



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE

PREGRADO

“Identificación y análisis de QTLs para el contenido de componentes fenólicos presente
en variedades de ciruelo asiático (*Prunus salicina L.*)”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los
requisitos para optar al Título de Ingeniería en Biotecnología Molecular

DIEGO IGNACIO VALDERRAMA SOTO

Director del Seminario de Título: Igor Pacheco Cruz

Patrocinante: Michael Handford

Septiembre 2020
Santiago – Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el **Sr Diego Ignacio Valderrama Soto**.

“Identificación y análisis de QTLs para el contenido de componentes fenólicos presente en variedades de ciruelo asiático (*Prunus salicina L.*)”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniería en Biotecnología Molecular.

Director Seminario de Título: _____

Comisión Revisora y Evaluadora

Presidente Comisión: _____

Evaluador: _____

Santiago de Chile,.....

Biografía



Nací el 4 de agosto de 1993 en la comuna de Santiago. Desde los 5 años vivo en Puente Alto. Toda mi enseñanza básica y media la desarrollé en el colegio polivalente Domingo Matte Mesías ubicada en Puente Alto.

En 2012 ingresé a Bachillerato en la Universidad de Chile, graduándome el año 2014 como bachiller con mención en Ciencias Naturales y Exactas. Ese mismo año ingresé a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular, de la cual me licencié el año 2018 obteniendo el grado de licenciado en Ingeniería en Biotecnología Molecular.

El año 2017 ingresé como voluntario en Fundación Daya, organización sin fines de lucro orientada en la investigación y promoción de terapias alternativas orientadas a aliviar el sufrimiento humano, promoviendo principalmente la terapia en base al uso de extractos artesanales de cannabis, ayudando a miles de personas a recobrar su calidad de vida frente a diversas patologías en las que el cannabis se ha visto jugar un papel importante en cuanto a paliar el dolor generado por estas patologías.

El tiempo que estuve en esta fundación me ayudó indirectamente a confirmar mi pasión por las ciencias y cómo esta debe estar al servicio de la sociedad y no en élites científicas.

Dedicatoria

Este seminario de título se lo dedico en primera instancia a mis padres por su amor sin condiciones, por siempre apoyarme en cada una de mis decisiones y por todo el sacrificio que han realizado para sacar adelante a 6 hij@s, dándonos lo mejor que pudieron y las mejores oportunidades para poder desarrollarnos como excelentes profesionales. Si estamos en donde estamos es sin duda por todo lo que ustedes hicieron por nosotros y por eso estaré eternamente agradecido de tenerlos como padres.

A mis herman@s Pamela, Belén, Seba, Cony y Javier por siempre estar apoyándome y soportarme mis periodos de estrés provocados por la vida universitaria, por comprender mis locuras y estar allí siempre para hacer más amena la vida. No siempre es color de rosa vivir en una familia numerosa, pero después de cada pelea nuestros lazos se hacen más fuertes. Los amo mucho, a pesar de que no se los diga siempre, estoy trabajando en ello ;).

Agradecimientos

Primero quisiera agradecer a mi director de seminario, Igor Pacheco por aceptarme en su grupo y siempre estar motivándome a aprender más sobre genética y bioinformática, por darme la libertad de desarrollarme como investigador respetando mis tiempos. También agradecerle por no solo ser mi director sino un compañero y amigo con el que siempre se puede contar incondicionalmente. Gracias por confiar en mí.

A Ailynne y Claudia por tener la disposición y paciencia de enseñarme todo lo necesario para haber realizado este seminario, ayudándome a resolver cada contratiempo que se me presentó.

A mis amigos de la vida y de la carrera, gracias por su compañía y hacer este recorrido más grato, cuento con la fortuna de tener a mi lado gente buena, apañadora y que se alegran por el éxito del que está al lado, eso vale más que todo el maldito dinero de este mundo.

A Sci-hub, por democratizar el conocimiento a cualquiera que busca la información, como siempre debió ser, quitándole poder a la élite científica.

Finalmente quisiera agradecer a las instituciones en las que trabajé para realizar este seminario. Al laboratorio de Bioinformática y Expresión Génica del INTA y al laboratorio de la Calidad de la Fruta de la facultad de Agronomía.

Este trabajo de seminario de título se enmarca en el contexto del Proyecto Fondecyt Regular n°1191446.

Tabla de contenido

Índice de tablas.....	7
Índice de figuras	8
RESUMEN.....	2
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN.....	5
Compuestos fenólicos y su importancia en la salud humana.....	5
Biosíntesis de compuestos fenólicos	6
Análisis de QTLs: interacción entre genética cuantitativa y genómica	12
<i>Prunus salicina</i> L. como modelo de estudio	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
Material vegetal.....	20
Evaluación de la calidad de la fruta	20
Cuantificación familias de fenoles y actividad antioxidante (AOX)	20
Maceración y extracción compuestos fenólicos	21
Ensayos espectrofotométricos	22
Determinación de antocianos por HPLC.....	24
Caracterización de peaks de antocianos presentes en ciruelo asiático	25
Análisis de datos fenotípicos: generación de histogramas y correlaciones	25
Determinación heredabilidad.....	26
Determinación BLUPs	27
Mapas de ligamiento de parentales	27
Análisis de QTL por marcadores o intervalos simples (KW e IM)	28
Análisis de Modelos de Múltiples QTL (MQM).....	29
RESULTADOS	31
Detección y cuantificación de familias de fenoles y actividad antioxidante (AOX) mediante espectrofotometría.....	31
Detección y cuantificación de antocianinas individuales mediante HPLC	32
Contenidos de compuestos fenólicos en 98ang	33
Correlaciones entre contenidos de compuestos fenólicos.	36
Correlaciones de contenidos de compuestos fenólicos entre temporadas.....	38
Correlaciones entre contenidos de compuestos fenólicos y rasgos agronómicos.....	39
Generación de modelos lineales mixtos y estimaciones de BLUPs.	41
Análisis de QTLs	44

DISCUSIÓN.....	50
La influencia ambiental en los compuestos fenólicos	50
Desde el desarrollo del fruto.....	51
Identificación de QTLs asociados a compuestos fenólicos	53
Proyecciones.....	57
CONCLUSIONES	58
BIBLIOGRAFÍA.....	59
Anexo	65
Anexo 1. Tabla rasgos fenotipicos analizados.....	65
Anexo 2. Curvas de calibración para ensayos espectrofotométricos y HPLC.	65
Anexo 3. Identificación tentativa de antocianinas detectadas.	65
Anexo 4. Distribución de datos de familias de fenoles y antocianos individuales.	65
Anexo 5. Perfil HPLC de antocianinas presentes en variedades disponibles de ciruela.	66
Anexo 6. Correlación de Pearson entre ensayos espectrofotométricos.	66
Anexo 7. Variables fijas y aleatorias, varianza, heredabilidad y valor de ajuste para modelos lineales mixtos de caracteres asociados a compuestos fenólicos en pulpa. ...	66
Anexo 8. Variables fijas y aleatorias, heredabilidad y valor de ajuste para modelos lineales mixtos de caracteres asociados a compuestos fenólicos en piel.	66
Anexo 9. Gráficos de distribución de residuos MLM en pulpa.	66
Anexo 10. Gráficos de distribución de residuos MLM en piel.....	67
Anexo 11. Gráficos Q-Q Normal de residuos MLM en pulpa.	67
Anexo 12. Gráficos Q-Q Normal de residuos MLM en piel.	67
Anexo 13. Grupos de ligamiento con QTLs obtenidos en ciruelos asiáticos “98.99” y “Angeleno”, mediante análisis de QTL.....	67
Anexo 14. Scripts usados para los distintos análisis realizados en R (R Core Team, 2018).....	68

Índice de tablas

Tabla 1. Rangos de concentración y principales parámetros de curvas de calibración de estándares usados para ensayos espectrofotométricos y HPLC.	
.....	31
Tabla 2. Parámetros estadísticos descriptivos de contenido de compuestos fenólicos en mesocarpo.....	35
Tabla 3. Parámetros estadísticos descriptivos de contenido de compuestos fenólicos en exocarpo.....	36
Tabla 4. Coeficientes de correlación Spearman (ρ) para compuestos fenólicos en tejidos de piel y pulpa.	39
Tabla 5. QTLs detectados en progenie 99xang mediante análisis Mapeo Múltiple de QTLs (MQM) y Kruskal Wallis (KW).	47

Índice de figuras

Figura 1. Ruta biosintética de flavonoides en <i>Prunus salicina</i> L..	8
Figura 2. Representación gráfica del proceso de obtención de extractos metanólicos para análisis por HPLC y por ensayos espectrofotométricos.	21
Figura 4. Matriz de correlaciones de rasgos fenotípicos.	41
Figura 6: QTLs detectados en LG8 de parental materno “Angeleno”	48
Figura 7: QTLs detectados en LG4 de parental materno “98.99”	49

Lista de abreviaturas

AOX: actividad AntiOXidante

ANOVA: *ANalysis Of VAriance*

bHLH: *basic Helix-Loop-Helix*

BLUP: *Best Linear Unbiased Prediction*

DPPH: 2.2-difenil-1-picrylhydrazyl

EBGs: *Early Biosynthetic Genes*

ETR1: *Ethylene Receptor 1*

ERS1: *Ethylene Response Sensor 1*

ERF: *Ethylene-Responsive Factor*

FBPM: Fenoles de Bajo Peso Molecular

FRAP: *Ferric Reducing Antioxidant Power*

GBS: *Genotyping by Sequencing*

GFS9: *Green Fluorescent Seed 9*

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*

HPLC-DAD: HPLC acoplado a Detector de red de diodos (DAD, del inglés *Diode Array Detector*)

LBGs: *Late Biosynthetic Genes*

LOD: *Log of Odds*

MBW: complejo proteico MYB-bHLH-WDR

MYB: **myeloblastosis**

NAC: NAM (*No Apical Meristem*)-ATAF (*Arabidopsis Transcription Activation Factor*)-CUC (*Cup-Shaped Cotyledon*)

ODEPA: Oficina de Estudios y Políticas Agrarias

QTL: *Quantitative Trait Locus*

RB: Réplica Biológica

SNARE: **SNAP** (*Soluble NSF Attachment Protein*) **Receptor**

SNPs: *Single Nucleotide Polymorphisms*

WDR: *Tryptophan-Aspartic Acid Repeat*

RESUMEN

El consumo de frutas que contienen compuestos con actividad antioxidante (entre ellos los compuestos fenólicos) está asociado con un impacto benéfico a la salud humana, dado su efecto protector frente a enfermedades no transmisibles asociadas a estrés oxidativo y que han ido en aumento en cuanto a su prevalencia a nivel mundial. En Chile, el ciruelo asiático (*Prunus salicina* L.) es el segundo carozo con mayor producción y puede acumular más de 40 compuestos fenólicos, los cuales se encuentran en distintas concentraciones, dependiendo de la variedad y de las condiciones ambientales, sugiriendo que el contenido de compuestos fenólicos es un carácter cuantitativo. Los QTL (*loci* de carácter cuantitativo) responsables de la variación en el contenido de compuestos fenólicos aún no han sido definidos en ciruela. El objetivo de este seminario de título es identificar los QTLs que controlan el contenido de compuestos fenólicos en el fruto del ciruelo asiático. Para ello se escogieron 92 individuos de la progenie F1 del cruce <“98.99” x “Angeleno”> (en adelante “98Ang”), cuyos individuos presentan diferencias en el contenido de antocianos y de familias de compuestos fenólicos en las frutas, utilizando HPLC y técnicas espectrofotométricas (fenoles, flavonoides y proantocianidinas totales, determinación de la actividad antioxidante mediante DPPH y FRAP), desde extracciones metanólicas de mesocarpo y exocarpo de frutos a maduración comercial. Con estos datos se llevaron a cabo modelos lineales mixtos y análisis de QTLs vía MapQTL, para determinar la asociación fenotipo-genotipo de compuestos fenólicos. Se encontraron 13 QTLs en “98.99” y 8 QTLs en “Angeleno”, asociados a compuestos fenólicos. Estos resultados serán útiles para mejorar la eficiencia en programas de mejora genética asistido por marcadores moleculares

para la generación de variedades de ciruelo asiático con mayor impacto positivo para la salud humana.

ABSTRACT

The consumption of fruits containing compounds with antioxidant activity (among them phenolic compounds) is associated with a protective effect against non-communicable diseases associated with oxidative stress and which have been increasing in terms of its prevalence worldwide. In Chile, the Asian plum (*Prunus salicina* L.) is the second-highest produced stone fruit and can accumulate more than 40 phenolic compounds, which are found in different concentrations, depending on the variety and environmental conditions, suggesting that the content of these compounds is a quantitative trait. The QTLs (quantitative trait *loci*) responsible for the variation in the content of phenolic compounds have not yet been defined in plum. The objective of this seminar title is to identify the QTLs that control the content of phenolic compounds in the Asian plum fruit. For this, we choose 92 F1 seedlings from the cross <"98.99" x "Angeleno"> (hereon "98Ang"), presenting differences in the content of anthocyanins and phenolic compounds in the fruits. These samples were also analyzed using HPLC and spectrophotometric techniques (phenols, flavonoids and proanthocyanidins total, determination of antioxidant activity by DPPH and FRAP), from methanolic extractions of mesocarp and exocarp of commercially ripened fruits. With these data, mixed linear models and analysis of QTLs were carried out via MapQTL, to determine the phenotype-genotype association of phenolic compounds. There were 13 QTLs in the parent "98.99" and 8 QTLs in the parent "Angeleno", associated with phenolic compounds. These results will be useful to improve the efficiency of genetic improvement programs assisted by molecular markers for the generation of Asian plum varieties with an increased positive impact on human health.

INTRODUCCIÓN

Compuestos fenólicos y su importancia en la salud humana

Dentro de una nutrición sana, el consumo de frutas y vegetales es fundamental, ya que constituyen fuentes notables de fitonutrientes y compuestos bioactivos, sumado al aporte energético y de fibras, necesarios en la ingesta diaria (Pereira y Ludwig, 2001; Shulaev y col., 2008; WHO, 2014). Entre estos componentes destacan los compuestos fenólicos, por ser uno de los grupos de metabolitos secundarios más numerosos y ubicuos en el reino vegetal (Naczk y Shahidi, 2004). Estos compuestos son producidos por las plantas en distintos órganos y con diversos fines, tales como pigmentación de tejidos (Howell, 1974; Konczak-Islam y col., 2003), mecanismo de defensa contra patógenos (Beckman, 2000), protección frente a condiciones climáticas adversas como alta radiación ultravioleta (Howell, 1974; Jeandet y col., 2002), atracción de polinizadores (Jakubská y col., 2005; Zhang y col., 2016) y componentes estructurales en las plantas, por ejemplo fenoles insolubles, como la lignina y el ácido hidroxicinámico, los cuales son componentes importantes de la pared celular, sirviendo como sostén mecánico, teniendo un rol regulatorio en el crecimiento celular (Naczk y Shahidi, 2004; Ogah y col., 2014). Los compuestos fenólicos son sintetizados a partir de las vías del ácido shikímico, ácido malónico y de los fenilpropanoides, estando representados principalmente por flavonoides y ácidos fenólicos (Haminiuk y col., 2012; Ogah y col., 2014). Se caracterizan por poseer al menos un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilos, permitiendo entregar un átomo de hidrógeno (electrón) a especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*), neutralizando a estos radicales libres, siendo esa conjugación estructural la que otorga propiedades antioxidantes a estas moléculas (Balsano y Alisi, 2009). Es esta propiedad antioxidante la que ha llevado a los compuestos fenólicos ganar un gran interés

los últimos años, pues se ha correlacionado el consumo diario de frutas de alto contenido de fenoles con beneficios a la salud humana, al ejercer un efecto protector frente a enfermedades asociadas a estrés oxidativo celular y al envejecimiento, tales como enfermedades cardiovasculares, diabetes, Parkinson, entre otras (Haminiuk y col., 2012; Jaiswal y col., 2013; Verdu y col., 2014).

Las Rosáceas son una de las familias con más integrantes en el reino de las plantas, incluyendo alrededor de 100 géneros y 3000 especies aproximadamente, entre las que destacan miembros de importancia comercial tales como el ciruelo, manzano, durazno, almendro, pera y cereza, entre otros (Shulaev y col., 2008; Ogah y col., 2014). Los frutos de estas especies contienen una alta riqueza y diversidad en compuestos fenólicos que, además de los atributos nutricionales anteriormente mencionados, son responsables de propiedades organolépticas como el amargor, astringencia, color y aroma (Naczk y Shahidi, 2004; Verdu y col., 2014). Uno de los grupos más importantes de los compuestos fenólicos presentes en los frutos son los flavonoides, los cuales a su vez se subdividen en siete categorías: flavonoles, flavanoles, antocianinas, isoflavonas, dihidrochalconas, flavonas y flavononas, encontrándose en *Rosaceae* las cinco primeras categorías (Ogah y col., 2014), siendo las antocianinas las más destacadas por sus beneficios a la salud humana al poseer actividad antioxidante, antiinflamatoria, antidiabética, entre otros beneficios (Garzón, 2008; González y col., 2016).

Biosíntesis de compuestos fenólicos

La ruta de biosíntesis de flavonoides tiene como precursores a tres moléculas de malonil-CoA (provenientes de la ruta del ácido malónico) y a una molécula de 4-coumaril-CoA. Esta última proviene desde la vía del ácido shikímico, donde a partir de fosfoenolpiruvato (PEP) y de eritrosa-4-fosfato se obtiene, tras una serie de reacciones, el ácido shikímico, el cual

es convertido a corismato, quien por medio de la vía de prefenato dará como uno de sus productos a fenilalanina, la cual es base de la vía general de fenil-propanoides, en donde se genera al sustrato común de la biosíntesis de compuestos fenilpropanoicos, 4-coumaril-CoA. La fenilalanina es convertida en ácido cinámico por la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL), para luego ser hidrolizado por la ácido cinámico 4-hidroxilasa (C4H), para generar ácido p-coumárico, el cual finalmente es convertido a 4-coumaril-CoA por la enzima 4-coumaril/CoA ligasa (4CL) (Vermerris y Nicholson, 2006; Cheng y col., 2016). La biosíntesis de flavonoides (Figura 1) sigue con la condensación de tres moléculas de malonil-CoA y la molécula de 4-coumaril-CoA mediante chalcona sintasa (CHS) generándose naringenina chalcona, la cual tras una serie de reacciones de hidroxilación y reducción catalizadas por chalcona isomerasa (CHI), flavonona 3-hidroxilasa (F3H) y flavonoide 3'-hidroxilasa (F3'H) dará paso a la formación de los dihidroflavonoles, dihidrokaemferol y dihidroquercetina, respectivamente. Estos dihidroflavonoles son precursores base para flavonoles, antocianinas y proantocianidinas. Los genes codificantes de estas enzimas han sido clasificados como genes biosintéticos tempranos (EBGs, del inglés *Early Biosynthetic Genes*), mientras que aquellos que siguen río abajo en la biosíntesis de flavonoides reciben el nombre de genes biosintéticos tardíos (LBGs, del inglés *Late Biosynthetic Genes*). Flavonol sintasa (FLS) cataliza la desaturación de dihidrokaemferol y dihidroquercetina, agregando un doble enlace entre C2 y C3, produciendo los flavonoles kaempferol y quercetina respectivamente. La dihidroflavonol 4-reductasa (DFR) cataliza la reducción de dihidroquercetina a leucoantocianidina, la cual es deshidratada por leucoantocianidina dioxigenasa/antocianidina sintasa (LDOX/ANS) para formar cianidina. UDP-flavonoide 3-O-glucosiltransferasa (UFGT) cataliza la galactosilación de cianidina a cianidina 3-glucósido. Finalmente, tanto leucoantocianidina reductasa (LAR) como antocianidina reductasa (ANR) catalizan reacciones de reducción de antocianidinas a flavan-3-oles, en donde LAR reduce

leucocianidina en catequina, mientras que ANR reduce cianidina en epicatequina (Vermerris y Nicholson, 2006; Morishita y col., 2009; Jaakola, 2013; Xu y col., 2015; Cheng y col., 2016).

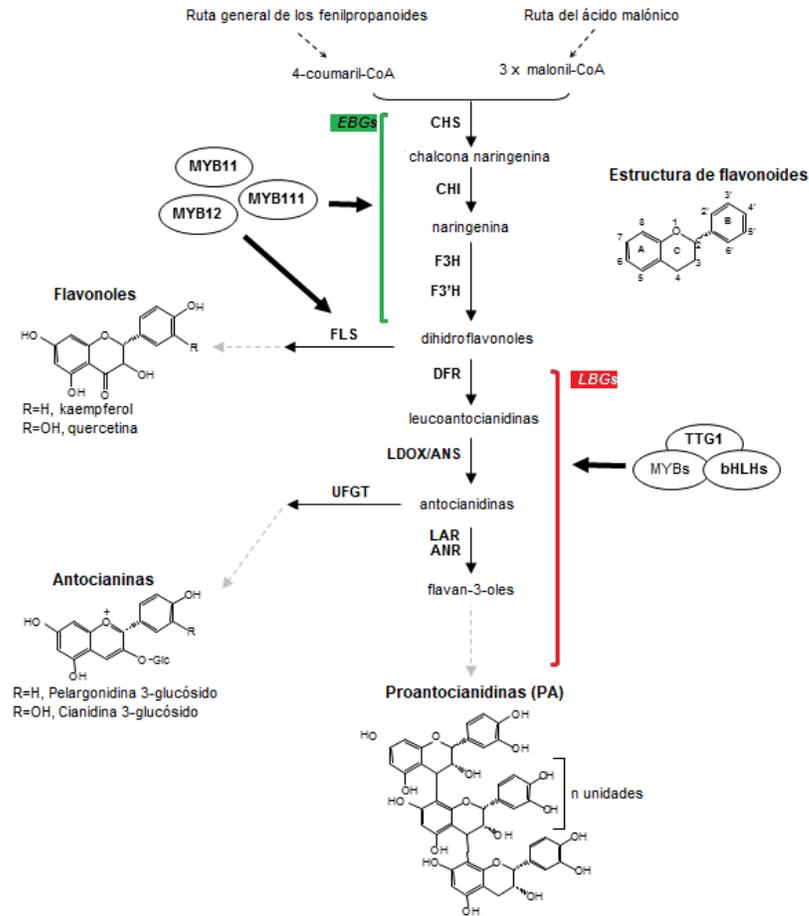


Figura 1. Ruta biosintética de flavonoides en *Prunus salicina* L.. Flavonoles, antocianinas y proantocianidinas poseen un precursor común llamado dihidroflavonol, el cual a su vez deriva, tras una serie de pasos enzimáticos, de una molécula de 4-coumaril-CoA y tres moléculas de malonil-CoA. También se muestra la estructura general de los flavonoides, que consta de un esqueleto base C6-C3-C6 y que por lo general se encuentra ciclada. Los nombres de las proteínas son: CHS, chalcona sintasa; CHI, chalcona isomerasa; F3H, flavonona 3-hidroxilasa; F3'H, flavonoide 3'-hidroxilasa; FLS, flavonol sintasa; DFR, dihidroflavonol 4-reductasa; LDOX, leucoantocianidina dioxigenasa; ANS, antocianidina sintasa; UFGT, UDP-flavonoide 3-O-glucosiltransferasa; LAR, leucoantocianidina reductasa; ANR, antocianidina reductasa. En óvalos se encuentran los complejos proteicos MBW (MYB-bHLH-WDR). TGT1 pertenece a la familia de proteínas WDR. EBGs, *Early Biosynthetic Genes*; LBGs, *Late Biosynthetic Genes*. Las flechas continuas representan pasos directos en la síntesis de compuestos, mientras que las flechas discontinuas representan múltiples pasos. Imagen extraída y adaptada de Xu y col., 2015.

La expresión génica de EBGs y LBGs es inducida, como se mencionó anteriormente, en respuesta a factores ambientales y fisiológicos como mecanismos de protección frente a patógenos, radiación UV, alta intensidad lumínica, maduración de frutos (pigmentación de tejidos); como atrayentes de polinizadores, etc. Esto requiere de una expresión coordinada de grupos de hormonas y factores de transcripción encargados de regular a dichos genes de una forma espacio-temporal precisa, donde en general hormonas como ácido abscísico, jasmonato y etileno actúan como inductores, mientras que giberelina actúa como represor (Xu y col., 2015). La producción de etileno en ciruela se ha visto correlacionada con la pigmentación roja de la piel (por acumulación de antocianos) durante la maduración del fruto, actuando sobre siete genes estructurales (PAL, CHS, CHI, F3H, FDR, LDOX/ANS y UFGT) y sobre el factor de transcripción MYB10, involucrados en la etapa inicial de la vía biosintética de antocianinas (El-Sharkawy y col., 2009; Cheng y col., 2016). Se observó que tras un tratamiento de etileno exógeno hubo un aumento en los niveles de expresión de los genes estructurales de la ruta biosintética de antocianos junto con el factor de transcripción MYB10, en una etapa temprana de acumulación de antocianos en las ciruelas, lo que sugiere el rol clave que tiene MYB10 como regulador en la acumulación de antocianos en estos frutos a través de la señalización de etileno. Además, este aumento en los niveles de expresión de los genes estructurales se correlacionó estrechamente con el aumento del nivel de expresión de genes de los receptores de etileno ETR1 (del inglés *Ethylene Receptor 1*) y ERS1 (del inglés *Ethylene Response Sensor 1*), mientras que la expresión de los siete genes de factores sensibles al etileno (ERF, del inglés *Ethylene-Responsive Factor*) estudiados mostró un patrón diferencial de expresión en las distintas etapas de desarrollo del fruto, sugiriendo que los ERFs cumplirían diversas funciones en la regulación de la acumulación de antocianos (Cheng y col., 2016). En cuanto a factores de transcripción, se ha demostrado que el diverso complejo proteico MBW (MYB-bHLH-WDR)

conformado por las familias de proteínas MYB (del inglés *myeloblastosis*, factores de transcripción con dominio MYB de unión a DNA conservado en plantas), bHLH (del inglés *basic Helix-Loop-Helix*, factor de transcripción con estructura del dominio de unión a DNA hélice-vuelta-hélice) y WDR (del inglés *Tryptophan-Aspartic Acid Repeat*, factores de transcripción que contienen el dominio WD-40 repetido) regulan a nivel transcripcional y post-transcripcional tanto a los genes tardíos de la vía como a la acumulación celular específica de los diversos flavonoides producidos en varios tejidos vegetales (Xu y col., 2015). Otro importante factor de transcripción es ANAC078 de la familia NAC (NAM-ATAF-CUC), el cual regula la biosíntesis de flavonoides y la acumulación de antocianinas en condiciones de estrés por alta intensidad lumínica (Morishita y col., 2009). Otros factores de transcripción que participan en la regulación de flavonoides bajo condiciones de estrés son WRKY, bZIP (cierre de leucina de dominio básico), HSF (factor de transcripción inducido por estrés térmico) y varias clases de dedos de zinc (Morishita et al., 2009).

Por último, otro factor a tener en cuenta es el transporte subcelular de los compuestos fenólicos, el cual si bien aún no está del todo clarificado, se tiene la hipótesis de que se existen tres mecanismos no exclusivos, acoplados y redundantes para el transporte de flavonoides hacia las vacuolas (compartimiento subcelular que corresponde al destino final de estas moléculas): a través del tráfico vesicular, transportadores de membrana y el complejo glutatión S-transferasa (GST)-flavonoide (Zhao, 2015).

Según estudios de biología celular, el transporte de flavonoides mediante vesículas pequeñas es guiada desde el Retículo Endoplasmático (RE) y/o Golgi por microtúbulos y citoesqueleto de actina hacia la vacuola central, en donde la fusión vesicular incluye la participación de receptores de proteínas de unión al factor sensitivo a N-etilmaleimida (SNAREs), GTPasas, proteínas de unión a citoesqueleto como la proteína Semilla

Fluorescente Verde 9 (GFS9), entre otras. Se ha visto que GFS9 juega un rol importante en la maquinaria del transporte y entrega de flavonoides a la vacuola central, pues se ha observado en mutantes deficientes de GFS9 de vid y *Arabidopsis* (Zhao, 2015) fallas en el tráfico vesicular con la fragmentación de las vacuolas, agregación de vesículas alargadas e incapacidad de acumular proantocianidinas (PAs) en semillas.

En cuanto a los transportadores de membrana y a GST, se ha sugerido que los transportadores MATE (Extrusión de multidroga y compuestos tóxicos) presentes en tonoplastos y en vesículas pequeñas pre-vacuolares, transportan PAs y antocianinas aciladas al tonoplasto desde vesículas pequeñas provenientes del retículo endoplasmático (RE), mientras que los transportadores ABC participan en el secuestro vacuolar y en la secreción de flavonoides fuera de la célula, de forma dependiente a glutatión (GSH), como es el caso de transportadores ABCC1 (transportadores ABC del tipo C) de vid, los cuales necesitan estrictamente GSH libre para el transporte de la antocianina malvidina 3-O-glucósido (M3G) hacia las vacuolas, sin alterar la estructura de M3G ni formar un conjugado GSH-M3G (Francisco y col., 2013).

A pesar de que ninguna proteína del complejo GSTs cataliza la conjugación flavonoide-GSH y tampoco hay evidencia disponible para el transporte de estos conjugados mediados por ABC, se sabe que GSH estimula la acumulación de flavonoides y que la localización subcelular de GST dependería de la presencia de antocianinas y PAs en las células vegetales, con lo que se hipotetiza que la unión de GST con GSH y flavonoides proveería a ABCCs presentes en el tonoplasto de ambos substratos protegidos para su co-transporte hacia las vacuolas (Zhao y Dixon, 2010).

Estos tres mecanismos (tráfico vesicular, transportadores de membrana y el complejo GST-flavonoide) actuarían de forma colaborativa en el transporte de flavonoides, donde

transportadores MATE (como TT19) secuestran antocianinas desde el citosol hacia vesículas pequeñas, mientras que el complejo GST participa en la acumulación de antocianinas en estas vesículas a la vez que facilita de GHS libre para el cotransporte de dichas vesículas a través del tráfico vesicular acoplados a transportadores ABCC1 hacia la vacuola central, fusionándose estas vesículas con ayuda de GFS9 (Gomez y col., 2011). Así pues, estos tres mecanismos trabajan acoplados y/o de forma simultánea, entregando diversas y redundantes rutas de transporte de flavonoides y PAs, lo que a su vez otorgaría mayor plasticidad y eficiencia en la regulación espaciotemporal de la distribución y almacenaje de estos compuestos fenólicos.

Análisis de QTLs: interacción entre genética cuantitativa y genómica

Es común que para un rasgo de interés agronómico (rendimiento, contenido de compuestos fenólicos, período de desarrollo del fruto, etc.), su expresión fenotípica esté influenciada por varios genes que contribuyen en distintas magnitudes, recibiendo estos rasgos el nombre de rasgos cuantitativos, complejos o poligénicos, en contraste con los cualitativos, mendelianos o monogénicos cuya expresión fenotípica está influenciada por uno o pocos pares de genes, siendo responsables de variaciones discretas como por ejemplo el tipo de adhesión de la pulpa al carozo en durazno, lo cual determina en gran parte el futuro uso de la fruta, es decir, si será enlatada, secada o como fruta de mesa (Wu y col., 2005).

Las regiones del genoma donde se encuentran genes asociados a rasgos poligénicos reciben el nombre de *Loci* de Rasgo Cuantitativo o QTL (del inglés *Quantitative Trait Loci*) (Collard y col., 2005). La variación fenotípica presentada en estos rasgos complejos es multifactorial, ya que es influenciada por el ambiente en que se desarrolla la planta (condiciones climáticas, de suelo, tratamientos y manejos agronómicos, etc.), al polimorfismo que presentan los genes que gobiernan aquel QTL y a la interacción ambiente-

genotipo, de modo que uno o varios QTLs pueden incidir en un fenotipo de interés (Abiola y col., 2003). Los QTLs en general corresponden a *loci* polimórficos, es decir, presentan variaciones de secuencia entre individuos de una determinada población, debido a mutaciones en el DNA (sustitución, delección y/o adición de bases nucleotídicas), lo que puede generar variaciones en la abundancia del transcrito correspondiente y/o la actividad de la proteína expresada (Griffiths y col., 2005). De este modo, un rasgo cuantitativo se expresa en fenotipos cuya magnitud variará de forma continua, según las contribuciones aditivas que haga cada variante de cada gen que participa en el proceso biológico en estudio, además de la influencia del ambiente.

Para lograr identificar QTLs de interés, se debe llevar a cabo análisis de QTLs, que son procedimientos genético-estadísticos que permiten mapear QTLs involucrados en rasgos de interés, es decir, ubicar la posición en el genoma de las regiones cuya variación genotípica se correlacione de manera significativa con la varianza fenotípica en una población segregante determinada, entendida como un conjunto de individuos de la misma especie que presente un grado de variación genética, por ejemplo colecciones de germoplasma o familias provenientes de cruzas controladas. La identificación de estos QTLs es uno de los primeros pasos para descubrir genes candidatos involucrados en el control de fenotipos de interés (Collard y col., 2005; Salazar y col., 2017).

Dependiendo del tipo de población, se pueden distinguir dos principales métodos de análisis de QTL: estudios de asociación a escala genómica (GWAS, del inglés *Genome-Wide Association Studies*) en el caso de poblaciones naturales o colecciones de germoplasma, y QTL basados en ligamiento para el caso de poblaciones provenientes de cruzas controladas bi-parentales.

Ambos análisis tienen en común la búsqueda de *loci* que presenten correlaciones significativas entre sus distintas clases (o alelos) y los valores fenotípicos para cada alelo. Como en cualquier análisis de correlación, el coeficiente R^2 representa el porcentaje de la varianza fenotípica total del rasgo que es explicado por el *locus* en cuestión.

Para llevar a cabo ambos tipos de análisis, necesitamos que la población a estudiar sea segregante, fenotipificada y genotipificada. Una población segregante, es decir derivada mediante reproducción sexual, presenta individuos con distintas variaciones genéticas para uno o varios rasgos de interés, lo que permite la construcción de mapas de ligamiento, que indican las posiciones y distancias relativas entre los *loci* a lo largo de los cromosomas. Para obtener un mapa de alta resolución se requiere de una población superior a los 100 individuos, ganando precisión en la medición de las distancias genéticas (Collard y col., 2005).

Respecto al fenotipo, es importante tener en cuenta que el fenotipo de una planta se ve afectado por la interacción ambiente-genotipo, por lo que un mismo rasgo de interés de la población a estudiar presenta diversas variantes fenotípicas, pudiendo ser estas variantes decisivas para la producción del rasgo de interés, por lo que evaluar y caracterizar las propiedades fenotípicas de una población vegetal es vital para futuros programas de mejoramiento genético.

Respecto al genotipo, este permite obtener el perfil genético (genotipo) de los individuos de una población, conociendo las variaciones genéticas presentes en dicha población y por tanto la presencia de *loci* polimórficos, lo que permite trazar la heredabilidad de sus progenitores. Estas variaciones genéticas en *loci* polimórficos son usadas para generar marcadores moleculares, que son secuencias nucleotídicas distintivas ubicadas en zonas estrechamente ligadas a genes polimórficos, en posiciones específicas que permitirán

generar mapas genéticos para los parentales de la población segregante. En este trabajo se usaron marcadores moleculares llamados SNPs (del inglés *Single Nucleotide Polymorphism*), los cuales proporcionarán información inicial sobre la segregación de *loci* polimórficos, cuyos alelos siguen una distribución mendeliana en cruces experimentales (Eduardo y col., 2013; Hackett y col., 2013; Pacheco y Silva Linge, 2015; Salazar y col., 2016).

La ubicación o mapeo de los QTL es otro de los aspectos que diferencian los dos tipos de análisis de QTL. Para el caso del GWAS, en general se utilizan marcadores de posición genómica conocida, sin embargo, la asociación entre marcadores y el QTL (de posición desconocida) se lleva a cabo en base al desequilibrio de ligamiento (propiedad que presentan genes que no segregan independientemente, pues su frecuencia de recombinación es menor al 50% y por tanto segregan juntos). En el análisis basado en ligamiento, como su nombre lo indica, el parámetro para ubicar los QTL en cuestión es el ligamiento, el cual se determina por medio del cálculo de frecuencias de recombinación entre dos marcadores. Es por esto que un paso importante es la generación de un mapa de ligamiento a partir de los datos provenientes del genotipo, el cual entrega información sobre la segregación de marcadores polimórficos (SNPs), provenientes de genotipo por secuenciación (GBS del inglés *Genotyping By Sequencing*) y que, en este trabajo, poseen como codificación, la posición en el genoma de referencia Durazno v1 (Verde y col., 2013; Salazar y col., 2017; Salazar y col., 2020).

El genotipo junto con la generación de una población segregante, en la cual existe una mezcla de variantes genotípicas, son necesarias para el análisis de ligamiento, en donde las fracciones de ligamiento entre marcadores son calculadas usando el valor LOD (del inglés *Logarithm of Odds*) que indica la probabilidad de ligamiento frente al no ligamiento

entre un par de marcadores y por tanto, las frecuencias de recombinación entre marcadores. Por ejemplo, para un par de marcadores con un valor LOD 3 (valor mínimo usado por convención para la construcción de mapas genéticos) indica que es 1000 veces más probable que dichos marcadores se encuentren ligados a que no estén ligados. De esta manera es posible inferir las distancias relativas y el orden entre los marcadores generando los grupos de ligamiento de la población segregante. Unos de los software ampliamente usado para la construcción de mapas genéticos es JoinMap de Kyazma el cual permite trabajar con diferentes tipos de poblaciones experimentales como poblaciones F2, de retrocruzamiento (o BC del inglés *BackCross*), endogámicas recombinantes y de dobles haploides (DH). También permite convertir las frecuencias de recombinación a centiMorgans (cM).

Luego, para el caso del análisis basado en ligamiento, existen varias estrategias de búsqueda de QTLs: análisis no paramétricos por marcador individual por Kruskal Wallis que calcula si el valor fenotípico difiere entre las variantes genotípicas para un marcador dado; Interval Mapping (IM), el cual analiza intervalos entre marcadores ligados compensando el efecto de los eventos de recombinación que pudiesen ocurrir entre el marcador y el QTL; Multiple QTL Mapping (MQM) que considera el efecto de QTLs vecinos en la varianza residual, reduciendo la varianza del QTL analizado, aumentando la potencia del test y la precisión en la ubicación del QTL; Composite Interval Mapping (CIM), que combina IM con regresión lineal haciendo más preciso y efectivo el mapeo de QTLs (Collard y col., 2005). El nivel mínimo de significancia para declarar a un QTL hallado como real es determinado mediante pruebas de permutación, en donde los valores fenotípicos son mezclados mientras los valores genotípicos son mantenidos constantes para realizar análisis QTL que

evalúan el nivel de asociaciones marcador-rasgo falsas positivas, con lo cual se determina el nivel de significancia mínimo al repetir este análisis sobre 500 veces.

De esta manera, el QTL determinado, corresponderá aquel intervalo entre los dos marcadores SNP con mayor significancia. En dicho intervalo debieran de haber variantes genotípicas ligadas a los *loci* o marcadores mapeados, donde se encuentran las mutaciones causantes de la variación del fenotipo. Además, como se mencionó antes, los resultados del análisis indican el porcentaje de contribución que cada uno de estos *loci* ejerce sobre la variación fenotípica (Salazar y col., 2016; Salazar y col., 2017).

De este modo, el análisis de QTL corresponde a una estrategia que nos permitiría determinar aquellas regiones del genoma que contienen genes involucrados en la regulación, biosíntesis u otros procesos mencionados anteriormente, con un impacto en el contenido final de compuestos fenólicos en frutos. Además, los marcadores que definen tales regiones pueden ser utilizados para la selección anticipada de individuos de cruza que posean los alelos favorables para el carácter de interés en los marcadores determinados, permitiendo aumentar la eficiencia en la generación de nuevas variedades con un mayor potencial de alimento funcional, siendo ejemplo de esto los trabajos de Rousseaux y col., 2005, quienes usaron líneas de introgresión de la especie de tomate silvestre *Lycopersicon pennellii* en la variedad doméstica de tomate *Lycopersicon esculentum* encontrando QTLs asociados al contenido de compuestos fenólicos, ácido ascórbico y β -caroteno, evidenciando que la introgresión de germoplasma silvestre puede mejorar la calidad nutricional en tomates. Otro trabajo sobre análisis de QTLs en líneas introgresivas, entre el tomate domesticado *Solanum lycopersicum* y la especie silvestre *Solanum chmielewskii*, fue desarrollada por Ballester y col., 2016, encontrando QTLs asociados a la acumulación de flavonol glucósido y de alcaloides, corroborando el potencial

de especies silvestres como fuente de mejoramiento genético sobre la calidad nutricional de frutos comerciales.

Prunus salicina L. como modelo de estudio

En Chile, una de las especies de Rosáceas más cultivada para exportación es el ciruelo asiático (*Prunus salicina* L.), el cual ocupó el noveno lugar en la producción nacional (segundo carozo más exportado después de la cereza) con 136.758 toneladas el año 2018 según ODEPA en su “Boletín de fruta fresca. Diciembre 2019” (“Exportaciones anuales”). Este fruto de carozo puede contener más de 40 compuestos fenólicos (Jaiswal y col., 2013), siendo un objetivo interesante para estudiar su potencial de mejora genética como alimento funcional. El contenido de compuestos fenólicos en el fruto del ciruelo corresponde a un carácter cuantitativo, ya que se ha descrito que depende de la variedad (componente genético) y es influenciado por variaciones ambientales (Venter y col., 2013, 2014; González y col., 2016).

El objetivo de un programa de mejoramiento genético en cultivos vegetales es obtener variedades con mayor producción y calidad del fruto, ya sea mejorando rasgos asociados al desarrollo del fruto (tiempo de madurez, peso, color, forma, etc.) u otros rasgos asociados al crecimiento y protección de la planta (mayor resistencia a enfermedades, crecimiento vigoroso, mejor aprovechamiento de nutrientes, etc.). En este sentido la población F1 “9899” x “Angeleno” es un material válido para un programa de este tipo, pues en los trabajos realizados por Salazar y col., 2020 se analizó la presencia de QTLs asociados a rasgos de interés agronómicos, hallándose variantes de SNPs que segregan para el color de piel y pulpa, tiempo de maduración del fruto, índice de degradación de clorofila y peso del fruto.

Por tanto, teniendo todo lo anterior como precedente, en este seminario de título se trabajó bajo la hipótesis de que **existen regiones del genoma del ciruelo asiático cuya variación se correlaciona con la varianza fenotípica del contenido de antocianos y familias de compuestos fenólicos en el fruto.**

Para probar dicha hipótesis el principal objetivo es identificar mediante análisis de QTLs, aquellas regiones del genoma involucradas en el contenido de componentes fenólicos de variedades de *Prunus salicina* L., bajo. Para esto, se realizó la extracción y cuantificación de compuestos fenólicos presentes en muestras de pulpa y piel en individuos de la progenie F1 de ciruelos, provenientes del cruce entre las variedades “98.99” y “Angeleno”, contando también con mapas genéticos para cada parental usando marcadores moleculares SNPs (Salazar y col., 2020), lo que posteriormente permitió llevar a cabo el análisis de QTLs para la asociación fenotipo-genotipo de compuestos fenólicos presentes en *Prunus salicina* L. La identificación y caracterización de QTLs candidatos permitirá generar marcadores moleculares para programas de mejoramiento basados en Selección Asistida por Marcadores (MAS, del inglés Marker-Assisted Selection), herramienta biotecnológica usada para mayor eficiencia en el desarrollo de nuevas variedades vegetales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

El material vegetal utilizado incluyó dos cultivares de ciruelo asiático, “98.99” y “Angeleno”, y algunos individuos de una progenie F1 derivada del cruce de ambos cultivares. La progenie (98.99xANG, 167 plántulas) se encuentra en la Estación Experimental Rinconada de Maipú (Santiago, Chile) en 2011. El parental materno, “98.99” es una selección de maduración temprana-media de piel roja y pulpa amarilla de alta calidad organoléptica, mientras que el parental paterno “Angeleno” posee un genotipo de madurez tardía-media con piel púrpura y un excelente rendimiento poscosecha (Salazar y col., 2017; Salazar y col., 2020).

Evaluación de la calidad de la fruta

En este estudio consideramos muestras de frutos de 92 y 80 individuos de la progenie 9899xANG (de aquí en adelante “98ang”) en las temporadas 2015-2016 y 2016-2017, respectivamente. Los datos de rasgos de interés agronómico fueron obtenidos de Salazar y col. (2020) que corresponden a: período de desarrollo del fruto (FDP, del inglés *Fruit Development Period*), tiempo de madurez (RT, del inglés *Ripening Time*), color de piel y pulpa (parámetros L, a, b, C*, H°), peso, cubrimiento, índice de absorbancia de clorofila relacionado a madurez (I_{AD}) en piel y pulpa (Contador y col., 2016), grados Brix (SS), pH y acidez.

Cuantificación familias de fenoles y actividad antioxidante (AOX)

Luego de la cosecha (determinada según Contador y col. (2016), cuando los frutos alcanzaron valores de I_{AD} entre 1 a 1,4 unidades y una textura cercana a los 40 N), los análisis fenotípicos mencionados se llevaron a cabo después de un día de incubación a 25°C, considerando diez frutos por individuo. Luego de analizar fenotípicamente cada

individuo, y para considerar la variabilidad en el contenido de fenoles producida por la variación en condiciones ambientales dentro de la planta, se agruparon muestras de tejido de exocarpo (piel o "sk") y mesocarpo (pulpa o "fl") de tres frutos. Así se generaron tres muestras por individuo, las cuales consideramos como triplicados (réplicas técnicas/fruto). Para evitar la oxidación de los tejidos, estas muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido inmediatamente después de su análisis fenotípico y almacenadas a -80°C hasta su uso en este estudio para extracción de compuestos fenólicos (Figura 2).

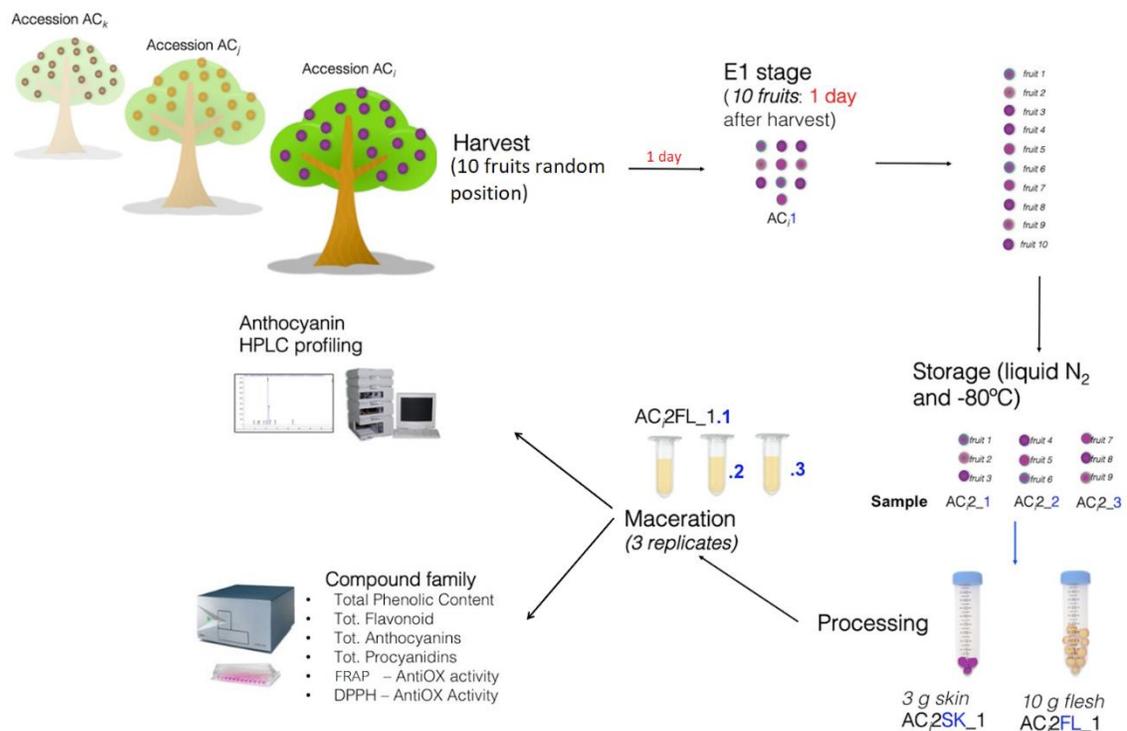


Figura 2. Representación gráfica del proceso de obtención de extractos metanólicos para análisis por HPLC y por ensayos espectrofotométricos. Se observa el proceso completo desde la cosecha de 10 frutos en posiciones aleatorias de cada accesión, su almacenaje en frío por un día y la división de estos 10 frutos en tres réplicas biológicas. Cada réplica es separada en piel y pulpa moliendo 3 y 10 gramos de tejido respectivamente para ser macerados, obteniéndose de esta manera extractos metanólicos para análisis de antocianinas individuales y ensayos espectrofotométricos. Figura tomada y adaptada de Pacheco y col., manuscript under preparation.

Maceración y extracción compuestos fenólicos

Para la cuantificación de compuestos fenólicos, muestras de piel (3 g) y pulpa (10 g) fueron molidas en molinillo (A 11 Basic, IKA, China) en presencia de nitrógeno líquido hasta obtener un polvo. La extracción se realizó con metanol 80% (10 mL), incubando en hielo, para luego sonicar (sonicador Elmasonic E 30 H, Elma, Alemania) y finalmente centrifugar (Centrífuga universal Z 326 K, Hermle, Alemania). Una parte del sobrenadante fue concentrado (Concentrador Savant DNA 120 SpeedVac System, Thermo Fisher Scientific, USA) en proporción 1:2 para cuantificación de familias de fenoles y actividad antioxidante y para análisis de antocianos vía HPLC-DAD. El resto del sobrenadante se concentró diez veces respecto de su volumen inicial para realización de protocolo de extracción de fenoles de bajo peso molecular (FBPM), no considerada en este trabajo. En ambos casos, tras la concentración, las muestras se filtraron (0,22 µm) y se almacenaron en viales ámbar a 4°C hasta su análisis.

Ensayos espectrofotométricos

Los siguientes ensayos espectrofotométricos fueron realizados en placas de 96 pocillos y se realizaron triplicados técnicos para cada muestra, incluyendo los estándares respectivos a cada método. En total, por cada individuo se realizaron 18 determinaciones por temporada (dos tejidos x tres réplicas técnicas/determinación x tres réplicas/fruto). Para cada muestra se determinó la concentración de fenoles totales, flavonoides totales y proantocianidinas totales, además de estimar la actividad antioxidante por FRAP y DPPH, mediante los métodos que se mencionan a continuación. Para la medición de absorbancia utilizamos un espectrofotómetro para placas de 96 pocillos Infinite M200 Pro NanoQuant (Tecan, Suiza).

La cuantificación de fenoles totales se realizó mediante el método de Folin y Coicalteau adaptado por Mubarak y col. (2012), para placas de 96 pocillos (15 µl muestra/pocillo). El reactivo de Folin-Coicalteau contiene molibdato y tungstato sódicos, los que son reducidos

por fenoles, generando un complejo fosfomolibdato-fosfotungstato con un máximo de absorción de 765 nm, con una intensidad proporcional al número de grupos hidroxilos fenólicos oxidados (Marina y col., 2008). Para determinar el contenido de fenoles a partir de la absorbancia se construyó una curva de calibración con soluciones de ácido gálico entre 0 y 600 µg/mL en metanol 80%, para luego expresar los resultados en mg de equivalentes de ácido Gálico (GAE) por kg de fruta fresca.

La determinación del contenido de flavonoides totales se efectuó mediante el método de Alvarez-Parrilla y col. (2011) adaptado a placas de 96 pocillos (15 µl muestra/pocillo). Esta determinación se basa en la formación del complejo flavonoide-aluminio, en donde el aluminio se une de manera lábil a grupos orto-dihidroxilos en el anillo A o B de flavonoides, formándose una solución de coloración amarilla, la cual al ser adicionado NaOH se torna de color rojo, con un máximo de absorción de 510 nm. Para la curva estándar se utilizaron concentraciones entre 0 y 600 µg/mL de catequina en metanol (n=30), se leyó absorbancia a 510 nm y los resultados fueron expresados en mg de equivalentes de catequina por kg de fruta fresca.

La cuantificación de proantocianidinas totales se hizo a través del método DMACA (Arnous y col., 2002) adaptado a placas de 96 pocillos (25 µl muestra/pocillo). En este método el p-dimetilaminocinnamaldehído (DMACA) reacciona selectivamente con el C₈ del anillo A de la unidad terminal de proantocianidinas, generando un complejo con un máximo de absorción a 640 nm (Wallace y Giusti, 2010). La curva de calibración se construyó con soluciones de catequina en concentraciones entre 0 y 50 µg/mL en metanol al 80% (n=30). Los resultados fueron expresados en mg de equivalentes de catequina por kg de fruta fresca (mg eq CAT/KgF).

La capacidad antioxidante fue estimada usando el método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) siguiendo el protocolo descrito por Yang y col. (2017) adaptado a placas de 96 pocillos (2 µl muestra/pocillo). Este método se basa en la capacidad reductora que tienen las muestras, a un pH bajo (3,6), al reducir el complejo Trotripiridiltriazina-Fe (III) a su forma ferrosa (TPTZ-Fe (II)), desarrollándose un intenso color azul con absorbancia de 593 nm. En este ensayo, se usa un exceso de Fe(III) de tal forma que el factor limitante de la velocidad de formación del complejo ferroso y, por tanto, del color es la capacidad reductora que posee la muestra (Benzie y Strain, 1996). La curva de calibración se construyó con soluciones de FeSO₄ en concentraciones entre 0 y 1000 µg/mL en agua (n=30). Los resultados de este ensayo fueron expresados en moles equivalentes de Fe (II) por kg de fruta fresca.

Por último, como segundo ensayo para la determinación de la capacidad antioxidante se realizó el método de eliminación del radical libre y estable DPPH (Usenik y col., 2013) adaptado a placas de 96 pocillos (30 µl muestra/pocillo). Este método se basa en la reducción del átomo desapareado de nitrógeno presente en el grupo hidrazina del radical 2,2 difenil 1-picrilhidrazil (DPPH) al recibir un átomo de hidrógeno por parte de las muestras antioxidantes, haciendo que la solución pase de una coloración violeta intensa a una solución con una coloración cada vez más atenuada, dependiendo de la capacidad reductora de la muestra y de absorción a 520 nm (Kedare y Singh, 2011). La curva de calibración se construyó con soluciones de Trolox en concentraciones entre 0 y 35 µg/mL en agua (n=30). Los resultados fueron expresados en moles de equivalente de Trolox por kg de fruta fresca.

Determinación de antocianos por HPLC

La determinación de antocianos individuales se realizó mediante HPLC acoplado a Detector de red de diodos (DAD, del inglés Diode Array Detector). Este sistema permite la detección de compuestos en un rango de longitud de onda que cubre el espectro visible y el ultravioleta, permitiendo la identificación tentativa de compuestos en base a sus características espectrales UV-Vis. Aquellos compuestos que no fueron identificados se nombraron como “Compuesto X”, donde X corresponde a cualquier letra del abecedario partiendo de la A en orden consecutivo.

Caracterización de peaks de antocianos presentes en ciruelo asiático

Previo a este trabajo, se llevó a cabo la caracterización por espectrometría de masas de los perfiles cromatográficos de antocianos obtenidos para maceraciones de distintas variedades de ciruela, incluidas ‘98.99’, ‘Angelino’ y una mezcla de extractos que representan toda la diversidad de antocianos en las variedades disponibles de ciruela. Los peaks fueron identificados comparándolos con estándares y reconociendo el valor m/z de los principales fragmentos en www.massbank.jp.

Para la cuantificación de antocianos por HPLC-DAD, el compuesto cianidina-3-glucósido (C3G) fue usado como estándar, inyectando concentraciones conocidas. Los valores de absorbancia x tiempo (área bajo la curva del peak C3G) obtenidos fueron utilizados para construir una curva de calibración, la cual se empleó para la cuantificación de los demás compuestos. De este modo se analizaron extractos metanólicos filtrados (0,22 µm) de muestras de piel y pulpa, provenientes de 85 individuos F1 de ambas temporadas mediante HPLC-DAD.

Análisis de datos fenotípicos: generación de histogramas y correlaciones

Una vez obtenidos todos los datos fenotípicos (ensayos espectrofotométricos, antocianinas individuales, rasgos de calidad de fruta, ver Anexo 1) se crearon matrices de datos en Excel

separando por tejido (piel y pulpa) y por temporada (T1 y T2) guardando dichas matrices en formato texto delimitado por tabulaciones (".txt") para usar el programa analítico R (R Core Team, 2018) y así generar histogramas de distribución por rasgo (contenido de cada compuesto), tejido y temporada, mediante un *script* creado para dicho fin usando comandos básicos de construcción de histogramas incluidos en R. También se realizaron análisis de correlaciones entre y dentro de los rasgos fenotípicos por tejido y temporada usando el método no paramétrico Spearman, aplicando un nivel de significancia de 0,001. Para ello se creó un *script*, descargando los paquetes "*PerformanceAnalytics*" (Peterson y Carl, 2020), "*corrplot*" (Wei y Simko, 2017) y "*Hmisc*" (Harrel y col., 2020) en R, con los que se construyeron matrices de correlación en base a valores-p significativos.

Determinación heredabilidad

Todos los rasgos fueron analizados por ANOVA, mediante *script* (Anexo 14) creado usando el comando "aov" de R, ajustando como factores independientes el genotipo (individuo), año (temporada) y la réplica de fruto (RB) para cada carácter, usando además las correlaciones encontradas mediante el método de correlación de Spearman para la determinación de las covariadas, que son caracteres correlacionados con el rasgo a estudiar y que por lo tanto podrían estar influenciando el contenido de algún compuesto. Para cada carácter analizado (contenido de familias de fenoles y antocianos individuales), consideramos como "covariada candidata" cualquier rasgo que estuviera correlacionado significativamente con el carácter bajo estudio.

La heredabilidad en sentido amplio (H^2) de cada rasgo se determinó usando los datos de varianza entregado por ANOVA. Se dividió la varianza debida al genotipo por la varianza total, entendida como la sumatoria de las varianzas de cada factor incluida la varianza residual, expresando el valor obtenido en porcentaje.

Las covariadas candidatas se utilizaron luego para la construcción de modelos de efectos mixtos y determinación de BLUP de componente genética (ver a continuación).

Determinación BLUPs

Para cada rasgo, se determinó el valor fenotípico que tiene cada individuo dentro de 98ang, considerando el efecto de la temporada, la réplica de fruto, y valores fenotípicos para covariadas candidatas. Esto se efectuó mediante la generación de modelos lineales mixtos (LMM, del inglés *Linear Mixed Models*) adecuados para cada rasgo.

Se creó un *script* (Anexo 14) para la generación de modelos lineales mixtos, descargando el paquete “lme4” (Bates y col., 2015), usando las covariadas obtenidas vía ANOVA y se estableció como efecto fijo las réplicas biológicas (RB), mientras que accesión, temporada y el resto de covariadas candidatas fueron considerados como efectos aleatorios, para determinar el efecto que posee cada accesión en los rasgos analizados. Los modelos lineales mixtos generados fueron ajustados mediante el criterio de Máxima Verosimilitud Restringida (REML, del inglés *REstringed Maximun Likelihood*), siendo el menor valor de la varianza residual y del criterio de información de Akaike (AIC, del inglés *Akaike Information Criterion*) encontrado el mejor modelo lineal ajustado. La validación de cada modelo se realizó gráficamente con las funciones “*qqplot*” y “*qqnorm*” con las cuales se verificó que los residuos de cada modelo presentaran homocedasticidad y que la distribución de los residuos sea normal, respectivamente. Para estimar los efectos aleatorios debidos al genotipo, y con ello obtener el valor fenotípico para cada individuo, se extrajo el predictor BLUP (del inglés *Best Linear Unbiased Predictor*) mediante la función “*ranef*”. Los BLUPs extraídos de cada modelo fueron usados en el análisis de QTLs.

Mapas de ligamiento de parentales

Para la realización del análisis de QTLs se usaron los mapas de ligamientos de cada parental (“98.99” y “Angeleno”) y los datos genotípicos de la progenie 98ang reportados previamente por Salazar y col. (2020).

Análisis de QTL por marcadores o intervalos simples (KW e IM)

Los datos fenotípicos generados (determinación de familias de fenoles, caracterización de antocianos individuales y rasgos agronómicos) fueron asociados a los marcadores genéticos (SNPs) empleados en el mapeo genético mediante el programa MapQTL 6 (Van Ooijen, 2009).

Primero, se crearon dos nuevos proyectos bajo los nombres “QTL9899 Tesis” y “QTLANG Tesis”, para el análisis QTL en los parentales “98.99” y “Angeleno” respectivamente. En cada proyecto se cargó en la pestaña *Population* los datos fenotípicos (valores BLUPs de cada rasgo) y genotípicos (marcadores moleculares presentes en cada individuo de la población F1, provenientes de Salazar y col. (2017), mientras que en la pestaña *Maps* se cargó el mapa genético del respectivo parental. Luego, para cada rasgo, se realizó una prueba de permutación (“PT”, del inglés *Permutation Test*) entre los datos genotípicos y los fenotípicos, con el objetivo de determinar el límite de significancia LOD para cada rasgo y temporada. Los umbrales de significancia se obtuvieron realizando 1000 permutaciones.

Para realizar el análisis de QTL de caracteres que no presentaron distribución normal, se realizó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis de asociación marcador-fenotipo escogiendo dicha opción en la barra *Analysis*. Posteriormente, se realizó la prueba paramétrica “mapeo por intervalos” (o “IM”, del inglés *Interval Mapping*), la cual determina la probabilidad de la existencia de un QTL putativo en el intervalo entre dos marcadores, escogiendo en la barra *Analysis* la función *Interval Mapping* y seleccionando todos los grupos de ligamiento y un rasgo a través de la opción *Analyse for QTLs* desde el nodo *qtrait*

en la pestaña *Population*. Los resultados gráficos se pudieron observar en la pestaña *Results Charts*, en cuyo panel es posible ajustar la línea de valor LOD límite en base al valor obtenido en PT y así detectar QTLs candidatos en intervalos en donde los marcadores moleculares presentaron un nivel de significancia superior al LOD umbral.

Análisis de Modelos de Múltiples QTL (MQM)

Un problema que presenta el análisis de mapeo de intervalos es no considerar el efecto de QTLs vecinos en la asociación de un QTL entre una cierta posición del genoma con la varianza fenotípica, donde parte de dicha asociación puede estar determinada por estos QTLs vecinos (Van Ooijen, 2009). En cambio, el análisis de mapeo de múltiples QTLs ("MQM", del inglés *Multiple QTL Mapping*), toma en cuenta el efecto de la presencia de QTLs vecinos en la varianza residual, reduciendo la varianza del QTL analizado y aumentando la potencia del test y la precisión en la ubicación del QTL. A la vez, considera la interacción entre QTLs, que no son vistos por IM, pudiendo descubrir nuevos peaks que antes no fueron analizados por IM. Para esto es necesario usar a los marcadores que presentaron un nivel de significancia LOD superior al LOD límite, considerándolos como cofactores candidatos asociados al QTL. Se escogieron los posibles marcadores cofactores y se realizó un análisis *Automatic Cofactor Selection* de la barra *Analysis*, determinando los cofactores finales para ser usados en MQM. Luego, se seleccionó la opción *Multiple QTL Mapping* de la barra *Analysis*, escogiendo todos los grupos de ligamiento, un rasgo en particular y el/los cofactor/es entregados por ACS. Los gráficos de QTLs se pudieron observar en la pestaña *Results Charts*, ajustando la línea de valor LOD límite en base al valor obtenido en la prueba de permutación y así detectar múltiples QTLs en caso de que existiesen en posiciones cercanas.

Tanto los grupos de ligamiento como los intervalos QTLs hallados fueron graficados usando el software MapChart 2.32 (Voorrips, 2002).

RESULTADOS

Detección y cuantificación de familias de fenoles y actividad antioxidante (AOX) mediante espectrofotometría

A partir de los datos de absorbancia obtenidos en los distintos ensayos espectrofotométricos, obtuvimos las curvas de calibración resumidas en la Tabla 1. La construcción de estas rectas, así como el análisis de las muestras de “98ang” se realizaron por separado en cada temporada (temporada 2015-2016, T1; temporada 2016-2017, T2). Los gráficos obtenidos para las distintas determinaciones se muestran en Anexo 2.

Tabla 1. Rangos de concentración y principales parámetros de curvas de calibración de estándares usados para ensayos espectrofotométricos y HPLC. Se presenta el *p-value* para cada coeficiente de determinación (R^2), indicando su significancia.

Compuesto	Compuesto estándar	Temporada	Rango conc. estándar (µg/ml)	Pendiente	Intercepto	R2	p-value
Fenoles totales	Ac. gálico	T1	0 - 400	4,10E-03	5,22E-02	0,9926	< 2,2e-16
		T2	0 - 600	3,30E-03	9,60E-02	0,9866	< 2,2e-16
Flavonoides totales	Catequina	T1	0 - 600	1,00E-03	1,00E-03	0,99	< 2,2e-16
		T2	0 - 600	1,00E-03	-1,30E-02	0,9807	< 2,2e-16
Proantocianidinas totales	Catequina	T1	0 - 40	2,84E-02	1,68E-02	0,9703	< 2,2e-16
		T2	0 - 50	1,81E-02	2,18E-02	0,9886	< 2,2e-16
DPPH	Trolox	T1	0 - 35	-5,70E-03	-0,2113	0,9501	< 2,2e-16
		T2	0 - 35	-6,70E-03	-0,1199	0,9604	< 2,2e-16
FRAP	FeSO4	T1	0 - 1000	5,00E-04	-2,70E-03	0,9937	< 2,2e-16
		T2	0 - 1000	5,00E-04	5,90E-02	0,9854	< 2,2e-16
C3G	C3G	T1	0 - 100	33,076	158,1	0,9949	< 2,2e-16
C3R	C3R	T1	0 - 100	17,837	103,64	0,9938	< 2,2e-16

En general, observamos que todas las curvas obtenidas muestran coeficientes de determinación (R^2) mayores a 0,95 con probabilidades de error cercanas a 0 (*p-values* <

2,2E-16). Los mayores coeficientes de determinación se observaron para fenoles totales, flavonoides totales, y actividad antioxidante FRAP, todos con $R^2 = 0,99$; los valores menores de R^2 se obtuvieron en la determinación de actividad antioxidante por DPPH ($R^2 = 0,95$). Con el objetivo de determinar si las regresiones entre ambas temporadas difieren estadísticamente, llevamos a cabo análisis de varianza entre los modelos de regresión lineal obtenidos por cada tipo de determinación, encontrando que el factor “temporada” tiene un impacto significativo en los parámetros de las regresiones lineales para todas las determinaciones (p -values $< 2,2E-16$). Por esto decidimos llevar a cabo la predicción de valores de concentración de cada familia de compuestos, usando la curva de calibración correspondiente a cada temporada.

Detección y cuantificación de antocianinas individuales mediante HPLC

Luego de inyectar en HPLC los extractos metanólicos correspondientes a la población “98xAng” en dos temporadas, 92 (x3 réplicas) extractos en T1 y 80 (x3 réplicas) extractos en T2, obtuvimos perfiles similares a los mostrados en Anexo 5. En estos perfiles notamos la presencia mayoritaria de dos picos de detección, previamente identificados mediante análisis de espectrometría de masas (UHPLC-DAD Orbitrap Electrospray Ionization MS) como cianidina 3- glucósido (C3G) y cianidina 3-rutinósido (C3R). Podemos apreciar además la presencia de una serie de peaks minoritarios, los cuales fueron identificados en general como antocianos unidos covalentemente a distintas procianidinas (Anexo 3).

Respecto a la cuantificación de antocianinas individuales, las regresiones lineales obtenidas para los compuestos C3G y C3R mostraron coeficientes de determinación de 0,99 y p -value $< 2.2E-16$, sugiriendo que son adecuadas para su uso como curvas de calibración. Cabe señalar que para estas determinaciones, utilizamos una curva de calibración única, ya que se llevaron a cabo para las muestras de ambas temporadas en un evento de cuantificación.

Por último, para la cuantificación de las antocianinas minoritarias (Compuestos D, E, F, T, L, R, P, M y U), empleamos la curva de calibración de C3G.

Contenidos de compuestos fenólicos en 98ang

Utilizando las curvas de calibración mostradas en la sección anterior, pudimos predecir los valores de contenido de cada tipo de compuesto en base a los valores de absorbancia. Los contenidos de cada compuesto o actividad antioxidante para los parentales, así como los estadísticos descriptivos para la progenie '98xAng' se resumen en la tabla 2. Cabe señalar que sólo se muestran valores de contenidos de fenoles en los parentales para la T1, esto es porque en la T2 no hubo disponibilidad de muestras para estas variedades. Además, de acuerdo a lo esperado, los contenidos de fenoles totales fueron mayores a flavonoides, proantocianidinas y antocianinas. En cuanto a la relación de contenidos de flavonoides, proantocianidinas y antocianinas, éstos variaron dependiendo de la variedad o individuo.

En general observamos que para todos los tipos de compuestos y actividades antioxidantes cuantificadas (Tablas 2 y 3), los valores de concentración en exocarpo (sk) superan al menos en dos veces a los valores observados en mesocarpo (fl). Podemos observar también que los contenidos de fenoles y actividades antioxidantes detectados en la temporada T1 fueron siempre mayores a T2, indicando una fuerte influencia ambiental en los rasgos evaluados. Respecto de las distribuciones de frecuencia observadas en '98xAng' para cada compuesto o actividad antioxidante en cada temporada, podemos observar en los histogramas del Anexo 4 que ninguno de los rasgos evaluados se distribuye normalmente; esto se confirma en las tabla 2 y 3, donde se muestran valores de significancia para el test de Shapiro-Wilk (prueba de ajuste a una distribución normal teórica) que no permiten rechazar la hipótesis nula para estas pruebas, indicando que

ningún set de datos adopta esta distribución, excepto en la actividad antioxidante por DPPH en mesocarpo para la temporada T2.

Con el objetivo de observar los potenciales efectos aditivos transmitidos desde cada parental a la progenie F1, llevamos a cabo comparaciones no paramétricas (prueba U de Wilcoxon) de los distintos rasgos evaluados entre cada parental y la progenie '98xAng'. De los 34 rasgos estudiados (17 tipos de compuestos cuantificados en dos tejidos, sólo en la T1, $17 \times 2 \times 1 = 34$; tablas 2 y 3), observamos que en 16 de ellos, al menos uno de los padres muestra un promedio significativamente distinto al de la población (8 en mesocarpo y 8 en exocarpo; $p < 0,05$). En el caso de los rasgos en que no se encuentran diferencias significativas entre parentales y población, podrían estar segregando *loci* con efectos positivos y negativos simultáneamente.

En cuanto al contenido en mesocarpo (fl), se observa que para los antocianos C3G y C3R la media poblacional (5,45 $\mu\text{g/Kg PF}$; tabla 2) es menor a la media de '98.99' y 'Angeleno' (4,86 y 7,01 $\mu\text{g/Kg PF}$, respectivamente; tabla 2), sugiriendo que en la progenie estarían segregando *loci* con efectos aditivos negativos para la concentración de C3R y C3G en mesocarpo, provenientes de ambos padres. Para las antocianinas compuestos F, L, P y U, los promedios obtenidos en ambos parentales es de 0 $\mu\text{g eq.C3G/Kg PF}$, mientras que en la progenie 98xAng, tuvieron valores promedio de 0,01 $\mu\text{g eq.C3G/Kg PF}$, sugiriendo que en ésta podrían estar segregando *loci* con efectos aditivos positivos para el contenido de estos compuestos.

En el caso del contenido de fenoles en exocarpo (sk), observamos que para flavonoides totales y proantocianidinas totales, los contenidos en ambos padres son mayores que los promedios de la progenie (Tabla 3), indicando que podrían estar segregando *loci* con un efecto aditivo negativo. Para los valores de antocianos totales, FRAP, DPPH, C3G y C3R,

observamos que el parental 'Angeleno' muestra una concentración mayor al promedio de la progenie '98xAng', sugiriendo que probablemente 'Angeleno' contribuye con efectos aditivos positivos y '98.99' con efectos aditivos negativos para la generación posterior.

Tabla 2. Parámetros estadísticos descriptivos de contenido de compuestos fenólicos en mesocarpo. El promedio de los parentales ("98.99" y "Angeleno") para cada rasgo corresponde a las réplicas biológicas (n= 3) de la temporada 1 y su valor es expresado junto con su correspondiente error estándar. Los promedios y medianas de la progenie "98xAng" para cada rasgo corresponden al contenido de cada individuo de la población de cada temporada (n= 92, T1; n= 80, T2). Para esta misma población se presenta el *p-value* de la prueba de Shapiro-Wilk para cada rasgo. En las columnas de cada parental se presentan valores destacados en rojo, indicando que su diferencia con respecto a la progenie "98xAng" es significativa (prueba U Mann-Whitney, datos no mostrados). En la columna Normalidad se destaca en azul aquellos rasgos que presentaron un valor mayor a 0,05 y por tanto su distribución es normal.

Compuesto	Temporada	Parental '98.99' ($\mu\text{g eq/Kg PF}$)	Parental 'Angeleno' ($\mu\text{g eq/Kg PF}$)	Promedio 98ang [$\mu\text{g eq/Kg PF}$]	Mediana 98ang [$\mu\text{g eq/Kg PF}$]	Normalidad (<i>p-value</i> prueba Shapiro-Wilk)
Fenoles Totales	T1	1191,44 \pm 71,35	1106,73 \pm 182,58	1263,25	1160,79	3,80E-04
	T2	NA	NA	276,82	269,24	3,30E-04
Flavonoides Totales	T1	129,92 \pm 5,54	127,38 \pm 5,56	321,61	200,71	6,40E-07
	T2	NA	NA	152,90	146,36	2,80E-05
Proantocianidinas totales	T1	514,91 \pm 41,99	324,48 \pm 61,21	407,02	367,74	2,70E-09
	T2	NA	NA	85,60	75,68	2,20E-05
Antocianinas Totales	T1	14,92 \pm 1,51	23,77 \pm 4,98	13,58	3,52	< 2,2E-16
	T2	NA	NA	7,30	1,91	< 2,2E-16
DPPH	T1	1187,92 \pm 86,48	1701,90 \pm 296,11	1137,37	1059,88	4,40E-09
	T2	NA	NA	239,25	232,56	0,6791
FRAP	T1	4851,25 \pm 1937,99	4455,73 \pm 804,65	6799,37	6419,31	< 2,2E-16
	T2	NA	NA	730,83	682,96	3,00E-04
C3G	T1	4,86 \pm 0,52	7,01 \pm 3,77	5,45	1,21	< 2,2E-16
	T2	NA	NA	3,34	0,49	< 2,2E-16
C3R	T1	9,87 \pm 0,99	9,10 \pm 4,89	7,60	1,97	< 2,2E-16
	T2	NA	NA	3,19	0,63	< 2,2E-16
Compuesto D	T1	0,02 \pm 0,01	0	0,02	0,01	< 2,2E-16
	T2	NA	NA	0,01	0	< 2,2E-16
Compuesto E	T1	0,03 \pm 0,01	0,02 \pm 0,01	0,03	0,01	< 2,2E-16
	T2	NA	NA	0,03	0,003	< 2,2E-16
Compuesto F	T1	0	0	0,01	0	< 2,2E-16
	T2	NA	NA	0,004	0,00	< 2,2E-16
Compuesto T	T1	0,02 \pm 0,005	0,03 \pm 0,008	0,02	0,01	< 2,2E-16
	T2	NA	NA	0,02	0	< 2,2E-16
Compuesto L	T1	0	0	0,01	0,00	< 2,2E-16
	T2	NA	NA	0,02	0,004	< 2,2E-16
Compuesto R	T1	0	0,01 \pm 0,007	0,01	0,0006	< 2,2E-16
	T2	NA	NA	0,01	0	< 2,2E-16
Compuesto P	T1	0	0	0,01	0	< 2,2E-16
	T2	NA	NA	0	0	< 2,2E-16
Compuesto M	T1	0,07 \pm 0,01	0,06 \pm 0,04	0,09	0,004	< 2,2E-16
	T2	NA	NA	0,05	0,004	< 2,2E-16
Compuesto U	T1	0	0	0,02	0	< 2,2E-16
	T2	NA	NA	0,003	0	< 2,2E-16

Tabla 3. Parámetros estadísticos descriptivos de contenido de compuestos fenólicos en exocarpo. Presenta la misma descripción que la tabla 2.

Compuesto	Temporada	Parental '98 99' ($\mu\text{g eq/Kg PF}$)	Parental 'Angeleno' ($\mu\text{g eq/Kg PF}$)	Promedio 98ang ($\mu\text{g eq/Kg PF}$)	Mediana 98ang ($\mu\text{g eq/Kg PF}$)	Normalidad (p-value prueba Shapiro-Wilk)
Fenoles Totales	T1	4968,72 \pm 1456,55	5310,79 \pm 957,13	4496,60	4080,46	1,20E-07
	T2	NA	NA	1254,15	1209,04	1,23E-03
Flavonoides Totales	T1	1362,07 \pm 284,55	1277,90 \pm 41,07	837,24	726,03	1,80E-08
	T2	NA	NA	882,65	823,80	8,00E-06
Proantocianidinas totales	T1	2884,14 \pm 783,99	2832,93 \pm 19,53	1679,54	1443,54	1,10E-11
	T2	NA	NA	478,13	445,18	3,40E-09
Antocianinas Totales	T1	158,56 \pm 39,05	361,37 \pm 0,96	180,27	139,72	< 2,2E-16
	T2	NA	NA	133,86	102,28	< 2,2E-16
DPPH	T1	4642,58 \pm 1337,99	6589,75 \pm 824,55	3738,03	3620,51	8,90E-06
	T2	NA	NA	1049,07	1045,32	0,0008211
FRAP	T1	36238,78 \pm 10754,80	44341,62 \pm 1629,86	32910,43	31205,26	5,20E-07
	T2	NA	NA	4648,35	4332,01	8,70E-06
C3G	T1	30,55 \pm 19,18	61,56 \pm 61,47	78,30	58,88	4,70E-13
	T2	NA	NA	58,31	43,33	< 2,2E-16
C3R	T1	73,47 \pm 45,42	56,556 \pm 56,38	96,05	66,72	< 2,2E-16
	T2	NA	NA	70,34	48,90	< 2,2E-16
Compuesto D	T1	0,07 \pm 0,0461	0,28 \pm 0,15	0,24	0,13	< 2,2E-16
	T2	NA	NA	0,07	0,01	< 2,2E-16
Compuesto E	T1	0,08 \pm 0,04	0,22 \pm 0,12	0,23	0,13	< 2,2E-16
	T2	NA	NA	0,20	0,08	< 2,2E-16
Compuesto F	T1	0	0	0,02	0	< 2,2E-16
	T2	NA	NA	0,01	0	< 2,2E-16
Compuesto T	T1	0	0,0708 \pm 0,0386	0,04	0,02	< 2,2E-16
	T2	NA	NA	0,17	0,05	< 2,2E-16
Compuesto L	T1	0	0	0,09	0	< 2,2E-16
	T2	NA	NA	0,04	0,01	< 2,2E-16
Compuesto R	T1	0,07 \pm 0,05	0,23 \pm 0,12	0,16	0,10	< 2,2E-16
	T2	NA	NA	0,13	0	< 2,2E-16
Compuesto P	T1	0	0,11 \pm 0,06	0,14	0,06	< 2,2E-16
	T2	NA	NA	0,06	0	< 2,2E-16
Compuesto M	T1	0,46 \pm 0,3	0,95 \pm 0,50	0,80	0,47	< 2,2E-16
	T2	NA	NA	0,54	0,03	< 2,2E-16
Compuesto U	T1	0	0,09 \pm 0,05	1,04	0,06	< 2,2E-16
	T2	NA	NA	0,04	0	< 2,2E-16

Correlaciones entre contenidos de compuestos fenólicos.

Las correlaciones entre el contenido de los distintos compuestos fenólicos evaluados en las temporadas y tejidos antes descritos, fueron estimadas mediante el método no paramétrico de Spearman y se muestran en la Figura 3. Respecto a las correlaciones entre compuestos dentro de una misma temporada y tejido, podemos decir que en general, las correlaciones más altas y significativas ($p < 0,001$) se encuentran entre las familias de fenoles, al igual que entre C3G y C3R con antocianos totales, en ambos tejidos y temporadas.

Respecto al contenido fenólico en pulpa T1 y T2 (Figura 3A y 3B), las correlaciones obtenidas fueron mayores a 0,7, excepto entre DPPH y FRAP, y entre Flavonoides totales

y FRAP de la primera temporada ($\rho = 0,6$ en ambos). Además, observamos que ningún antociano individual ni antocianos totales correlacionaron con las demás familias de fenoles, a excepción del compuesto U en T2 ($\rho = 0,4$). Estos resultados sugieren que en la progenie 98xAng, el contenido de fenoles, flavonoides, proantocianidinas y actividades antioxidantes podrían estar controladas por determinantes genéticos comunes, y que los antocianos podrían estar reguladas por *loci* en común, pero distintos de las demás familias de compuestos.

Entre los antocianos de pulpa T1, los que presentan mayor cantidad de correlaciones altas ($\rho > 0,7$) son C3G, C3R y los compuestos D, E, R y M. En el caso de pulpa T2, las correlaciones fueron menores respecto de T1, donde aquellos que presentan mayor cantidad de correlaciones altas ($\rho > 0,7$) son C3G y C3R. Los antocianos C3G y C3R correlacionan entre sí perfectamente en T1 y T2, mientras que con los compuestos E y M lo hacen con un valor $\rho = 0,8$ en T1.

En cuanto a exocarpo, en ambas temporadas se apreciaron más correlaciones altas ($\rho > 0,8$) que las observadas en el mesocarpo, así como también correlaciones significativas ($p\text{-value} < 0,001$) entre antocianos y las demás familias de fenoles y actividades antioxidantes, aunque no mayores a 0,6. Las correlaciones entre ensayos espectrofotométricos presentaron valores $\rho \geq 0,8$ con algunas excepciones entre la correlación de DPPH y el resto de ensayos ($\rho > 0,6$) en ambas temporadas. Entre los antocianos de piel T1, los que presentan mayor cantidad de correlaciones altas ($\rho = 0,8$) son C3G, C3R y los compuestos D, E y M, mientras que en piel T2 son C3G y compuestos E, T y M. C3G y C3R correlacionan entre sí casi perfectamente ($\rho = 0,9$); ambos antocianos en T1 correlacionan con los compuestos D y E con un valor $\rho = 0,9$ y en T2 correlacionan con el compuestos E con un valor $\rho = 0,8$.

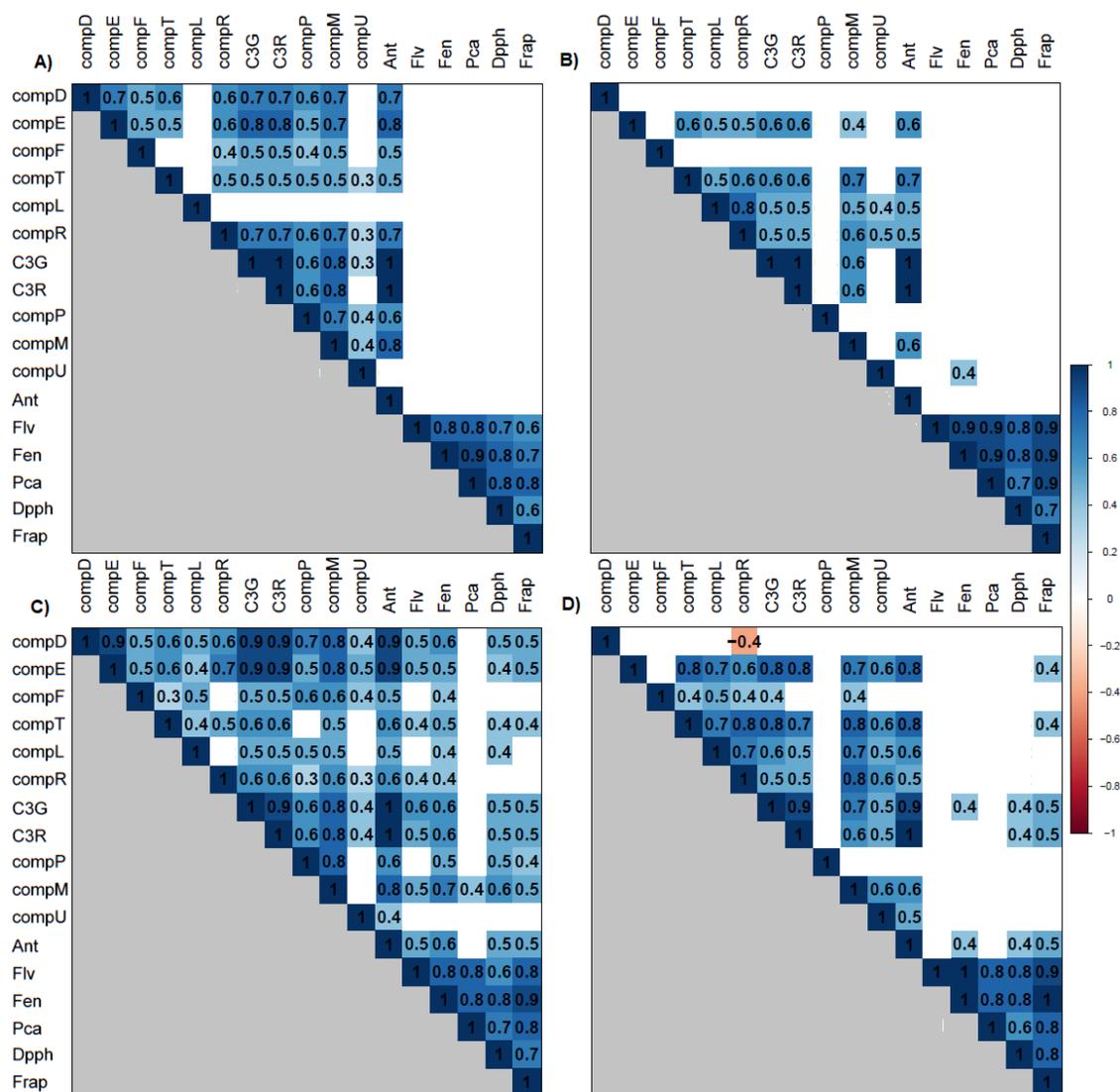


Figura 3. Matriz de correlación de Spearman entre compuestos fenólicos. Matriz de correlaciones basada en gradiente de color según coeficientes de Spearman, en donde aquellas correlaciones positivas y cercanas a 1 poseen color azul y aquellas correlaciones negativas cercanas a -1 poseen color rojo. Las casillas en blanco corresponden a correlaciones no significativas ($p > 0,001$). A: Correlación entre compuestos fenólicos correspondientes a muestras de pulpa, T1; B: Correlación entre compuestos fenólicos correspondientes a muestras de pulpa, T2; C: Correlación entre compuestos fenólicos correspondientes a muestras de piel, T1; D: Correlación entre compuestos fenólicos correspondientes a muestras de piel, T2.

Correlaciones de contenidos de compuestos fenólicos entre temporadas.

A continuación se examinó la correlación para cada tejido entre temporadas, con el objetivo de observar la influencia del ambiente en el contenido de familias de fenoles. Los

coeficientes de correlación de Spearman para cada tejido se resumen en la tabla 4, observándose correlaciones significativas ($p < 0,05$) pero con bajos coeficientes de correlación entre los mismos caracteres ($p < 0,5$). Las correlaciones más altas entre temporadas se encuentran en tejido de pulpa y corresponden a C3G, C3R y Antocianos totales con valores $\rho \geq 0,29$. Estos datos, por lo tanto, indican que existen correlaciones débiles entre temporadas para los compuestos y familias analizadas, sugiriendo una significativa influencia ambiental en estos rasgos.

Tabla 4. Coeficientes de correlación Spearman (ρ) para compuestos fenólicos en tejidos de piel y pulpa. Nivel de significancia de la prueba: 0,05.

Compuesto	Piel	Pulpa
Fenoles totales	0,046	0,186
Flavonoides totales	0,168	0,016
Procianidinas totales	0,062	0,128
C3G	0,110	0,292
C3R	0,236	0,294
Antocianos totales	0,188	0,299
Compuesto D	0,137	0,004
Compuesto E	0,194	-0,012
Compuesto F	0,049	0,061
Compuesto T	0,018	0,055
Compuesto L	0,021	0,155
Compuesto R	0,103	0,144
Compuesto P	0,090	0,196
Compuesto M	0,116	0,209
Compuesto U	0,132	-0,004
DPPH	0,134	0,114
FRAP	0,037	0,190

Correlaciones entre contenidos de compuestos fenólicos y rasgos agronómicos.

Con el propósito de determinar si algún compuesto fenólico está influenciado por características pomológicas o fenológicas del fruto en la población 98xAng, comparamos mediante análisis de correlación de Spearman, entre contenido fenólico y las evaluaciones

de rasgos agronómicos entregados por Salazar y col. (2017) para cada tejido y temporada, con un nivel de significancia dado por un p-value de 0,001, tal como muestra la Figura 4.

Al igual que en el caso de las correlaciones intra-temporadas de antocianos, hay mayor cantidad de correlaciones significativas en tejidos de piel. En ambos tejidos la mayor cantidad de correlaciones significativas se encuentran en la primera temporada. La particularidad esta vez se encuentra en la presencia de correlaciones altas e inversas entre distintos antocianos (C3G, C3R, comp. E y T mayoritariamente) y varios parámetros asociados al color del fruto en ambas temporadas y tejidos. En cuanto a las familias de fenoles, estos presentan pocas correlaciones con los datos agronómicos para ambos tejidos. En mesocarpo solo está la correlación entre flavonoides totales y el peso del fruto, aunque en ambas temporadas. En piel, en T1 se encuentra correlacionado negativamente fenoles totales y FRAP con rasgos asociados al color, y junto a DPPH correlacionan positivamente con el grado de cubrimiento del color en el fruto. En T2, sólo FRAP se correlaciona negativamente con Color L y positivamente con cubrimiento.

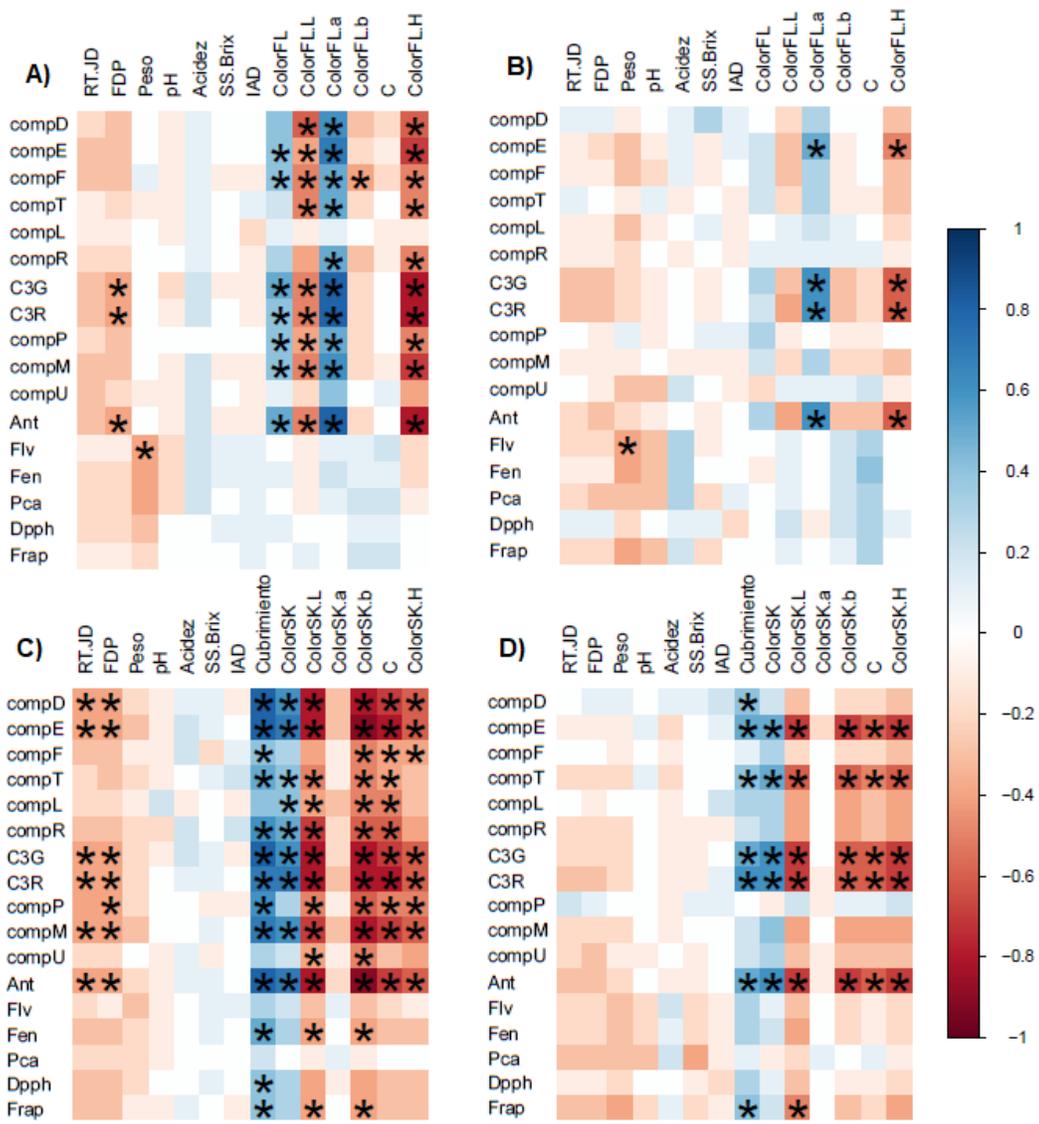


Figura 4. Matriz de correlaciones de rasgos fenotípicos. Matriz de correlaciones basada en gradiente de color según coeficientes de Spearman, en donde aquellas correlaciones positivas y cercanas a 1 poseen color azul y aquellas correlaciones negativas cercanas a -1 poseen color rojo. Las correlaciones significativas ($p < 0,001$) presentan un * en su casilla. A: Correlación entre rasgos fenotípicos correspondientes a muestras de pulpa, T1; B: Correlación entre rasgos fenotípicos correspondientes a muestras de pulpa, T2; C: Correlación entre rasgos fenotípicos correspondientes a muestras de piel, T1; D: Correlación entre rasgos fenotípicos correspondientes a muestras de piel, T2.

Generación de modelos lineales mixtos y estimaciones de BLUPs.

Debido a la alta influencia de variables ambientales (temporada) en los fenotipos observados, sugerida por bajos valores de correlación entre distintas temporadas,

decidimos estimar predictores de efectos genéticos aditivos para cada individuo de la progenie 98xAng, de modo tal que, considerando variables con un alto impacto en la variabilidad de los rasgos estudiados, podamos estimar un valor fenotípico corregido para cada individuo. Para esto, se determinaron los mejores predictores lineales no sesgados (BLUPs) para cada individuo en cada carácter, obtenidos a través de modelos lineales mixtos. La construcción de estos modelos comienza incluyendo como variable fija la réplica biológica del fruto (RB) y como variables aleatorias la accesión y la temporada, siendo este el modelo inicial. Luego incluimos iterativamente covariadas que pudieran aumentar el ajuste y mejorar las distribuciones de residuos. La determinación de estas covariadas es en base a aquellos caracteres que resultaron ser factores determinantes mediante ANOVA (datos no mostrados). El modelo final para cada carácter es escogido considerando el menor valor residual y del criterio de información de Akaike.

En los anexos 7 y 8 se muestran las variables incluidas en los modelos para cada carácter, con las covariadas consideradas en los modelos y los valores de ajuste de los modelos finales para mesocarpo y exocarpo, respectivamente. En los anexos 9-12, se muestran criterios de evaluación de los modelos como la distribución y normalidad de los residuos (qqplot), respectivamente.

La heredabilidad en sentido amplio de los caracteres en mesocarpo son de mediana magnitud ($\leq 37\%$), siendo el contenido de flavonoides totales el rasgo con la heredabilidad más alta (36,3%), mientras que la heredabilidad más baja (2,5%) corresponde al carácter proantocianidinas totales.

En el exocarpo, la heredabilidad fue de menor magnitud en comparación con el mesocarpo ($\leq 32\%$). La heredabilidad más alta (31,4%) corresponde al carácter C3G y la heredabilidad de menor magnitud (2,4%) corresponde a FRAP.

Los bajos valores de heredabilidad presentes en ambos tejidos, son contrastados con los altos valores de variabilidad ambiental obtenidos (73,5% y 75,4% en pulpa y piel, respectivamente), confirmando la gran influencia de las variables ambientales en los rasgos relacionados a compuestos fenólicos, mientras que los valores moderados en los caracteres indican que estos presentan componentes genético importantes en el análisis de QTLs (Oliveira y col., 2014).

La obtención de los valores genéticos de cada individuo se logra determinando los BLUPs a partir de los efectos aleatorios debido al genotipo (es decir, a cada accesión) del modelo lineal mixto final de cada carácter, usando este valor genotípico en el análisis de QTLs, corrigiendo el promedio general de la población 98xang teniendo en cuenta el efecto real que tienen los componentes genéticos en cada rasgo. Un ejemplo de dicho efecto se observa en el carácter "C3G" en piel (figura 5), en donde la adición del valor genético corrige el valor del promedio general de la población 98xang causando una disminución del 1,32% en el contenido de cianidina-3-glucósido de la población, siendo el nuevo promedio de la progenie 98xang 54,62 μg iniciales per Kg de peso fresco de fruta.

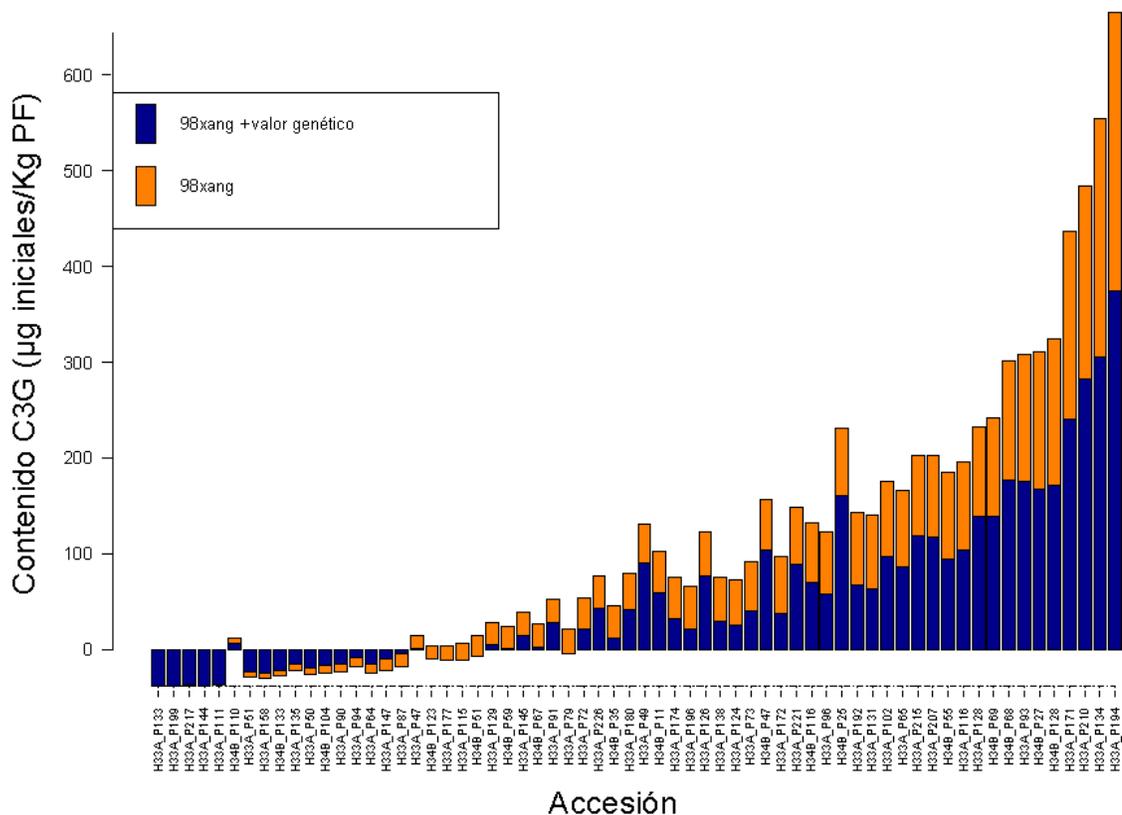


Figura 5: Contenido de cianidina-3-glucósido corregido por valor genético estimado (BLUP). Gráfico de barras que compara el promedio del contenido de C3G en piel de la población 98xang de temporada 2, con el nuevo promedio producto de la adición del valor genético (BLUP) extraído para este rasgo mediante la generación de modelos lineales mixtos. El contenido de C3G está expresado en µg iniciales per Kg de peso fresco de fruta. En este caso, el valor cero (0) en el contenido de C3G equivale al promedio de la población para este carácter.

Análisis de QTLs

Los valores genéticos (BLUPs) de cada rasgo son usados en el análisis de QTLs, junto con los datos genotípicos y los mapas genéticos de cada parental de la progenie 98xang generados por Salazar y col. (2020). Se detectaron QTLs asociados a compuestos fenólicos en todos los grupos de ligamiento, con excepción de LG2 y presentes mayoritariamente en piel. Los principales parámetros informativos del análisis de QTLs se encuentran descritos en la tabla 5.

En el mapa genético del parental “98.99” se detectaron 13 QTLs, la mayoría correspondientes a caracteres de antocianos individuales y en exocarpo, concentrándose principalmente en LG4. Los QTLs segregantes desde este parental, explican un rango entre 13,1% y 26,7% de la variación fenotípica de los caracteres, correspondientes a Flavonoides totales (en pulpa, LG8) y C3G (en piel, LG4), respectivamente. En el caso del parental “Angelino”, hay ocho QTLs asociados a compuestos fenólicos, distribuidos principalmente entre los grupos LG3 y LG5. La variación fenotípica explicada por cada QTL (al carácter correspondiente) se encontró en el rango entre 12,4% y 27,1%, pertenecientes a los QTLs Compuesto L (en piel, LG3) y Flavonoides totales (en pulpa, LG5), respectivamente.

El valor LOD en el parental materno varió entre 2,77 y 5,12, mientras que en “Angelino” varió con un rango mayor, entre 2,79 y 5,69. En ambos parentales, el valor LOD reportado fue mayor al valor LOD límite determinado mediante la prueba de permutación (PT, Permutation Test) en el análisis de QTLs de cada rasgo evaluado. A pesar de esto, los QTLs detectados, en ambos parentales, para el carácter Compuesto U, no tuvieron un valor LOD significativo (2,07 y 0,96 para “98.99” y “Angelino”, respectivamente) y por ende fueron descartados como QTLs candidatos.

Los ocho grupos de ligamiento junto con los QTLs hallados fueron graficados usando MapChart 2.32 (Voorrips, 2002) para cada parental y son presentados en Anexo 13. En LG8 de “Angelino” se encuentran en la misma posición, los QTLs Proantocianidinas totales y DPPH en pulpa (Figura 6), sugiriendo que las proantocianidinas en su conjunto serían las principales encargadas de la capacidad antioxidante en el mesocarpo del fruto. Otro grupo de QTLs interesantes se encuentra, como se mencionó anteriormente, en LG4 de “98.99”, en el cual se encontró la mayor agrupación de QTLs asociados a antocianos individuales, entre ellas C3G y C3R (Figura 7), donde 7 QTLs se encuentran posicionados en un rango

pequeño dentro de este grupo de ligamiento (desde 20,14 cM a 35,16 cM), mientras que el QTL de compuesto M se encuentra a 42,05 cM. Todos estos QTLs se hallaron en el exocarpo, lo que sumado a que otros QTLs hallados en esta misma región, asociados a rasgos de color (Salazar y col, 2017), corroborarían la compleja red de participación de diversos genes en el proceso de pigmentación del exocarpo del fruto, a través de la síntesis y acumulación de antocianos, tales como C3G y C3R. Encontrar en aquellos QTLs genes candidatos relacionados con la regulación, transporte y biosíntesis de compuestos fenólicos es un paso importante para un mejor entendimiento de la producción de estos metabolitos secundarios y con ello una herramienta para el futuro desarrollo de programas de mejora genética en ciruelos.

Tabla 5. QTLs detectados en progenie 99xang mediante análisis Mapeo Múltiple de QTLs (MQM) y Kruskal Wallis (KW). Tabla resumen de QTLs relacionados a compuestos fenólicos presentes en los grupos de ligamiento (LG) de ambos parentales. Se indica la posición y marcador asociado a cada QTL detectado mediante el análisis paramétrico MQM (valor LOD y varianza fenotípica debida al QTL) y el análisis no paramétrico Kruskal-Wallis. La prueba de permutación entrega el valor LOD de significancia ($p < 0,05$) de cada QTL para cada rasgo. El nombre de cada QTL es el mismo a su rasgo correspondiente. El nombre en abreviatura de cada rasgo se encuentra descrito en Anexo 1.

Rasgo (QTL)	Parental	Tejido	Grupo de ligamiento	Posición (cM)	Valor LOD	Valor Permutation Test	Variación fenotípica debida a QTL (%)	Marcador con LOD más alto	KW
Fen	98.99	pulpa	3	7,51	3,77	2,8	20,4	3_02695739	14,13
			7	28,98	3,22		14,1	7_14305246	15,42
Flv	98.99	pulpa	8	58,01	3,01	2,7	13,1	8_18107776	14,39
			8	41,64	3,17	2,7	16,1	8_16024758	12,88
			5	29,96	5,69	2,7	27,1	5_10866620	16,43
Pca	Angeleno	pulpa	5	20,60	5,03		17,9	5_05188952	11,69
			8	4,36	4,45	2,7	17,5	8_02960820	17,96
DPPH	Angeleno	pulpa	8	4,36	2,79	2,7	15,5	8_02960820	10,27
C3G	98.99	piel	4	33,91	5,12	2,8	26,7	4_07429482	22,31
C3R	98.99	piel	4	25,77	4,35	2,4	21	4_06220253	19,76
Comp D	Angeleno	piel	3	27,73	5,47	2,8	23,2	3_07486878	8,48
Comp E	98.99	piel	4	28,91	4,24	2,6	20,5	4_06577345	20,29
Comp F	98.99	piel	4	25,77	2,92	2,3	14,6	4_06220253	10,19
Comp T	98.99	piel	4	25,77	4,88		20,6	4_06220253	14,95
			7	55,49	3,68	2,4	15	7_18439580	9,60
Comp L	98.99	pulpa	1	7,50	4,29	1,3	15,8	1_03223529	2,55
			4	35,16	4,58	2,3	18,3	4_07594839	22,44
			3	0,62	2,85	2,5	12,4	3_00246196	4,85
Comp R	Angeleno	piel	4	36,40	3,21	2,7	16	4_10742408	19,92
Comp P	Angeleno	piel	3	0,62	3,25	2,3	16,2	3_00246196	12,81
Comp M	98.99	piel	4	42,05	2,77	2,7	15,5	4_11045830	10,27

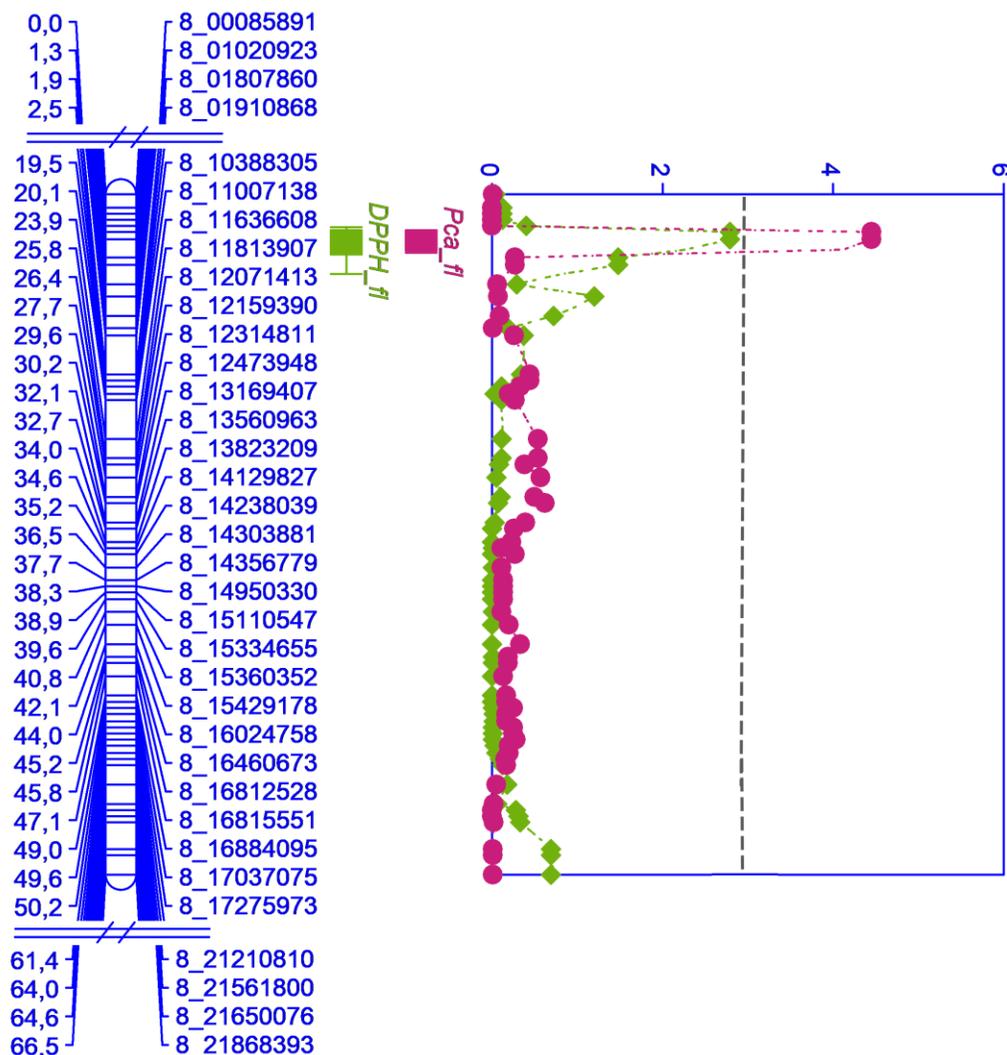


Figura 6: QTLs detectados en LG8 de parental paterno “Angeleno”. Mapa genético del grupo de ligamiento 8 del parental “Angeleno” con QTLs detectados mediante Mapeo por intervalos (IM, del inglés Interval Mapping) y por MQM. Cada QTL está asignado a su carácter correspondiente usando el mismo nombre. La abreviatura “fl” al lado de cada nombre indica que proviene de tejido de pulpa. Al lado izquierdo de LG8 se indica la posición (cM) de cada marcador y a la derecha se encuentra el marcador asociado a dicha posición. El gráfico a la derecha indica los valores LOD de cada QTL identificados por color. Todos los QTLs detectados superaron el valor LOD límite informado en el análisis de QTLs de cada rasgo evaluado, indicados en la tabla 5 (valor Permutation Test). Línea gris punteada indica nivel LOD 3, aceptado como valor mínimo de significancia. Simbología: Pca_fl, contenido de proantocianidinas totales en pulpa; DPPH_fl, Capacidad antioxidante mediante DPPH en pulpa.

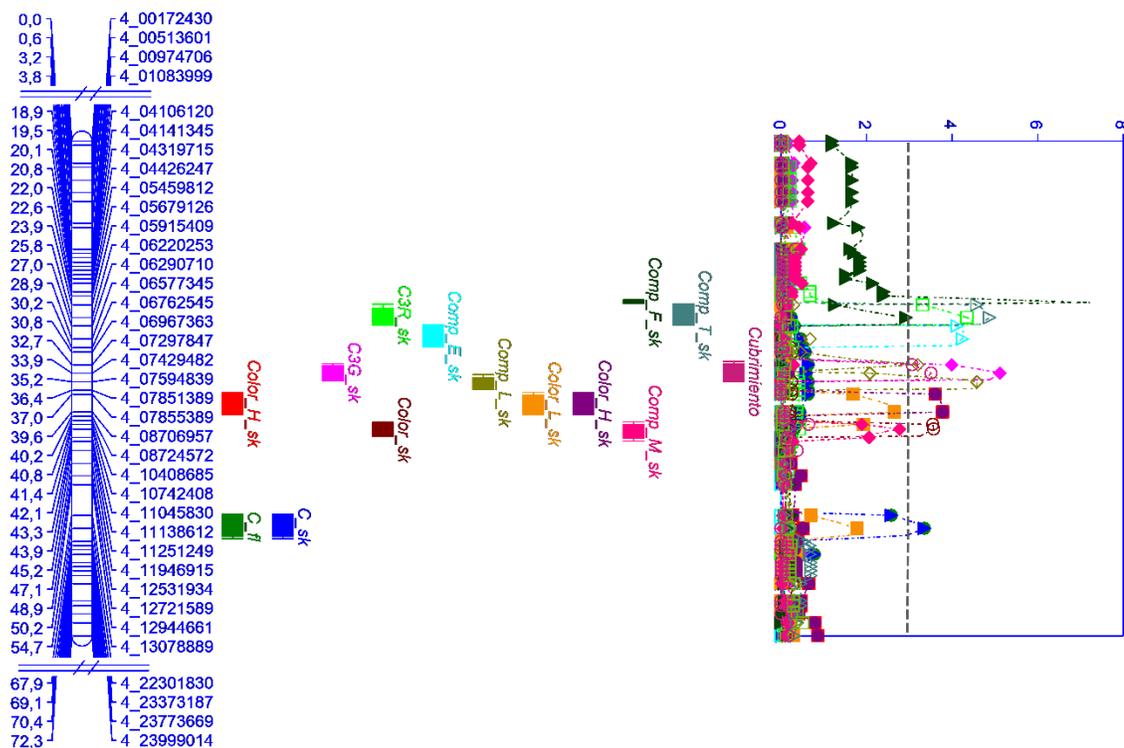


Figura 7: QTLs detectados en LG4 de parental materno “98.99”. Mapa genético del grupo de ligamiento 4 del parental “98.99” con QTLs detectados mediante Mapeo por intervalos (IM, del inglés Interval Mapping) y por MQM. Cada QTL está asignado a su carácter correspondiente usando el mismo nombre. La abreviatura “sk” al lado de cada nombre indica que proviene de tejido de piel y “fl” de pulpa. Al lado izquierdo de LG4 se indica la posición (cM) de cada marcador y a la derecha se encuentra el marcador asociado a dicha posición. El gráfico a la derecha indica los valores LOD de cada QTL identificados por color. Todos los QTLs detectados superaron el valor LOD límite informado en el análisis de QTLs de cada rasgo evaluado, indicados en la tabla 5 (valor Permutation Test). Línea gris punteada indica nivel LOD 3, aceptado como valor mínimo de significancia. Simbología: Comp_U_sk, contenido de compuesto U en piel; Cubrimiento, cubrimiento de color en piel; Comp_T_sk, contenido de compuesto T en piel; Comp_F_sk, contenido de compuesto F en piel; Comp_M_sk, contenido de compuesto M en piel; Color_H_sk, parámetro H* de color en piel; Color_L_sk, parámetro L* de color en piel; Comp_L_sk, contenido de compuesto L en piel; Comp_E_sk, contenido de compuesto E en piel; C3R_sk, contenido de cianidina 3 -rutinósido en piel; Color_sk, sobrecolor en piel; Comp_C3G_sk, contenido de cianidina 3 -glucósido en piel; C_sk, parámetro C* de color en piel; C_sk, parámetro C* de color en pulpa.

DISCUSIÓN

La influencia ambiental en los compuestos fenólicos

Mejorar la calidad de frutas en cuanto a componentes fenólicos, dándole un valor agregado al fruto, ha sido un gran desafío en programas de mejoramiento frutal debido a que estos rasgos son heredados cuantitativamente, y la cantidad almacenada de estos compuestos está controlada por varios genes (son rasgos poligénicos), además de ser fuertemente influenciada por el ambiente, como por ejemplo, el ataque de patógenos, exposición a alta radiación ultravioleta, la presencia de polinizadores, etc. (Howell, 1974; Beckman, 2000; Jeandet y col., 2002; Jakubska y col., 2005; Zhang y col., 2016). Por esto, separar los componentes heredables (varianza genética) de los no heredables (varianza ambiental) es fundamental para establecer métodos apropiados de selección en estos programas de mejoramiento genético (Oliveira y col., 2014).

El fuerte efecto ambiental se observó en otros estudios en diferentes especies de Rosáceas, por ejemplo Abdelghafar y col. (2020) encontraron 14 QTLs asociados a compuestos fenólicos en durazno, de los cuales solo un QTL fue estable en los dos años analizados. Resultados similares obtuvieron Chagné y col. (2012), quienes detectaron 79 QTLs para 17 compuestos fenólicos presentes en manzana, habiendo solo 7 grupos de QTLs estables en dos años de evaluación, representando a 7 clases compuestos fenólicos. Finalmente, si bien Verdu y col. (2014) obtuvieron valores de Heredabilidad altos en extractos de manzana (0,57 – 0,98), de los 171 QTLs detectados son escasos los que cruzan los 3 años de evaluación, representando solamente a cuatro clases de compuestos fenólicos.

Este efecto ambiental se vio demostrado en la población 98Ang de este trabajo, en donde los compuestos fenólicos mostraron grandes diferencias en cuanto a su contenido en

ambas temporadas, siendo los contenidos de compuestos fenólicos de la primera temporadas superiores a la segunda temporada, visible en las variadas distribuciones generadas (Anexo 4). Esto avaló el uso de distintas curvas de calibración para la determinación del contenido de familias de compuestos para cada temporada. Sumado a esto, las correlaciones de Spearman entre temporadas (Tabla 4) fueron bajas ($\rho \geq 0,30$) para ambos tejidos analizados, piel y pulpa, lo que finalmente fue corroborado mediante ANOVA, donde se encontró que el factor “temporada” tiene un impacto significativo en los parámetros para todas los caracteres, siendo incluido posteriormente como covariada aleatoria en los modelos lineales mixtos generados.

A pesar de esta fuerte influencia ambiental, se observan efectos aditivos transmitidos desde cada parental, “98.99” y “Angelino”, a la progenie F1 98Ang (Tablas 2 y 3), lo que junto a los valores de heredabilidad en sentido amplio ($\leq 40\%$), indican la presencia de componentes genéticos importantes en el análisis de QTLs (Oliveira y col., 2014). Es por eso que fue posible estimar predictores lineales no sesgados (BLUPs) de efectos genéticos aditivos para cada individuo de la progenie 98Ang mediante la construcción de modelos lineales mixtos (Anexos 7 y 8).

Pero encontrar QTLs estadísticamente significativos no es una tarea sencilla, es como encontrar una aguja en un pajar: en este análisis se divide sistemáticamente el genoma mapeado, detectando en estas secciones parceladas asociaciones entre el fenotipo y el genotipo de marcadores (Collard y col., 2005).

Desde el desarrollo del fruto

En este seminario de título, se trabajó con datos fenotípicos ligados a compuestos fenólicos, junto con un set de rasgos agronómicos y de calidad del fruto (Salazar y col., 2020) asociados al estado de desarrollo y madurez del fruto debido a la estrecha relación existente

entre el proceso de madurez en el fruto y acumulación de compuestos fenólicos en este órgano (Andreotti y col., 2008). Asociar ambos conjuntos de datos tiene como objetivo obtener un análisis de QTLs más robusto en cuanto a estas asociaciones y facilitar así el desarrollo de programas de selección asistida por marcadores tales que permitan identificar nuevos individuos (futuros cultivares) que no solo posean ciertos compuestos fenólicos específicos, sino también en qué estado de madurez del fruto son más determinantes dichos compuestos fenólicos, como es el caso de las antocianinas C3G y C3R. Estos flavonoides están asociados al cubrimiento del color de la piel de la ciruela, encontrándose sus QTLs en el mismo grupo de ligamiento en “98.99” (LG4) y que se asemejan a los resultados obtenidos por Salazar y col. (2020), en donde QTLs para los rasgos de color de piel (SKC) y sobrecolor (OVC) se encontraron en “98.99”, en posiciones similares dentro del LG4

En otras especies y variedades de *Prunus* también se han hallado QTLs de sobrecolor en distintos grupos de ligamiento como por ejemplo en durazno (*Prunus persica* L. Batsch) en LGs 3, 4, 5, 6 y 7 (Eduardo y col., 2011; Hernández y col., 2017); en cereza (*Prunus avium* L.) se hallaron QTLs para color rojo en piel en los grupos de ligamiento 3, 6 y 7 (Sooriyapathirana y col., 2010) y en damasco (*Prunus armeniaca* L.) se identificaron QTLs en los LGs 2, 3 y 6 (Ruiz y col., 2010; Socquet-Juglard y col., 2013; García-Gómez y col., 2019). Un dato interesante en estos trabajos es que en LG3 se ha encontrado un gen candidato en común, que codifica para el factor de transcripción MYB10, el cual es inducido mediante la exposición a luz solar, regulando la biosíntesis de antocianinas, generando la coloración roja en frutos (Takos y col., 2006). Esto indicaría que C3G y C3R, que son los pigmentos más abundantes encontrados en frutos rojos (Gao y Mazza, 1995; Mozeti y col., 2002; Fanali y col., 2011; Mikulic-Petkovsek y col., 2016), participarían de manera

significativa en la pigmentación roja-violeta en la piel, siendo su biosíntesis regulada por MYB10 y por otros componentes genéticos, aún desconocidos, presentes en los QTLs asociados al color de la piel que se encuentran distribuidos en otros grupos de ligamiento.

Identificación de QTLs asociados a compuestos fenólicos

Como se mencionó anteriormente, la identificación de QTLs asociados a compuestos fenólicos es un paso importante para la futura generación de variedades frutales con mayor valor agregado en cuanto a su función antioxidante. Sumado a esto, la identificación de QTLs permite entender a mayor cabalidad las rutas de biosíntesis de estos compuestos, en donde varios mecanismos relacionados con su síntesis, transporte y sitios de almacenaje aún permanecen desconocidos (Zhao y Dixon, 2010; Verdu y col., 2014; Xu y col., 2015; Zhao, 2015), esto debido a la gran cantidad de compuestos fenólicos producidos por las plantas, muchos de ellos con pequeñas diferencias entre cada estructura y a las distintas funciones que cumplen estos compuestos en la planta, destacando la alta complejidad genética en la biosíntesis de metabolitos secundarios presente en este reino.

En la población F1 estudiada en este trabajo, los rasgos asociados a compuestos fenólicos mostraron diferencias significativas entre las temporadas evaluadas lo que indica una fuerte influencia ambiental, siendo esto esperable debido a la sensibilidad a la variación ambiental que presentan los rasgos poligénicos. A pesar de esto, la heredabilidad en sentido amplio para estos compuestos, en tejidos de piel y pulpa, fue de nivel moderado, por lo que estimar los parámetros genéticos de estos rasgos es crucial para que puedan ser usados para futuros programas de mejoramiento genético.

El uso de modelos lineales mixtos para obtener los componentes genéticos de la varianza total es ampliamente usado en programas de mejora de varias especies vegetales (Zhu y Weir, 1998; Oliveira y col., 2014; Salazar y col., 2017; Salazar y col., 2020), debido a que

permite el uso de los métodos BLUP y REML, lo que permite una aproximación más precisa en el posterior análisis de QTLs al considerar la influencia de factores ambientales en los rasgos evaluados. Siguiendo esta metodología permitió hallar QTLs relacionados a compuestos fenólicos provenientes de “98.99” en los grupos de ligamiento 1, 3, 4, 7 y 8, concentrándose la mayoría en LG4 y LG7, mientras que en “Angeleno” se identificaron QTLs solo en los LGs 3, 4, 5 y 8. Esta variada dispersión de QTLs fenólicos también es encontrada en otras especies de carozos, aunque en posiciones distintas (Abidi, 2012; Zeballos y col., 2016; Abdelghafar y col., 2020), lo que demuestra la compleja y organizada red de componentes genéticos especializados en la producción, acumulación y transporte de estos metabolitos secundarios.

Para los rasgos de familias de fenoles, se detectó un QTL para fenoles totales en LG3 en pulpa; 4 QTLs para flavonoides totales se hallaron, en tejidos de piel y pulpa, en LG5, LG7 y LG8 y dos QTLs, solo en pulpa, para proantocianidinas totales en LG5 y LG8. Similares resultados fueron reportados por Zeballos y col. (2016) con una población F1 de nectarinas (*Prunus persica L.*) derivada del cruce entre “Venus” y “Big Top”, en donde se halló en LG2 un QTL asociado a fenoles totales en ambos parentales y 5 QTLs en los grupos de ligamiento 2, 3, 4 y 7 asociados a la acumulación de flavonoides. Por su parte, Abdelghafar y col. (2020) utilizó una población F2 de duraznos (*Prunus persica L.*) derivada del cruce entre “Zin Dai” y “Crimson Lady”, detectando 3 QTLs asociados al contenido de flavonoides, en donde 2 fueron ubicados en LG7 y el otro en LG5. Esto sugeriría la existencia de una región conservada en especies de *Prunus* para el control del contenido de flavonoides en LG7 y LG5.

En cuanto a la actividad antioxidante, en este trabajo se identificó un solo QTL en LG8 y en pulpa, el cual se encuentra en el mismo grupo de ligamiento reportado por Zeballos y

col. (2016), quienes además hallaron otro QTL relacionado con la capacidad antioxidante en LG4. Abdelghafar y col. (2020) detectaron 2 QTLs asociados a actividad antioxidante en LG1 y 5, aunque ninguno de los QTLs identificados por ellos fueron estables para las dos temporadas analizadas (2013 y 2014) sugiriendo que estos rasgos fueron afectados fuertemente por eventos climáticos y/o el manejo de estos cultivares en cada temporada. A su vez, en este trabajo, el QTL DPPH en pulpa se encuentra agrupado al QTL de proantocianidinas totales, sugiriendo que estos fenoles podrían ser los principales responsables de la actividad antioxidante en ciruelos.

Con respecto a los antocianos, se identificaron QTLs en los grupos de ligamiento 1, 3, 4 y 7, concentrándose mayoritariamente en LG3 y LG4, donde los principales antocianos, C3G y C3R, se hallaron en este último QTL. Estos resultados se contrastan con lo reportado previamente por Zeballos y col. (2016) y Abdelghafar y col. (2020), quienes detectaron QTLs para antocianos totales en LG5 y LG7, respectivamente. En este trabajo no se realizó un análisis para el rasgo Antocianos totales, aunque sabiendo que C3G y C3R son los antocianos más abundantes en la progenie 98xang, se deduce que este rasgo tendría un QTL en la misma posición (LG4), de modo que las diferencias reportadas se podrían deber a la presencia de distintos tipos de antocianos presentes en *Prunus persica* L. y *Prunus salicina* L.

Como se puede observar, en todos los trabajos de análisis de QTLs asociados a compuestos fenólicos, los *loci* asociados se encuentran dispersos a lo largo de los ocho grupos de ligamiento que conforman el genoma para *Prunus salicina* L. y *Prunus persica* L. formando en su mayoría agrupamientos entre estos QTLs, sugiriendo que para varios compuestos fenólicos existen elementos regulatorios comunes que controlan la regulación/biosíntesis de estos compuestos fenólicos, como sería el caso visto

anteriormente del factor de transcripción MYB10 en LG4, confirmando la complejidad y alta organización genética en la producción de los metabolitos secundarios más abundantes (Naczek y Shahidi, 2004; Takos y col., 2006).

Por otro lado, también se observó una gran diferencia en cuanto a la posición de los QTLs en común con los estudios comparados. Esto se debe a que este es el primer trabajo que se realiza en *Prunus salicina* L. y al hecho de que cada mapa de QTL depende del contexto genético de los padres de la población, los genotipos de los marcadores analizados a lo largo de su genoma y su segregación, elementos que son únicos para cada cruce, no habiendo garantías de que usando los mismos marcadores en otra población se obtengan los mismos QTLs. Por esto, para realizar una comparación eficaz entre mapas se deben usar marcadores comunes denominados “anclas” (Collard y col., 2005), que son altamente polimórficos para varios mapas de poblaciones. A su vez, la diferencia en las ubicaciones de estos QTLs podría sugerir que estas regiones genómicas no son del todo conservadas en la familia de las Rosáceas (Zeballos y col., 2016).

Lamentablemente, hasta la fecha no hay estudios similares en cuanto a identificación de QTLs en esta especie, de hecho tampoco se encuentra disponible el genoma perteneciente a *Prunus salicina* L. de modo que las comparaciones se hacen en referencia a la especie más cercana secuenciada *Prunus persica*, de la cual sí se cuenta con estudios relacionados a la identificación de QTLs de compuestos fenólicos (revisado anteriormente), aunque también existe el problema de que no existe un consenso sobre los programas usados tanto para el mapeo genético como para el análisis de QTL, pudiendo los diferentes algoritmos usados incidir en las discrepancias al comparar distintos trabajos.

Proyecciones

Este seminario de título entrega herramientas útiles, es decir marcadores moleculares, para el futuro desarrollo de variedades con mayor contenido de compuestos fenólicos, otorgando a estas futuras variedades de un potencial de alimento funcional, lo cual es altamentepreciado debido a la creciente cantidad de personas que sufren enfermedades crónicas no transmisibles asociadas a estrés oxidativo. Pero, primero es necesario evaluar estos marcadores moleculares en nuevas poblaciones generadas del cruce “98.99” y “Angeleno”, como también en otras variedades de ciruelo japonés.

Debido a la alta influencia ambiental observada en este trabajo, una proyección futura sería agregar más temporadas de estudio como también recolectar datos del ambiente (variación del clima, lluvias, sequías, radiación, temperaturas, etc.) en las distintas temporadas con el objeto de generar diseños de estudio que incluyan estas variables ambientales y poder afinar finalmente el posterior análisis de QTLs.

Por otro lado, al ser este trabajo uno de los primeros en el análisis de QTLs en *Prunus salicina* L., una proyección interesante sería realizar el mismo análisis, pero con progenies provenientes de otros cultivares de esta especie, con el objeto de corroborar los QTLs hallados como también ganar mayor conocimiento en cuanto a la biosíntesis de los compuestos fenólicos.

Por último, otra proyección de este trabajo sería la validación de los genes candidatos encontrados en los intervalos de los QTLs hallados para de esta forma en conjunto con el refinamiento del mapa genético, entender los complejos mecanismos involucrados en el desarrollo del fruto en cuanto a la producción y acumulación de compuestos fenólicos, los cuales tienen un rol importante en este proceso.

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en este seminario de título se comprueba la hipótesis de este trabajo, pues efectivamente existen regiones del genoma del ciruelo asiático cuya variación se correlaciona con la varianza fenotípica de los compuestos fenólicos analizados presentes en el fruto, obteniéndose un rango de varianza fenotípica explicada entre 12,4% y 27,1%, valores que fueron validados tras obtener resultados estadísticamente significativos en los ensayos espectrofotométricos de familias de compuestos fenólicos (fenoles, flavonoides y proantocianidinas totales más dos ensayos de actividad antioxidante), en la heredabilidad de nivel moderado de la población F1 estudiada y en el análisis de QTLs, lo que entregó además de regiones genómicas definidas para estos compuestos, la presencia de genes candidatos involucrados tanto en la regulación como en la biosíntesis de compuestos fenólicos, los cuales aún deben validados, pero entregan una primera aproximación a esclarecer el mecanismo involucrado en la ruta de estos compuestos con alto potencial antioxidante.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdelghafar, A., da Silva Linge, C., Okie, W. R., & Gasic, K. (2020). Mapping QTLs for phytochemical compounds and fruit quality in peach. *Molecular Breeding*, *40*(3), 32. <https://doi.org/10.1007/s11032-020-01114-y>
- Abidi, W. (2012). *Evaluation of agronomical and biochemical traits and mapping QTLs controlling fruit quality traits in peach [Prunus persica (L.) Batsch] progenies*. Universidad de Zaragoza.
- Abiola, O., Angel, J. M., Avner, P., Bachmanov, A. A., Belknap, J. K., Bennett, B., ... Zou, F. (2003, November). The nature and identification of quantitative trait loci: A community's view. *Nature Reviews Genetics*, Vol. 4, pp. 911–916. <https://doi.org/10.1038/nrg1206>
- Alvarez-Parrilla, E., De La Rosa, L. A., Amarowicz, R., & Shahidi, F. (2011). Antioxidant activity of fresh and processed Jalapeño and Serrano peppers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(1), 163–173. <https://doi.org/10.1021/jf103434u>
- Andreotti, C., Ravaglia, D., Ragaini, A., & Costa, G. (2008). Phenolic compounds in peach (*Prunus persica*) cultivars at harvest and during fruit maturation. *Annals of Applied Biology*, *153*(1), 11–23. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2008.00234.x>
- Arnous, A., Makris, D. P., & Kefalas, P. (2002). Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. *Journal of Food Composition and Analysis*, *15*(6), 655–665. <https://doi.org/10.1006/jfca.2002.1070>
- Ballester, A.-R., Tikunov, Y., Molthoff, J., Grandillo, S., Viquez-Zamora, M., de Vos, R., ... Bovy, A. G. (2016). Identification of Loci Affecting Accumulation of Secondary Metabolites in Tomato Fruit of a *Solanum lycopersicum* × *Solanum chmielewskii* Introgression Line Population. *Frontiers in Plant Science*, *7*(September2016), 1428. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01428>
- Balsano, C., & Alisi, A. (2009). Antioxidant Effects of Natural Bioactive Compounds. *Current Pharmaceutical Design*, *15*(26), 3063–3073. <https://doi.org/10.2174/138161209789058084>
- Beckman, C. H. (2000). Phenolic-storing cells: Keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *57*(3), 101–110. <https://doi.org/10.1006/pmpp.2000.0287>
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, *239*(1), 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Chagné, D., Krieger, C., Rassam, M., Sullivan, M., Fraser, J., André, C., ... Laing, W. A. (2012). QTL and candidate gene mapping for polyphenolic composition in apple fruit. *BMC Plant Biology*, *12*(1), 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-12>
- Cheng, Y., Liu, L., Yuan, C., & Guan, J. (2016). Molecular Characterization of Ethylene-Regulated Anthocyanin Biosynthesis in Plums During Fruit Ripening. *Plant Molecular Biology Reporter*, *34*(4), 777–785. <https://doi.org/10.1007/s11105-015-0963-x>

- Collard, B. C. Y., Jahufer, M. Z. Z., Brouwer, J. B., & Pang, E. C. K. (2005, January). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica*, Vol. 142, pp. 169–196. <https://doi.org/10.1007/s10681-005-1681-5>
- Contador, L., Díaz, M., Millanao, M., Hernández, E., Shinya, P., Sáenz, C., & Infante, R. (2016). A proposal for determining the flesh softening of peach and nectarine in postharvest through simplified targeted modeling. *Scientia Horticulturae*, 209, 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.06.015>
- D. Ruiz, P. Lambert, J.M. Audergon, L. Dondini, S. Tartarini, M. Adami, ... R. Testolin. (2010). IDENTIFICATION OF QTLS FOR FRUIT QUALITY TRAITS IN APRICOT. *Acta Horticulturae*, (862), 587–592. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2010.862.93>
- Eduardo, I., Chietera, G., Pirona, R., Pacheco, I., Troglio, M., Banchi, E., ... Pozzi, C. (2013). Genetic dissection of aroma volatile compounds from the essential oil of peach fruit: QTL analysis and identification of candidate genes using dense SNP maps. *Tree Genetics & Genomes*, 9, 189–204. <https://doi.org/10.1007/s11295-012-0546-z>
- Eduardo, I., Pacheco, I., Chietera, G., Bassi, D., Pozzi, C., Vecchietti, A., & Rossini, L. (2011). QTL analysis of fruit quality traits in two peach intraspecific populations and importance of maturity date pleiotropic effect. *Tree Genetics and Genomes*, 7(2), 323–335. <https://doi.org/10.1007/s11295-010-0334-6>
- El-Sharkawy, I., Sherif, S., Mila, I., Bouzayen, M., & Jayasankar, S. (2009). Molecular characterization of seven genes encoding ethylene-responsive transcriptional factors during plum fruit development and ripening. *Journal of Experimental Botany*, 60(3), 907–922. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern354>
- Fanali, C., Dugo, L., D’Orazio, G., Lirangi, M., Dachà, M., Dugo, P., & Mondello, L. (2011). Analysis of anthocyanins in commercial fruit juices by using nano-liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry and high-performance liquid chromatography with UV-vis detector. *Journal of Separation Science*, 34(2), 150–159. <https://doi.org/10.1002/jssc.201000665>
- Francisco, R. M., Regalado, A., Ageorges, A., Burla, B. J., Bassin, B., Eisenach, C., ... Nagy, R. (2013). ABCC1, an ATP binding cassette protein from grape berry, transports anthocyanidin 3-O-glucosides. *Plant Cell*, 25(5), 1840–1854. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.102152>
- Gao, L., & Mazza, G. (1995). Characterization, Quantitation, and Distribution of Anthocyanins and Colorless Phenolics in Sweet Cherries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(2), 343–346. <https://doi.org/10.1021/jf00050a015>
- García-Gómez, B. E., Salazar, J. A., Dondini, L., Martínez-Gómez, P., & Ruiz, D. (2019). Identification of QTLs linked to fruit quality traits in apricot (*Prunus armeniaca* L.) and biological validation through gene expression analysis using qPCR. *Molecular Breeding*, 39(2), 1–19. <https://doi.org/10.1007/s11032-018-0926-7>
- GARZÓN, G. A. (2008). Anthocyanins As Natural Colorants And Bioactive Compounds: A Review. *Acta Biológica Colombiana*, 13(3), 27–36. Retrieved from

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-548X2008000300002&lng=en&nrm=iso&tlng=es

- Gomez, C., Conejero, G., Torregrosa, L., Cheynier, V., Terrier, N., & Ageorges, A. (2011). In vivo grapevine anthocyanin transport involves vesicle-mediated trafficking and the contribution of anthoMATE transporters and GST. *Plant Journal*, 67(6), 960–970. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04648.x>
- González, M., Salazar, E., Cabrera, S., Olea, P., & Carrasco, B. (2016). Analysis of anthocyanin biosynthesis genes expression profiles in contrasting cultivars of Japanese plum (*Prunus salicina* L.) during fruit development. *Gene Expression Patterns*, 21(1), 54–62. <https://doi.org/10.1016/j.gep.2016.06.005>
- Griffiths, A. J., & Lewontin William M Gelbart David T Suzuki, R. C. (2005). *An Introduction to Genetic Analysis Eighth Edition*.
- Hackett, C. A., Mclean, K., & Bryan, G. J. (2013). Linkage Analysis and QTL Mapping Using SNP Dosage Data in a Tetraploid Potato Mapping Population. *PLoS ONE*, 8(5), 63939. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063939>
- Haminiuk, C. W. I., Maciel, G. M., Plata-Oviedo, M. S. V., & Peralta, R. M. (2012, October). Phenolic compounds in fruits - an overview. *International Journal of Food Science and Technology*, Vol. 47, pp. 2023–2044. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03067.x>
- Hernández Mora, J. R., Micheletti, D., Bink, M., Van de Weg, E., Cantín, C., Nazzicari, N., ... Aranzana, M. J. (2017). Integrated QTL detection for key breeding traits in multiple peach progenies. *BMC Genomics*, 18(1), 404. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3783-6>
- HOWELL, R. K. (1974). *Phenols, Ozone, and Their Involvement in Pigmentation and Physiology of Plant Injury*. <https://doi.org/10.1021/bk-1974-0003.ch008>
- Jaakola, L. (2013, September). New insights into the regulation of anthocyanin biosynthesis in fruits. *Trends in Plant Science*, Vol. 18, pp. 477–483. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.06.003>
- Jaiswal, R., Karaköse, H., Rühmann, S., Goldner, K., Neumüller, M., Treutter, D., & Kuhnert, N. (2013). Identification of phenolic compounds in plum fruits (*prunus salicina* l. and *prunus domestica* l.) by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry and characterization of varieties by quantitative phenolic fingerprints. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(49), 12020–12031. <https://doi.org/10.1021/jf402288j>
- Jakubska, A., Przado, - D, Steininger, - M, Anioł-Kwiatkowska, - J, & Kadej, - M. (n.d.). (No Title). Retrieved from <http://www.ecology.kee.hu>
- Jeandet, P., Douillet-Breuil, A. C., Bessis, R., Debord, S., Sbaghi, M., & Adrian, M. (2002, May 8). Phytoalexins from the vitaceae: Biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 50, pp. 2731–2741. <https://doi.org/10.1021/jf011429s>
- Kedare, S. B., & Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of

- antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48(4), 412–422.
<https://doi.org/10.1007/s13197-011-0251-1>
- Konczak-Islam, I., Okuno, S., Yoshimoto, M., & Yamakawa, O. (2003). Composition of phenolics and anthocyanins in a sweet potato cell suspension culture. *Biochemical Engineering Journal*, 14(3), 155–161. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00216-4](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00216-4)
- Marina, D., Avella, G., Alberto, C., García, O., & Cisneros, A. M. (2008). Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal. *Simposio de Metrología*, 1–5. Retrieved from http://cenam.mx/simposio2008/sm_2008/memorias/M2/SM2008-M220-1108.pdf
- Mikulic-Petkovsek, M., Stampar, F., Veberic, R., & Sircelj, H. (2016). Wild *Prunus* Fruit Species as a Rich Source of Bioactive Compounds. *Journal of Food Science*, 81(8), C1928–C1937. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13398>
- Morishita, T., Kojima, Y., Maruta, T., Nishizawa-Yokoi, A., Yabuta, Y., & Shigeoka, S. (2009). Arabidopsis NAC transcription factor, ANAC078, regulates flavonoid biosynthesis under high-light. *Plant and Cell Physiology*, 50(12), 2210–2222. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp159>
- Mozeti, B., Trebse, P., & Hribar, J. (2002). Determination and Quantitation of Anthocyanins and Hydroxycinnamic Acids in Different Cultivars of Sweet Cherries (*Prunus avium* L.) from Nova Gorica Region (Slovenia). *Food Technology and Biotechnology*, 40(3), 207–212. Retrieved from https://sci-hub.tw/https://hrcak.srce.hr/index.php?show=clanak&id_clanak_jezik=263069
- Mubarak, A., Swinny, E. E., Ching, S. Y. L., Jacob, S. R., Lacey, K., Hodgson, J. M., ... Considine, M. J. (2012). Polyphenol composition of plum selections in relation to total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(41), 10256–10262. <https://doi.org/10.1021/jf302903k>
- Naczki, M., & Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.059>
- Ogah, O., Watkins, C. S., Ubi, B. E., & Oraguzie, N. C. (2014). Phenolic compounds in rosaceae fruit and nut crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(39), 9369–9386. <https://doi.org/10.1021/jf501574q>
- Oliveira, E. J., Santana, F. A., Oliveira, L. A., & Santos, V. S. (2014). Genetic parameters and prediction of genotypic values for root quality traits in cassava using REML/BLUP. *Genetics and Molecular Research*, 13(3), 6683–6700. <https://doi.org/10.4238/2014.August.28.13>
- Pacheco, I., & Silva Linge, D. (2015). Whole-Genome Analysis of Diversity and SNP-Major Gene Association in Peach Germplasm. *PLoS ONE*, 10(9), 136803. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136803>
- Pereira, M. A., & Ludwig, D. S. (2001). Dietary fiber and body-weight regulation: Observations and mechanisms. *Pediatric Clinics of North America*, 48(4), 969–980. [https://doi.org/10.1016/S0031-3955\(05\)70351-5](https://doi.org/10.1016/S0031-3955(05)70351-5)

- Rousseaux, M. C., Jones, C. M., Adams, D., Chetelat, R., Bennett, A., & Powell, A. (2005). QTL analysis of fruit antioxidants in tomato using *Lycopersicon pennellii* introgression lines. *Theoretical and Applied Genetics*, *111*(7), 1396–1408. <https://doi.org/10.1007/s00122-005-0071-7>
- Salazar, Juan A., Pacheco, I., Shinya, P., Zapata, P., Silva, C., Aradhya, M., ... Infante, R. (2017). Genotyping by sequencing for Snp-Based linkage analysis and identification of QTLs linked to fruit quality traits in Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.). *Frontiers in Plant Science*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00476>
- Salazar, Juan Alfonso, Pacheco, I., Zapata, P., Shinya, P., Ruiz, D., Martínez-Gómez, P., & Infante, R. (2020). Identification of loci controlling phenology, fruit quality and post-harvest quantitative parameters in Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.). *Postharvest Biology and Technology*, *169*, 111292. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111292>
- Salazar, Juan Alfonso, Ruiz, D., Campoy, J. A., Tartarini, S., Dondini, L., & Martínez-Gómez, P. (2016). *Inheritance of reproductive phenology traits and related QTL identification in apricot*. <https://doi.org/10.1007/s11295-016-1027-6>
- Shulaev, V., Korban, S. S., Sosinski, B., Abbott, A. G., Aldwinckle, H. S., Folta, K. M., ... Veilleux, R. E. (2008). Multiple models for Rosaceae genomics. *Plant Physiology*, *147*(3), 985–1003. <https://doi.org/10.1104/pp.107.115618>
- Socquet-Juglard, D., Christen, D., Devènes, G., Gessler, C., Duffy, B., & Patocchi, A. (n.d.). *Mapping Architectural, Phenological, and Fruit Quality QTLs in Apricot*. <https://doi.org/10.1007/s11105-012-0511-x>
- Sooriyapathirana, S. S., Khan, A., Sebolt, A. M., Wang, D., Bushakra, J. M., Lin-Wang, K., ... Iezzoni, A. F. (2010). QTL analysis and candidate gene mapping for skin and flesh color in sweet cherry fruit (*Prunus avium* L.). *Tree Genetics and Genomes*, *6*(6), 821–832. <https://doi.org/10.1007/s11295-010-0294-x>
- Takos, A. M., Jaffé, F. W., Jacob, S. R., Bogs, J., Robinson, S. P., & Walker, A. R. (2006). Light-induced expression of a MYB gene regulates anthocyanin biosynthesis in red apples. *Plant Physiology*, *142*(3), 1216–1232. <https://doi.org/10.1104/pp.106.088104>
- Usenik, V., Stampar, F., & Kastelec, D. (2013). Phytochemicals in fruits of two *Prunus domestica* L. plum cultivars during ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *93*(3), 681–692. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5783>
- Van Ooijen, J. W. (2009). MapQTL 6. *Genome*, (April).
- Venter, A., Joubert, E., & De Beer, D. (2013). Characterisation of phenolic compounds in South African plum fruits (*Prunus salicina* Lindl.) using HPLC coupled with diode-array, fluorescence, mass spectrometry and on-line antioxidant detection. *Molecules*, *18*(5), 5072–5090. <https://doi.org/10.3390/molecules18055072>
- Venter, A., Joubert, E., & De Beer, D. (2014). Nutraceutical value of yellow- and red-fleshed South African plums (*Prunus salicina* Lindl.): Evaluation of total antioxidant capacity and phenolic composition. *Molecules*, *19*(3), 3084–3109. <https://doi.org/10.3390/molecules19033084>

- Verde, I., Abbott, A. G., Scalabrin, S., Jung, S., Shu, S., Marroni, F., ... Rokhsar, D. S. (2013). The high-quality draft genome of peach (*Prunus persica*) identifies unique patterns of genetic diversity, domestication and genome evolution. *Nature Genetics*, *45*(5), 487–494. <https://doi.org/10.1038/ng.2586>
- Verdu, C. F., Guyot, S., Childebrand, N., Bahut, M., Celton, J. M., Gaillard, S., ... Laurens, F. (2014). QTL analysis and candidate gene mapping for the polyphenol content in cider apple. *PLoS ONE*, *9*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107103>
- Vermerris, W., & Nicholson, R. L. (2006). *Phenolic compound biochemistry*. Springer.
- Voorrips, R. E. (2002). MapChart: Software for the Graphical Presentation of Linkage Maps and QTLs. *Journal of Heredity*, *93*(1), 77–78. <https://doi.org/10.1093/jhered/93.1.77>
- Wallace, T. C., & Giusti, M. M. (2010). Evaluation of parameters that affect the 4-dimethylaminocinnamaldehyde assay for flavanols and proanthocyanidins. *Journal of Food Science*, *75*(7), 619–625. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01734.x>
- WHO | Increasing fruit and vegetable consumption to reduce the risk of noncommunicable diseases. (2014). WHO. Retrieved from https://www.who.int/elena/bbc/fruit_vegetables_ncds/en/#.XYocnGWEaFQ.mendeley
- Wu, B. H., Li, S. H., Quilot, B., Génard, M., Kervella, J., & Gomez, L. (2005). Sugar and acid concentrations associated with several qualitative traits in unselected *Prunus persica* x *P. davidiana* progenies. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, *80*(3), 335–339. <https://doi.org/10.1080/14620316.2005.11511940>
- Xu, W., Dubos, C., & Lepiniec, L. (2015, March 1). Transcriptional control of flavonoid biosynthesis by MYB-bHLH-WDR complexes. *Trends in Plant Science*, Vol. 20, pp. 176–185. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.12.001>
- Yang, D., Zhang, Q., Ren, G., & Ying, T. (2017). A comparative study on antioxidant activity of different parts of lotus (*Nelumbo nucifera gaertn*) rhizome. *Food Science and Technology*, *37*(1), 135–138. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.10816>
- Zeballos, J. L., Abidi, W., Giménez, R., Monforte, A. J., Moreno, M. Á., & Gogorcena, Y. (2016). Mapping QTLs associated with fruit quality traits in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] using SNP maps. *Tree Genetics and Genomes*, *12*(3), 1–17. <https://doi.org/10.1007/s11295-016-0996-9>
- Zhang, F. P., Yang, Q. Y., & Zhang, S. B. (2016). Dual effect of phenolic nectar on three floral visitors of *elsholtzia rugulosa* (lamiaceae) in SW China. *PLoS ONE*, *11*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154381>
- Zhao, J. (2015, September 1). Flavonoid transport mechanisms: How to go, and with whom. *Trends in Plant Science*, Vol. 20, pp. 576–585. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.06.007>
- Zhao, J., & Dixon, R. A. (2010). The ‘ins’ and ‘outs’ of flavonoid transport. *Trends in Plant Science*, *15*(2), 72–80. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2009.11.006>
- Zhu, J., & Weir, B. (1998). *Mixed Model Approaches for Genetic Analysis of Quantitative*

Anexo

Anexo 1. Tabla rasgos fenotípicos analizados. Lista de rasgos fenotípicos asociados a compuestos fenólicos y de interés agronómico analizados en dos temporadas (2015-2016, T1; 2016-2017, T2). Se indica el número de individuos disponibles y el número de muestras analizadas de cada temporada. Para cada rasgo se analizaron muestras de tejido de mesocarpo (pulpa) y exocarpo (piel). Los rasgos Tiempo de madurez y Período de desarrollo del fruto están expresados en días julianos. En Anexo 3 se describen la identificación tentativa de las antocianinas detectadas (Compuestos D, E, F, L, M, P, R, T y U). Los rasgos agronómicos fueron obtenidos de Salazar y col. (2020).

Anexo 2. Curvas de calibración para ensayos espectrofotométricos y HPLC. Los datos usados para generar cada curva de calibración fueron analizados mediante regresión lineal, obteniéndose el coeficiente de determinación y ecuación de la recta para cada curva. **A.** Curva de calibración para determinación de fenoles totales temporadas T1 y T2. **B.** Curva de calibración para determinación de flavonoides totales temporadas T1 y T2. **C.** Curva de calibración para determinación de proantocianidinas totales temporadas T1 y T2. **D.** Curva de calibración para determinación actividad antioxidante DPPH temporadas T1 y T2. **E.** Curva de calibración para determinación actividad antioxidante FRAP temporadas T1 y T2. **F.** Curva de calibración para determinación antocianinas individuales temporadas T1 y T2. En cada curva se indica tanto el coeficiente de determinación (R^2) como la ecuación de la recta obtenida. Las temporadas se indican por color verde (T1) y rojo (T2), mientras que las antocianinas por color morado (C3G) y naranja (C3R).

Anexo 3. Identificación tentativa de antocianinas detectadas. Antocianinas detectadas bajo HPLC-DAD y UHPLC-MS. Los datos fueron comparados para identificar peaks y obtener de esa manera una identificación tentativa de estos compuestos. El tiempo de retención promedio corresponde a los tiempos registrados vía HPLC-DAD para antocianos en ambas temporadas; los valores de peak máximo y valor m/z corresponden a los registros obtenidos por UHPLC-MS. Cy: cianidina, Glc: glucosa, EGC: epigallocatequina, Rha: ramnosa; Rut: Rutina.

Anexo 4. Distribución de datos de familias de fenoles y antocianos individuales. Cada gráfico muestra la distribución que siguen los datos obtenidos a través de ensayos espectrofotométricos para familias de fenoles y HPLC-DAD para las dos antocianinas más predominantes en muestras de ciruelos. En cada agrupación se encuentran cuatro gráficos de distribución que corresponden a cada tejido (piel y pulpa) y a cada temporada (T1 y T2). A: Fen, Fenoles totales; B: Flv, Flavonoides totales; C: Pca, Proantocianidinas totales; D: ensayo actividad antioxidante FRAP; E: ensayo actividad antioxidante DPPH; F: C3G, Cianidina 3-glucósido; G: C3R, Cianidina 3-rutinósido; H: Comp. D; I: Comp. E; J: Comp. F; K: Comp. T; L: Comp. L; M: Comp. R; N: Comp. P; Ñ: Comp. M; O: Comp. U. En cada

gráfico, el eje de las abscisas corresponde a la concentración en las unidades pertenecientes a cada ensayo (ver Materiales y Métodos).

Anexo 5. Perfil HPLC de antocianinas presentes en variedades disponibles de ciruela. Registro del perfil HPLC de antocianinas presentes en muestras de ciruela. La detección de antocianinas en ambos registros fue a 520 nm, en donde los peaks más altos corresponden a las antocianinas C3G y C3R respectivamente. Aquellos compuestos que no fueron identificados se nombraron como “Compuesto X”, donde X corresponde a cualquier letra del abecedario partiendo de la A en orden consecutivo. En la imagen se presentan los peaks para C3G, C3R y 7 compuestos sin identificar. Figura tomada y adaptada de Pacheco y col., manuscript under preparation.

Anexo 6. Correlación de Pearson entre ensayos espectrofotométricos. Mediante el paquete de R “PerformanceAnalytics” se generaron histogramas de distribución de cada ensayo (diagonal en cada grupo), gráficos de correlación de Pearson entre ensayos espectrofotométricos (debajo de la diagonal) y su coeficiente de Pearson correspondiente (arriba de la diagonal), con su nivel de significancia (estrellas rojas, *: 90%, **: 95%, ***: 99%). A: Correlación entre ensayos espectrofotométricos correspondientes a muestras de piel de la temporada 1; B: Correlación entre ensayos espectrofotométricos correspondientes a muestras de piel de la temporada 2. C: Correlación entre ensayos espectrofotométricos correspondientes a muestras de pulpa de la temporada 1; D: Correlación entre ensayos espectrofotométricos correspondientes a muestras de pulpa de la temporada 2.

Anexo 7. Variables fijas y aleatorias, varianza, heredabilidad y valor de ajuste para modelos lineales mixtos de caracteres asociados a compuestos fenólicos en pulpa. Los modelos lineales mixtos seleccionados para cada carácter en mesocarpo son presentados junto con la varianza de cada variable aleatoria. La heredabilidad genética y el residual son expresados en porcentaje. Para la selección del mejor modelo, el valor de ajuste corresponde al criterio de información de Akaike (AIC), siendo seleccionado aquel modelo con el menor valor AIC, a excepción de aquellos destacados en negrita y azul, los cuales son escogidos por presentar menor valor residual en comparación al mejor modelo según AIC. El nombre en abreviatura de cada rasgo se encuentra descrito en Anexo 1; RB: Réplica Biológica.

Anexo 8. Variables fijas y aleatorias, heredabilidad y valor de ajuste para modelos lineales mixtos de caracteres asociados a compuestos fenólicos en piel. Los modelos lineales mixtos seleccionados para cada carácter en exocarpo son presentados junto con la varianza de cada variable aleatoria. La heredabilidad genética y el residual son expresados en porcentaje. Para la selección del mejor modelo, el valor de ajuste corresponde al criterio de información de Akaike (AIC), siendo seleccionado aquel modelo con el menor valor AIC, a excepción de aquellos destacados en negrita y azul, los cuales son escogidos por presentar menor valor residual en comparación al mejor modelo según AIC. El nombre en abreviatura de cada rasgo se encuentra descrito en Anexo 1; RB: Réplica Biológica.

Anexo 9. Gráficos de distribución de residuos MLM en pulpa. Para la corroboración del ajuste de los modelos lineales mixtos generados, se graficó la dispersión de los residuos de cada modelo, de cada rasgo fenólico, presentes en tejido de pulpa. Un modelo lineal

mixto válido debe presentar una dispersión constante y sin una tendencia clara en los residuos, es decir, los residuos deben presentar un patrón azaroso. En el eje X se indican los valores ajustados según el modelo generado, mientras que en el eje Y se distribuyen los residuos del modelo. A: Fen, Fenoles totales; B: Flv, Flavonoides totales; C: Pca, Proantocianidinas totales; D: ensayo actividad antioxidante DPPH; E: ensayo actividad antioxidante FRAP; F: C3G, Cianidina 3-glucósido; G: C3R, Cianidina 3-rutinósido; H: Comp. D; I: Comp. E; J: Comp. F; K: Comp. T; L: Comp. L; M: Comp. R; N: Comp. P; Ñ: Comp. M; O: Comp. U.

Anexo 10. Gráficos de distribución de residuos MLM en piel. Se graficó la dispersión de los residuos de cada modelo, de cada rasgo fenólico, presentes en tejido de piel. En el eje X se indican los valores ajustados según el modelo generado, mientras que en el eje Y se distribuyen los residuos del modelo. A: Fen, Fenoles totales; B: Flv, Flavonoides totales; C: Pca, Proantocianidinas totales; D: ensayo actividad antioxidante DPPH; E: ensayo actividad antioxidante FRAP; F: C3G, Cianidina 3-glucósido; G: C3R, Cianidina 3-rutinósido; H: Comp. D; I: Comp. E; J: Comp. F; K: Comp. T; L: Comp. L; M: Comp. R; N: Comp. P; Ñ: Comp. M; O: Comp. U.

Anexo 11. Gráficos Q-Q Normal de residuos MLM en pulpa. La verificación de normalidad de los residuos de los MLM generados se realiza con este tipo de gráficos, pues compara la distribución de los residuos obtenidos con la distribución normal teórica, de modo que, los residuos deben distribuirse lo más cercano posible a la diagonal (línea roja) presente en este tipo de gráfico para indicar que los residuos se distribuyen normalmente. En el eje X se indica la distribución normal teórica según el modelo generado, mientras que en el eje Y se indica la distribución de los residuos. En ambos ejes, la distribución está expresada en cuartiles. A: Fen, Fenoles totales; B: Flv, Flavonoides totales; C: Pca, Proantocianidinas totales; D: ensayo actividad antioxidante DPPH; E: ensayo actividad antioxidante FRAP; F: C3G, Cianidina 3-glucósido; G: C3R, Cianidina 3-rutinósido; H: Comp. D; I: Comp. E; J: Comp. F; K: Comp. T; L: Comp. L; M: Comp. R; N: Comp. P; Ñ: Comp. M; O: Comp. U.

Anexo 12. Gráficos Q-Q Normal de residuos MLM en piel. Presenta la misma descripción que Anexo 11. A: Fen, Fenoles totales; B: Flv, Flavonoides totales; C: Pca, Proantocianidinas totales; D: ensayo actividad antioxidante DPPH; E: ensayo actividad antioxidante FRAP; F: C3G, Cianidina 3-glucósido; G: C3R, Cianidina 3-rutinósido; H: Comp. D; I: Comp. E; J: Comp. F; K: Comp. T; L: Comp. L; M: Comp. R; N: Comp. P; Ñ: Comp. M; O: Comp. U.

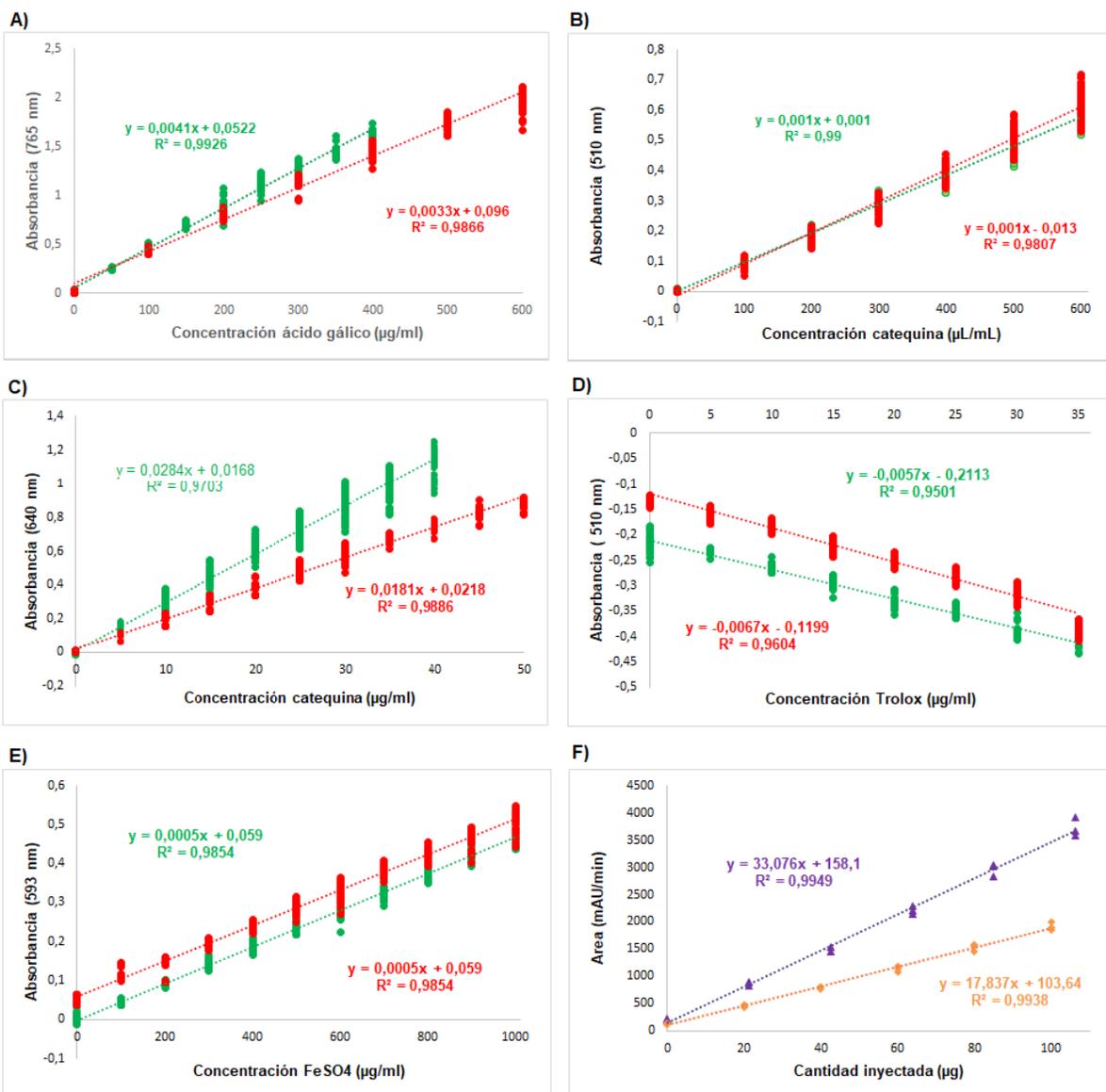
Anexo 13. Grupos de ligamiento con QTLs obtenidos en ciruelos asiáticos “98.99” y “Angelino”, mediante análisis de QTL. Grupos de ligamientos de “98.99” y “Angelino” (Anexos 13A-H) con los QTLs obtenidos mediante MapQTL 6. Al lado derecho de cada grupo de ligamiento se encuentran, en su posición relativa, los QTLs de rasgos fenotípicos analizados junto con un gráfico LOD, indicando el nivel LOD obtenido para cada QTL. Para cada rasgo fenólico, los valores límite LOD están indicados en la tabla 5 (Permutation Test). Línea gris punteada indica nivel LOD 3, aceptado como valor mínimo de significancia. Las imágenes se enfocan en los grupos de ligamiento y la posición de los QTLs, teniendo que haber cortado la ubicación de varios marcadores moleculares.

Anexo 14. Scripts usados para los distintos análisis realizados en R (R Core Team, 2018). El software R permite crear *scripts* usando distintos comandos integrados en el programa básico como también comandos provenientes de distintos paquetes creados para análisis específicos (para el análisis de BLUP fue necesario descargar paquetes anexos para generar los análisis adecuados). En color verde, y después del símbolo #, se expresan los comentarios orientados a ayudar a quien use el *script* y por tanto no son considerados por R al momento de activar el *script*. En cada *script* se incluyen también las salidas de cada comando (cuadros rojos), a modo de ejemplo y para mayor entendimiento en el uso de estos *script*. A) *Script* para el análisis de ANOVA. B) *Script* para el análisis de BLUP.

Anexo 1. Tabla resumen rasgos fenotípicos analizados.

Tipo carácter	Nombre carácter	N° de individuos		N° total de muestras analizadas		Abreviatura carácter
		T1	T2	T1	T2	
Contenido fenoles-HPLC-DAD	Compuesto D	85	85	510	510	CompD
	Compuesto E	85	85	510	510	CompE
	Compuesto F	85	85	510	510	CompF
	Compuesto T	85	85	510	510	CompT
	Compuesto L	85	85	510	510	CompL
	Compuesto R	85	85	510	510	CompR
	Cianidina-3-Glucósido	85	85	510	510	C3G
	Cianidina-3-Rutinósido	85	85	510	510	C3R
	Compuesto P	85	85	510	510	CompP
	Compuesto M	85	85	510	510	CompM
	Compuesto U	85	85	510	510	CompU
Contenido fenoles-espectrofotométrico	Flavonoides totales	92	80	552	480	Flv
	Fenoles totales	92	80	552	480	Fen
	Proantocianidinas totales	92	80	552	480	Pca
	Actividad antioxidante DPPH	92	80	552	480	Dpph
	Actividad antioxidante FRAP	92	80	552	480	Frap
Calidad de la fruta	Tiempo de madurez	92	80	552	480	RT.JD
	Período desarrollo de fruto	92	80	552	480	FDP
	Peso	92	80	552	480	Peso
	Índice de absorbancia de clorofila	92	80	552	480	IAD1
	Grados Brix	92	80	552	480	SS.Brix1
	pH	92	80	552	480	pH
	Acidez	92	80	552	480	Acidez
	Color	92	80	552	480	Color
	Color L	92	80	552	480	Color.L
	Color a	92	80	552	480	Color.a
	Color b	92	80	552	480	Color.b
C	92	80	552	480	C	
Color H	92	80	552	480	Color.H	

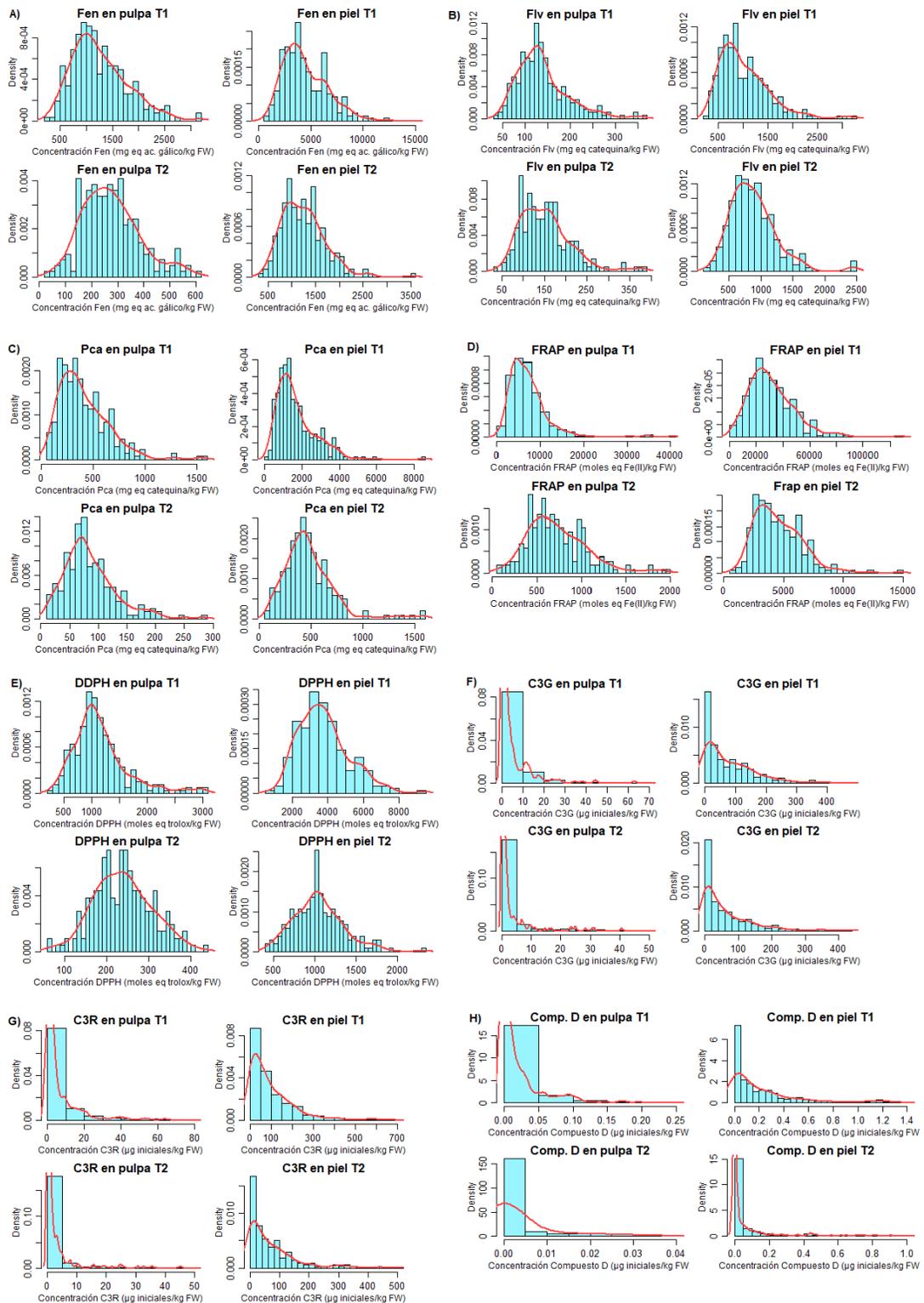
Anexo 2. Curvas de calibración para ensayos espectrofotométricos y HPLC.



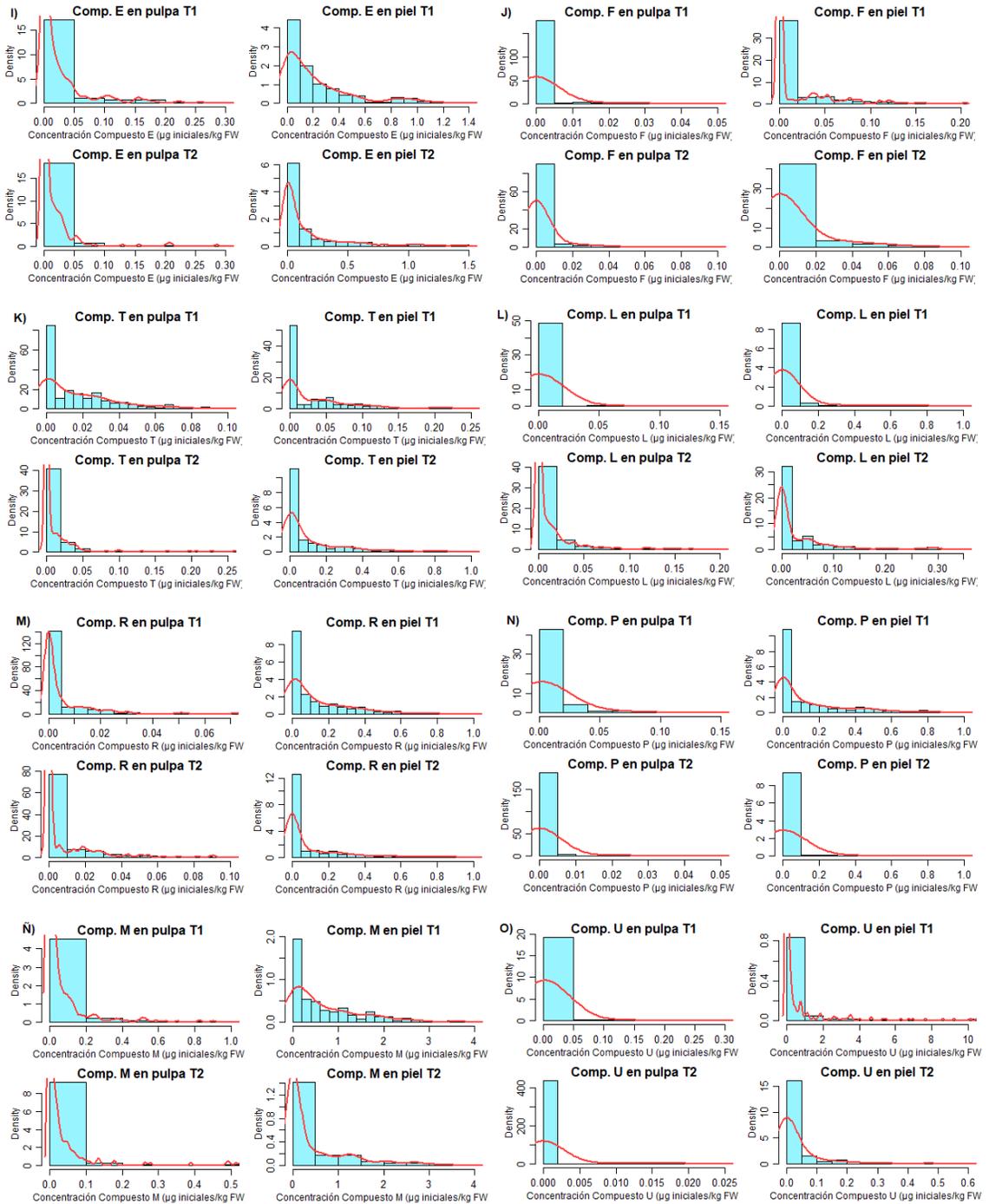
Anexo 3. Identificación tentativa de antocianinas detectadas.

Tiempo retención promedio (min)	Peak máximo (nm)	Valor m/z	Carácter	Identificación tentativa
4,18	281,517	737,17	Compuesto D	Cy-Glc-EGC
4,87	----	----	Compuesto E	----
5,61	----	----	Compuesto F	----
6,10	281,517	883,23	Compuesto T	Cy-Glc-Rha-EGC
6,80	285,517	737,17	Compuesto L	Cy-Glc-EGC
8,52	----	----	Compuesto R	----
8,86	277,517	449,11	C3G	Cy-Glc
9,38	277,517	595,16	C3R	Cy-Rut
11,45	281,52	1025,23	Compuesto P	Cy-Glc-EGC-EGC
11,91	----	1313,30	Compuesto M	Cy-Glc-EGC-EGC-EGC
29,06	----	----	Compuesto U	----

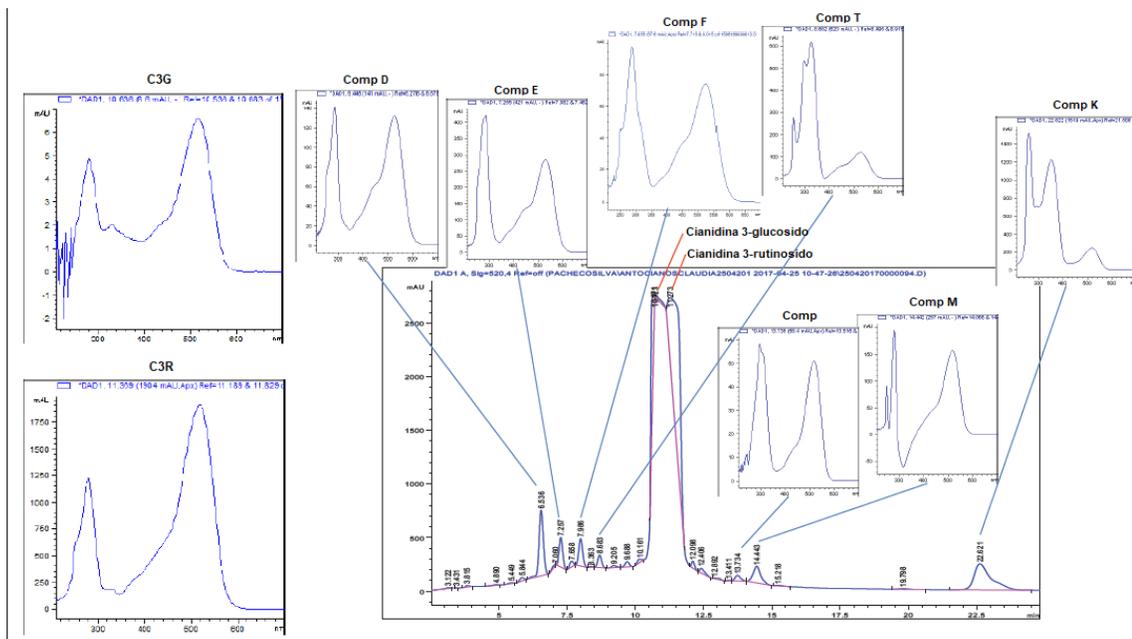
Anexo 4. Distribución de datos de ensayos espectrofotométricos y dos antocianinas más predominantes.



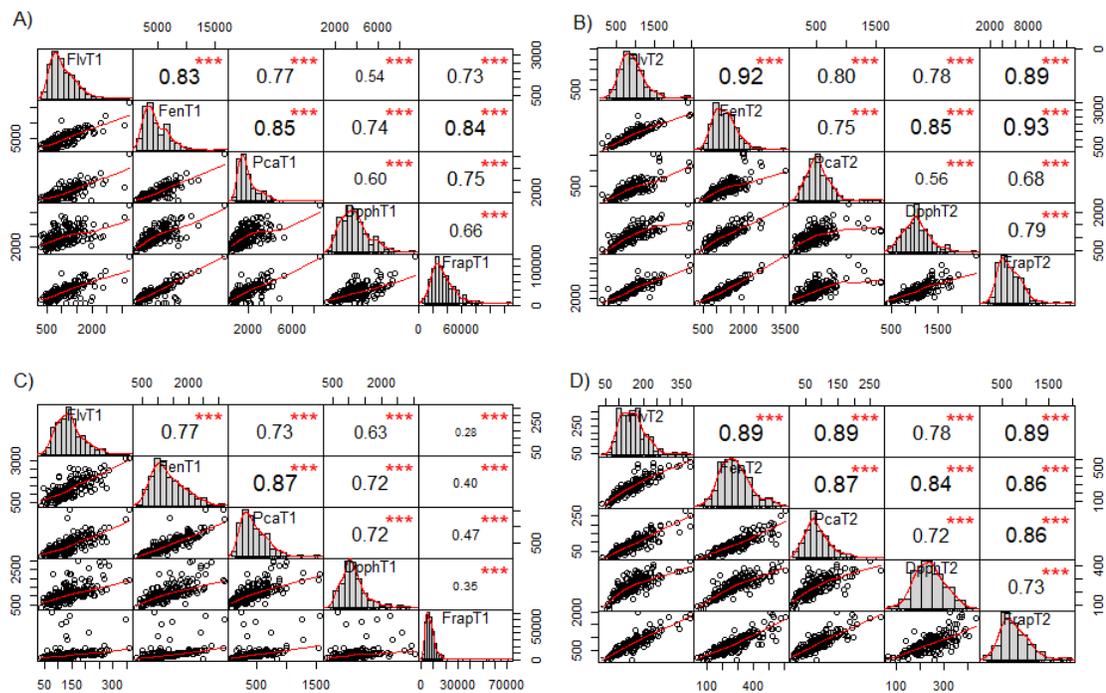
Anexo 4. Continuado.



Anexo 5. Perfil HPLC de antocianinas presentes en extractos metanólicos de piel y pulpa de frutos de población F1 “98.99 x Angeleno”.



Anexo 6. Correlación de Spearman entre ensayos espectrofotométricos.



Anexo 7. Variables fijas y aleatorias, varianza, heredabilidad y valor de ajuste para modelos lineales mixtos de caracteres asociados a compuestos fenólicos en pulpa. Para la selección del mejor modelo, el valor de ajuste corresponde al criterio de información de Akaike (AIC), siendo seleccionado aquel modelo con el menor valor AIC, a excepción de aquellos destacados en negrita y azul, los cuales son escogidos por presentar menor valor residual en comparación al mejor modelo según AIC. El nombre en abreviatura de cada rasgo se encuentra descrito en Anexo 1; RB: Réplica Biológica.

Rasgo	Variable Fija	Variab aleatorias	Varianza	Heredabilidad (%)	Porcentaje residual (%)	Valor de ajuste (AIC)*
Fen	RB	Peso	37113	12,14	2,82	5339,33
		Accesion	83965			
		RT.JD	56934			
		Temporada	494168			
		Residual	19523			
Flv	RB	Accesion/Temp	1292,1	36,27	23,76	4514,63
		Accesion	1240,6			
		Temporada	74,9			
		Residual	812,7			
Pca	RB	Accesion/Temp	21036	2,52	11,21	5808,23
		Accesion	2121			
		Temporada	51547			
		Residual	9431			
DPPH	RB	Peso	18531	9,91	8,69	5526,5
		Accesion	53045			
		RT.JD	23723			
		Temporada	393505			
		Residual	46545			
FRAP	RB	Accesion	2964335	4,00	57,49	9662,78
		Temporada	28507165			
		Residual	42567940			
C3G	RB	Accesion/Temp	4,231	23,82	73,26	4176,15
		Accesion	48,911			
		Temporada	1,748			
		Residual	150,406			
C3R	RB	Accesion	76,072	17,27	80,72	4604,81
		Temporada	8,874			
		Residual	355,548			
Comp D	RB	Accesion	0,0003	34,19	46,08	-1405,4
		Temporada	0,0002			
		Residual	0,0004			

Anexo 7. Continuado.

Rasgo	Variable Fija	Variables aleatorias	Varianza	Heredabilidad (%)	Porcentaje residual (%)	Valor de ajuste (AIC)*
Comp E	RB	Accesion/Temp	0,0003	20,23	77,00	-934
		Accesion	0,0022			
		Residual	0,0085			
Comp F	RB	Accesion	0,0000	7,83	92,17	-2487,87
		Residual	0,0005			
Comp T	RB	Accesion	0,0007	29,27	70,73	-1772,27
		Residual	0,0017			
Comp L	RB	Accesion	0,0003	8,98	90,07	-1477,68
		Temporada	0,0000			
		Residual	0,0032			
Comp R	RB	Accesion/Temp	0,0001	29,91	49,41	-2586,12
		Accesion	0,0002			
		Temporada	0,0000			
		Residual	0,0003			
Comp P	RB	Accesion	0,0001	3,01	96,14	-1501,35
		Temporada	0,0000			
		Residual	0,0032			
Comp M	RB	Accesion	0,0165	10,48	89,22	501,89
		Temporada	0,0005			
		Residual	0,1404			
Comp U	RB	Accesion	0,0005	4,47	95,11	-909,65
		Temporada	0,0000			
		Residual	0,0097			

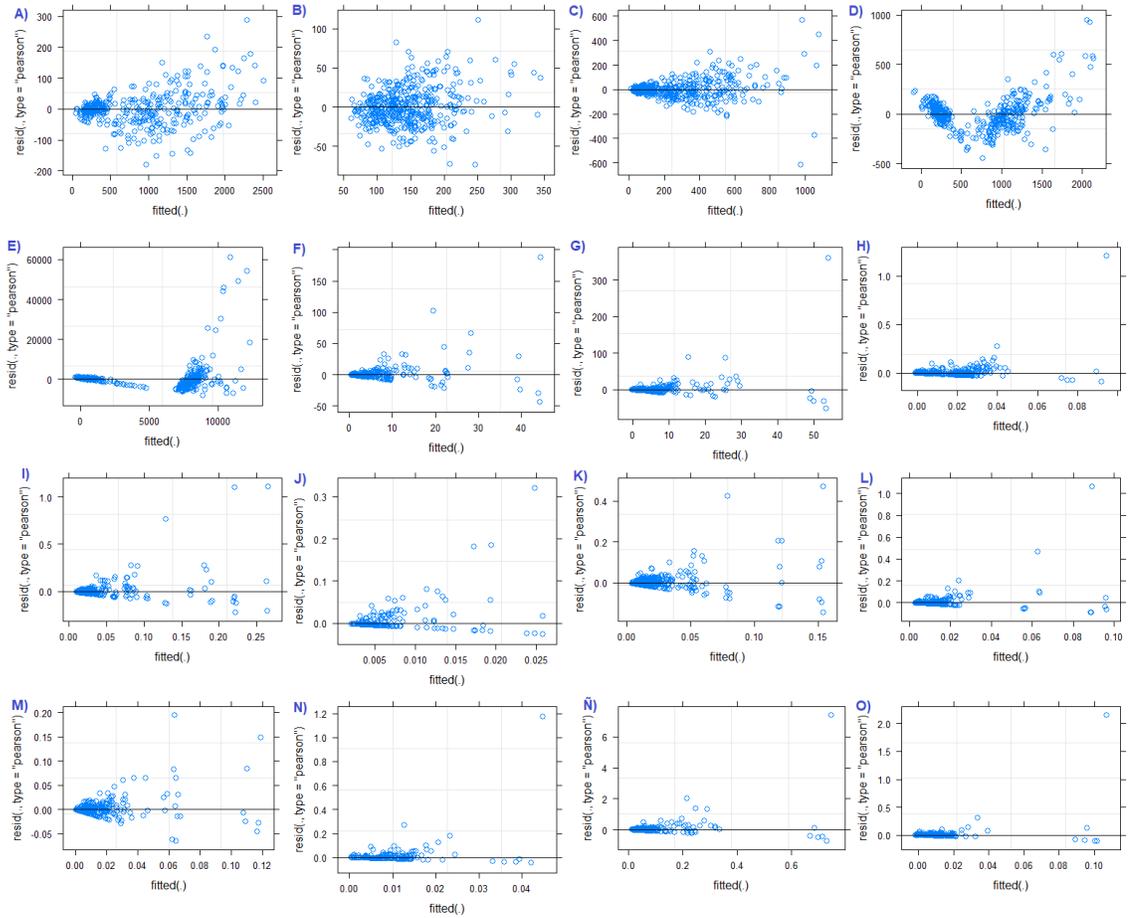
Anexo 8. Variables fijas y aleatorias, varianza, heredabilidad y valor de ajuste para modelos lineales mixtos de caracteres asociados a compuestos fenólicos en piel.

Rasgo	Variable fija	Variabes aleatorias	Varianza	Heredabilidad (%)	Porcentaje residual (%)	Valor de ajuste (AIC)*
Fen	RB	Peso	1660143	13,46	0,02	4407,48
		Accesion	1063217			
		Temporada	5174588			
		Residual	1649			
Flv	RB	Accesion/Temp	72504	27,93	32,45	6468,58
		Accesion	57299			
		Temporada	8791			
		Residual	66584			
Pca	RB	Accesion/Temp	354440	6,92	15,51	7229,44
		Accesion	98010			
		Temporada	743609			
		Residual	219516			
DPPH	RB	Accesion	446431	9,32	15,30	7722,27
		Temporada	3611130			
		Residual	732752			
		Accesion/Temp	74605697			
FRAP	RB	Accesion	12429247	2,36	15,43	9981,97
		Temporada	358925385			
		Residual	81337758			
		Accesion/Temp	74605697			
C3G	RB	Peso	1180,41	31,39	1,13	3602,99
		Accesion/Temp	3019,89			
		Accesion	2056,35			
		Temporada	219,25			
C3R	RB	Residual	74,28	32,04	36,77	5950,72
		Accesion/Temp	3063,3			
		Accesion	3460,7			
		Temporada	306,5			
Comp D	RB	Residual	3971,4	17,27	26,85	-339,97
		Accesion/Temp	0,0344			
		Accesion	0,0146			
		Temporada	0,0129			
		Residual	0,0227			

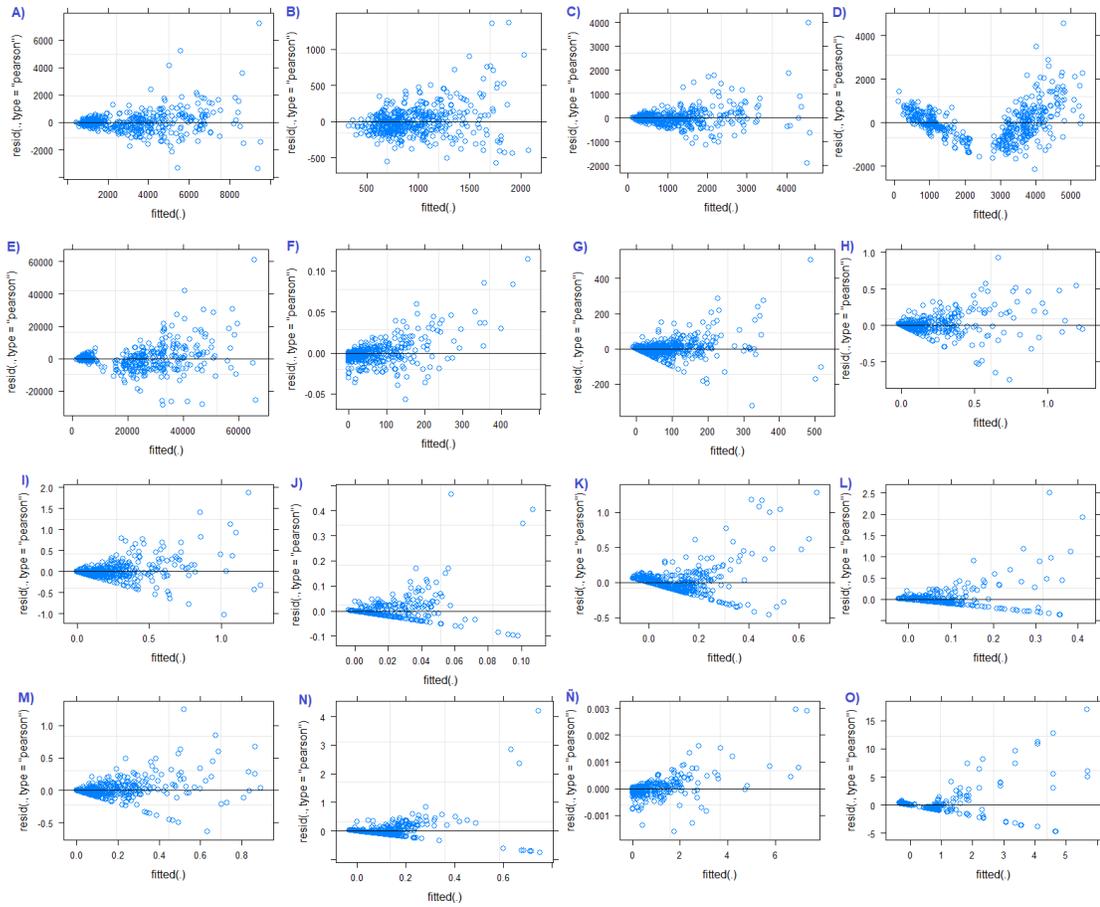
Anexo 8. Continuado.

Rasgo	Variable fija	Variables aleatorias	Varianza	Heredabilidad (%)	Porcentaje residual (%)	Valor de ajuste (AIC)*
Comp E	RB	Accesion/Temp	0,0294	25,23	50,12	143,77
		Accesion	0,0302			
		Temporada	0,0001			
		Residual	0,0600			
Comp F	RB	Accesion	0,0004	17,37	80,78	1739,33
		Temporada	0,0000			
		Residual	0,0019			
Comp T	RB	Accesion	0,0134	23,03	62,45	-179,26
		Temporada	0,0085			
		Residual	0,0364			
Comp L	RB	Accesion	0,0079	14,43	82,76	-78,9
		Temporada	0,0015			
		Residual	0,0455			
Comp R	RB	Accesion/Temp	0,0310	3,74	44,27	-272,19
		Accesion	0,0022			
		Temporada	0,0000			
		Residual	0,0264			
Comp P	RB	Accesion	0,0217	18,20	78,53	304,05
		Temporada	0,0039			
		Residual	0,0935			
Comp M	RB	Peso	0,2343	8,91	0,52	-229,46
		Accesion/Temp	0,8594			
		Accesion	0,1137			
		Temporada	0,0622			
Comp U	RB	Residual	0,0066	22,47	66,89	2180,21
		Accesion	1,1275			
		Temporada	0,5342			
		Residual	3,3569			

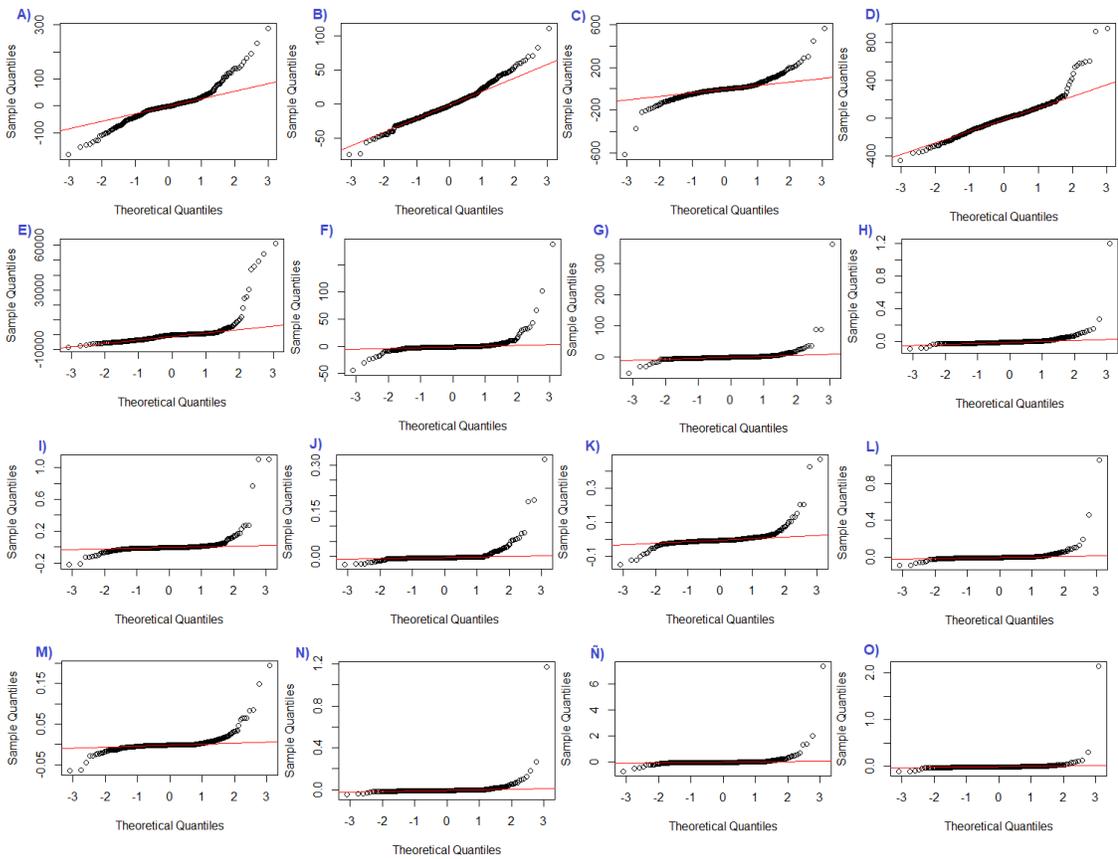
Anexo 9. Gráficos de distribución de residuos MLM en pulpa.



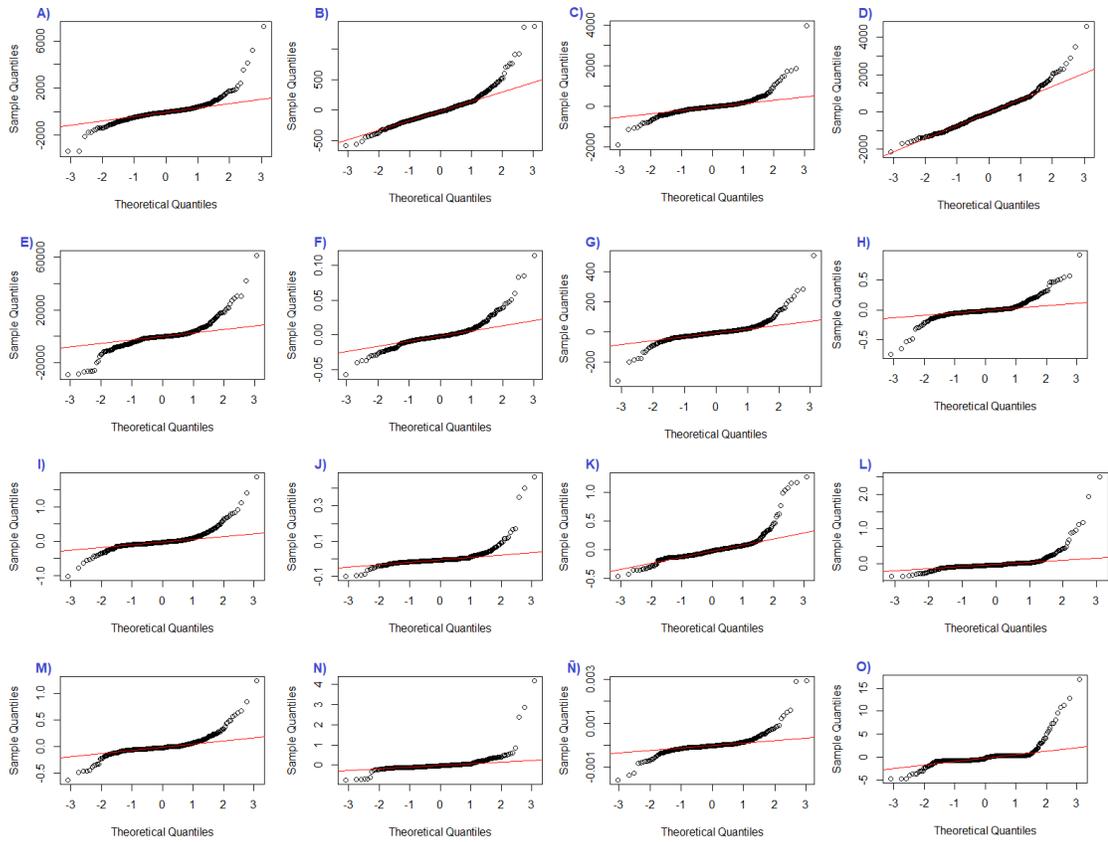
Anexo 10. Gráficos de distribución de residuos MLM en piel.



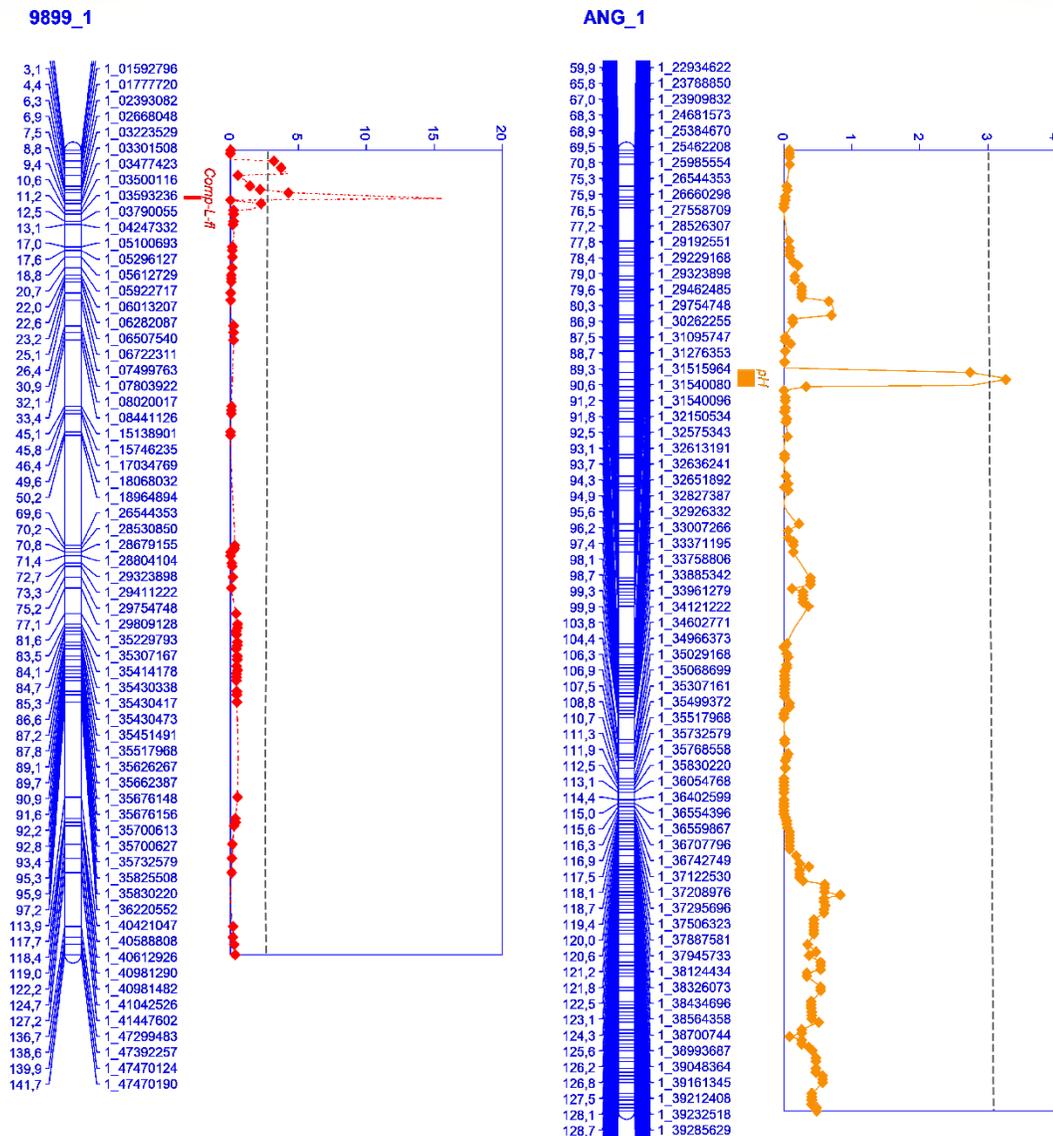
Anexo 11. Gráficos Q-Q Normal de residuos MLM en pulpa.



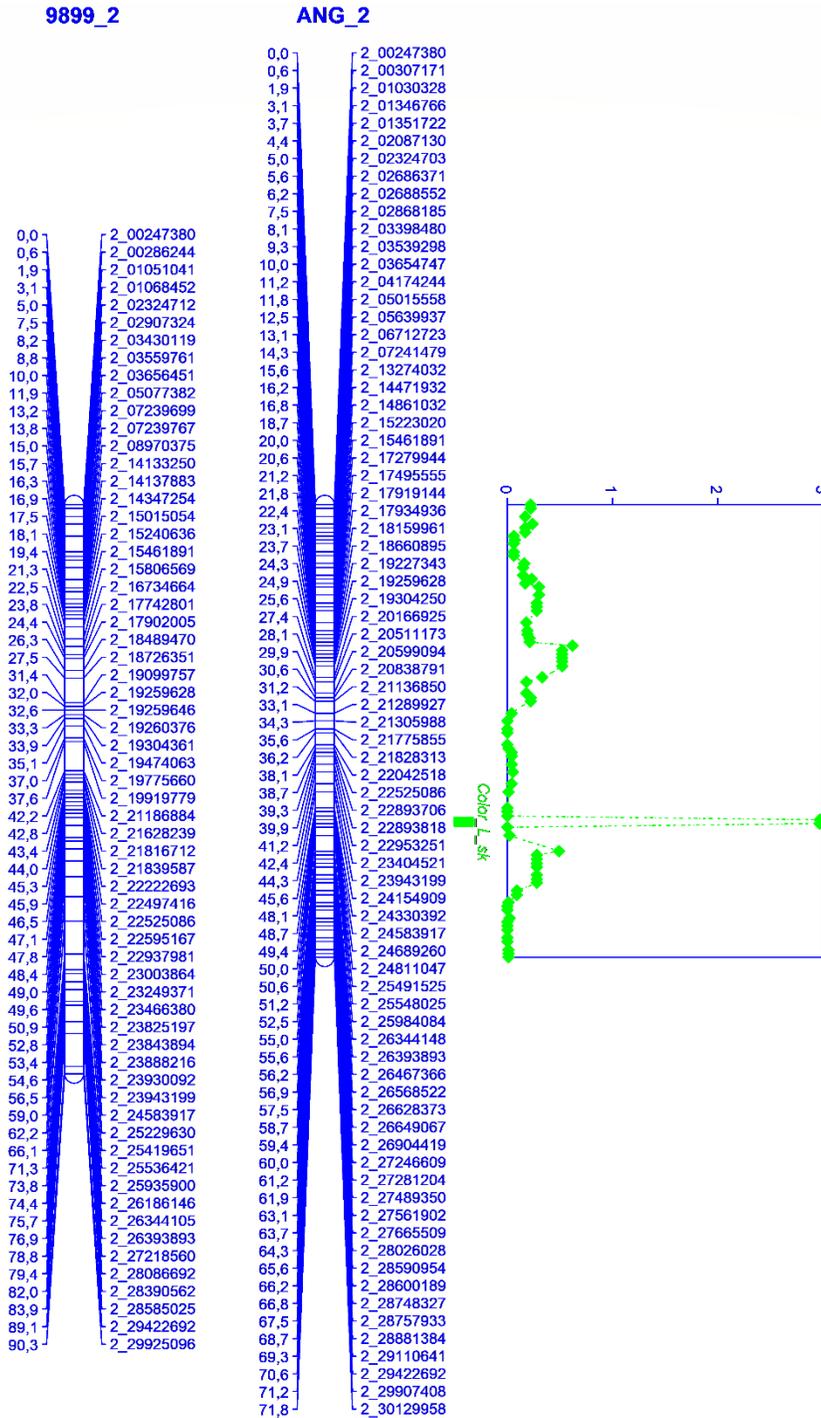
Anexo 12. Gráficos Q-Q Normal de residuos MLM en piel.



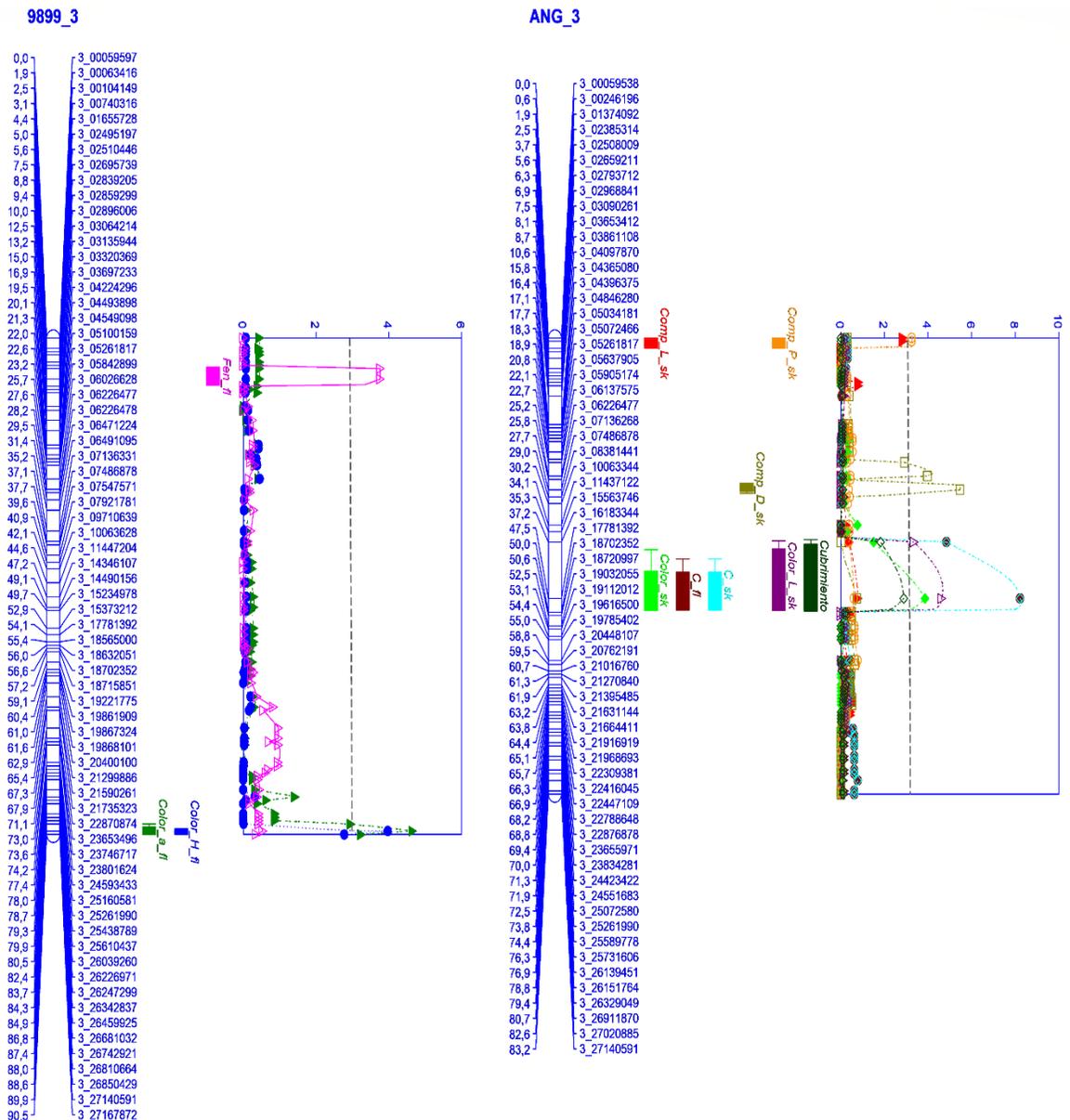
Anexo 13A. Grupo de ligamiento 1, con QTLs obtenidos en ciruelos asiáticos “98.99” y “Angelino”, mediante análisis de QTL. Línea gris punteada indica nivel LOD 3, aceptado como valor mínimo de significancia. Simbología: en LG1 de “98.99” (9899_1): Comp_L_fl, contenido de compuesto L en pulpa. En LG1 de “Angelino” (ANG_1): pH, acidez del fruto. Cubrimiento, cubrimiento de color en piel; Comp_T_sk, contenido de compuesto T en piel; Comp_F_sk, contenido de compuesto F en piel; Comp_M_sk, contenido de compuesto M en piel; Color_H_sk, parámetro H* de color en piel; Color_L_sk, parámetro L* de color en piel; Comp_L_sk, contenido de compuesto L en piel; Comp_E_sk, contenido de compuesto E en piel; C3R_sk, contenido de cianidina 3 -rutinosido en piel; Color_sk, sobrecolor en piel; Comp_C3G_sk, contenido de cianidina 3 -glucósido en piel; C_sk, parámetro C* de color en piel; C_sk, parámetro C* de color en pulpa.



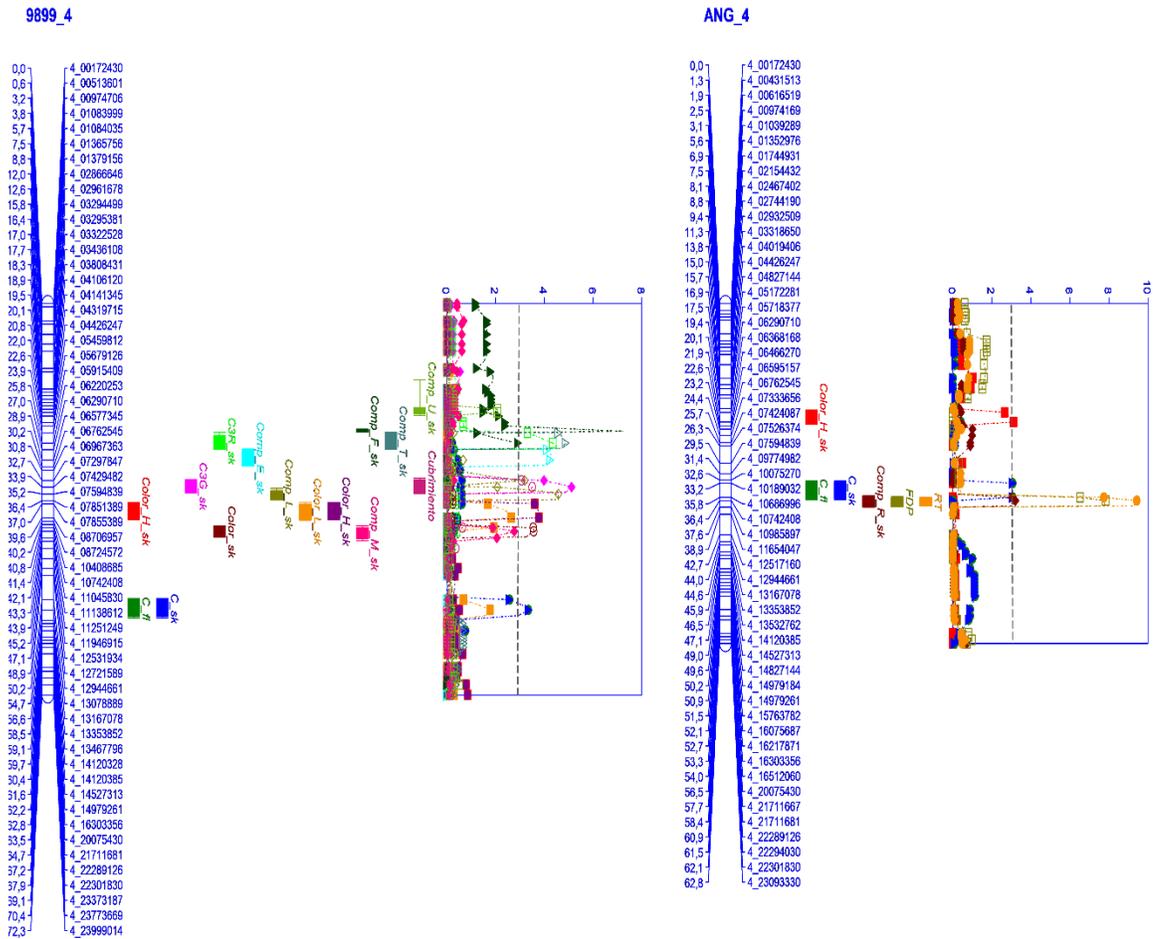
Anexo 13B. Grupo de ligamiento 2, con QTLs obtenidos en ciruelos asiáticos “98.99” y “Angelino”, mediante análisis de QTL. Línea gris punteada indica nivel LOD 3, aceptado como valor mínimo de significancia. Simbología: en LG2 de “Angelino” (ANG_2): Color_L_sk, parámetro L* de color en piel.



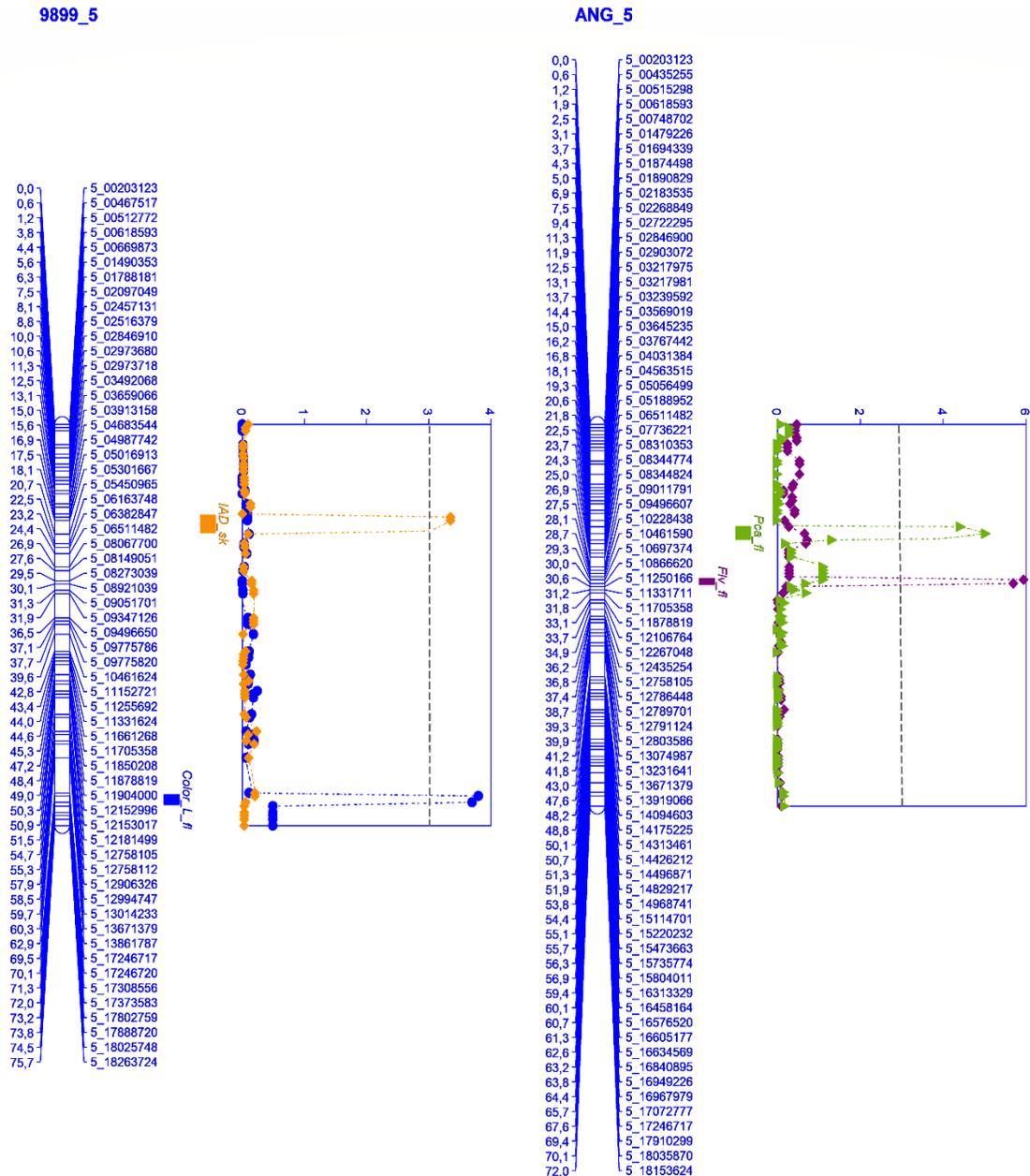
Anexo 13C. Grupo de ligamiento 3, con QTLs obtenidos en ciruelos asiáticos “98.99” y “Angelino”, mediante análisis de QTL. Línea gris punteada indica nivel LOD 3, aceptado como valor mínimo de significancia. Simbología: en LG3 de “98.99” (9899_3): Fen_fl, contenido de fenoles totales en pulpa; Comp_L_sk, contenido de compuesto L en piel; Color_H_fl, parámetro H* de color en pulpa; Color_a_fl, parámetro a de color en pulpa. En LG3 de “Angelino” (ANG_3): Cubrimiento, cubrimiento de color en piel; Comp_P_sk, contenido de compuesto P en piel; Color_L_sk, parámetro L* de color en piel; Comp_D_sk, contenido de compuesto D en piel; C_sk, parámetro C* de color en piel; C_sk, parámetro C* de color en pulpa; Comp_L_sk, contenido de compuesto L en piel; Color_sk, sobrecolor en piel.



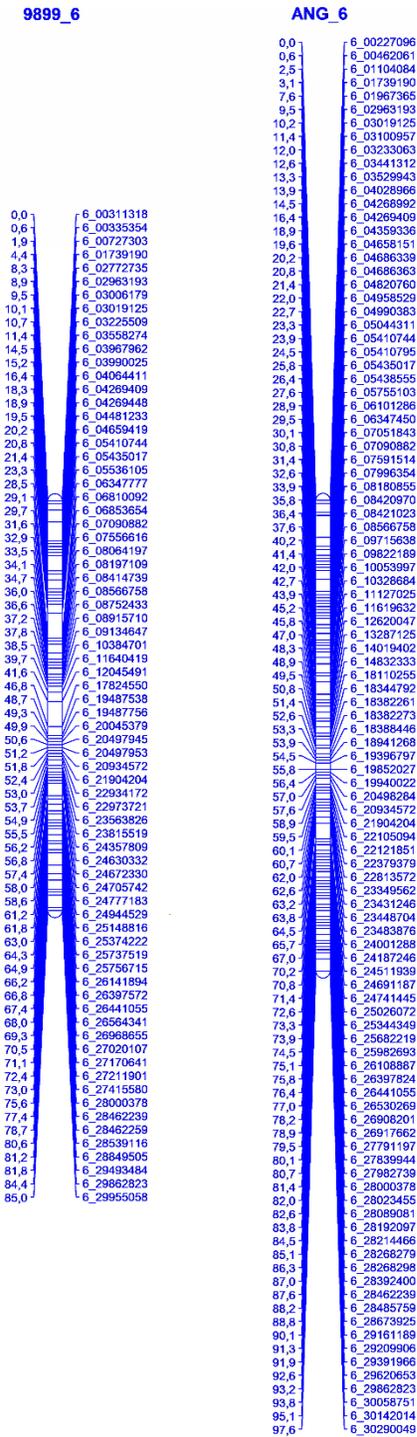
Anexo 13D. Grupo de ligamiento 4, con QTLs obtenidos en ciruelos asiáticos “98.99” y “Angelino”, mediante análisis de QTL. Línea gris punteada indica nivel LOD 3, aceptado como valor mínimo de significancia. Simbología: en LG4 de “98.99” (9899_4): Comp_U_sk, contenido de compuesto U en piel; Cubrimiento, cubrimiento de color en piel; Comp_T_sk, contenido de compuesto T en piel; Comp_F_sk, contenido de compuesto F en piel; Comp_M_sk, contenido de compuesto M en piel; Color_H_sk, parámetro H* de color en piel; Color_L_sk, parámetro L* de color en piel; Comp_L_sk, contenido de compuesto L en piel; Comp_E_sk, contenido de compuesto E en piel; C3R_sk, contenido de cianidina 3-rutinósido en piel; Color_sk, sobrecolor en piel; Comp_C3G_sk, contenido de cianidina 3-glucósido en piel; C_sk, parámetro C* de color en piel; C_sk, parámetro C* de color en pulpa. En LG4 de “Angelino” (ANG_4): RT, tiempo de madurez del fruto; FDP, período de desarrollo del fruto; Comp_R_sk, contenido de compuesto R en piel; Color_H_sk, parámetro H* de color en piel; C_sk, parámetro C* de color en piel; C_sk, parámetro C* de color en pulpa.



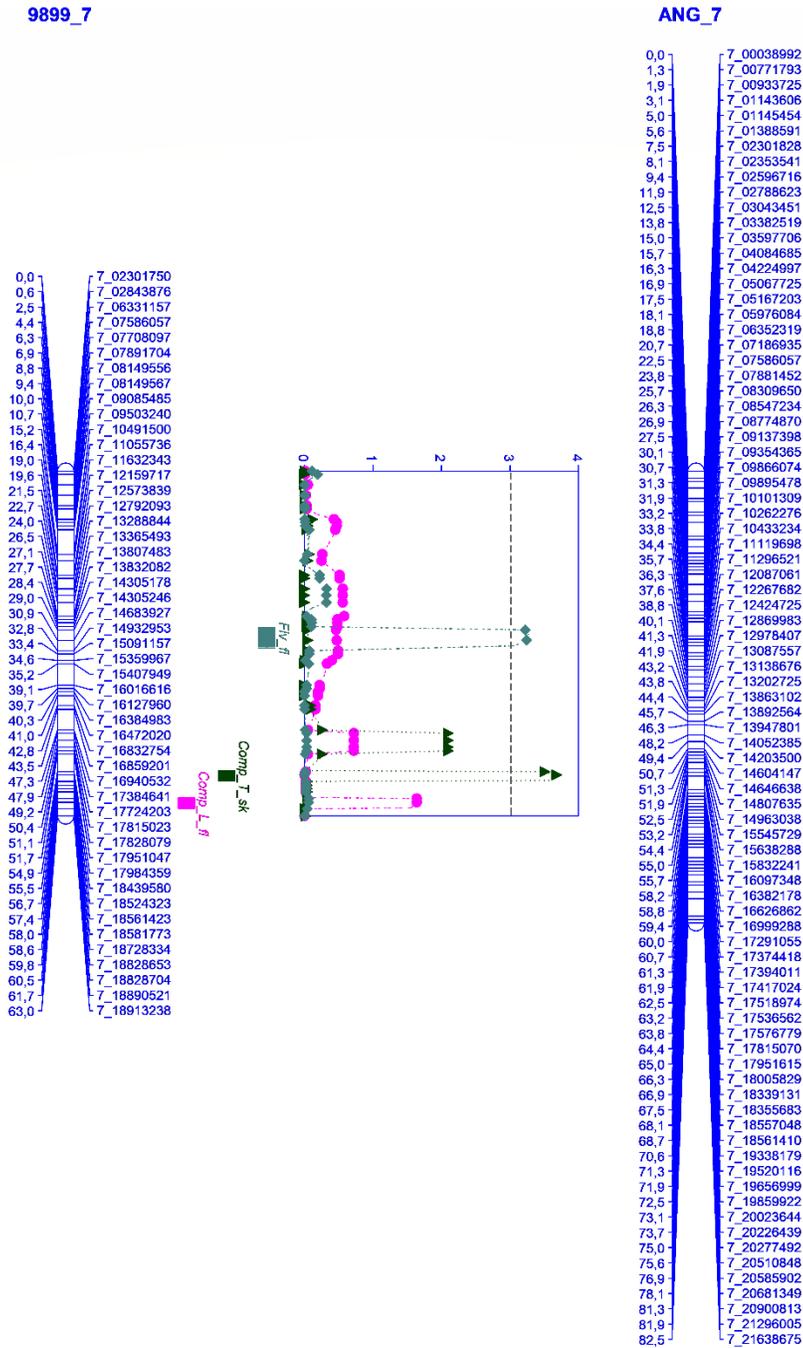
Anexo 13E. Grupo de ligamiento 5, con QTLs obtenidos en ciruelos asiáticos “98.99” y “Angelino”, mediante análisis de QTL. Línea gris punteada indica nivel LOD 3, aceptado como valor mínimo de significancia. Simbología: en LG5 de “98.99” (9899_5): IAD_sk, índice de absorción de clorofila en piel; Color_L_fl, parámetro L* de color en pulpa. En LG5 de “Angelino” (ANG_5): Pca_fl, contenido de proantocianidinas totales en pulpa; Flv_fl, contenido de flavonoides totales en pulpa.



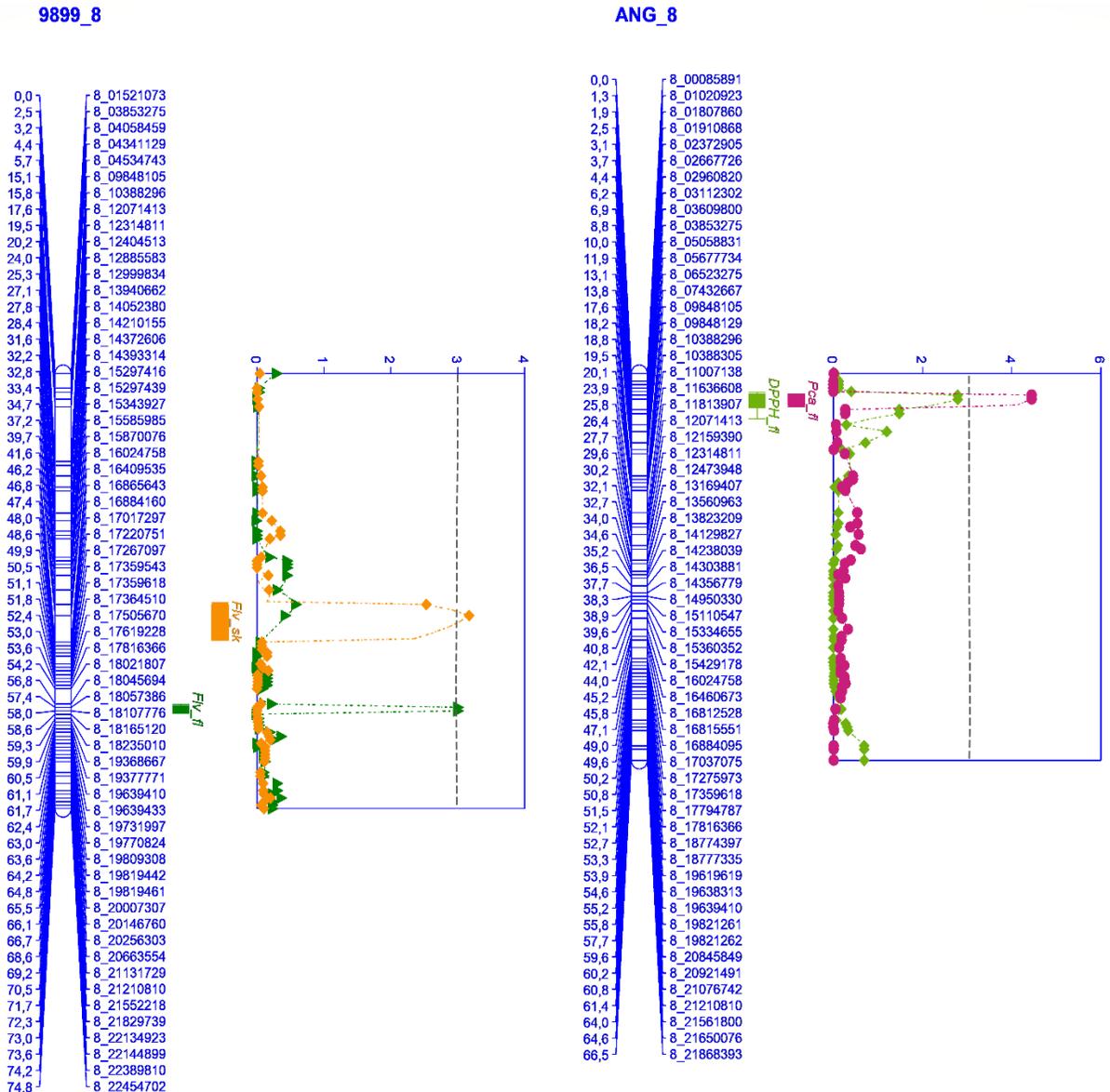
Anexo 13F. Grupo de ligamiento 6, sin QTLs obtenidos en ciruelos asiáticos “98.99” y “Angeleno”, mediante análisis de QTL.



Anexo 13G. Grupo de ligamiento 7, con QTLs obtenidos en ciruelos asiáticos “98.99” y “Angelino”, mediante análisis de QTL. Línea gris punteada indica nivel LOD 3, aceptado como valor mínimo de significancia. Simbología: en LG7 de “98.99” (9899_7): Flv_fl, contenido de flavonoides totales en pulpa; Comp_T_sk, contenido de compuesto T en piel; Comp_L_fl, contenido de compuesto L en pulpa.



Anexo 13H. Grupo de ligamiento 1, con QTLs obtenidos en ciruelos asiáticos “98.99” y “Angelino”, mediante análisis de QTL. Línea gris punteada indica nivel LOD 3, aceptado como valor mínimo de significancia. Simbología: en LG8 de “98.99” (9899_8): Flv_sk, contenido de flavonoides totales en piel; Flv_fl, contenido de flavonoides totales en pulpa. En LG8 de “Angelino” (ANG_8): Pca_fl, contenido de proantocianidinas totales en pulpa; DPPH_fl, Capacidad antioxidante mediante DPPH en pulpa.



Anexo 14. Scripts usados para los distintos análisis realizados en R (R Core Team, 2018).

```

A) #ANOVA para determinar factores significativos para BLUPs
dsk<-read.table("blupskin.txt", header= TRUE, dec = ".", na.strings = "NA")
ac3rsk<-aov(C3R ~ Accesion, data = dsk);summary(ac3rsk) #agregar factores segun correlaciones sig.

```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Accesion	94	3018576	32113	5.219	<2e-16 ***
Residuals	427	2627497	6153		

```

---
signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
ac3rsk2<-aov(C3R ~ Accesion + RB + year, data = dsk); summary(ac3rsk2)

```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Accesion	94	3018576	32113	5.58	< 2e-16 ***
RB	1	80787	80787	14.04	0.000204 ***
year	1	100716	100716	17.50	3.49e-05 ***
Residuals	425	2445994	5755		

```

ac3rsk3<-aov(C3R ~ RB + RT.JD + Accesion*year + FDP, data = dsk); summary(ac3rsk3)

```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
RB	1	13016	13016	4.979	0.02653 *
RT.JD	1	172805	172805	66.100	1.85e-14 ***
Accesion	75	2841939	37893	14.494	< 2e-16 ***
year	1	28344	28344	10.842	0.00113 **
FDP	1	1	1	0.000	0.98576
Accesion:year	62	909699	14673	5.612	< 2e-16 ***
Residuals	256	669256	2614		

```

#escoger modelo con menor valor residual
#despues copiar datos a excel y tabularlos-> Datos/Texto en columnas/de ancho fijo/

```

Anexo 14. Continuado.

```

B) #Modelos para obtener BLUPS de fenoles totales en pulpa
blupf1<-read.table("blupflesh.txt", header = TRUE, dec = ",", na.strings = "NA")
blupsk<-read.table("blupskin.txt", header = TRUE, dec = ",", na.strings = "NA")
library(lme4)
library(cAIC4)#para obtener criterio de info Akaike

m1cogsk1<-lmer(compG ~ RB+(1|Accesion)+(1|year), data = blupsk) #agregar covariadas segun ANOVA
summary(m1cogsk1)

m1cogsk2<-lmer(compG ~ RB+(1|Accesion)+(1|year)+(1|Accesion:year), data = blupsk)
summary(m1cogsk2)#se escoge el modelo con menor valor residual y AIC

m1cogsk3<-lmer(compG ~ RB+(1|Accesion)+(1|year)+(1|RT.JD), data = blupsk)
summary(m1cogsk3)

m1c3gsk4<-lmer(C3G ~ RB+(1|Accesion)+(1|year)+(1|Accesion:year)+(1|Peso)+(1|FDP), data = blupsk)
summary(m1c3gsk4)
+(1|RT.JD)+(1|Peso)

```

```

#Linear mixed model fit by REML ['lmerMod']
Formula:
  Fen ~ RB + (1 | Accesion) + (1 | year) + (1 | Peso) + (1 | RT.JD)
Data: fentot

REML criterion at convergence: 5539.6

Scaled residuals:
   Min       1Q   Median       3Q      Max
-1.43716 -0.33797 -0.03312  0.29822  2.61041

Random effects:
   Groups             Name                Variance Std.Dev.
Peso      (Intercept)  37239      193.0
Accesion  (Intercept)  83963      289.8
RT.JD     (Intercept)  56939      238.6
year      (Intercept)  501830     708.4
Residual                    19394      139.3
Number of obs: 387, groups:
  Peso, 386; Accesion, 76; RT.JD, 40; year, 2

Fixed effects:
   Estimate Std. Error t value
(Intercept)  752.27      504.73   1.490
RB           -13.26       15.23  -0.871

Correlation of Fixed Effects:
   (Intr)
RB -0.058

```

```

#comparar los modelos por AIC (valor de ajuste), escogiendo el de menor valor
cAIC(m1cogsk1)
cAIC(m1cogsk2)
cAIC(m1cogsk3)

```

```

# extraer los efectos aleatorios debidos al genotipo
cogskblup<-ranef(m1cogsk1)
str(cogskblup)

```

```

#List of 5
 $ Peso      :'data.frame': 386 obs. of  1 variable:
  ..$ (Intercept): num [1:386] -243.8 81.9 487.9 -152.8 -72.5 ...
 $ Accesion:year:'data.frame': 137 obs. of  1 variable:
  ..$ (Intercept): num [1:137] -92.6 -109.2 -572.8 64 11.2 ...
 $ Accesion   :'data.frame': 76 obs. of  1 variable:
  ..$ (Intercept): num [1:76] -8.94 -10.54 -49.1 9.81 -51.28 ...
 $ RT.JD      :'data.frame': 40 obs. of  1 variable:
  ..$ (Intercept): num [1:40] 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 ...
 $ year       :'data.frame': 2 obs. of  1 variable:
  ..$ (Intercept): num [1:2] 499 -499
- attr(*, "class")= chr "ranef.mer"

```

```

c3gflgenblup<-c3gflblup2$Accesion
write.csv(c3gflgenblup, file = "Blup_C3G_flesh.csv")
#descargar datos a excel y tabularlos-> Datos/Texto en columnas/de ancho fijo/

```