

Artículo de divulgación

¿Cómo utilizar la información generada por la secuenciación de genomas vegetales en Agronomía? Un caso con aplicación al mejoramiento genético de tomate

Cambiaso, V¹; Pereira da Costa, JH¹; Picardi, LA²; Pratta, GR¹; Zorzoli, R² y Rodríguez, GR¹

Cátedra de Genética, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario.

¹Instituto de Investigaciones en Ciencias Agrarias de Rosario (IICAR CONICET-UNR),²Consejo de Investigaciones de la UNR (CIUNR).

vladimir.cambiaso@unr.edu.ar

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una de las hortalizas de mayor importancia a nivel nacional e internacional debido al nivel de consumo, producción y de ingresos que genera. Tanto el mercado como los sistemas productivos se dividen en función del destino de la producción en tomates para consumo en fresco y tomates para industria. Esta división se consolidó a mediados de los años 60 cuando se logró desarrollar materiales mejor adaptados a la cosecha mecánica provocando incluso la separación de los programas de mejoramiento en función de los diferentes objetivos productivos de cada sistema (Rasmussen 1968).

Los fitomejoradores cuentan con una gran diversidad de especies y variedades que conforman el germoplasma de tomate, como se puede apreciar en la Figura 1. Hasta el momento se han descrito 12 especies silvestres y una sola cultivada, siendo la mayoría fértiles entre sí. A partir de estudios de diversidad fenotípica y molecular, Blanca y colaboradores (2012 y 2015) sostienen que el proceso de domesticación del cultivo se produjo en dos etapas. La primera caracterizada por la selección de frutos de tamaño intermedio y la fijación de la autogamia como sistema reproductivo y la segunda por la selección de frutos de mayor tamaño y por una fuerte disminución de la variabilidad genética (Ranc et al. 2008; Blanca et al. 2015). Durante la primera etapa se originó desde la especie silvestre *S. pimpinellifolium* la variedad botánica cultivada *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*, comúnmente conocida como tomate tipo *cherry*. Actualmente estos términos han dejado de utilizarse como sinónimos ya que la categoría *cherry* se basa en una simple clasificación morfológica por tamaño de fruto y en ella se incluyen tanto variedades modernas de frutos pequeños e híbridos

interespecíficos además de los genotipos que se corresponden taxonómicamente con la variedad botánica (Blanca et al. 2015).

A partir de los años 30 en los programas de mejoramiento se comenzó a introgresar en genotipos cultivados genes de resistencia a diferentes estreses bióticos provenientes de especies silvestres. Esto incrementó la variabilidad genética de los cultivares tradicionales liberados por estos programas, respecto de aquellos cultivares denominados criollos o en inglés *heirlooms*, que no fueron obtenidos en programas comerciales sino que fueron conservados y transferidos entre agricultores (Williams and St. Clair 1993; Sim et al. 2009; Sim et al. 2011). A lo largo de la historia del mejoramiento, la mayoría de los programas han tenido como principales objetivos de mejora el incremento del rendimiento, la firmeza de los frutos y las resistencias a factores bióticos, pero han desatendido el sabor. Los cultivares criollos y algunas especies silvestres se perfilan entonces como un posible reservorio de genes que permitirían recuperar este carácter tan importante para el consumidor Causse et al. 2001; Saliba-Colombani et al. 2001; Rodríguez et al. 2010; Pereira da Costa et al. 2013; Tieman et al. 2017; Gao et al. 2019). Otra causa importante en la disminución del sabor de los frutos fue la incorporación, en materiales comerciales, de genes que por un lado permitieron incrementar notablemente la vida poscosecha de los frutos pero que por otro afectaron su calidad. Estos genes, *rin* (*ripening inhibitor*) y *nor* (*non ripening*), son mutaciones naturales ocurridas en el germoplasma de tomate cultivado. Se ha demostrado que algunos cultivares de *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* y accesiones de *S. pimpinellifolium* que presentan buenas características de calidad de

fruto también tienen mayor vida poscosecha que los cultivares comerciales de tomate aunque menor que los genotipos homogotas para los mutantes de madurez del fruto *nor* y *rin* (Pratta et al. 1996; Zorzoli et al. 1998; Rodríguez et al. 2010). De esta manera, los cruzamientos con especies silvestres se postulan como una alternativa para mejorar tanto la vida poscosecha como la calidad de los frutos.

El programa de mejoramiento de tomate para consumo en fresco que lleva adelante la Cátedra de Genética de la FCA-UNR tiene como uno de sus principales objetivos el de mejorar caracteres de calidad de fruto incrementando a su vez la vida poscosecha. El cruzamiento entre el cultivar argentino Caimanta de *S. lycopersicum* L. y la accesión LA0722 de *S. pimpinellifolium* L. fue identificado como el más promisorio para alcanzar dichos objetivos (Pratta et al. 2003). A partir de este cruzamiento interespecífico, se han desarrollado poblaciones con diferentes estructuras genéticas tales como: F₂, líneas endocriadas recombinantes (RIL), híbridos de segundo ciclo (HSC) y líneas casi isogénicas (NIL) (Rodríguez et al. 2013). Para estudiar la herencia de caracteres complejos y localizar las regiones del genoma involucradas en su determinación se han caracterizado molecularmente estas poblaciones con diferentes tipos de marcadores de ADN (Rodríguez et al. 2006; Pratta et al. 2011; Pereira da Costa et al. 2013). De esta manera se ha logrado no solo detectar fenotípicamente los genotipos superiores sino también conocer y validar las regiones genómicas implicadas en la determinación de estos caracteres.

En el año 2012 cuando un consorcio internacional de grupos de investigación logró ensamblar el genoma completo de la varie-

dad cultivada Heinz 1706 poniendo a disposición del mundo entero la primera versión de un genoma de referencia en tomate (The Tomato Genome Consortium 2012), comenzó una nueva era en el mejoramiento genético de este cultivo, la Era de la Genómica. Obtener un genoma de referencia de alta calidad implica conocer con gran certeza el orden de los nucleótidos (A, C, G y T) en el ADN para todos los cromosomas de la especie y demanda una capacidad de procesamiento informático muy grande. Una vez ensamblado el genoma de referencia se puede utilizar como guía para alinear secuencias genómicas de otros genotipos. Este proceso se conoce como re-secuenciado de genomas y además de requerir una calidad de secuencia mucho menor que la de la referencia también insueme una inferior cantidad de recursos informáticos para llevarlo a cabo. Es por ello que desde la publicación del genoma de referencia en tomate a la fecha ya se han re-secuenciado y alineado más de 600 accesiones tanto de especies silvestres como cultivadas. Se destacan dos proyectos de re-secuenciación debido al gran número de materiales secuenciados, uno con 150 genomas llevado a cabo por la Universidad y Centro de Investigación de Wageningen, Holanda (Aflitos et al. 2014) y otro con 360 genomas por el Instituto de Genómica Agrícola de Shenzhen, China (Lin et al. 2014).

A partir de la gran cantidad de información generada en tan poco tiempo resulta pertinente plantearse cómo se pueden utilizar estos datos para incrementar el conocimiento que tenemos acerca de la estructura genética de las poblaciones de mejora desarrolladas y sobre la determinación de las características de interés de nuestro programa de mejoramiento. Por tal motivo, la Cátedra de Genética llevó adelante el proyecto de re-secuenciación del cultivar argentino "Caimanta" y la accesión silvestre "LA0722", siendo nuestro grupo de trabajo el pionero del país en secuenciar un cultivar de tomate de origen nacional. El alineado de las secuencias se realizó en colaboración con el grupo de investigación del Dr. David Francis de la Universidad Estatal de Ohio (EEUU) mediante el otorgamiento de una beca al Ing. Agr. (Dr.) Vladimir Cambiaso para estadías cortas en el exterior en el marco del programa BEC.AR de la Presidencia de la Nación.

Tabla 1. Clasificación de los cultivares utilizados para realizar la comparación de secuencias genómicas, el análisis de agrupamiento y el estudio de la estructura poblacional.

Nº	Nombre del Cultivar	Tipo de Cultivar	Tamaño de Fruto	Identificación del Cultivar
1	* Alisa Craig	Tradicional	Intermedio	N020212 / EA00240_EA01101
2	* Rutgers	Tradicional	Grande	EA00465
3	* Galina	Cherry	Intermedio	EA00325
4	* John's Big Orange	Criollo	Grande	EA00371
5	* Sonata	Criollo	Intermedio	LYC 1969 / EA02724
6	* Cross Country	Moderno (Para procesado)	Grande	LYC 3897_T 1662 / EA03701
7	* LYC3340	Cherry	Pequeño	LYC 3340_T 1039 / EA03306
8	* LYC3153	Criollo	Grande	LYC 3153_T 825 / EA03221
9	* LYC3155	Criollo	Grande	LYC 3155_T 828 / EA03222
10	* PI129097	Cherry	Pequeño	PI 129097 / EA04710
11	* Polish Joe	Criollo	Grande	EA00157
12	* Cal J TM VF	Moderno (Para procesado)	Grande	CGN20815 / EA02054
13	* Anto	Criollo	Grande	V710092 / EA01835
14	* Belmonte	Criollo	Grande	SG 16 / EA00892
15	* PI311117	Cherry	Pequeño	PI 311117 / EA05701
16	* LA0113	Cherry	Pequeño	LA0113 / EA00526
17	* ES 58 Heinz	Moderno (Consumo en fresco)	Grande	LYC 1410 / EA02655
18	* Large Red Cherry	Moderno (Para procesado)	Grande	TR00018
19	* Porter	Tradicional	Intermedio	EA00940
20	* Dixy Golden Giant	Criollo	Grande	TR00020
21	* Marmande VFA	Tradicional	Grande	TR00022
22	* Thessaloniki	Criollo	Grande	TR00023
23	* Watermelon Beefsteak	Criollo	Grande	EA01640
24	* LA1479	Cherry	Pequeño	LA1479 / TR00028
25	** Ailsa Craig	Tradicional	Intermedio	LA2838A / TS-9
26	** N739	Moderno (Consumo en fresco)	Grande	TS-74
27	** NC EBR-6	Moderno (Consumo en fresco)	Grande	LA3846 / TS-121
28	** Rutgers	Tradicional	Grande	LA1090 / TS-122
29	** Severianin	Moderno (Consumo en fresco)	Grande	LA2413 / TS-130
30	** Marmande	Tradicional	Grande	LA1504 / TS-163
31	** B-L-35	Moderno (Consumo en fresco)	Intermedio	LA4347 / TS-185
32	** Prince Borghese	Moderno (Consumo en fresco)	Intermedio	LA0089 / TS-206
33	** Flora Dade	Moderno (Consumo en fresco)	Grande	LA3242 / TS-212
34	** Platense	Moderno (Consumo en fresco)	Grande	LA3243 / TS-237
35	** Rio Grande	Moderno (Para procesado)	Grande	LA3343 / TS-263#
36	*** Caimanta	Moderno (Consumo en fresco)	Grande	Caimanta
37	** LA0722	Silvestre	Pequeño	LA0722

* Material del proyecto de re-secuenciación de 150 genomas (Aflitos et al. 2014)

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

*** Material del proyecto de re-secuenciación de la Cátedra de Genética FCA-UNR (Cambiaso et al. 2019a)

En negrita: genotipos progenitores

Con fondo gris: materiales utilizados como control

Obtener las secuencias de los genotipos progenitores del programa de mejoramiento, permitió por un lado compararlas entre sí para desarrollar marcadores moleculares pero también compararlas con otras secuencias para determinar la diversidad abarcada por el cruzamiento. Como resultado de comparar los genomas de ambos progenitores se detectaron 1.398.056 polimorfismos, o diferencias en las bases nucleotídicas de las secuencias, de los cuales ya se han utilizado cerca de 300 para desarrollar diferentes tipos de marcadores moleculares distribuidos estratégicamente en los 12 cromosomas (Cambiaso et al. 2019a). Estos marcadores fueron utilizados en primer lugar para caracterizar molecularmente una población F₂ y construir un mapa de ligamiento genético (Cambiaso et al. 2019a). La construcción de este mapa sirve como referencia para localizar regiones genómicas involucradas en la determinación de caracteres de calidad de fruto y

para realizar la selección, que al ser asistida por marcadores moleculares, identifica más eficientemente los genotipos con características de calidad superiores. A su vez, la información de secuencia y los marcadores desarrollados fueron utilizados para caracterizar las demás poblaciones generadas en el programa de mejoramiento y para identificar regiones genómicas asociadas a caracteres de interés. En el caso de la población de RILs derivadas del cruzamiento entre "Caimanta" y "LA0722", se detectaron asociaciones nuevas para el peso de los frutos y la vida poscosecha y se pudo demostrar que dicha población presenta una estructura genética relacionada principalmente con peso de los frutos (Cambiaso et al. 2019b). Respecto de los HSC la información de secuencia permitió construir un mapa de ligamiento en una población F₂ derivada de estos e identificar y validar regiones genómicas asociadas a caracteres de calidad de fruto (Cabodevilla

et al. 2019). Finalmente los marcadores obtenidos también están siendo utilizados para desarrollar nuevas NILs, validar el porcentaje de recuperación del genoma cultivado en cada una de ellas y determinar las regiones segregantes.

Con el objetivo de determinar la variabilidad existente entre los dos genotipos utilizados como progenitores del programa de mejoramiento y otros cultivares de tomate que cubren una amplia variabilidad genética, se realizó un análisis de agrupamiento y un estudio de la estructura poblacional. Se seleccionaron 35 genotipos de los dos proyectos más grandes de re-secuenciación en tomate y se analizó el polimorfismo en 229 puntos distribuidos en todo el genoma y localizados en regiones no codificantes. A modo de control entre datos obtenidos de los diferentes proyectos de re-secuenciación, se incluyeron tres culti-

vares ("Alisa Craig", "Rutgers" y "Marmande") secuenciados en ambos proyectos. En la Tabla 1 se presenta una clasificación basada en características fenotípicas de los genotipos seleccionados, por tipo de cultivar en: silvestre, cherry, criollo, tradicional y moderno para procesado o para consumo en fresco, y por tamaño de fruto en: pequeño, intermedio y grande. En la Figura 2 se presenta el agrupamiento obtenido al realizar el análisis junto con un esquema de la estructura poblacional en donde se representa con barras de colores el grado de pertenencia a cada grupo para cada cultivar.

El análisis permitió distinguir dos grandes grupos denominados G1 y G2. En el G1 se agruparon las accesiones con tamaño de fruto pequeño junto con "LA0722" y en el G2 las de tamaño intermedio y grande junto con "Caimanta". A su vez el G2 se subdividió en dos grupos, G2-A y G2-B, dentro del

grupo G2-A se encuentran la mayor parte de los cultivares criollos y tradicionales de diferentes tamaños, mientras que en el G2-B se agruparon principalmente los cultivares modernos para procesado y para consumo en fresco con tamaño de fruto grande. "Caimanta" se ubicó en el grupo G2-B junto con otro cultivar de origen argentino incluido en el análisis llamado "Platense" y junto con "Flora-Dade", un material que forma parte de la genealogía de "Caimanta". Respecto de los tres cultivares utilizados como control entre los datos obtenidos de los dos proyectos de re-secuenciación, el cultivar "Rutgers" fue el único de los tres que presentó diferencias entre los dos orígenes distintos, ubicándose uno en el subgrupo G2-A y el otro en el subgrupo G2-B. Esto demuestra que en ciertas ocasiones cultivares que han sido registrados con el mismo nombre en función de sus características fenotípicas pueden presentar

Figura 1. Frutos representativos de la diversidad existente en el germoplasma de tomate clasificado por tipo de cultivares. La figura fue realizada compaginando fotografías de frutos obtenidas de la página web www.codigotomate.com.ar

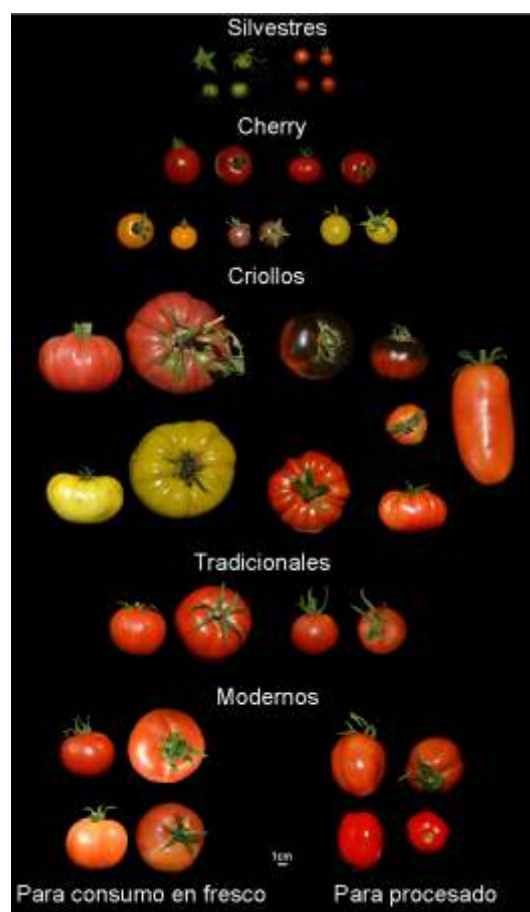
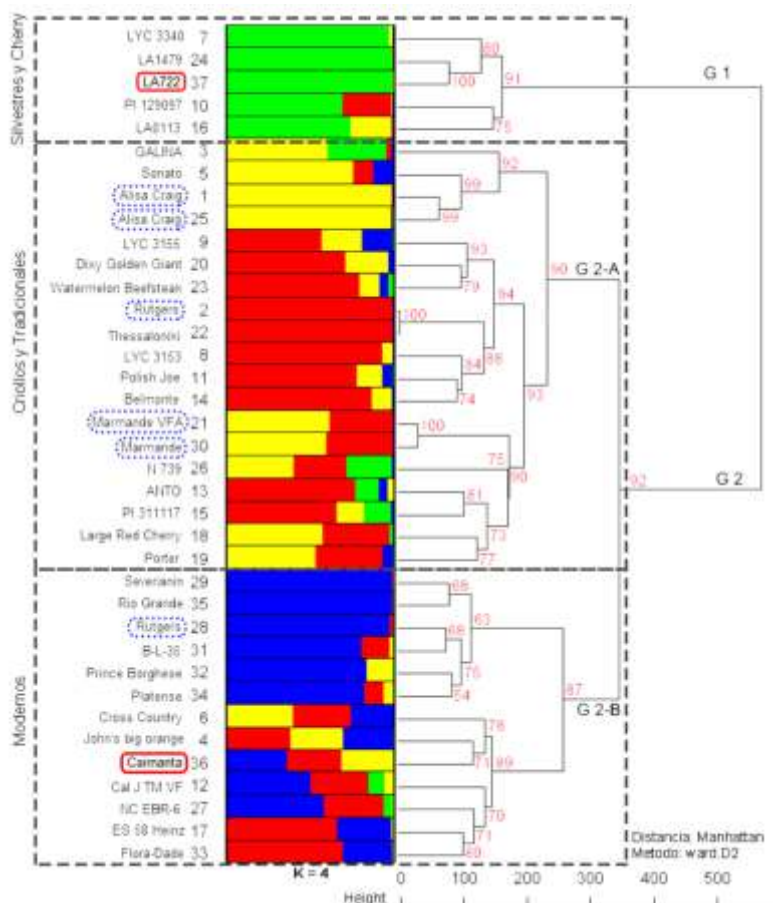


Figura 2. Esquema de la estructura poblacional y agrupamiento de los cultivares de tomate. Las barras de colores representan el grado de pertenencia de cada cultivar a cada grupo. En líneas punteadas de color azul se resaltan los cultivares utilizados como control y en líneas sólidas de color rojo los genotipos progenitores del Programa de Mejoramiento de Tomate de la Cátedra de Genética FCA-UNR.



importantes diferencias genotípicas. A su vez, estos resultados resaltan la importancia de secuenciar los genotipos utilizados en programas de mejoramiento a pesar de la gran cantidad de información de secuencias públicas disponibles para cientos de cultivares de tomate.

El esquema de la estructura poblacional presentó una importante correlación con el agrupamiento obtenido. Esto nos permitió por un lado validar que el cruzamiento entre "Caimanta" y "LA0722" abarca una gran parte de la variabilidad genética disponible en tomate ya que si observamos la Figura 2, el genoma de "Caimanta" presenta en partes casi iguales regiones compartidas con los cultivares modernos (color azul) y con los criollos y tradicionales (colores rojo y amarillo) mientras que "LA0722" tiene un genoma completamente silvestre (color verde). Mientras que por otro lado nos brinda información muy útil para plantear nuevos cruzamientos, ya que conocer la diferente composición de los genomas (representada con las barras de colores en la Figura 2) nos permitirá realizar cruces más o menos amplias en función de los objetivos del programa de mejoramiento.

Bibliografía

- Aflitos S, et al. (2014) "Exploring genetic variation in the tomato (*Solanum section Lycopersicon*) clade by whole-genome sequencing". *Plant J* 136–148.
- Blanca J, et al. (2012) "Variation revealed by SNP genotyping and morphology provides insight into the origin of the tomato". *PLoS One* 7:e48198.
- Blanca J, et al. (2015) "Genomic variation in tomato, from wild ancestors to contemporary breeding accessions". *BMC Genomics* 16:1–19.
- Cabodevilla VG, et al. (2019) "A segregating F_2 population from a tomato second cycle hybrid allows the identification of novel qtl for fruit quality traits". *SciHortic* (en prensa).
- Cambiaso V, et al. (2019a) "Whole genome re-sequencing analysis of two tomato genotypes for polymorphism insight in cloned genes and a genetic map construction". *SciHortic* 247:58–66.
- Cambiaso V, et al. (2019b) "Selected genome regions for fruit weight and shelf life in tomato RILs discernible by markers based on genomic sequence information". *Breed Sci*.
- Causse M, et al. (2001) "Genetic analysis of organoleptic quality in fresh market tomato. 2. Mapping QTLs for sensory attributes". *TheorAppl Genet* 102:273–283.
- CodiGoTomaTe. *Conservación y divulgación de Germoplasma de Tomate*. <http://codigotomate.com.ar>
- Gao L, et al. (2019) "The tomato pan-genome uncovers new genes and a rare allele regulating fruit flavor". *Nat Genet* 51:1044–1051.
- Lin T, et al. (2014) "Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding". *Nat Genet* 46:1220–1226.
- Pereira da Costa JH, et al. (2013) "QTL detection for fruit shelf life and quality traits across segregating populations of tomato". *SciHortic* 156:47–53.
- Pratta GR, et al. (1996) "Evaluación de caracteres de interés agronómico en especies del género *Lycopersicon*". *Hortic Argentina* 15:25–32.
- Pratta GR, et al. (2003) "Diallel analysis of production traits among domestic, exotic and mutant germplasm of *Lycopersicon*". *Genet Mol Res* 2:206–13.
- Pratta GR, et al. (2011) "Phenotypic and molecular characterization of selected tomato recombinant inbred lines derived from the cross *Solanum lycopersicum* x *S. pimpinellifolium*". *J Genet* 90:229–37.
- Ranc N, et al. (2008) "A clarified position for *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* in the evolutionary history of tomatoes (*solanaceae*)". *BMC Plant Biol* 8:130.
- Rasmussen WD (1968) "Advances in American Agriculture: The Mechanical Tomato Harvester as a Case Study". *Technol Cult* 9:531–543.
- Rodríguez GR, et al. (2006) "Recombinant lines obtained from an interspecific cross between *Lycopersicon* species selected by fruit weight and fruit shelf life". *J Am Soc Hortic Sci* 131:651–656.
- Rodríguez GR, et al. (2010) "Inheritance of shelf life and other quality traits of tomato fruit estimated from F_1 's, F_2 's and backcross generations derived from standard cultivar, nor homozygote and wild cherry tomato". *Euphytica* 176:137–147.
- Rodríguez GR, et al. (2013) "Recursos Genéticos y Genómicos para Mejorar la Calidad del Fruto en Tomate". *Agromensajes* 35:30–34.
- Saliba-Colombani V, et al. (2001) "Genetic analysis of organoleptic quality in fresh market tomato. 1. Mapping QTLs for physical and chemical traits". *TheorAppl Genet* 102:259–272.
- Sim S-C, et al. (2009) "Oligonucleotide array discovery of polymorphisms in cultivated tomato (*Solanum lycopersicum* L.) reveals patterns of SNP variation associated with breeding". *BMC Genomics* 10:466.
- Sim S-C, et al. (2011) "Population structure and genetic differentiation associated with breeding history and selection in tomato (*Solanum lycopersicum* L.)". *Heredity* 106:927–935.
- The Tomato Genome Consortium (2012) "The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution". *Nature* 485:635–41.
- Tieman D, et al. (2017) "A chemical genetic roadmap to improved tomato flavor". *Science* 355:391–394.
- Williams CE y St. Clair DA (1993) "Phenetic relationships and levels of variability detected by restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA analysis of cultivated and wild accessions of *Lycopersicon esculentum*". *Genome* 36:619–630.
- Zorzoli R, et al. (1998) "Efecto de los mutantes nor y rin y de genes silvestres sobre características del fruto en *Lycopersicon*". *Mendeliana* 13:12–19.

agrobiotec FCA

Plataforma Agrotecnológica Biomolecular
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS UNR

agrobiotec@unr.edu.ar
Teléfono 0341-4970080

Campo Experimental Villarino
Facultad de Ciencias Agrarias – UNR.

S2125ZAA Zavalla
Santa Fe – ARGENTINA

