

MAPEO DE QTL RELACIONADOS AL TAMAÑO DE FRUTO EN TOMATE PLATENSE

Introducción: Proyecto tomate platense

El tomate (*Solanum lycopersicum*) representa un modelo de estudio alternativo al de *Arabidopsis thaliana* principalmente en relación a los procesos de formación, maduración y metabolismo de frutos carnosos y climatéricos. Al igual que el resto de la familia de las Solanaceas –la cual comprende más de 3000 especies adaptadas a los más diversos ambientes– conserva el mismo número cromosómico de su ancestro diploide (12 pares) y una arquitectura genómica similar. Su genoma relativamente pequeño (9000 Mb) fue totalmente secuenciado en 2012 y gracias a ello junto a ciertas características (es un cultivo naturalmente autógeno capaz de cruzarse con otras especies del género y dar poblaciones genéticamente estables) es que se dispone de una gran cantidad de información y recursos genéticos y genómicos.

En la Argentina el tomate es el segundo cultivo hortícola más importante después de la papa con una producción anual cercana a las 750 mil toneladas y un consumo promedio de 37 kg por persona al año. En la actualidad alrededor del 80% de las semillas de tomate son importadas, principalmente de EEUU y Holanda, y si bien se trata de cultivares ‘larga vida’ el mejoramiento focalizado en dar estabilidad y firmeza a los frutos post-cosecha fue en detrimento a la pérdida de sabor y aroma. Como alternativa, el proyecto **tomate platense** llevado a cabo por productores del cinturón hortícola de La Plata revaloriza variedades originales que fueron desplazadas a fines de la década del 80 y que se caracterizan por presentar una gran adaptación a las condiciones ecológicas de la zona, sabor intenso, abundante semilla y jugo y un gran tamaño del fruto cuya forma irregular y achatada puede presentar numerosos lóculos. En la Universidad Nacional de La Plata existen grupos de investigación que trabajan conjuntamente con los productores regionales con el objetivo de profundizar en el conocimiento de la genética del tomate platense e intentar insertarlo en la cadena de distribución nacional.

En el presente trabajo práctico se abordará un análisis de QTL en tomate utilizando datos publicados en el sitio **Solanaceae Genomics Network** (www.solgenomics.net)

Objetivos:

- Utilizar herramientas bioinformáticas para el mapeo de QTL asociados a características de interés en tres cromosomas de tomate.
- Generar nuevos posibles marcadores moleculares asociados al tamaño de fruto en tomate.

Introducción: Carácter cuantitativo y loci de carácter cuantitativo (QTL).

El tamaño y la composición del fruto de tomate son caracteres cuantitativos que como tales presentan una herencia compleja y resultan de la acción acumulativa de un conjunto de genes (poligenes). Uno de los objetivos más importantes en la construcción de mapas genéticos en programas de mejoramiento es la localización de los genes que controlan estos caracteres o sus loci llamados “loci de carácter cuantitativo” o QTL (*Quantitative Trait Loci*). Las etapas a seguir en el mapeo de QTL se detallan a continuación.

Etapas 1) Selección de parentales: los fenotipos de las líneas parentales deben ser contrastantes en el rasgo de interés agronómico y deben presentar polimorfismo genético en cuanto a los loci marcadores. En este caso se pretende cruzar una variedad de tomate comercial

que presenta frutos chicos con una variedad de tomate platense que presenta frutos de gran tamaño.

Etapa 2) Población de segregantes: A continuación son seleccionadas líneas recombinantes endogámicas (RILs) generadas por varias generaciones a partir de la autofecundación de la F1. Cada RIL contiene una combinación de segmentos cromosómicos únicos provenientes de líneas parentales y un mayor número de generaciones representan un mayor número de recombinaciones. A partir de esta población se genera una matriz mixta de datos genotípicos y fenotípicos provenientes del tipo de alelo en los marcadores moleculares utilizados y de la medición de las variables fenotípicas. A modo de ejemplo se analizarán datos obtenidos de 107 individuos representantes de RILs de una F2 a los que se les midió el área y perímetro de los frutos así como también se les determinó el perfil alélico de 28 marcadores moleculares detallados en la tabla.

Etapa 3) Construcción del mapa genético: En el mapeo de caracteres cuantitativos se requiere el uso de marcadores moleculares los cuales pueden ser un gen o un fragmento de DNA sin función conocida pero con una ubicación física (*locus*) identificable en el cromosoma y cuya herencia genética se puede seguir en la descendencia. Estos marcadores suelen ocurrir repetidamente en el genoma ya que surgen como diferentes clases de mutaciones, tales como sustituciones (mutación puntual), rearrreglos (inserciones y deleciones) o errores en la replicación de DNA repetido en tándem. Los principales marcadores de ADN que se utilizan son: polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), secuencias polimórficas amplificadas y clivadas (CAPS), polimorfismos de ADN amplificados al azar (RAPD), repeticiones de secuencia simple o microsatélites (SSR) y polimorfismo de nucleótido simple (SNP). El porcentaje de recombinación es una medida directa de las distancias entre genes. Se utiliza una función de mapa (Haldane o Kosambi) para traducir de la frecuencia de recombinación la distancia o viceversa. Estos mapas se construyen con la ayuda de softwares como WinQTL Cartographer.

Etapa 4) Análisis de QTL: El mapeo de QTL permite identificar el número de loci involucrados en un carácter cuantitativo, su localización cromosomal, su modo de acción génica (aditividad, dominancia, epistasia) así como también descomponer la interacción genotipo y ambiente a nivel de cada QTL. Las asociaciones entre los marcadores moleculares y el fenotipo se evalúan de manera de calcular la probabilidad estadística de que un QTL se encuentre cerca de un marcador. Estos valores son presentados como el logaritmo de las probabilidades (LOD, *Log Of the Odds*) o la razón de máxima verosimilitud (LR) considerándose ligamiento cuando este valor supera un valor umbral crítico (LTR). El programa asigna un valor LTR de 11,41 cuyo equivalente es un valor de LOD=2,5 (LOD=LR/4,61). El test de razón de máxima verosimilitud es $LR=2\ln(L1/L0)$ siendo L0 el valor de la función de verosimilitud de una hipótesis nula y L1 el valor de la función de verosimilitud de una hipótesis alternativa.

Dentro de los métodos de mapeo propuestos para localización de QTLs se encuentran:

-Mapeo por marcador simple (SIM, *single marker analysis*): Asocia un marcador a un QTL empleando un método estadístico como puede ser un ANOVA o regresión lineal. Una diferencia significativa entre marcador-QTL indica que ese marcador está genéticamente ligado a un QTL que controla el carácter que se está evaluando. Mientras más próximo esté un marcador del QTL menor será la probabilidad de que ocurra un evento de recombinación entre el locus del marcador y el QTL y éstos serán transmitidos juntos a la progenie con mayor frecuencia.

-Mapeo por intervalo simple (IM, *simple interval mapping*): Permite localizar la posición del QTL en el intervalo determinado por dos marcadores.

-Mapeo por intervalo compuesto (CIM, *composite interval mapping*): Es una combinación de los dos métodos anteriores. Evalúa la probabilidad de que un intervalo entre dos marcadores se asocie a la presencia de al menos un QTL que afecta un carácter cuantitativo como también considera el efecto de otros marcadores adicionales (cofactores) sobre ese carácter.

A continuación se muestran los marcadores moleculares que utilizaremos en el mapeo de QTL asociados al tamaño del fruto de tomate (fuente: www.solgenomics.net).

Cromosoma	Marcador	Distancia cM	Protocolo	Cromosoma	Marcador	Distancia cM	Protocolo
2	TG608	00	RFLP	7	CD57	40	RFLP
2	CT205	17	RFLP	7	TG174	60	CAPS
2	TG165	28	RFLP	7	SSR45	80	SSR
2	TG14	44	RFLP	7	TG20	93	RFLP
2	SSR32	58	SSR	7	TG499	105	CAPS
2	Ovate	73	CAPS	11	TG497	00	RFLP
2	TG337	79	CAPS	11	SSR80	14	SSR
2	TG537	85	SSR	11	TG508	20	RFLP
2	fw2.2	94	SSR	11	TG523	25	CAPS
2	TG151	97	RFLP	11	CT182	38	SSR
2	TG154	107	RFLP	11	TG147	53	RFLP
7	TG342	00	RFLP	11	TG384	59	RFLP
7	CT52	09	RFLP	11	TG36	83	SSR
7	cos103R	17	SSR	11	TG393	97	RFLP

Primera parte: Bioinformática

- Explorar el [sitio www.solgenomics.net](http://www.solgenomics.net) para la búsqueda de marcadores moleculares (search>Marker) y análisis de QTL relacionados al tamaño del fruto de tomate (Search>QTL>Analyze QTLs>fruit área>Analyze QTL in population tomato susage LA1589 F2).
- Descargar el software **Windows QTL Cartographer 2.5** desde <https://brcwebportal.cos.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>
- Seguir las instrucciones a continuación. Para más detalles, consultar el tutorial WinQTLCart.pdf que se encuentra en la bibliografía.

Parte A- Generar un archivo de datos con formato .MCD

Abrir el programa WinQTL Cartographer, seleccionar la opción “New” y completar los pasos con la siguiente información:

- Paso 1) Chromosome number: 3
 Trait: 2
 Other trait: 0
 Individual number: 107
 Cross type: Ri1 (autofecundación)
 >Avanzar
- Paso 2) Browse> cargar archivo ‘step 2 Chromosomes’
 Send Data>Avanzar
- Paso 3) Marcar “Position”
 Browse>cargar archivo ‘step 3 Position markers’
 Send data>Avanzar

Paso 4) Seleccionar la opción *Data in three files*
Desmarcar en las tres opciones *Include individual labels*

Paso 5) Browse> cargar archivo 'Step 5 Genotypes' >Send data
Browse> cargar archivo 'Step 5 Traits' > Send data
>Avanzar

Paso 6) Corroborar que la información se haya cargado correctamente
>Concluir

Parte B: Generar archivos .QRT para análisis de QTL a través de diferentes métodos.

Marcar el archivo .mcd

Method>Single-Marker Analysis

Graphic>Chrom>show all chroms

Tools>QTL information> Automatic locating QTLs

CLOSE

Method>Interval Mapping

Threshold value setting (LR)> By Manual Input

START

Graphic>Chrom>show all chroms

Tools>QTL information> Automatic locating QTLs

CLOSE

Method>Composite Interval Mapping

Threshold value setting (LR)> By Manual Input

Control>Model 6: Standard Model

Regression method: 1. Forward regression method

START

Graphic>Chrom>show all chroms

Tools>QTL information> Automatic locating QTLs

CLOSE

DrawCrh>View>Add QTL position