UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
INSTITUTO DE HORTICULTURA
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

ASOCIACIÓN GENÓMICA PARA RESISTENCIA A *Pythium* spp. EN *Solanum lycopersicum* L.

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

PRESENTA:

DIEGO ORTIZ TORRES

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

DR. JUAN ENRIQUE RODRÍGUEZ PÉREZ

APROBADA

CHAPINGO, ESTADO DE MÉXICO MAYO 2022

ASOCIACIÓN GENÓMICA PARA RESISTENCIA A *Pythium* spp. EN *Solanum lycopersicum* L.

Tesis realizada por **Diego Ortiz Torres**, bajo el Comité Asesor indicado, aprobado por el mismo y aceptado como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

DIRECTOR:

DR. JUAN ENRIQUE RODRÍGUEZ PÉREZ

ASESOR:

DR. JAIME SAHAGÚN CASTELLANOS

ASESOR:

DR. SANTOS GERARDO LEYVA MIR

ASESOR:

DRA. LETICIA ROBLES YERENA

Chapingo, México, mayo 2022

Agradecimientos

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACyT), por brindarme el financiamiento para realizar mis estudios de maestría.

A la **Universidad Autónoma Chapingo** y **al Instituto de Horticultura** por contribuir en mi formación como Maestro en Ciencias en Horticultura.

Al **Dr. Juan Enrique Rodríguez Pérez**, con toda admiración y respeto, por contribuir en mi formación académica profesional, por su apoyo y disponibilidad para el desarrollo de la presente investigación, por su amistad y confianza.

Al **Dr. Jaime Sahagún Castellanos**, con mi respeto y admiración, por su orientación y en las etapas de investigación para mejoras de la presente investigación, por su amistad y confianza.

Al **Dr. Santos Gerardo Leyva Mir** por su invaluable apoyo y disposición para compartir su conocimiento para un mejor desarrollo de la investigación.

A la **Dra. Leticia Robles Yerena** por su valioso apoyo en la fase de laboratorio y correcciones necesarias para mejorar la presente investigación.

Al **Quim. Ricardo Gaspar Hernández** por el apoyo en la fase de laboratorio.

Al **C. Jorge Luis Sánchez Galicia** por su apoyo en evaluación fenotípica.

A los compañeros de posgrado y del Proyecto de Mejoramiento Genético de Jitomate para Invernadero de la UACh, especialmente a Ariadna, Ismael, Placido, Felipe, Iván, Efrén y Liliana por su colaboración en la preparación, establecimiento y registro de datos experimentales.

Dedicatoria

A ese ser supremo que me ha brindo fortaleza en momentos difíciles durante mi vida y que ahora me ha permitido culminar una meta más en mi vida.

A mis padres ***Olivia y Juan***, por ser el motor y soporte en mi formación personal y profesional, por su apoyo incondicional en buenos y malos momentos, por su esfuerzo y sobre todo por su amor incondicional.

A mis hermanas ***Karen*** *y* ***Emily*** por ser parte de mi hermosa familia, por su apoyo y cariño para alcanzar mis metas.

A ***Alma Deanda*** por su sincera amistad, apoyo, confianza y cariño, por brindarme aliento para alcanzar mis metas personales y profesionales.

Al ***Dr. Efraín Contreras Magaña***, donde quiera que se encuentre, por haber sido un excelente amigo, por contribuir en mi formación profesional y personal.

A mis amigos que se han convertido en mi familia por elección estando en Chapingo, especialmente ***Ismael, Placido, David y Llenny***.

Datos bibliográficos

Datos personales

Nombre: Diego Ortiz Torres

Fecha de nacimiento: 21 de abril de 1995

Lugar de nacimiento: Quechulac, Guadalupe Victoria, Puebla.

CURP: OITD950421HPLRRG01

Profesión: Agrónomo en Horticultura Protegida

Cédula profesional**:** 11995238

Desarrollo académico

Licenciatura: 2014-2018. Universidad Autónoma Chapingo

Bachillerato: 2011-2014. Preparatoria Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo.

CONTENIDO

Datos bibliográficos i
Resumen v
Abstract vi
1. INTRODUCCIÓN 1
2. OBJETIVO 2
3. HIPÓTESIS 2
4. REVISIÓN DE LITERATURA 3
4.1 Importancia del tomate 3
4.2 *Pythium* spp. en tomate 3
4.3 Mecanismos de tolerancia a *Pythium* spp. 4
4.4 Estrategias de mejoramiento genético para tolerancia a *Pythium* spp. 6
4.5 Genotipificación por secuenciación (GBS, Genotyping by Sequencing) 7
4.6 Análisis de asociación genómica (Genome-Wide Association Study, GWAS) 8
5. MATERIALES Y MÉTODOS 9
5.1 Genotipos evaluados. 10
5.2 Evaluación fenotípica (fenotipificación). 10
5.2.1 Inoculación de plántulas. 11
5.2.2 Unidad y diseño experimental. 11
5.2.3 Caracteristicas evaluadas. 12
5.3 Análisis de datos fenotípicos. 12
5.3.1 Análisis estadísticos. 12
5.4 Fase de genotipificación. 13
5.4.1 Extracción de ADN 13
5.5 Análisis de datos genotípicos. 14
5.5.1 Secuenciación del genoma. 14
5.6 Análisis de asociación genómica. 14
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 15
6.1 Evaluación fenotípica. 15
6.2 Análisis estadístico 16
6.2 Genotipificación 23

6.3 Análisis de asociación genómica 23
7. CONCLUSIONES 28
8. LITERATURA CITADA 29
ANEXO 34

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Análisis de varianza de caracteres evaluados en plántulas de 95 líneas de tomate inoculadas con *Pythium* spp. 17
Cuadro 2. Comparaciones de medias para caracteres evaluados del factor tratamiento. 18
Cuadro 3. Estructura canónica total. 20
Cuadro 4. Coeficientes de correlaciones de Pearson de caracteres evaluados en 95 genotipos de tomate inoculados con *Pythium* spp. (debajo de la diagonal) y sin inocular (arriba de la diagonal). 21
Cuadro 5. Descripción de SNPs significativos asociados a los caracteres evaluados (AP, AF, LR, MSP Y MSR) en 95 líneas de tomate *(Solanum lycopersicum* L.) del programa de mejoramiento genético de la Universidad Autónoma Chapingo inoculadas con *Pythium* spp. 25

Cuadro A1. Comparaciones de medias para caracteres evaluados del factor Genotipo. 34
Cuadro A2. Análisis Discriminante Canónico. 37
Cuadro A3. SNPs no identificados en el genoma de referencia de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) asociados a los caracteres evaluados (AP, AF, LR, MSPA Y MSR) en 95 líneas de tomate del programa de mejoramiento genético de tomate de la Universidad Autónoma Chapingo. 38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sistema radical de plantas infectadas con *Pythium* spp. en la parte superior vs plantas sin infección en la parte inferior. 15

Figura 2. Tallo de plantas infectadas con *Pythium* spp. 16

Figura 3. Dendrograma de agrupamiento de 95 líneas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) con inoculación de *Pythium* spp. 19

Figura 4. Tasas de crecimiento diario ($mm \cdot dia^{-1}$) y sus intervalos de confianza al 95 % de 95 líneas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) con y sin inoculación de *Pythium* spp 22

Figura 5. Graficas de Manhattan de asociación de marcadores de cinco caracteres fenotípicos, construidas a partir de la asociación de 14, 328 SNPs y caracteres fenotípicos, obtenidas en el programa TASSEL v5.2.60 con el modelo lineal general ponderado con 95 líneas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Se consideran significativos los marcadores ubicados por encima de la línea punteada. 27

Resumen

ASOCIACIÓN GENÓMICA PARA RESISTENCIA A *Pythium* spp*.* EN *Solanum lycopersicum* L.[1]

Pythium spp, como patógeno del tomate (*Solanum lycopersicum* L.), ocasiona pudrición de semillas, plántulas, raíces, frutos y otros órganos vegetales que entran en contacto con el suelo. En el control de este patógeno, la resistencia genética de variedades es una estrategia que no genera impacto ambiental ni deterioro de la salud humana. El objetivo de la presente investigación fue **i**dentificar regiones genómicas que confieren tolerancia a *Pythium* spp**.** en plántulas de 95 líneas homocigóticas de tomate. Para ello, se realizó un análisis de genotipificación GBS (genotyping by sequencing) y una evaluación de la resistencia de plántulas cultivadas en sistema de balsa flotante, inoculadas con *Pythium* spp. (4.16×10^5 propágulos/mL), con la técnica de raíz desnuda, bajo un diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones. Posteriormente, se realizó un análisis GWAS (genome wide associations) para asociar las valoraciones genotípicas y fenotípicas. El GBS generó una biblioteca de 14,328 SNPs (single nucleotide polymorphism) polimórficos después de un estricto análisis de filtrado. Los genotipos L92D, SS2, L47S8, L47Sinv y Mermaide mostraron la mayor tolerancia al ataque de *Pythium* spp. El análisis GWAS identifico 70 marcadores asociados al vigor de plántula ante el patógeno (altura de plántula, materia seca acumulada de raíz y de parte aérea, área foliar, longitud de raíz y tasa diaria de incremento de altura), 18 SNPs están asociados a genes descritos en el genoma de referencia. Asimismo, se identificaron tres regiones altamente asociadas con la tolerancia a *Pythium* spp.*,* la familia de genes WRKY, la región asociada a proteínas MORC del dominio dedo de zinc (zf)-CW y el gen I2 que confiere resistencia al ataque de patógenos de raíz en tomate.

Palabras clave: genotyping by sequencing, genome wide associations, polimorfismos de un solo nucleótido, patógenos de raíz.

[1]Tesis de Maestría en Ciencias en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo
Autor: Diego Ortiz Torres
Director de tesis: Dr. Juan Enrique Rodríguez Pérez

Abstract

GENOMIC ASSOCIATION FOR *Pythium* spp. RESISTANCE IN *Solanum lycopersicum* L.[2]

Pythium spp, as a tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Pathogen, causes rotting seeds, seedlings, roots, fruits and other plant organs that come into contact with the soil. In the control of this pathogen, the genetic resistance of varieties is a strategy that neither generate environmental impact nor deterioration of human health. The objective of the present investigation was to identify genomic regions that confer tolerance to *Pythium* spp. in seedlings of 95 homozygous tomato lines. For this, a GBS genotyping analysis (genotyping by sequencing) was realized as well as an evaluation of seedlings resistance grown in a floating raft system, inoculated with *Pythium* spp. (4.16 x 105 propagules/mL), with the bare root technique, under a randomized complete block design with three replications. Subsequently, a GWAS (genome wide associations) analysis was performed to associate the genotypic and phenotypic values. GBS generated a library of 14,328 polymorphic single nucleotide polymorphism (SNPs) after strict filtering analysis. Five genotypes (L92D, SS2, L47S8, L47Sinv and Mermaide) showed highest tolerance to *Pythium* spp. The GWAS analysis revealed 70 markers associated with seedling vigor against the pathogen (seedling height, accumulated root and aerial dry matter, leaf area, root length and daily rate of height increase), 18 SNPs are associated with genes described in the reference genome. Likewise, three regions highly associated with tolerance to *Pythium* spp. were identified: the WRKY gene family, the region associated with MORC proteins of the zinc finger domain (zf) CW, and the I2 gene that confers resistance to the attack of tomato root pathogens.

Key words: genotyping by sequencing, genome-wide associations, single nucleotide polymorphism, root fitopathogens

---

[2]Thesis of Master in Science in Horticulture, Universidad Autónoma Chapingo

Author: Diego Ortiz Torres
Advisor: Dr. Juan Enrique Rodríguez Pérez

1. INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una de las hortalizas con mayor importancia a nivel mundial. México es uno de los principales países exportadores. La demanda y producción de esta hortaliza se encuentran en continuo aumento. Sin embargo, su rendimiento se ve afectado por la incidencia de enfermedades causadas por hongos, dentro de los más importantes se encuentran los del género *Pythium* spp*.* (Pelegrín et al*.,* 2004).

Entre los diversos microorganismos fitopatógenos que atacan a las plantas virus, hongos, bacterias o nematodos, los hongos son el grupo que causa más enfermedades y origina grandes pérdidas que ascienden a miles de millones de dólares al año. *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Pythium* son hongos del suelo que más se estudian debido a su amplio rango de plantas hospedantes que atacan, su amplia distribución y a los grandes daños económicos que provocan en cultivos de importancia, entre ellos el tomate (Martínez et al*.,* 2016).

En diversos sistemas de producción *Pythium* spp ocasiona pudrición de semillas, ahogamiento de plántulas, pudrición de raíces, frutos y otros órganos vegetales que se encuentran en contacto con el suelo (Agrios, 2005). En el caso del tomate, *Pythium* spp ataca durante estados tempranos de crecimiento, preemergencia y posemergencia, causa podredumbre del tallo con la consecuente muerte de plántulas (Jones et al*.,* 2001).

Aunque este patógeno puede controlarse con fungicidas, el uso de estos genera graves daños al ambiente y a la salud humana, de tal forma que existe gran interés en la identificación de genes que confieran resistencia o tolerancia al ataque de dicho patógeno (Intana et al*.,* 2008) debido a que la generación y uso de variedades con resistencia genética es el método más económico y con menor impacto ambiental.

La tolerancia a algún estrés biótico como las enfermedades fúngicas puede estar asociada con unos cuantos genes de efecto mayor; o bien, a un conjunto de genes cuantitativos que, al expresarse simultáneamente, confieren diversos mecanismos de tolerancia a la planta durante el ataque de patógenos (Walley et al., 2007).

La identificación de un conjunto de genes de efectos cuantitativos es difícil y laboriosa ya que se requiere realizar evaluaciones fenotípicas y caracterizar el genoma de la especie mediante técnicas de secuenciación del ADN conocidas como GBS (Genotyping by Sequencing) con el fin de identificar polimorfismos de un solo nucleótido. Posteriormente, la asociación de la expresión fenotípica con los polimorfismos detectados puede realizarse mediante técnicas de análisis de asociación del genoma completo (GWAS) que permiten identificar simultáneamente conjuntos de genes asociados a un rasgo de interés fenotípico particular (Korte y Farlow, 2013), lo que permite acortar significativamente los periodos de mejoramiento genético.

2. OBJETIVO

Identificar regiones genómicas que confieren tolerancia a *Pythium* spp. a partir de 95 líneas homocigóticas de tomate, mediante evaluaciones fenotípicas, de plántulas, estudios de genotipificación vía secuenciación (GBS, genotyping-by-sequencing) y asociación genómica (GWAS, Genome-Wide Association Study), con el fin de identificar genotipos sobresalientes para su uso dentro del mejoramiento genético de tomate con tolerancia a *Pythium* spp**.**

3. HIPÓTESIS

La tolerancia del tomate a *Pythium* spp. está conferida por genes de efectos aditivos, los cuales se encuentran en regiones genómicas específicas que pueden identificarse mediante evaluaciones fenotípicas, estudios de secuenciación GBS y análisis GWAS.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Importancia del tomate

En México del total del Producto Interno Bruto Nacional (PIB), el sector agropecuario contribuye con el 3.4 %. De ese porcentaje, la actividad hortofrutícola sobresale con 45 % de las exportaciones del sector y el tomate representa el 8.41 % (SIAP, 2021).

México aportó 2.4 % de la producción mundial de tomate en 2020 y se colocó en la novena posición entre los países que cultivan esta hortaliza, además, es el mayor exportador del mundo con ventas anuales por más de 1 millón 650 toneladas, donde, su cliente principal fue Estados Unidos de América. Las exportaciones del tomate en 2020 generaron 1 883 millones de dólares. Esta hortaliza es el tercer cultivo agrícola que más divisas genera, solo después del aguacate y las frutillas (SIAP, 2021).

La participación del tomate en la producción nacional de hortalizas en 2020, fue 20.9 %, se sembraron 45 mil 300 hectáreas que produjeron 3 millones 371 mil toneladas. El 52 % de la producción nacional de tomate fue aportada por cinco estados: Sinaloa, San Luis Potosí, Michoacán, Zacatecas y Jalisco (SIAP, 2021).

4.2 *Pythium* spp. en tomate

De los factores bióticos que afectan al tomate, sobresalen las enfermedades causadas por organismos fitopatógenos, entre los cuales destaca *Pythium* spp. (Flores et al., 2008). *Pythium* spp. se encuentra en todo el mundo. Se encuentra sobre cultivos, suelo o sustratos y afecta semillas, plántulas y plantas adultas de la mayoría de las hortalizas cultivadas. Esta enfermedad se presenta con más frecuencia en climas templados y tropicales (Agrios, 2005).

El síntoma más común asociado al ataque de *Pythium* spp. en tomate es el estrangulamiento de tallo y la subsecuente muerte de plántulas. La enfermedad inicia con una lesión oscura y acuosa en la raíz que se extiende en forma ascendente a lo largo del tallo por encima de la superficie del suelo (2 a 4 cm) con coloración café pardo

o negra (Punja et al*.,* 2003, Grijalba et al., 2015). Cuando esta lesión se desarrolla en una porción grande o total del tallo, la planta se dobla, marchita y muere. En partes de la planta afectadas por *Pythium* spp y sometidas a alta humedad relativa, puede generarse un crecimiento de micelio de color blanco algodonoso. Si la planta sobrevive se genera retraso general del crecimiento, amarillamiento leve del follaje y perdida de producción de fruto (Punja et al*.,* 2003).

Diferentes especies de *Pythium* pueden afectar al tomate, entre ellas, *P. aphanidermatum, P. myriotilum, P. arrheromanes, P. ultimun*. y *P. debarianum*. Con temperaturas de moderadas a altas, *P. aphanidermatum* y *P. ultimun* se presentan con mayor frecuencia en plántulas (Jones et al*.,* 2001).

De manera ocasional afectan plantas con longitud mayor a 10 cm, inicialmente causan en el tallo una lesión húmeda color café oscuro a negra. Lo que generalmente conduce a la marchitez y muerte de la planta (Grijalba et al., 2015).

En condiciones propicias, *Pythium* spp tiene la capacidad de crecer de forma indefinida en el suelo como micelio vegetativo sobre varios sustratos orgánicos. Lo cual puede ser influenciado por el material vegetal en el que se desarrolle, pH, humedad y actividad de microorganismos asociados. La producción de zoosporas del patógeno se favorece con la presencia de agua libre en el suelo, característico de un mal drenaje. Después de germinar, el patógeno penetra por tallo o raíz de la planta en forma directa, aunque la presencia de heridas incrementa la infección. En condiciones favorables el patógeno produce oosporas de pared engrosada que le permiten sobrevivir en el suelo en ausencia de huésped por largos periodos de tiempo (Persley et al., 2010).

4.3 Mecanismos de tolerancia a *Pythium* spp.

Los cultivos están constantemente amenazados por numerosos factores ambientales bióticos y abióticos que les generan estrés, lo que limita su crecimiento, desarrollo y producción. Las plantas enfrentan estos factores en forma eficaz, generando cambios

fisiológicos, anatómicos, bioquímicos y moleculares a partir de la regulación específica, temporal y espacial de genes de defensa (Walley et al., 2007).

Estudios de microarreglos indican que más de 100 genes se regulan en los primeros 30 minutos después de la infección por algún patógeno (Zipfel et al., 2004). Mientras que algunos genes están involucrados en las cascadas de traducción de señales, otros activan enzimas implicadas en la biosíntesis de fitoalexinas o enzimas protectoras (Richter et al., 2005).

Estos genes son activados por compuestos que los patógenos liberan sobre o dentro de la planta, lo que desencadena series de señales de traducción, que activa genes con funciones específicas de defensa como la hipersensibilidad, muerte celular programada y respuesta sistémica adquirida (Zamioudis & Pieterse, 2012).

La muerte celular programada es un proceso de suicidio celular controlado genéticamente, que cumple un rol esencial en la biología de las plantas, Este proceso se lleva a cabo en determinadas células y en el momento apropiado (Ellis et al., 1991). Este proceso induce cambios celulares como condensación de la cromatina, fragmentación de ADN, cambios ultraestructurales en membranas y organelos y activación de proteasa (Rojo et al., 2003). Esto se desencadena durante la respuesta hipersensible lo que permite aislar al patógeno, restringir su acceso a nutrimentos y factores celulares necesarios para su crecimiento o propagación (Lorrain et al., 2003).

La resistencia sistémica adquirida, presente en la mayoría de las plantas, confiere tolerancia ante una infección secundaria por patógenos; sin embargo, el tiempo y nivel de protección depende de la especie vegetal y del efecto. Este mecanismo se caracteriza por dos procesos de defensa, uno local y otro sistémico, en los que se requiere la acumulación de proteínas con actividad antimicrobiana relacionadas al patógeno (Van Loon et al., 2006).

Por ello este proceso inducible en los tejidos distales de la planta en respuesta a una infección local por un patógeno, también incrementa la resistencia frente a futuros ataques de una amplia gama de patógenos (Vlot et al., 2008).

4.4 Estrategias de mejoramiento genético para tolerancia a *Pythium* spp.

El manejo integrado de enfermedades fungosas incluye manejo cultural, el control biológico y el control químico, sin embargo, no son tan eficaces, debido a que, los fitopatógenos poseen diversos mecanismos de amplia adaptabilidad que les permite superarlos (Martínez et al., 2016). El mejoramiento genético es otra alternativa para el control de fitopatógenos, que al generar variedades vegetales con resistencia a plagas y enfermedades se reduce el uso de agroquímicos (Botero & Arias, 2018), por lo que es un control amigable con el ambiente.

La resistencia conferida por genes mayores expresados en estado de plántula y/o planta adulta son de herencia cualitativa (resistencia vertical), este tipo de resistencia se presenta a lo largo de todo el ciclo de crecimiento del cultivo. Sin embargo, es fácilmente superada en periodos cortos debido al constante ataque y microevolución de los fitopatógenos. En contraste, la resistencia genética generada por la acción de numerosos genes de efectos menores (resistencia horizontal), genera menor frecuencia de infección y mayor durabilidad de la tolerancia a través del tiempo. Si bien, los genes menores no logran expresar altos niveles de resistencia, la combinación de muchos de ellos confiere niveles de resistencia que pueden ser incluso cercanos a la inmunidad (Singh et al., 2011, Herrera et al., 2012).

En las últimas décadas el mejoramiento genético ha logrado avances significativos en la agricultura, debido principalmente a la aplicación de herramientas de la biología molecular, la genómica y la bioinformática. La combinación de la información fenotípica con la genómica puede proveer el conocimiento requerido para identificar caracteres agronómicamente importantes y producir rápidamente cultivares superiores con mejor adaptación a los nuevos escenarios ambientales (Varshney et al., 2014). Por ejemplo, el mapeo de ligamiento genético, mapeo por asociación y la selección genómica han generado impactos relevantes en el desarrollo de variedades de especies cultivadas (Jannink et al., 2016).

El uso de técnicas de selección asistida como la genotipificación por secuenciación (GBS) y estudios de asociación genómica (GWAS) pueden favorecer en la selección de genotipos con genes de tipo cuantitativo asociados a un rasgo de interés en

particular (Korte & Farlow, 2013), como es el caso de la tolerancia al ataque de *Pythium* spp.

4.5 Genotipificación por secuenciación (GBS, Genotyping by Sequencing)

La genotipificación por secuenciación (GBS) es uno de los métodos de creación de bibliotecas genómicas de complejidad reducida, debido a que, emplea enzimas de restricción sensibles a la metilación, lo cual permite evitar regiones repetitivas de los genomas, además, genera gran número de variantes SNP en poblaciones grandes (Beissinger et al., 2013). El método GBS ha sido aplicado exitosamente en varios cultivos incluyendo el tomate, puede realizarse tanto en genomas pequeños, grandes y de alta diversidad (Kim et al., 2021).

La técnica GBS crea bibliotecas genómicas, que implica cinco pasos principales: preparación de muestras, ensamblaje de bibliotecas, secuenciación, identificación de SNPs y análisis de diversidad (Taranto et al., 2016). Inicialmente, se realiza la extracción de ADN de los genotipos que conforman la población que será secuenciada, se corta el ADN de cada uno de los genotipos con enzimas de restricción (ER), las cuales deben mantener salientes de 2 a 3 pb y no deben cortar con frecuencia la principal fracción repetitiva del genoma, lo cual es útil para promover la ligación de adaptadores que permiten secuenciar los fragmentos de ADN.

La secuenciación mediante las plataformas Illumina requiere de dos tipos de adaptadores: código de barras y adaptador común, los cuales se adhieren en los extremos de los fragmentos de ADN. Posteriormente, se procede a incrementar el conjunto de fragmentos mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y los productos obtenidos de PCR se secuencian mediante alguna plataforma de secuenciación (Elshire et al., 2011).

Los fragmentos secuenciados obtenidos del GBS se pueden alinear con el genoma de referencia de la especie estudiada. En caso de que no se cuente con este se utiliza como genoma de referencia el de una especie o pariente cercano (Perea et al., 2016)

o mediante la identificación de pares de lecturas casi idénticas, que se presume representan alelos alternativos. La alineación con el genoma de referencia se puede hacer mediante programas computacionales como NGSEP (Perea *et al*., 2016), TASSEL GBS, UNEAK (Universal Network Enabled Analysis Kit), Stacks (reference-base and *de novo*), IGST (IBIS Genotyping-by-sequencing Tool), Fast-GBS (Torkamaneh et al., 2016), lo cual permite la identificación de SNPs. La información generalmente se resguarda en un archivo electrónico con formato "vcf" para su posterior análisis.

Para determinar la estructura de la población, evaluar la diversidad genética y eliminar casi duplicados (es decir, genotipos muy similares), se suelen utilizar enfoques tanto paramétricos como no paramétricos. La estructura de la población puede determinarse mediante el método de agrupamiento paramétrico basado en modelos bayesianos implementado en el paquete computacional STRUCTURE v.2.3 (Taranto, et al., 2016).

4.6 Análisis de asociación genómica (Genome-Wide Association Study, GWAS)

La aplicación de los análisis GWAS en plantas puede dividirse en cuatro categorías principales: resistencia biótica, tolerancia abiótica, caracteres asociados al rendimiento y composición metabólica. Con respecto a la resistencia biótica, los análisis GWAS son de importancia debido a que se estima que entre 20 y 40 % de las pérdidas en rendimiento de los cultivos es debido a interacciones bióticas (Alseekh et al., 2021).

Es escasa la aplicación de análisis GWAS en problemas fitopatológicos en tomate. Mediante esta técnica se han detectado loci asociados con resistencia a mancha bacteriana causada por *Xhantomonas euvesicatoria* y *Xhantomonas perforans* (Sim et al., 2015). También, se han detectado QTLs asociados con la resistencia a marchitez bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* (Nguyen et al., 2021).

El objetivo de los análisis de asociación genómica es identificar regiones genómicas que se asocian con la variación fenotípica de un carácter de interés (Alseekh et al., 2021). Para ello, se requiere evaluar el rasgo de interés de la población mediante experimentos in vivo que permitan el registro de caracteres cuantitativos; por otra

parte, se requiere realizar la genotipificación de la misma población, a través de estudios GBS (Tam et al., 2019).

La secuenciación del genoma completo de plantas ayuda a detectar polimorfismos de un solo nucleótido (SNP). Los SNPs son de los marcadores más utilizados recientemente en diversos estudios de diversidad genética y como herramienta del mejoramiento genético de cultivos económicamente importantes, debido a que poseen excelentes atributos: son abundantes, tienen distribución uniforme, tasa de error reducida y herencia codominante (Jimenez et al., 2013).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en el Programa de Mejoramiento Genético de Tomate para Invernadero de la Universidad Autónoma Chapingo (UACh) durante el año 2021, en condiciones de invernadero de mediana tecnología tipo “full vent” cubierto con plástico calibre 600, de color blanco lechoso y filtro UV.

La fase fenotípica se desarrolló en un invernadero situado en el campo experimental del Departamento de Fitotecnia de la UACh (19°29´35’’ LN, 98°52´19’’ LO y 2,267 msnm).

El incremento de *Pythium* spp. se realizó en el laboratorio de Micología Agrícola del Departamento de Parasitología Agrícola de la UACh.

El estudio molecular se realizó en el laboratorio de Marcadores Moleculares del Departamento de Fitotecnia de la UACh (19°29´ LN, 98°53´ LO y 2240 msnm) y en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad del CINVESTAV, Irapuato.

5.1 Genotipos evaluados.

Los genotipos evaluados fueron 95 líneas homocigóticas (F_{14}-F_{15}) del Programa de Mejoramiento Genético de Tomate para Invernadero de la UACh, entre los materiales se cuenta con hábitos de crecimiento determinado e indeterminado, frutos tipo saladette, bola y cereza, además de color rojo, anaranjado y amarillo, entre otras características de variación fenotípica. Las líneas fueron generadas a partir de la segregación de poblaciones originadas mediante cruzas entre híbridos comerciales y seleccionadas mediante pedigrí.

5.2 Evaluación fenotípica (fenotipificación).

Los 95 genotipos se sembraron en charolas de poliestireno de 200 cavidades, usando como sustrato espuma agrícola (peat foam foami) Oasis®. Dieciocho días después de la siembra, se trasplantaron a un sistema de hidroponía en balsa flotante con placas de poliestireno como sostén. Para ello se utilizaron cajas de madera de 2.4 m x 1.2 m y 20 cm de altura, con capacidad de 500 litros, cubiertas con plástico para invernadero blanco lechoso calibre 600. La solución nutritiva utilizada fue la propuesta por Cadahia (2005) modificada para etapa de plántula. Las plántulas se trasplantaron a placas de polietileno las cuales funcionaron como sostén.

Incremento de inoculo.

Previo a la inoculación de las plántulas se realizó el incremento de *Pythium ultimum*, el cual, se obtuvo de la colección de hongos del Departamento de Parasitología Agrícola de la UACh.

El incremento de este hongo se realizó en cajas Petri con un medio de cultivo PDA (200 g·L de papa, 20 g·L de Agar y 15 g·L de dextrosa). Se sembraron 600 cajas, de 9 cm de diámetro las cuales fueron incubadas durante 8 días a temperatura constante de 24 °C. Al concluir la incubación se molió el inoculo contenido en 5 Petri en un litro de agua estéril más 1mL de Tween 20 como emulsionante. Se obtuvo 120 litros de

solución inoculante con concentración de 4.16 x 10^5 propágulos/mL la cual fue determinada mediante un hematocitómetro (marca: MARIENFELD, modelo: SUPERIOR).

5.2.1 Inoculación de plántulas.

La inoculación se realizó 5 días después del trasplante (23 días después de la siembra), una vez que se garantizó el establecimiento adecuado de las plántulas al sistema de balsa flotante.

La inoculación consistió en extraer de la solución nutritiva las placas de polietileno con plántulas, generar daño mecánico a las raíces mediante el corte con longitud de 4 cm. Posteriormente, se expusieron en la solución inoculante durante 1 hora. En las plántulas correspondientes a los testigos únicamente se cortó raíz con longitud de 4 cm.

La duración de la evaluación fue de 7 días, contados a partir de la inoculación de las plántulas.

5.2.2 Unidad y diseño experimental.

La unidad experimental (UE) se conformó de 5 plántulas. Distanciadas a 5 cm; en tanto que la distancia entre UEs fue 9.5 cm, lo que resultó en una densidad de 178.7 plántulas/m^{-2}.

El diseño experimental utilizado fue bloques completos al azar con tres repeticiones en el caso de la aplicación de *Pythium* y dos para el testigo.

5.2.3 Características evaluadas.

Las características estudiadas fueron evaluadas en plántulas de 30 días de edad a partir de la siembra. Con 10 días después del trasplante en el sistema de balsa flotante y 7 días después de la exposición al patógeno.

Altura de plántula (AP, en cm) medida en tres plántulas de la UE en tres oportunidades: 1, 3 y 7 días después de haber provocado la infección de *Pythium*.

Al final de la prueba (7 días después de la inoculación) se midieron las siguientes características:

Longitud de raíz (LR, en cm) obtenida mediante fotografías digitales con una escala conocida y posteriormente se determinó mediante el sofware ImageJ (v1.4.3.67; National Institutes of Health).

Materia seca de raíz (MSR, en g), secada a 50 °C hasta peso constante.

Materia seca parte aérea (MSP, en g), secada a 50 °C hasta peso constante.

Área foliar (AF, en cm^2), Se tomaron fotografías digitales con una escala conocida y posteriormente se determinó mediante el software ImageJ (v1.4.3.67; National Institutes of Health).

Materia seca total (MST en g).

5.3 Análisis de datos fenotípicos.

5.3.1 Análisis estadísticos.

Con base en la altura de planta medida en tres ocasiones para cada UE, se realizaron análisis de regresión no lineal con el modelo exponencial:

$$E(AP) = Be^{-Cx}$$

Donde: AP = altura de planta; x = días después del trasplante; B = Parámetro asociado a la ordenada al origen; C = velocidad de crecimiento de altura de planta; e = Base del logaritmo natural (e=2.718281828).

La tasa de crecimiento diario C, calculada en cada unidad experimental, fue sometida a análisis subsecuentes.

Los datos de los caracteres evaluados fueron estudiados mediante análisis de varianza y comparaciones de medias de Tukey ($p \leq 0.05$). Adicionalmente se obtuvieron correlaciones lineales de Pearson para cada par de variables.

Estos análisis se obtuvieron con el paquete estadístico SAS versión 9.4.

5.4 Fase de genotipificación.

5.4.1 Extracción de ADN.

Para la extracción de ADN, se sembraron los genotipos en charolas de poliestireno de doscientas cavidades con turba como sustrato. El tejido vegetal de hojas verdes tiernas y sin daño aparente se obtuvo a los 35 días después de la siembra. Éste se pulverizó con nitrógeno líquido y se trituró.

La extracción de ADN se realizó con el método CTAB (bromuro de alquiltrimetilamonio). La pureza e integridad del ADN se realizó mediante su corrimiento en un gel de agarosa con concentración de 1.5 % y se cuantificó mediante un espectrofotómetro (marca Thermo Scientific modelo NanoDrop Lite) en el laboratorio de Marcadores Moleculares del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo.

La digestión de ADN se realizó con las enzimas BglII y DdeI; posteriormente se purificaron fragmentos de 75 pb, la preparación de las bibliotecas etiquetadas, la cuantificación y secuenciación se realizó con el equipo Ilumna NextSeq 2x75 del Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (Langebio).

5.5 Análisis de datos genotípicos.

5.5.1 Secuenciación del genoma.

La información inicial de la biblioteca genómica generada por el GBS se analizó mediante los softwares NGSEP 4.0.1 y Bowtie 2.3.5.1 con el fin de detectar los SNP e InDels (inserciones o deleciones). Para ello, las secuencias se alinearon con el genoma de referencia Slycopersicum 390, obtenido en la dirección de internet de Phytozome: https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html. Se utilizó el software NGSEP 4.0.1 para la anotación funcional de las variantes, el filtrado y la conversión de VCF a otros formatos para su posterior análisis.

5.6 Análisis de asociación genómica.

Se realizó el análisis de asociación de los SNPs detectados y los Best Linear Unbiased Predictors (BLUPs) obtenidos de Meta-R. Los datos fenotípicos se evaluaron utilizando TASSEL v5.2.60 siguiendo el análisis de componentes principales (PCA) y el modelo lineal general (GLM). Para la identificación de los marcadores (SNP) significativos, se tomó en cuenta la significancia estadística (p-value) de cada una ellos como predictores del comportamiento fenotípico, basado en el modelo lineal mixto ponderado y generado por TASSEL, con lo que se generaron gráficas Manhatan para los caracteres evaluados. A los SNPs con alta significancia estadística se les determinó su ubicación y su asociación con genes descritos dentro del genoma de referencia de *Solanum lycopersicum* ITAG4.0 (https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Evaluación fenotípica.

La infección de *Pythium* ssp en plántulas de tomate se desarrolló rápidamente. En 7 días se mostraron los síntomas característicos de daño por *Pythium*: lesión de color café oscuro en el tallo, poco desarrollo del sistema radical y marchitez (Grijalba et al., 2015). Sin embargo, algunos genotipos no presentaron ningún daño, lo que indicó que el método empleado generó variación necesaria para la identificación de niveles de tolerancia de los genotipos al patógeno.

Figura 1. Sistema radical de plantas infectadas con *Pythium* spp. en la parte superior vs plantas sin infección en la parte inferior.

Figura 2. Tallo de plantas infectadas con *Pythium* spp.

6.2 Análisis estadístico.

Los análisis de varianza (Cuadro 1) mostraron diferencias estadísticas ($p \leq 0.01$) para los factores tratamientos y genotipos en todas las variables evaluadas. Es decir, la inoculación de *Pythium* modificó todas las variables respuesta.

En la interacción tratamiento x genotipo se obtuvo significancia ($p \leq 0.01$) en materia seca de raíz (MSR), área foliar (AF), longitud de raíz (LR) tasa de crecimiento diario (C) lo cual implica que las diferencias en las respuestas de las dos condiciones fitopatógenas no fueron iguales a través de los genotipos.

Por lo cual, se realizaron comparaciones de medias de Tukey de los factores genotipos y tratamientos.

Cuadro 1. Análisis de varianza de caracteres evaluados en plántulas de 95 líneas de tomate inoculadas con *Pythium* spp.

FV	GL	AP		MSR		MSP		MST		AF		LR		C	
TRAT	1	247755.1	**	5.67	**	57.6	**	99.41	**	5142821.4	**	13855.2	**	0.7500	**
GEN	95	4271	**	0.036	**	4.97	**	5.742	**	130330.6	**	4.99691	**	0.0005	**
TRAT*GEN	95	524.5		0.012	**	0.19		0.209		15097.5	**	4.48858	**	0.0002	**
BLOQ	2	41187.9		0.014		33.63		35.02		543754.2		25.42882		0	
ERROR	382	299.1		0.004		0.24		0.266		7324		2.21678		0	
CV		12.1		27.716		14.87		14.7		17		14.03826		0	
MEDIA		143.3		0.236		3.28		3.51		503.4		10.6059		0.092	

FV: fuente de variación, GL: grados de libertad, TRAT: tratamiento, GEN: genotipo, BLOQ: bloques, AP: altura de planta, MSR: materia seca de raíz, MSP: materia seca de parte aérea, MST: materia seca total, AF: área foliar, LR: Longitud de raíz, C: tasa de crecimiento diario, CV: Coeficiente de variación. ** Significativo con P ≤ 0.01.

Los coeficientes de variación (Cuadro 1) fueron bajos al considerar que las plántulas estuvieron sometidas a un fuerte estrés causado por la inoculación de *Pythium* spp., ya que las concentraciones de inóculo (4.16×10^5 propágulos/mL), son excesivamente superiores a las posibles encontradas en condiciones de producción.

Las comparaciones de medias de Tukey para condición fitopatológica (Cuadro 2) indicaron que hubo reducción ($p \leq 0.01$) de crecimiento en todos los genotipos al ser inoculados con el patógeno. Las reducciones afectaron ($p \leq 0.05$) principalmente a la raíz ya que la MSR y LR disminuyeron ($p \leq 0.01$) 59 y 63 %, respectivamente. También hubo fuertes reducciones en el desarrollo de la parte aérea, aunque en menores porcentajes, ya que AP, MSP y AF disminuyeron ($p \leq 0.01$) 25, 17 y 31 %, respectivamente. Este comportamiento se atribuye a que el patógeno al causar daños en el sistema vascular inicialmente demerita el desarrollo radicular, lo que impacta directamente el desarrollo deficiente de la parte aérea (Ferreyra et al., 2015; Grijalba et al., 2015). Asimismo, el sistema de balsa flotante permitió el desarrollo óptimo de *Pythium* spp., ya que formó, liberó y diseminó en forma eficiente oosporas que infectaron el sistema radical impidiendo que la planta absorbiera nutrimentos, por lo que se limitó fuertemente el desarrollo de la parte aérea.

Cuadro 2. Comparaciones de medias para caracteres evaluados del factor tratamiento.

TRATAMIENTO	AP		MSR		MSP		MST		AF		LR		C	
Testigo	164.002	a	0.335637	a	3.59139	a	3.927	a	597.921	a	15.5104	a	0.1289	a
Inoculado	122.523	b	0.137208	b	2.95891	b	3.096	b	408.94	b	5.7	b	0.0563	b
DMS	3.7309		0.0141		0.1051		0.111		18.462		0.32		0	

AP: altura de planta, MSR: materia seca de raíz, MSP: materia seca de parte aérea, MST: materia seca total, AF: área foliar, LR: Longitud de raíz, C: tasa de crecimiento diario, DMS: diferencia mínima significativa.

La tasa de crecimiento (C) diario de altura de plántula, obtenida mediante regresión no lineal, disminuyó ($p \leq 0.01$) 56 % en las plántulas inoculadas con respecto al testigo.

Las comparaciones de medias de genotipos (Cuadro A1) no permiten determinar claramente aquellas líneas sobresalientes en todos los caracteres evaluados. Sin embargo, los genotipos L92D, SS2, L47S8, L47Sinv y Mermaide fueron los más sobresalientes en la mayoría de las características evaluadas.

Debido a que los análisis de comparaciones de medias de la interacción genotipo por tratamiento no permitieron identificar en forma eficiente, aquellos genotipos con mayor tolerancia debido a la alta magnitud de las variaciones dentro de cada tratamiento, se decidió aplicar un análisis de agrupamiento considerando solamente los tratamientos con la presencia de *Pythium*, el dendrograma obtenido con las distancias euclidianas y el algoritmo de la mínima varianza de Ward (Figura 3). El criterio cubico de agrupamiento la pseudo F y pseudo T cuadrada sugirieron una altura de corte con 5 grupos que correspondió a una r cuadrada semiparcial de 0.0373. Sin embargo, este análisis no permite identificar las variables responsables de las agrupaciones generadas.

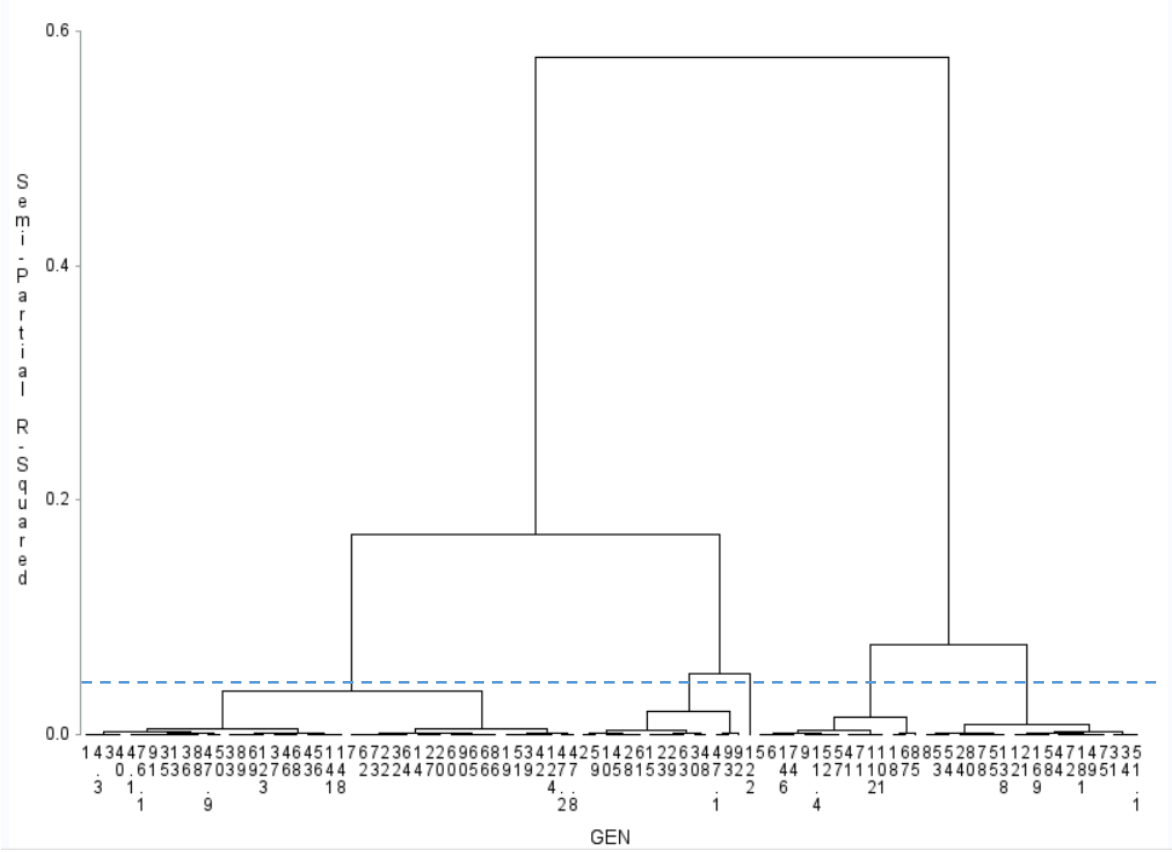


Figura 3. Dendrograma de agrupamiento de 95 líneas de tomate (*Solanum lycopersicum L*.) con inoculación de *Pythium* spp.

Para solventar lo anterior se realizó un análisis discriminante utilizando como criterio de clasificación los grupos del análisis anterior, el cual indicó que las distancias entre centroides de grupos fueron estadísticamente diferentes de cero y que con una sola variante discriminante (VD1) se captó el 97 % de la variabilidad de los datos lo que indica alta eficiencia en las agrupaciones, con un valor propio de 8.98 (Cuadro A2), también atribuida por la alta asociación de los caracteres evaluados ya que todos indican el vigor de las plantas.

Cuadro 3. Estructura canónica total.

Variable	Label	VD1	VD2	VD3	VD4
AP	AP	0.638	0.474	-0.472	0.008
MSR	MSR	0.737	0.087	-0.238	-0.212
MSP	MSP	0.922	-0.202	-0.311	-0.021
AF	AF	0.996	-0.041	0.014	-0.027
LR	LR	0.200	-0.335	0.030	-0.184
C	C	0.104	0.228	0.173	0.910

AP: altura de planta, MSR: materia seca de raíz, MSP: materia seca de parte aérea, AF: área foliar, LR: Longitud de raíz, C: tasa de crecimiento diario, DMS: diferencia mínima significativa.

En el vector característico de VD1 del Cuadro 3, sobresalen MSP y AF como variables de mayor peso, aunque también aparecen AP Y MSR, todos con signo positivo, lo que indica que altos valores de VD1, presentan genotipos con mayor vigor ante la presencia de *Pythium* expresado por dichas variables. Es decir, presentan mayor biomasa y vigor de la parte aérea.

La variable LR no figura como una variable de importancia debido a que al momento de la inoculación del fitopatógeno se generó daño mecánico cortando la raíz, posterior a la infección el sistema radical detuvo su desarrollo.

La prueba de validación cruzada sugirió la necesidad de reagrupar 7 genotipos en diferentes grupos

Las correlaciones lineales de Pearson (Cuadro 4) en condiciones de crecimiento normal, son positivas y tienden a ser altas debido a que los caracteres evaluados son indicadores del crecimiento y vigor de plántulas. En esta condición la MSP con LR y C tuvieron la menor magnitud. En el caso de la tasa de crecimiento (C) no se presentaron asociaciones. Esto es un indicador de la pérdida de organización del crecimiento y del vigor de las plántulas ante el patógeno, que altera el crecimiento. Esto se debe, a que el desarrollo radicular de las plantas está directamente afectado por diversos factores como humedad, temperatura, oxigenación y ataque de patógenos, por lo que, el buen manejo de estos factores impactará directamente en la calidad del sistema radicular y por consiguiente en un mejor desarrollo de la parte aérea de la planta (Ferreyra et al., 2015).

Cuadro 4. Coeficientes de correlación de Pearson de caracteres evaluados en 95 genotipos de tomate inoculados con *Pythium spp*. (debajo de la diagonal) y sin inocular (arriba de la diagonal).

	AP	MSR	MSP	AF	LR	C
AP		0.495 **	0.637 **	0.657 **	0.243 **	0.055
MSR	0.349 **		0.707 **	0.830 **	0.297 **	-0.152
MSP	0.647 **	0.595 **		0.877 **	0.229 **	-0.053
AF	0.633 **	0.587 **	0.871 **		0.238 **	-0.098
LR	-0.008	0.051	0.033	0.111		-0.037
C	0.047	-0.029	-0.043	0.052	-0.007	

AP: altura final, MSR: materia seca de raíz, MSP: materia seca de parte aérea, AF: área foliar, LR: Longitud de raíz, C: tasa de crecimiento de planta. ** Significativo con P ≤ 0.01.

Las tasas de crecimiento diario (Figura 4), obtenidas mediante regresión no lineal, varían de acuerdo con los tratamientos (testigo e inoculado). Se presentó mayor tasa de crecimiento en el tratamiento testigo ($p \leq 0.05$). Esto puede deberse a que el desarrollo de plántulas se reduce considerablemente al interactuar con factores bióticos o abióticos que afectan el desarrollo de raíz, ya que el patógeno redujo ($p \leq 0.05$) 64 % el desarrollo de LR reflejado en la AP, debido a que este tipo de factores dificultan el transporte de agua y nutrimentos hacia los diferentes órganos de la planta, reducen turgencia en los tejidos y limitan el crecimiento de tallo (Taiz et al., 2006).

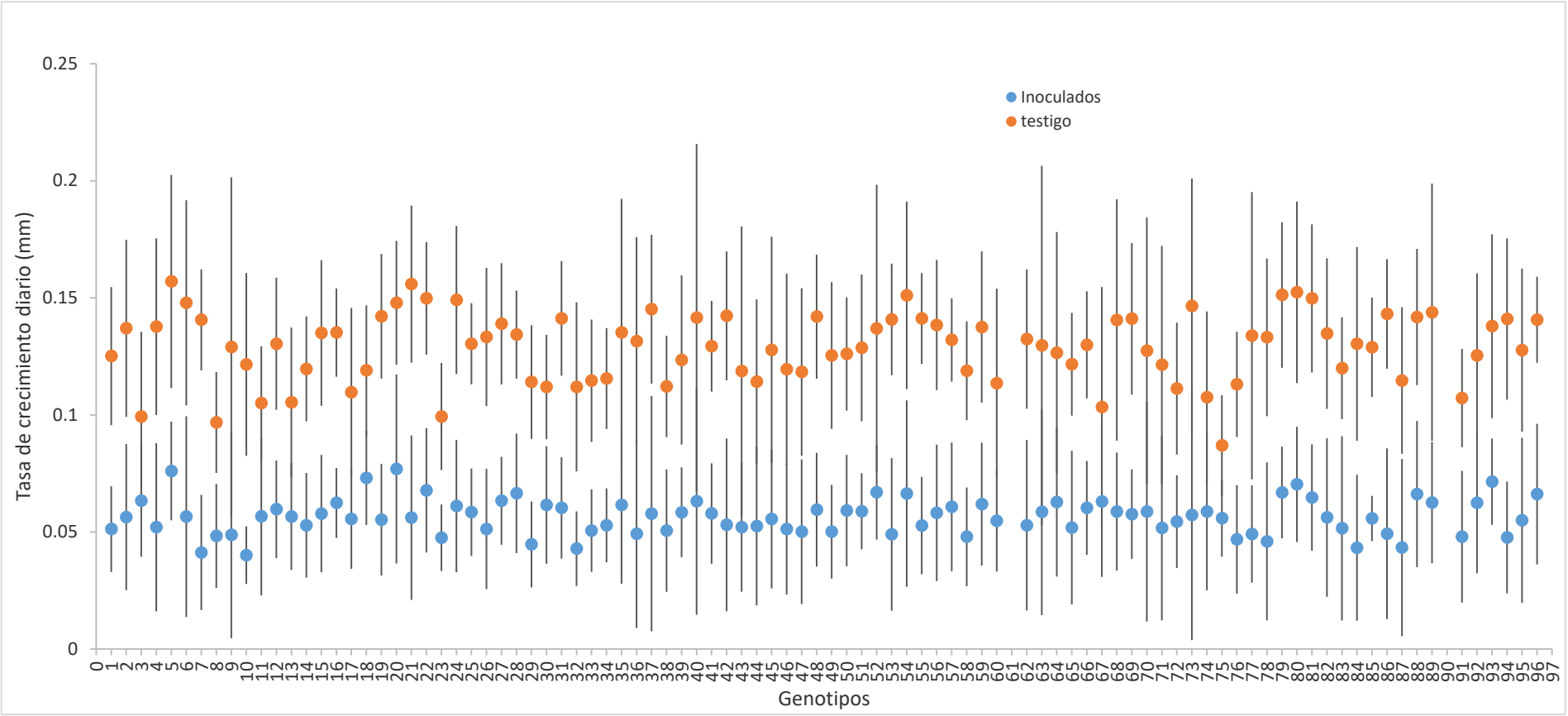


Figura 4. Tasas de crecimiento diario (mm·dia^{-1}) y sus intervalos de confianza al 95 % de 95 líneas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) con y sin inoculación de *Pythium* spp.

6.2 Genotipificación

A partir de los datos obtenidos en archivos iniciales, se realizó el filtrado de datos con los softwares NGSEP 4.0.1 y Bowtie 2.3.5.1 esto con el fin de detectar SNPs e InDels (inserciones o deleciones), lo que llevó a la identificación inicial de 22, 127 marcadores SNPs, de los que finalmente se conservaron 14, 328 para análisis posteriores en GWAS.

6.3 Análisis de asociación genómica

El análisis de asociación genómica (GWAS) integró los 14,328 SNPs detectados con el GBS y los BLUPs (Best Lineal Unbiased Predictor) obtenidos previamente a partir de los registros de caracteres fenotípicos evaluados. El análisis GWAS detectó 70 SNPs significativos asociados a 5 caracteres fenotípicos, de los cuales, 19 están descritos en las distintas versiones del genoma de referencia (Cuadro 5) publicadas en la página web de Phytozome, los 51 SNPs restantes aún no han sido descritos (Cuadro A2).

Dentro de las regiones identificadas y descritas, se sugiere que la región Solyc05g050050.1.1 confiere tolerancia a *Pythium* spp. en tomate ya que se asocia a los genes WRKY una de las familias de factores de transcripción más importantes que regula la respuesta de las plantas al estrés biótico y abiótico (Banerjee et al., 2015). En un estudio realizado en el cultivo de pepino, se identificó que esta familia de genes se expresó en mayor medida en respuesta al ataque de *Pseudoperonospora cubensis* y *Podosphaera fusca* lo que generó mayor tolerancia de las plantas de pepino al estrés causado por dichos patógenos (Chen et al, 2020). En otros cultivos como berenjena, zanahoria, canola y piña, se ha reportado la expresión de genes de la familia WRKY al inducir estrés por salinidad, sequía, calor y frio, lo que sugiere, que esta familia de genes confiere tolerancia a estrés, tanto de tipo biótico, como abiótico, debido a que la red transcripcional de genes WRKY produce proteínas en una amplia gama de procesos biológicos asociados con respuestas a estos tipos de estrés, incluida la producción de compuestos antimicrobianos (por ejemplo fitoalexinas), autofagia,

respuestas reguladas por ácido jasmónico y homeostasis redox (Nan & Gao, 2019; He et al., 2016; Yang et al., 2020; Zhou et al., 2015).

Otra región identificada en el cromosoma 2 de los caracteres AP Y AF que puede conferir tolerancia a estrés es Solyc02g082290.4.1 asociada a proteínas MORC del dominio dedo de zinc (zf)-CW, que participan principalmente en la remodelación de la cromatina inducida por patógenos y la regulación de genes epigenéticos, como la metilación del ADN o las modificaciones de las histonas (Koch et al., 2017). Un estudio realizado en *Arabidopsis thaliana*, mostró que la planta detecta la infección de Turnip Crinkle Virus (TCV), al identificar la presencia de la proteína de la cubierta del TCV, lo cual desencadena la activación de respuestas inmunitarias de las plantas en los sitios de entrada del patógeno, incluidas la mayor expresión de genes de defensa, acumulación de ácido salicílico (hormona de defensa), desarrollo de hipersensibilidad, y muerte celular programada (Kang et al., 2008).

En el cromosoma 11 se localiza la región Solyc11g010620.3.1 que codifica para genes miembros de la familia del complejo de mantenimiento estructural de cromosomas (Structural Maintenance of Chromosomes, SMC), que son máquinas moleculares conservadas evolutivamente encargadas de organizar a los cromosomas a lo largo del ciclo celular, median la compactación de los cromosomas, promueven la reparación del ADN y/o controlan la unión de las cromátidas hermanas en los procesos de meiosis y mitosis (Yang & Pecinka, 2022). En *Arabidopsis*, algunas subunidades de genes de esta familia están implicadas en la reparación del ADN y en el desarrollo de anteras (Bolaños-Villegas et al., 2013); en tanto que otras subunidades de condensina de esta familia influyen directamente el desarrollo de raíces y pelos radicales en plantas de *Arabidpsis* sometidas a estrés por boro (Sakamoto et al., 2011).

La región Solyc11g071390.1.1 codifica la expresión del gen I2, el cual confiere resistencia al ataque por *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici raza 2 en tomate (Gonzalez et al., 2016). El gen I2 codifica una proteína de resistencia, esta región se caracteriza por ser una región repetitiva rica en leucina, lo que le da mayor o menor especificidad ante el ataque del patógeno (Simons et al., 1998).

Cuadro 5. Descripción de SNPs significativos asociados a los caracteres evaluados (AP, AF, LR, MSP Y MSR) en 95 líneas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) del programa de mejoramiento genético de tomate de la Universidad Autónoma Chapingo inoculadas con *Pythium* spp.

Carácter	Cromosoma	p-value	Posición	Transcrito	Descripción
AP	2	5.054	43995142	Solyc02g082290.4.1	PTHR23336//PTHR23336:SF11 - ZINC FINGER CW-TYPE COILED-COIL DOMAIN PROTEIN 3.
AP	2	4.708	43907415	Solyc02g079300.2.1	PTHR12549:SF13 - PROTEIN BINDING / TRANSCRIPTION FACTOR/ ZINC ION BINDING PROTEIN.
AP	5	4.171	59369290	Solyc05g050050.1.1	PF03106 - WRKY DNA-BINDING DOMAIN (WRKY).
AF	2	5.365	43995142	Solyc02g082290.4.1	PTHR23336//PTHR23336:SF11 - ZINC FINGER CW-TYPE COILED-COIL DOMAIN PROTEIN 3.
LR	4	4.277	511143	Solyc04g005770.3.1	PF01535//PF13041 - PPR REPEAT (PPR) // PPR REPEAT FAMILY (PPR_2).
LR	4	2.404	205164	Solyc04g005250.4.1	PTHR23068//PTHR23068:SF12 - DNA CYTOSINE-5- - METHYLTRANSFERASE 3-RELATED
LR	4	2.248	426586	Solyc04g005620.3.1	IPR006459//IPR006702 - CASPARIAN STRIP MEMBRANE PROTEIN
LR	8	2.431	59510825	Solyc08g075300.3.1	PTHR13586//PTHR13586:SF3 - SCD6 PROTEIN-RELATED

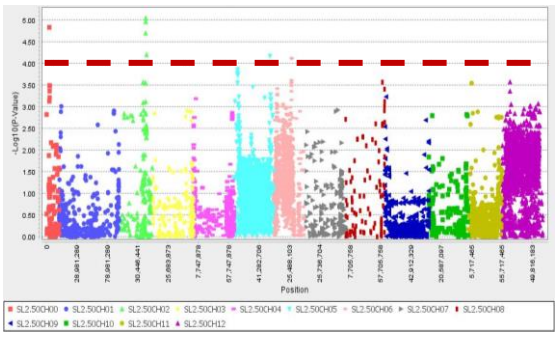
AP: altura final, AF: área foliar, LR: Longitud de raíz

Continuación cuadro 5. Descripción de SNPs significativos asociados a los caracteres evaluados (AF, A.FOL, LR, MSPA Y MSR) en 95 líneas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) del programa de mejoramiento genético de tomate de la Universidad Autónoma Chapingo inoculadas con *Pythium* spp.

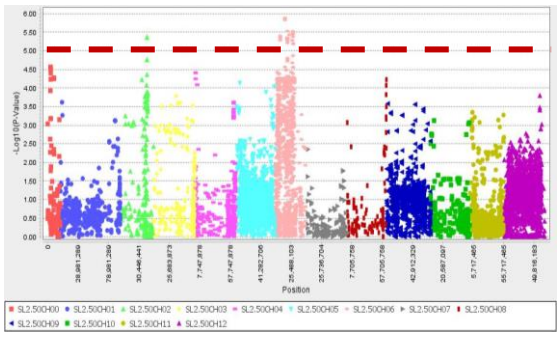
Carácter	Cromosoma	p-value	Posición	Transcrito	Descripción
MSP	2	4.641	43907415	Solyc02g079300.2.1	PTHR12549:SF13 - PROTEIN BINDING / TRANSCRIPTION FACTOR/ ZINC ION BINDING PROTEIN.
MSR	2	3.171	21875932	Solyc02g021180.1.1	2.7.11.1 - NON-SPECIFIC SERINE/THREONINE PROTEIN KINASE / THREONINE-SPECIFIC PROTEIN KINASE.
MSR	2	3.122	43907415	Solyc02g079300.2.1	PTHR12549:SF13 - PROTEIN BINDING / TRANSCRIPTION FACTOR/ ZINC ION BINDING PROTEIN
MSR	3	3.357	62545537	Solyc03g111970.2.1	PF00067 - CYTOCHROME P450 (P450)
MSR	5	3.013	3495128	Solyc05g009350.3.1	PTHR13119:SF12 - PROTEIN SUPPRESSOR OF SABLE.
MSR	9	3.759	1767438	Solyc09g008310.3.1	2.7.7.2 - FAD SYNTHETASE.
MSR	11	4.372	55901282	Solyc11g072700.1.1	PTHR10811//PTHR10811:SF27 - FRINGE-RELATED
MSR	11	3.793	3709639	Solyc11g010620.3.1	PTHR18937//PTHR18937:SF222 - STRUCTURAL MAINTENANCE OF CHROMOSOMES SMC FAMILY MEMBER
MSR	11	3.697	3598973	Solyc11g010550.1.1	K05310 - ETHANOLAMINEPHOSPHOTRANSFERASE (GPI7)
MSR	11	3.467	55176476	Solyc11g071390.1.1	DISEASE RESISTANCE PROTEIN I2 / PF00560 - LEUCINE RICH REPEAT (LRR_1)

MSP: materia seca de parte aérea, MSR: materia seca de raíz.

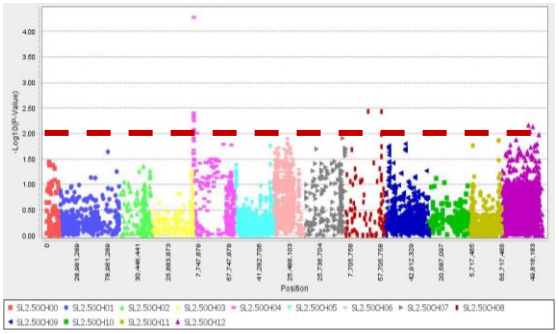
c) Altura final



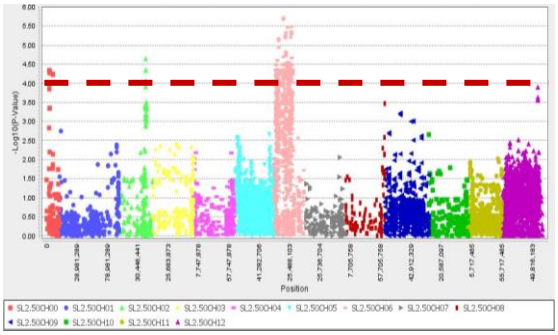
b) Área foliar



a) Longitud de raíz



d) Materia seca parte aérea



e) Materia seca de raíz

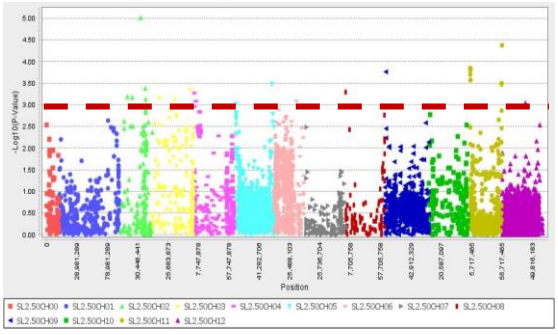


Figura 5. Gráficas de Manhattan de asociación de marcadores de cinco caracteres fenotípicos, construidas a partir de la asociación de 14, 328 SNPs y caracteres fenotípicos, obtenidas en el programa TASSEL v5.2.60 con el modelo lineal general ponderado con 95 líneas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Se consideran significativos los marcadores ubicados por encima de la línea punteada.

7. CONCLUSIONES

Los genotipos inoculados con *Pythium* spp. presentaron reducción en todos los caracteres evaluados altura final, materia seca de raíz, materia seca de parte aérea, área foliar, longitud de raíz y tasa de crecimiento diario. Se identificaron 5 genotipos (L92D, SS2, L47S8, L47Sinv y Mermaide) con mayor tolerancia al ataque de *Pythium* spp. Estos fueron los más sobresalientes en la mayoría de los caracteres evaluados.

El análisis GBS identificó 14, 328 marcadores SNPs los cuales se integraron en conjunto con BLUPs para realizar el análisis GWAS. En el análisis GWAS se detectaron 70 SNPs significativos asociados a los caracteres evaluados altura final, materia seca de raíz, materia seca de parte aérea, área foliar, longitud de raíz, en plántulas inoculadas con *Pythium* spp. del total de los SNPs significativos, únicamente 18 se encuentran descritos en el genoma de referencia de tomate.

Se identificaron tres regiones altamente asociadas con la tolerancia a *Pythium* spp. la región Solyc05g050050.1.1 del cromosoma 5 asociada a la familia de genes WRKY que regula procesos biológicos que confieren tolerancia a estrés de tipo biótico y abiótico, la región Solyc02g082290.4.1 del cromosoma 2 asociada a proteínas MORC del dominio dedo de zinc (zf)-CW, que participan en la remodelación de la cromatina inducida por patógenos y regulación de genes epigenéticos y la región Solyc11g071390.1.1 confiere resistencia al ataque de patógenos de raíz en tomate, por ejemplo, Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici raza 2.

El uso de herramientas como el GWAS permite identificar genotipos sobresalientes para ser empleados en programas de mejoramiento genético.

8. LITERATURA CITADA

Agrios, G. N. (2005). Plant pathology (5th eds.) Elsevier academic Press.

Alseekh, S., Kostova, D., Bulut, M., & Fernie, A. R. (2021). Genome-wide association studies: assessing trait characteristics in model and crop plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *78*(15), 5743-5754. doi: https://doi.org/10.1007/s00018-021-03868-w

Ascencio, A., López, A., Borrego, F., Rodríguez, S. A., Flores, A., Jiménez, F., & Gámez, A. J. (2008). Marchitez vascular del tomate: I. Presencia de razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen en Culiacán, Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, *26*(2), 114-120.

Banerjee, A., & Roychoudhury, A. (2015). WRKY proteins: signaling and regulation of expression during abiotic stress responses. *The Scientific World Journal,* 2015.

Beissinger, T. M., Hirsch, C. N., Sekhon, R. S., Foerster, J. M., Johnson, J. M., Muttoni, G., et al. (2013). Marker density and read depth for genotyping populations using genotyping-by-sequencing. *Genetics* 193, 1073–1081. doi: 10.1534/genetics.112.147710

Bolaños, P., Yang, X., Wang, H. J., Juan, C. T., Chuang, M. H., Makaroff, C. A., & Jauh, G. Y. (2013). Arabidopsis CHROMOSOME TRANSMISSION FIDELITY 7 (AtCTF7/ECO1) is required for DNA repair, mitosis and meiosis. *The Plant Journal*, 75(6), 927-940. doi: 10.1111/tpj.12261.

Botero, K., & Arias, T. (2018). Uso de las ciencias ómicas para el mejoramiento genético de cultivos. *Revista de Ciencias Agrícolas*, *35*(2), 64-78.

Chen, C., Chen, X., Han, J., Lu, W., & Ren, Z. (2020). Genome-wide analysis of the WRKY gene family in the cucumber genome and transcriptome-wide identification of WRKY transcription factors that respond to biotic and abiotic stresses. *BMC Plant Biology*, 20(1), 1-19.

Ellis, R. E., Yuan, J., & Horvitz, H. R. (1991). Mechanisms and functions of cell death. *Annual Review of Cell Biology*, *7*(1), 663-698.

Elshire, R. J., Glaubitz, J. C., Sun, Q., Polonia, J. A., Kawamoto, K., Buckler, E. S., & Mitchell, S. E. (2011). A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PloS One*, *6*(5), e19379. doi: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019379.

Ferreyra, R., Contreras, G., Ahumada, R., Valenzuela, J., & Bravo, R. (2003). Manejo de riego por goteo en uva de mesa cv. Thompson Seedless cultivada en suelos de textura fina. *Agricultura Técnica,* 63(2), 180-192.

Gonzalez, Y., Catanzariti, A. M., Baker, B., Mcgrath, D. J., & Jones, D. A. (2016). Identification of I-7 expands the repertoire of genes for resistance to *F usarium* wilt in tomato to three resistance gene classes. *Molecular Plant Pathology*, 17(3), 448-463.

Grijalba, P. E., Zapata, R. L., Palmucci, H. E., & Baron, C. (2015). Podredumbre basal de plantas adultas de tomate causada por *Pythium aphanidermatum* (Oomycota). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, *50*(1), 11-15.

He, Y., Mao, S., Gao, Y., Zhu, L., Wu, D., Cui, Y., ... & Qian, W. (2016). Genome-wide identification and expression analysis of WRKY transcription factors under multiple stresses in Brassica napus. *PloS One*, 11(6), e0157558.

Herrera, A., Singh, P., Huerta, J., Rosewarne, M., Periyannan, K., Viccars, L & Lagudah, S. (2012). Lr68: a new gene conferring slow rusting resistance to leaf rust in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, *124*(8), 1475-1486.

Intana, W., Yenjit, P., Suwanno, T., Sattasakulchai, S., Suwanno, M., & Chamswarng, C. (2008). Efficacy of antifungal metabolites of Bacillus spp. for controlling tomato damping-off caused by *Pythium aphanidermatum*. *Walailak Journal of Science and Technology (WJST)*, *5*(1), 29-38.

Jannink, J. L., Lorenz, A. J., & Iwata, H. (2010). Genomic selection in plant breeding: from theory to practice. *Briefings in Functional Genomics*, *9*(2), 166-177.

Janzen, G. M., Wang, L., & Hufford, M. B. (2019). The extent of adaptive wild introgression in crops. *New Phytologist*, *221*(3), 1279-1288.

Jimenez, F. R., Maughan, P. J., Alvarez, A., Kietlinski, K. D., Smith, S. M., Pratt, D. B., Elzinga, D. B. & Jellen, E. N. (2013). Assessment of genetic diversity in Peruvian amaranth (*Amaranthus caudatus* and *A. hybridus*) germplasm using single nucleotide polymorphism markers. *Crop Science*, *53*(2), 532-541. doi: https://doi.org/10.2135/cropsci2012.07.0413

Jones, J. B. (2001). *Plagas y enfermedades del tomate* (No. 635.6429). American Phytopathological Society.

Jones, J.B.; Stall, R. E.; Zitter, T. A. *Plagas y enfermedades del tomate*. Ediciones Mundi-Prensa.

Kamoun, S., Furzer, O., Jones, J. D., Judelson, H. S., Ali, G. S., Dalio, R. J., ... & Govers, F. (2015). The Top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, *16*(4), 413-434.

Kang, H. G., Kuhl, J. C., Kachroo, P., & Klessig, D. F. (2008). CRT1, an Arabidopsis ATPase that interacts with diverse resistance proteins and modulates disease resistance to turnip crinkle virus. *Cell Host & Microbe*, 3(1), 48-57.

Kim, M., Jung, J. K., Shim, E. J., Chung, S. M., Park, Y., Lee, G. P., & Sim, S. C. (2021). Genome-wide SNP discovery and core marker sets for DNA barcoding and variety identification in commercial tomato cultivars. *Scientia Horticulturae*, *276*, 109734. doi: https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109734.

Koch, A., Kang, H. G., Steinbrenner, J., Dempsey, D. M. A., Klessig, D. F., & Kogel, K. H. (2017). MORC proteins: novel players in plant and animal health. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1720.

Korte, A., & Farlow, A. (2013). The advantages and limitations of trait analysis with GWAS: a review. *Plant methods*, 9(1), 1-9.

Lorrain, S., Vailleau, F., Balagué, C., & Roby, D. (2003). Lesion mimic mutants: ¿keys for deciphering cell death and defense pathways in plants? *Trends in Plant science*, *8*(6), 263-271.

Martínez, F. E., Cervantes, L., Aíl, C. E., Hernández, L. G., Sánchez, C. L. D. T., & Rueda, E. O. (2016). Hongos fitopatógenos asociados al tomate (*Solanum Lycopersicum* L.) en la Zona Árida del noroeste De México: la importancia de su diagnóstico. *European Scientific Journal*, *12*(18).

Martínez, R., Garza, T. S., Moreno, V. R., Hernández, S., & Mayek, N. (2016). Bases bioquímicas de la tolerancia al estrés osmótico en hongos fitopatógenos: el caso de Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid. *Revista Argentina de Microbiología*, *48*(4), 347-357.

Nan, H., & Gao, L. Z. (2019). Genome-wide analysis of WRKY genes and their response to hormone and mechanic stresses in carrot. *Frontiers in Genetics*, 10, 363.

Nguyen, T. T., Le, N. T., & Sim, S. C. (2021). Genome-wide association study and marker development for bacterial wilt resistance in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Scientia Horticulturae*, *289*, 110418. doi: https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110418

Pelegrín, L. S.; Arias, A.P.; Fajardo, J. P.; Vega, C. T. (2004). Diferenciación de variedades de tomate frente al tizón temprano (*Alternaria solani*) en dos épocas de siembra en el Valle del Cauto. *Granma Ciencia*, 8*(2):* 1-3.

Perea, C., De La Hoz, J. F., Cruz, D. F., Lobaton, J. D., Izquierdo, P., Quintero, J. C., & Duitama, J. (2016). Bioinformatic analysis of genotype by sequencing (GBS) data with NGSEP. *BMC Genomics*, *17*(5), 539-551.

Persley, D., Cooke, T., & House, S. (Eds.). (2010). *Diseases of Vegetable Crops in Australia*. Csiro Publishing.

Punja, Z. K.; Yip R. Biological control of damping-off and root rot caused by *Pythium aphanidermatum* on greenhouse cucumbers. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 2003. 25:4, 411-417

Richter, H., Pezet, R., Viret, O., & Gindro, K. (2005). Characterization of 3 new partial stilbene synthase genes out of over 20 expressed in Vitis vinifera during the interaction with *Plasmopara viticola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *67*(3-5), 248-260.

Rojo, E., Solano, R., & Sánchez-Serrano, J. J. (2003). Interactions between signaling compounds involved in plant defense. *Journal of Plant Growth Regulation*, *22*(1), 82-98.

Sakamoto, T., Inui, Y. T., Uraguchi, S., Yoshizumi, T., Matsunaga, S., Mastui, M., Umeda, M., Fukui, K., & Fujiwara, T. (2011). Condensin II alleviates DNA damage and is essential for tolerance of boron overload stress in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 23(9), 3533-3546. doi: 10.1105/tpc.111.086314.

Servicio de información agroalimentaria y pesquera. (2021). Atlas Agroalimentario 2020. https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2021/Panorama-Agroalimentario-2021

Sim, S. C., Robbins, M. D., Wijeratne, S., Wang, H., Yang, W., & Francis, D. M. (2015). Association analysis for bacterial spot resistance in a directionally selected complex breeding population of tomato. *Phytopathology*, *105*(11), 1437-1445. doi: https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-15-0051-R

Simons, G., Groenendijk, J., Wijbrandi, J., Reijans, M., Groenen, J., Diergaarde, P., Van der Lee, T., Bleeker, M., Onsterk, J., de Both, M., Haring, M., Mes, J., Cornelissen, B., Zabeau, M., & Vos, P. (1998). Dissection of the Fusarium I2 gene cluster in tomato reveals six homologs and one active gene copy. *The Plant Cell*, 10(6), 1055-1068.

Singh, R. P., Huerta-Espino, J., Bhavani, S., Herrera-Foessel, S. A., Singh, D., Singh, P. K., ... & Crossa, J. (2011). Race non-specific resistance to rust diseases in CIMMYT spring wheats. *Euphytica*, *179*(1), 175-186.

Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Fisiologia vegetal* (Vol. 10). Universitat Jaume I.

Tam, V., Patel, N., Turcotte, M., Bossé, Y., Paré, G., & Meyre, D. (2019). Benefits and limitations of genome-wide association studies. *Nature Reviews Genetics*, *20*(8), 467-484. doi: https://doi.org/10.1038/s41576-019-0127-1

Taranto, F., D'Agostino, N., Greco, B., Cardi, T., & Tripodi, P. (2016). Genome-wide SNP discovery and population structure analysis in pepper (*Capsicum annuum*) using genotyping by sequencing. *BMC Genomics*, *17*(1), 1-13.

Torkamaneh, D., Laroche, J., & Belzile, F. (2016). Genome-wide SNP calling from genotyping by sequencing (GBS) data: a comparison of seven pipelines and two sequencing technologies. *PloS One*, *11*(8), e0161333.

van Loon, L. C., Rep, M., & Pieterse, C. M. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Anual. Review of Phytopatholy.*,*44*, 135-162.

Varshney, R. K., Terauchi, R., & McCouch, S. R. (2014). Harvesting the promising fruits of genomics: applying genome sequencing technologies to crop breeding. *PLoS Biology*, *12*(6), e1001883.

Vlot, A. C., Klessig, D. F., & Park, S. W. (2008). Systemic acquired resistance: the elusive signal (s). *Current Opinion in Plant Biology*, *11*(4), 436-442

Walley, J. W. et al. (2007) 'Mechanical Stress Induces Biotic and Abiotic Stress Responses via a Novel cis -Element', *PLos Genetics*, *3*(10), pp. 1800–1812.

Yang, F., & Pecinka, A. (2022). Multiple Roles of SMC5/6 Complex during Plant Sexual Reproduction. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), 4503. doi.org/10.3390/ijms23094503.

Yang, Y., Liu, J., Zhou, X., Liu, S., & Zhuang, Y. (2020). Identification of WRKY gene family and characterization of cold stress-responsive WRKY genes in eggplant. *Peer Journal*, *8*, e8777.

Zamioudis, C., & Pieterse, C. M. (2012). Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *25*(2), 139-150.

Zhou, J., Wang, J., Zheng, Z., Fan, B., Yu, J. Q., & Chen, Z. (2015). Characterization of the promoter and extended C-terminal domain of Arabidopsis WRKY33 and functional analysis of tomato WRKY33 homologues in plant stress responses. *Journal of Experimental Botany*, *66*(15), 4567-4583.

Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E. J., Jones, J. D., Felix, G., & Boller, T. (2004). Bacterial disease resistance in Arabidopsis through flagellin perception. *Nature*, *428*(6984), 764-767.

ANEXO

Cuadro A1. Comparaciones de medias para caracteres evaluados del factor Genotipo.

GENOTIPO	AP		MSR		AF		LR	
L92D	192.00	AB	0.434	A	972.01	A	10.33	ABC
SS2	233.33	A	0.427	AB	945.4	AB	10.00	ABC
MERM	141.33	D-V	0.408	A-C	767.16	A-C	11.42	ABC
L59	170.33	B-J	0.294	A-M	772.95	A-C	10.50	ABC
L47B1	168.28	B-L	0.337	A-I	727.99	B-E	11.75	AB
L2	156.72	B-Q	0.341	A- I	724.52	B-F	10.50	ABC
L51	190.28	A-C	0.322	A-J	706.88	C-G	11.33	ABC
L29	159.61	B-O	0.345	A-H	700.84	C-H	10.67	ABC
L28	151.39	B-T	0.303	A-L	669.54	C-I	11.17	ABC
L45	123.28	J-X	0.321	A- J	673.01	C-I	10.42	ABC
L19	186.83	A-E	0.320	A-J	644.42	C-J	10.75	ABC
L73	159.11	B-O	0.242	D-R	634.47	C-K	11.58	ABC
L10	128.00	H-X	0.351	A-G	638.24	C-K	10.67	ABC
L15	154.94	B-S	0.252	B-R	621.74	C-L	11.08	ABC
L48	182.72	B-F	0.308	A-L	624.55	C-L	10.75	ABC
L65	139.56	E-V	0.237	D-R	605.27	C-M	11.00	ABC
L63	131.61	G-X	0.238	D-R	597.6	D-N	10.08	ABC
L64	148.28	B-T	0.229	E-R	597.91	D-N	10.58	ABC
L27	129.11	H-X	0.166	I-R	598.53	D-N	9.58	BC
L30	170.28	B-J	0.228	E-R	601.01	D-N	11.50	ABC
L42	156.33	B-R	0.229	E-R	582.67	D-O	10.00	ABC
L39	168.72	B-L	0.239	D-R	582.9	D-O	11.08	ABC
L90	155.11	B-S	0.354	A-F	586.55	D-O	11.17	ABC
L47SINV	190.89	A-C	0.259	A-Q	587.34	D-O	10.67	ABC
L91	169.67	B-K	0.367	A-E	588.03	D-O	10.83	ABC
L14	135.17	G-X	0.293	A-O	589.01	D-O	9.92	ABC
L47S8	187.39	A-D	0.285	A-P	573.23	D-P	11.92	AB
L22	127.39	H-X	0.316	A-K	581.49	D-P	11.50	ABC
DMS	47.302		0.179		234.07		4.0723	

AP: altura final, MSR: materia seca de raíz, AF: área foliar, LR: Longitud de raíz, DMS: diferencia mínima significativa. Dentro de columnas, genotipos con la misma letra son estadísticamente iguales ($P \leq 0.05$)

Cuadro A1 continuación.

GENOTIPO	AP		MSR		AF		LR	
L69	146.61	B-U	0.225	E-R	562.92	C-Q	10.67	ABC
L60	162.44	B-M	0.221	E-R	568.49	C-Q	10.42	ABC
L33	138.89	F-V	0.203	E-R	569.25	C-Q	10.50	ABC
L36	162.06	B-M	0.308	A-L	560.19	C-R	11.75	AB
L76-H	151.22	B-T	0.290	A-O	561.37	C-R	10.50	ABC
L7	133.61	G-X	0.341	A-I	543.28	C-S	11.00	ABC
L47S2	189.28	A-C	0.283	A-P	548.86	C-S	10.25	ABC
SS5	141.94	D-V	0.424	A-C	549.56	C-S	13.75	A
L66	161.22	B-M	0.257	A- Q	551.03	C-S	10.67	ABC
L23	155.11	B-S	0.274	A- Q	556.03	C-S	10.33	ABC
L37	110.94	Q-X	0.260	A- Q	516.55	D-T	10.75	ABC
L20	116.56	M-X	0.205	D-R	518.43	D-T	11.50	ABC
L46	131.94	G-X	0.231	D-R	519.91	D-T	10.67	ABC
L43	133.83	G-X	0.227	E-R	524.51	D-T	9.83	ABC
L4-1	174.33	B-H	0.231	D-R	527.17	D-T	10.33	ABC
L35	177.78	B-G	0.251	B-R	528.26	D-T	11.58	ABC
L86	160.00	B-O	0.239	D-R	530.98	D-T	10.17	ABC
L78	130.89	G-X	0.246	C-R	507.07	E-T	10.83	ABC
L62	137.06	F-X	0.242	D-R	509	E-T	11.42	ABC
L32	133.11	G-X	0.217	E-R	502.71	E-U	9.08	BC
L13	160.11	B-M	0.253	B-R	498.65	E-V	11.83	AB
L50	168.39	B-L	0.262	A-Q	491.37	F-W	11.83	AB
L1	184.11	B-F	0.230	D-R	491.87	F-W	10.67	ABC
L68	117.17	M-X	0.204	E-R	488.69	G-W	9.08	BC
L89	160.06	B-O	0.307	A-L	488.76	G-W	9.92	ABC
RF48	121.89	L-X	0.246	C-R	474.49	G-X	10.83	ABC
L3	144.11	C-V	0.267	A-Q	475.16	G-X	9.75	ABC
L24	123.39	J-X	0.301	A-M	475.98	G-X	10.33	ABC
L88	158.39	B-P	0.170	H-R	466.89	H-X	11.25	ABC
L4-3	173.44	B-I	0.210	E-R	469.22	H-X	9.92	ABC
RF41	119.44	M-X	0.243	D-R	444.41	I-X	12.25	AB
L75	125.61	J-X	0.131	L-R	446.73	I-X	10.42	ABC
L8	111.78	P-X	0.238	D-R	454.07	I-X	9.92	ABC
L56	123.61	J-X	0.193	E-R	454.58	I-X	11.92	AB
RF38	139.06	F-V	0.256	A-Q	461.75	I-X	9.92	ABC
L55	122.94	K-X	0.185	F-R	418.79	J-Y	10.50	ABC
L21	158.00	B-Q	0.168	H-R	421.12	J-Y	10.83	ABC
L40	139.28	F-V	0.196	E-R	422.64	J-Y	12.00	AB
DMS	47.302		0.179		234.07		4.0723	

AP: altura final, MSR: materia seca de raíz, AF: área foliar, LR: Longitud de raíz, DMS: diferencia mínima significativa. Dentro de columnas, genotipos con la misma letra son estadísticamente iguales ($P \leq 0.05$)

Continuación cuadro A1.

GENOTIPO	AP		MSR		AF		LR	
L53	104.94	T-X	0.217	E-R	426.69	J-Y	9.83	ABC
L80	141.61	D-V	0.208	E-R	429.94	J-Y	8.58	BC
L44	157.00	B-Q	0.189	E-R	410.79	J-Z	11.00	ABC
L54	106.67	T-X	0.218	E-R	414.43	J-Z	9.92	ABC
L12	144.06	C-V	0.174	G-R	407.44	L-Z	10.75	ABC
RF81	128.78	H-X	0.191	E-R	408.57	L-Z	9.75	ABC
L49	138.56	F-V	0.155	J-R	396.65	L-Z	9.33	BC
L58	161.39	B-M	0.155	J-R	379.37	M-Z	11.67	ABC
L74	147.61	B-T	0.145	J-R	360.21	O-Z	9.33	BC
L72	120.17	M-W	0.175	H-R	369.12	N-Z	11.83	AB
L31	106.72	T-X	0.182	F-R	369.19	N-Z	11.00	ABC
RF69	151.33	B-T	0.122	M-R	348.52	P-Z	10.25	ABC
L5	137.78	G-V	0.166	I-R	337.96	Q-Z	9.75	ABC
L34	97.78	V-X	0.118	N-R	338.28	Q-Z	10.42	ABC
L51-H	89.83	X	0.176	F-R	338.41	Q-Z	9.92	ABC
RF46	113.39	O-X	0.165	I-R	328.27	R-Z	9.83	ABC
L52	107.89	S-X	0.102	QR	325.8	S-Z	7.67	C
L57	100.11	U-X	0.123	M-R	302.22	T-Z	9.17	BC
L6	121.56	L-X	0.226	E-R	307.39	T-Z	11.67	ABC
L9	98.67	V-X	0.140	K-R	308.12	T-Z	9.17	BC
L71	146.94	B-U	0.163	I-R	308.53	T-Z	11.25	ABC
RF1	137.56	F-W	0.134	L-R	271.93	U-Z	10.58	ABC
L18	117.78	M-X	0.152	J-R	267.88	V-Z	11.58	ABC
L11-4	106.50	T-X	0.121	N-R	263.31	W-Z	9.75	ABC
RF12	126.83	I-X	0.146	J-R	263.86	W-Z	10.75	ABC
L41	109.11	R-X	0.109	P-R	250.85	X-Z	11.33	ABC
L85	113.67	N-X	0.113	O-R	207.58	YZ	10.25	ABC
L67	90.89	XW	0.076	R	181.96	Z	8.42	BC
DMS	47.302		0.179		234.07		4.0723	

AP: altura final, MSR: materia seca de raíz, AF: área foliar, LR: Longitud de raíz, DMS: diferencia mínima significativa. Dentro de columnas, genotipos con la misma letra son estadísticamente iguales ($P \leq 0.05$)

Cuadro A2. Análisis Discriminante Canónico.

	Correlación canonica	Correlación canonica ajustada	Error estándar aproximado	Correlación canonica cuadrada	Eigenvalues of Inv(E)*H =CanRsq/(1-CanRsq)			Prueba de H0: Las correlacicones canonicas en estas columnas son cero					
					Eigenvalue	Diferencia	Proporción	Acumulativo	Likelihood Ratio	Valor de F aproximado	Num DF	Den DF	Pr > F
1	0.948	0.944	0.010	0.899	8.989	8.7758	0.97	0.9706	0.077	13.53	24	301.23	<.0001
2	0.419	0.351	0.084	0.175	0.213	0.1564	0.02	0.9937	0.778	1.52	15	240.57	0.098
3	0.231	0.161	0.097	0.053	0.056	0.0551	0.006	0.9998	0.944	0.64	8	176	0.747
4	0.041	-0.200	0.102	0.001	0.001		0.0002	1	0.998	0.05	3	89	0.985

Cuadro A3. SNPs no identificados en el genoma de referencia de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) asociados a los caracteres evaluados (AP, AF, LR, MSPA Y MSR) en 95 líneas de tomate del programa de mejoramiento genético de la Universidad Autónoma Chapingo.

Carácter	Cromosoma	p-value	Posición	Transcrito	Descripción
AP	2	4.970	43995098	NA	NA
AP	2	4.208	45308326	NA	NA
AP	6	4.122	29356614	NA	NA
AF	6	5.879	15698021	NA	NA
AF	6	5.827	15698049	NA	NA
AF	6	5.528	19799572	NA	NA
AF	6	5.514	28859853	NA	NA
AF	6	5.470	28822925	NA	NA
AF	6	5.432	22754583	NA	NA
AF	6	5.397	7993004	NA	NA
AF	6	5.344	7993018	NA	NA
AF	6	5.344	19883337	NA	NA
AF	6	5.294	19883262	NA	NA
AF	6	5.282	7992990	NA	NA
AF	6	5.282	27823109	NA	NA
AF	6	5.215	19883275	NA	NA
AF	6	5.190	29356614	NA	NA
LR	4	2.311	532294	NA	NA
LR	8	2.435	37523832	NA	NA
MSP	6	5.719	15698021	NA	NA
MSP	6	5.668	15698049	NA	NA
MSP	6	5.482	28859853	NA	NA
MSP	6	5.461	22754583	NA	NA
MSP	6	5.351	28859910	NA	NA
MSP	6	5.333	19799572	NA	NA
MSP	6	5.288	28822924	NA	NA
MSP	6	5.249	19168569	NA	NA
MSP	6	5.199	27823109	NA	NA
MSP	6	5.186	19168472	NA	NA
MSP	6	5.175	7993018	NA	NA
MSP	6	5.116	7992990	NA	NA
MSP	6	4.936	7993004	NA	NA
MSP	6	4.820	19883337	NA	NA
MSP	6	4.760	19883262	NA	NA
MSP	6	4.719	19883275	NA	NA
MSP	6	4.689	15697984	NA	NA
MSP	6	4.663	29356614	NA	NA
MSR	2	5.009	35587340	NA	NA
MSR	2	3.377	43272667	NA	NA

AP: altura final, AF: área foliar, LR: Longitud de raíz, MSP: materia seca de parte aérea, MSR: materia seca de raíz

Continuación Cuadro A3.

Carácter	Cromosoma	p-value	Posición	Transcrito	Descripción
MSR	2	3.183	13798965	NA	NA
MSR	3	3.156	11744413	NA	NA
MSR	3	3.118	37048725	NA	NA
MSR	4	3.268	1188985	NA	NA
MSR	4	3.080	3830613	NA	NA
MSR	5	3.478	62603253	NA	NA
MSR	6	3.088	37037035	NA	NA
MSR	8	3.290	356802	NA	NA
MSR	11	3.841	3678472	NA	NA
MSR	11	3.569	4012908	NA	NA
MSR	11	3.496	55118012	NA	NA
MSR	12	3.037	38645153	NA	NA

MSR: materia seca de raíz