitt, J. D., Peterson, S., Lincoln, S. E., & Tanksley, S. D. (1988). Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Nature*, *335*, 721–726. <https://doi.org/10.1038/335721a0>
- Peralta, I., Spooner, D. M., & Knapp, S. (2008). Systematic Botany. In C. Anderson (Ed.),

- Systematic Botany Monographs* (Vol. 84, p. 192). The American Society of Plant Taxonomists.
- Pereira da Costa, J. H., Rodríguez, G. R., Pratta, G. R., Picardi, L. A., & Zorzoli, R. (2013). QTL detection for fruit shelf life and quality traits across segregating populations of tomato. *Scientia Horticulturae*, 156, 47–53. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423813001295>
- Pratta, G. R., Zorzoli, R., & Picardi, L. A. (1996). Evaluación de caracteres de interés agronómico en especies del género *Lycopersicon*. *Horticultura Argentina*, 15(39), 25–32.
- Rodríguez, G. R., Moysenko, J. B., Robbins, M. D., Morejón, N. H., Francis, D. M., & van der Knaap, E. (2010). Tomato Analyzer: a useful software application to collect accurate and detailed morphological and colorimetric data from two-dimensional objects. *Journal of Visualized Experiments*, (37), 1–9. <https://doi.org/10.3791/1856>
- Rodríguez, G. R., Muños, S., Anderson, C., Sim, S.-C., Michel, A., Causse, M., ... van der Knaap, E. (2011). Distribution of SUN, OVATE, LC, and FAS in the tomato germplasm and the relationship to fruit shape diversity. *Plant Physiology*, 156(1), 275–85. <https://doi.org/10.1104/pp.110.167577>
- Rodríguez, G. R., Pratta, G. R., Zorzoli, R., & Picardi, L. A. (2006). Evaluación de caracteres de planta y fruto en líneas recombinantes autofecundadas de tomate obtenidas por cruzamiento entre *Lycopersicon esculentum* y *L. pimpinellifolium*. *Ciencia E Investigación Agraria*, 33(2), 133–141.
- Saliba-Colombani, V., Causse, M., Langlois, D., Philouze, J., & Buret, M. (2001). Genetic analysis of organoleptic quality in fresh market tomato. 1. Mapping QTLs for physical and chemical traits. *Theoretical and Applied Genetics*, 102, 259–272. <https://doi.org/10.1007/s001220051643>
- Snedecor, G. (1964). *Métodos Estadísticos* (5ta ed.). México: Compañía Editorial.
- Stevens, M. A., & Rick, C. M. (1986). Genetics and Breeding. In J. G. Atherton & J. Rudich (Eds.), *The Tomato Crop* (pp. 35–100). New York: Chapman and Hall.
- Sun, L., Rodriguez, G. R., Clevenger, J. P., Illa-berenguer, E., Lin, J., Blakeslee, J. J., ... Knaap, E. Van Der. (2015). Candidate gene selection and detailed morphological evaluations of fs8 . 1 , a quantitative trait locus controlling tomato fruit shape. *Journal of Experimental Botany*, 66(20), 6471–6482. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv361>

- Tanksley, S. D. (1993). Mapping polygenes. *Annual Review of Genetics*, 27, 205–233. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.27.120193.001225>
- Tanksley, S. D., Ganai, M. W., Prince, J. P., de Vicente, M. C., Bonierbale, M. W., Broun, P., ... Martin, G. B. (1992). High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics*, 132, 1141–1160.
- The Tomato Genome Consortium. (2012). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, 485, 635–641. <https://doi.org/10.1038/nature11119>
- Thompson, J.R., L. a Marcelino, and M.F. Polz. (2002). Heteroduplexes in mixed-template amplifications: formation, consequence and elimination by “reconditioning PCR”. *Nucleic Acids Res*, 30(9), 2083–2088.
- Wu, S., Clevenger, J. P., Sun, L., Visa, S., Kamiya, Y., Jikumaru, Y., ... van der Knaap, E. (2015). The control of tomato fruit elongation orchestrated by sun, ovate and fs8.1 in a wild relative of tomato. *Plant Science*, 238, 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.05.019>
- Wu, S., Xiao, H., Cabrera, A., Meulia, T., & Knaap, E. Van Der. (2011). SUN Regulates Vegetative and Reproductive Organ Shape by Changing Cell Division Patterns. *Plant Physiology*, 157(November), 1175–1186. <https://doi.org/10.1104/pp.111.181065>
- Xiao, H., Jiang, N., Schaffner, E., Stockinger, E. J., & van der Knaap, E. (2008). A retrotransposon-mediated gene duplication underlies morphological variation of tomato fruit. *Science*, 319, 1527–1530. <https://doi.org/10.1126/science.1153040>
- Xiao, H., Radovich, C., Welty, N., Hsu, J., Li, D., Meulia, T., & van der Knaap, E. (2009). Integration of tomato reproductive developmental landmarks and expression profiles, and the effect of SUN on fruit shape. *BMC Plant Biology*, 9(49), 1–21. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-9-49>
- Yates, H. E., Frary, A., Doganlar, S., Frampton, A., Eannetta, N. T., Uhlig, J., & Tanksley, S. D. (2004). Comparative fine mapping of fruit quality QTLs on chromosome 4 introgressions derived from two wild tomato species. *Euphytica*, 135(3), 283–296. <https://doi.org/10.1023/B:EUPH.0000013314.04488.87>
- Zorzoli, R., Pratta, G. R., & Picardi, L. A. (1998). Efecto de los mutantes nor y rin y de genes silvestres sobre características del fruto en *Lycopersicon*. *Mendeliana*, 13, 12–19.